



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LOS ESTÍMULOS DEL MEDIO SÓLIDO:  
CONTACTO DIRECTO CON EL AIRE Y ESTIMULO DEL SOPORTE,  
EN LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA POR *Aspergillus terreus*.**

TESIS:  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

**Pérez Sánchez Ailed**

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis:

**Dr. Javier Barrios González**

Asesores:

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

**Dra. Roxana Uri Miranda Labra**



El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Básicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

Así mismo, se contó con el Apoyo de CONACyT, con el otorgamiento de la Beca para Estudios de posgrado No. 486197.



México, D.F., 2014.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis:

**Efecto de los estímulos del medio sólido: contacto directo con el aire y estímulo del soporte, en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*.**

Que presentó:

Ailed Pérez Sánchez

Comité tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

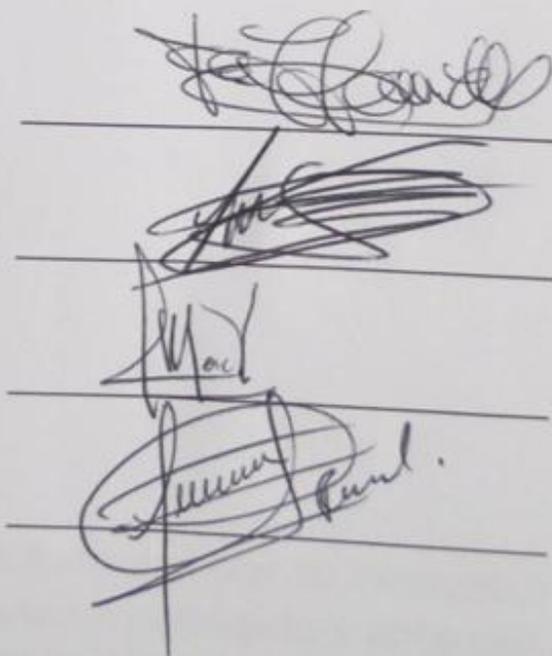
Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Vocal: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dra. Roxana Uri Miranda Labra



The image shows four handwritten signatures on horizontal lines, corresponding to the members of the Jury listed on the left. The signatures are: 1. Francisco José Fernández Perrino (President), 2. Luis Enrique Gómez Quiroz (Secretary), 3. Armando Mejía Álvarez (Vocal), and 4. Roxana Uri Miranda Labra (Vocal).

Dedico este trabajo a Dios, mi madre y mi hermana por su invaluable apoyo a lo largo de mi vida, por haberme guiado, corregido y apoyado, porque son mi inspiración y mi fortaleza.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias dios no por darme todo, si no por darme lo que necesito; por todas las bendiciones en mi vida por tu inmensa misericordia, por no dejarme caer, por tu infinito amor hacia mí.

A mi Madre Alma Delia por ser mi mejor amiga, por tu apoyo, por tu invaluable sabiduría de cómo enfrentarme a la vida, gracias por darme tu amor, tus valores, tu moral, soy lo que soy gracias a ti, te amo mami.

A mi Tía Isabel por ser una ejemplo de vida por enseñarme que la bondad no tiene límites, que la generosidad es una virtud y que no hay imposibles, que todo se consigue con trabajo y dedicación.

A mi abuela, María de los ángeles, por apoyarme en todo momento, por protegerme y por darme todo su amor. A mi padre, Rafael, por su disciplina y apoyo a lo largo de mi vida. A mi hermana Deli por ser mi cómplice, mi amiga y un apoyo incondicional para mí.

Quiero agradecer en especial al Dr. Javier Barrios González, por su guía, apoyo y paciencia a lo largo de todo el trabajo así como la oportunidad de realizar la tesis bajo su dirección. Gracias por su comprensión y motivación que siempre me alentaron a ser mejor.

A mi asesor el Dr. Armando Mejía gracias por sus consejos y apoyo para poder realizar mejor mi trabajo.

A mi asesora la Dra. Roxana Uri Miranda Labra gracias por tu guía, apoyo, paciencia, comprensión, dedicación que le has brindado a mí y al proyecto, eres mi ejemplo a seguir, una bendición tenerte como maestra y como amiga.

Gracias a todos mis profesores de la maestría, que me transmitieron parte de su conocimiento.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, por hacer más ameno el trabajo, por todos sus consejos, sabiduría y apoyo: Ulises, Cristian, Eduardo, Marisol, Victoria, Alma Rosa, Jessi, Omar, Alejandra, Corelly, Eduardo, Wilma, Vanesa.

A mi amiga y compañera Esmeralda por su amistad, motivación y sobre todo por su apoyo para realizar este proyecto.

Un agradecimiento especial a CONACyT, por la beca otorgada para poder cumplir con este objetivo, y sobre todo a la UAM-I por darme la oportunidad para lograrlo.

Y a todos aquellos que de alguna manera estuvieron siempre conmigo y que creyeron en mí.



# ÍNDICE

	pág.
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	V
ABREVIACIONES.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1 ESTATINAS.....	9
2.1.1 LOVASTATINA.....	11
2.1.1.1 BIOSÍNTESIS.....	12
2.1.1.2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LOVASTATINA.....	13
2.2 ESTRÉS OXIDATIVO (EOX).....	14
2.2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs).....	14
2.2.2 RESPUESTA A EOX.....	16
2.2.3 EROs MOLÉCULAS SEÑALIZADORES.....	17
2.2.4 REGULACIÓN DEL EOX.....	19
2.2.5 FACTORES TRANSCRIPCIONALES EN RESPUESTA A EOX.....	19
2.2.5.1 Yap1p.....	20
2.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.....	24
2.3.1 TIPOS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.....	24
2.3.1.1 FS SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS NATURALES.....	24
2.3.1.2 FS SOPORTES INERTES IMPREGNADOS.....	24
2.3.2 FISIOLÓGÍA DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA.....	25
2.3.3 ESTÍMULOS DEL MEDIO SÓLIDO.....	27
2.2.3.1 ESTIMULO DEL SOPORTE.....	27
2.2.3.2 ESTIMULO: CONTACTO DIRECTO CON EL AIRE.....	28
2.4 PARÁMETROS DE LA FS.....	29
2.4.1 ACTIVIDAD DEL AGUA Y HUMEDAD.....	29
2.4.2 TEMPERATURA Y PH.....	30
2.4.3 AIREACIÓN.....	30
2.4.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA AIREACIÓN.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	35
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 APARATOS Y/O EQUIPOS.....	37
6.2 MICROORGANISMOS.....	37
6.1.1 <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	37
6.1.2 <i>Aspergillus terreus</i> TUB-F514.....	37
6.3 VECTORES.....	38
6.3.1 pJet 1.2/blot.....	38
6.3.2 pGdpKi-RNAi.....	38
6.4 MEDIOS DE CULTIVO.....	40
6.4.1 MEDIO DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	40
6.4.1.1 MEDIO LURIA-BERTANI (LB).....	40
6.4.1.2 ANTIBIÓTICOS SUPLEMENTADOS.....	40
6.4.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>Aspergillus terreus</i> .....	40
6.4.2.1 MEDIO Czapek.....	40
6.4.2.2 MEDIO Czapek/sorbitol.....	40
6.4.2.3 MEDIO PMI.....	41
6.4.2.4 MEDIO Power.....	41
6.4.2.5 SOLUCIÓN DE SALES 20x (SS20X).....	41
6.4.2.6 SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA (SET).....	41
6.4.2.7 MEDIO COMPLETO PARA <i>A. terreus</i> .....	42

6.4.2.8 MEDIO PAPA AGAR DEXTROSA PDA (BD Bioxon®).....	42
6.4.2.9 MEDIO DE PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA. ....	42
6.4.2.9.1 EN POLIURETANO.....	42
6.4.2.9.2 EN BAGAZO DE CAÑA.....	43
6.4.2.9.3 EN SALVADO DE TRIGO.....	43
6.4.2.9.4 SET PARA LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA.....	43
6.5 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA FS.....	44
6.5.1 MATRAZ ABIERTO (MA) Y MATRAZ CERRADO (MC) EN POLIURETANO.....	44
6.5.2 CONTROL DE HUMEDAD EN MA.....	44
6.5.3 MATRAZ CERRADO Y COLUMNA AIREADA EN DIFERENTES SOPORTES.....	44
6.5.3.1 MATRAZ CERRADO.....	44
6.5.3.2 COLUMNAS.....	44
6.6 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL.....	45
6.6.1 FERMENTACIÓN LIQUIDA CONVENCIONAL.....	45
6.6.2 FERMENTACIÓN LIQUIDA CON LA ADICIÓN DE SOPORTE.....	45
6.6.3 FERMENTACIÓN LIQUIDA CON ADICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	45
6.7 SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>atyap1</i> .....	46
6.7.1 DISEÑO DE OLIGOS DEL GEN <i>atyap1</i> PARA EL SILENCIAMIENTO.....	46
6.7.2 PCR PARA LA OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN <i>atyap1</i> .....	46
6.7.3 LIGACIÓN DEL GEN <i>atyap1</i> CON EL VECTOR <i>pJet 1.2/blot</i> .....	47
6.7.4 DIGESTIÓN CON <i>NcoI</i> DEL VECTOR <i>pJet -atyap1</i> .....	47
6.7.5 AMPLIFICACIÓN DEL VECTOR <i>pGdpKi-RNAi</i> .....	47
6.7.6 DIGESTIÓN CON <i>NcoI</i> DEL VECTOR <i>pGdpKi-RNAi</i> .....	47
6.7.7 DESFOSFORILACIÓN DEL VECTOR <i>pGdpKi-RNAi/NcoI</i> .....	48
6.7.8 LIGACIÓN VECTOR - INSERTO <i>pGdpKi-RNAi-yap1</i> .....	48
6.7.9 TRANSFORMACIÓN <i>pGdpKi-RNAi-yap1</i> .....	49
6.7.10 SELECCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES <i>Δatyap1</i> .....	51
6.7.11 SENSIBILIDAD EN ESPORAS PARA PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	51
6.7.12 CRECIMIENTO RADIAL.....	51
6.7.13 ESPORULACIÓN.....	52
6.7.14 CONFIRMACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL VECTOR AL GENOMA DE <i>A. terreus</i> .....	52
6.7.15 CARACTERIZACIÓN DE LAS TRANSFORMACIÓN <i>Δatyap1</i> .....	53
6.7.15.1 SENSIBILIDAD EN MICELIO PARA PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	53
6.7.15.2 PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA, EXPRESIÓN DE GENES, BIOMASA, HUMEDAD, pH Y EROS.....	53
6.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	53
6.8.1 LOVASTATINA.....	53
6.8.2 DETERMINACIÓN DE BIOMASA Y HUMEDAD.....	54
6.8.3 CUANTIFICACIÓN DE pH.....	54
6.8.4 CUANTIFICACIÓN DE EROS.....	54
6.8.5 MUESTREO PARA EXPRESIÓN DE GENES.....	55
6.9 TÉCNICAS MOLECULARES.....	56
6.9.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>Aspergillus terreus</i> .....	56
6.9.2 PREPARACIÓN DE ELECTROCOMPETENTES <i>E.coli</i> DH5α.....	56
6.9.3 TRANSFORMACIÓN EN <i>E.coli</i> DH5α.....	56
6.9.4 LISIS ALCALINA: TÉCNICA PARA OBTENER ADN PLASMÍDICO.....	57
6.9.5 ELECTROFORESIS Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	57
6.9.6 TRANSFORMACIÓN POR PROTOPLASTOS.....	58
6.9.7 NORTHERN-BLOT.....	59
6.9.8 SOUTHER-BLOT.....	62
7. RESULTADOS.....	63
7.1 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA FS.....	63
7.1.1 COMPARACIÓN DE MATRAZ ABIERTO Y MATRAZ CERRADO Y COLUMNA.....	63
7.1.2 CONTROL DE HUMEDAD EN MATRAZ ABIERTO.....	64
7.1.3 PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA Y GENERACIÓN DE EROS EN: MATRAZ ABIERTO CON CONTROL DE HUMEDAD Y MATRAZ CERRADO.....	65
7.1.4 BIOSÍNTESIS DE LOVASTATINA USANDO DIFERENTES SOPORTES SÓLIDOS A DIFERENTES GRADOS DE AIREACIÓN.....	66
7.2 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL.....	68

7.2.1 FL CON LA ADICIÓN DE SOPORTE.....	68
7.2.2 FL CON ADICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	72
7.3 SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>atyap1</i> .....	75
7.3.1 CONSTRUCCIÓN DE pGdpKi-RNAi- <i>yap1</i> .....	75
7.3.2 SELECCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES $\Delta$ <i>atyap1</i> .....	76
7.3.3 CONFIRMACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL VECTOR AL GENOMA DE <i>A. terreus</i> .....	78
7.3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE $\Delta$ <i>atyap1</i> .....	79
7.3.4.1 PERFILES DE EXPRESIÓN DE GENES EN $\Delta$ <i>atyap1</i> .....	79
7.3.4.2 SENSIBILIDAD EN MICELIO PARA PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	81
7.3.4.3 ESPORULACIÓN EN $\Delta$ <i>atyap1</i> .....	82
6.3.4.4 PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA, BIOMASA, pH Y EROS EN $\Delta$ <i>atyap1</i> .....	83
8. DISCUSIÓN.....	85
8.1 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN FS USANDO DIFERENTES SOPORTES SÓLIDOS.....	85
8.2 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL.....	91
8.2.1 FL CON ADICIÓN DE SOPORTE.....	91
8.2.2 FERMENTACIÓN LIQUIDA CON ADICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO.....	94
8.3 SILENCIAMIENTO DE <i>atyap1</i> .....	96
9. CONCLUSION.....	99
10. PERSPECTIVAS.....	101
11. REFERENCIAS.....	103
12. ANEXO A.....	107



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Modelo que explica la gran variedad de efectos biológicos de las estatinas; y por tanto, los usos actuales y potenciales. La inhibición de la HGM-CoA reductasa, no solamente reduce los niveles de colesterol, sino también los intermediarios isoprenoides, afectando la prenilación de las proteínas G (i.e., Ras). Esto puede resultar en la modulación de la transducción de señales de los receptores hacia la expresión de los genes, que directa o indirectamente afectan el balance proliferación/apoptosis, quimiosinas inflamatorias, y mensajeros citogenéticos, todos mediados por proteínas G (Barrios- González & R. Miranda 2011).....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura base de las estatinas (izquierda). Cadenas ligadas al C8 (R1) y al C6 (R2) de la estructura base (derecha) (Manzoni y col, 2002).....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la lovastatina (Rollini 2002).....	11
<b>Figura 4.</b> Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández y col. 2003).....	11
<b>Figura 5.</b> Ruta biosintéticas de la lovastatina (Manzoni et al., 2002).....	12
<b>Figura 6.</b> Clúster biosintéticos de la lovastatina: <i>lovB</i> y <i>lovF</i> biosíntesis de policétidos; <i>lovC</i> enoil reductasa; <i>lovD</i> transesterasa; <i>lovE</i> y <i>lovH</i> genes reguladores; ORF2 y ORF17 genes del citocromo P-450; ORF1 y ORF10 genes potenciales de resistencia; ORF12 y ORF16 genes de transporte; <i>lovG</i> , ORF12, ORF15 y ORF18 función desconocida) (Rollini 2002).....	12
<b>Figura 7.</b> Acumulación de EROs en FL y FS en la producción de lovastatina por <i>A. terreus</i> (U. Miranda, et al. 2013).....	17
<b>Figura 8.</b> Posibles sitios de unión de Factores Transcripcionales (que responden a diferentes tipos de estímulos. Nótese que en su mayoría, son Factores Transcripcionales que responden a EOx (Skn7, Nrf2, Msn2/4, AtfB, Ap-1, Aft2 y NF-κB) y algunos más que responden a estrés nutricional (CreA, Adr1, Rpn4). Algunos sitios de unión se encontraron sobre la cadena principal (+, sobre la línea) y algunos otros, se encontraron en la cadena antisentido (-, debajo de la cadena) (U. Miranda, et al. 2013).....	20
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de regulación de <i>yap1</i> frente a estrés oxidativo (Candice E. Paulsen, 2009).....	22
<b>Figura 10.</b> Modelo para la activación transcripcional de genes de biosíntesis de antioxidantes y de aflatoxina por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.....	23
<b>Figura 11.</b> Vector pJet1.....	38
<b>Figura 12.</b> Vector pGdpPki-RNAi empleado para silenciar <i>atyap1</i> de <i>A. terreus</i> (Marcial et al. 2011).....	38
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de interferencia por RNA.....	39
<b>Figura 14.</b> Diagrama de la construcción de pGdpKiRNAi- <i>yap1</i> .....	48
<b>Figura 15.</b> Mecanismo de reacción de la DCF (Sigma-Aldrich).....	54
<b>Figura 16.</b> Cinética de producción de lovastatina en fermentación sólida a distintos niveles de aireación: Columna aireada con flujo de aireación de 0.04L/g/h ■, Matraz abierto (MA) ♦, Matraz cerrado (MC) ▲. En Panel A) Cinética de Humedad, B) Crecimiento, C) Producción volumétrica de lovastatina, D) Acumulación de EROs. (URF=Unidades Relativas de Fluorescencia).....	63
<b>Figura 17.</b> Humedad final en FSs de 96 h, con diferentes estrategias para controlar la humedad en MA. El control es un matraz cerrado (C) ♦, Matraz Abierto (MA) sin sistema de humedad Los sistemas con control de humedad son MA con medio de cultivo 2.5X (Aw: 0.9775) en: <b>M1</b> = 1 vaso, <b>M2</b> = 2 vasos, <b>M3</b> = 3 vasos; MA con NaCl 3.5 g/L (Aw: 0.9775) en: <b>N1</b> = 1 vaso, <b>N2</b> = 2 vasos, <b>N3</b> = 3 vasos; MA con Agua destilada en: <b>A1</b> = 1 vaso, <b>A2</b> = 2 vasos, <b>A3</b> = 3 vasos. En donde ♦ son los sistemas que no muestran diferencia significativa con el control, en la prueba de comparación LSD (p<0.05); y ♦ el sistema que no mostró diferencias significativas con el control, y además la menor desviación estándar.....	64
<b>Figura 18.</b> Cinética de producción de lovastatina en MC ♦ y MA ■ con humedad controlada. En donde A) Cinética de pH, B) % Humedad C) Crecimiento, D) Producción volumétrica de lovastatina E) Acumulación de EROs (URF: Unidades relativas de fluorescencia).....	65
<b>Figura 19.</b> Sistemas de producción de lovastatina en FS: comparando diferentes soportes A) Poliuretano B) Bagazo de caña C) Salvado de trigo, con diferente nivel de aireación: Columna Aireada y Matraz cerrado.....	66
<b>Figura 20.</b> Cinética de producción de lovastatina en diferentes tipos de FS: A) Poliuretano B) Bagazo de caña C) Salvado de trigo. Se utilizaron diferentes niveles de aireación: Columna aireada ■ y Matraz cerrado (MC) ♦, evaluando los parámetros de pH, % de humedad, crecimiento, producción específica de lovastatina y Acumulación de EROs (URF: Unidades relativas de fluorescencia).....	67
<b>Figura 21.</b> Producción de lovastatina en FL con adición de soporte en diferentes conformaciones a las 96h: <b>Ctl</b> FL convencional; <b>A1</b> FL con Poliuretano en todo el líquido; <b>A2</b> : FL con un círculo de 6cm de diámetro y 1cm de grosor; <b>A3</b> : con un círculo de 3cm de diámetro y 1cm de grosor; <b>3B</b> : con 0.3 g de PUF en cubos de 1cm <sup>2</sup> ; <b>2B</b> : con 0.2 g de PUF en cubos de 1cm <sup>2</sup> , <b>1B</b> con 0.1 g de PUF en cubos de 1cm <sup>2</sup> . Y sistemas con 0.2 g de PUF en las siguientes conformaciones: <b>R1</b> : un rectángulo de 3x1x1cm, <b>R2</b> : un rectángulo de 5x1x1cm (0.24g), <b>R3</b> : en cubos de 1cm <sup>3</sup> ; <b>R4</b> : en cubos de 0.5 cm <sup>3</sup> , <b>R5</b> : picado en cubos aproximadamente de 0.1cm <sup>3</sup> . En donde en el panel A) producción volumétrica de lovastatina en B) pH, C) Biomasa y en D) producción específica de lovastatina.....	70

<b>Figura 22.</b> Cinética de una FL con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , en donde representan la concentración en uM de Peróxido de hidrogeno: 0♦, 3■, 7▲, 21×, 980✱, 4500•, respectivamente. Donde se observa en el panel A) la cinética de pH en el B) Producción específica de lovastatina, C) Crecimiento, D) Acumulación de EROs.....	72
<b>Figura 23.</b> Cinética completa de la producción de lovastatina con adición de 21uM de peróxido de hidrogeno. Donde él ♦ es el control FL convencional, y ■ es el sistema con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	73
<b>Figura 24.</b> Inicio de la producción de lovastatina con adición de 21uM de peróxido de hidrogeno. Donde él ♦ es el control FL convencional, y ■ es el sistema con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . En donde el panel A) muestra la cinética de pH, B) Northern Blot de lovE en la FL convencional o Ctl y la adición de peróxido en 21 24 y 36 horas, C) la producción específica de lovastatina y D) muestra la acumulación de EROs. El contenido de EROs con diferentes letras indica diferencias significativas del resto, esto de acuerdo a la prueba de comparación LSD (p<0.05).....	73
<b>Figura 25.</b> Adición de Peróxido a la FL a diferentes tiempos. Cinética de producción específica de lovastatina donde ♦ es el control FL convencional, donde se le adiciono peróxido (21uM) a las 48 ■, 72 ▲ y 96 X horas iniciada la fermentación. No se encontraron diferencias significativas entre el la FL convencional y con adición de peróxido a diferentes tiempos. ....	74
<b>Figura 26.</b> Construcción de <i>pGdpKiRNAi-yap1</i> : <b>A)</b> PCR para la obtención del fragmento del gen <i>atyap1</i> , selección de la temperatura optima de amplificación 68°C, <b>B)</b> Purificación de <i>atyap1</i> 553pb extremos romos, <b>C)</b> Clonación de <i>atyap1</i> en vector pJet, lisis alcalina de las transformantes con la construcción, <b>D)</b> Digestión con <i>NcoI</i> del vector <i>pJet-yap1</i> <b>E)</b> Purificación de <i>atyap1</i> con extremos <i>NcoI</i> , <b>F)</b> Clonación del vector <i>pGdpKi-RNAi</i> , lisis alcalina de las transformantes, <b>G)</b> Digestión con <i>NcoI</i> del vector <i>pGdpKi-RNAi</i> , <b>H)</b> Desfosforilación del vector <i>pGdpKiRNAi/ NcoI</i> , obtenidos de vector con extremos <i>NcoI</i> desfosforilados, <b>I)</b> Ligación vector - inserto <i>pGdpKiRNAi-yap1</i> , lisis alcalina de las transformantes obtenidas, <b>J)</b> Digestión de <i>pGdpKiRNAi-yap1</i> con <i>NcoI</i> comprobación de la construcción. Marcador 1kb (Invitrogen). ....	75
<b>Figura 27.</b> Sensibilidad a estrés oxidativo en esporas de las transformantes de <i>atyap1</i> (T1 – T8) causado por peróxido de hidrogeno a distintas concentraciones mM, donde P es la cepa parental, el conteo de esporas fue realizado a las 48 horas. ....	76
<b>Figura 28.</b> Cinética de crecimiento radial de las transformantes de <i>Δatyap1</i> (T1 – T8), donde P es la cepa parental.....	77
<b>Figura 29.</b> Cinética de esporulación de las transformantes de <i>Δatyap1</i> (T1–T8), Cepa parental (P), en medio Power...	77
<b>Figura 30.</b> Producción de lovastatina a las 48 horas de las transformantes de <i>Δatyap1</i> (T1, T5, T7, T8), donde P es la cepa parental, en A) Fermentación Sólida FS (MC) y B) Fermentación líquida convencional FL.....	78
<b>Figura 31.</b> Confirmación de la integración del vector al genoma de <i>A. terreus</i> . En donde P es la cepa parental y <i>Δatyap1</i> es la transformante con el gen <i>atyap1</i> silenciado. <i>pki1</i> es el fragmento del vector del silenciamiento.....	78
<b>Figura 32.</b> Purificación de las sondas de los genes <i>lovE</i> , <i>brlA</i> , <i>yap1</i> y <i>sod1</i> utilizadas para el análisis del Northern Blot de silenciamiento <i>atyap1</i> (Marcador 1K Invitrogen).....	79
<b>Figura 33.</b> Comparación de la expresión de los genes <i>yap1</i> , <i>sod1</i> , <i>brlA</i> y <i>lovE</i> durante la FS y FL de lovastatina en: la cepa parental (P) con la cepa con el silenciamiento del gen <i>yap1</i> ( <i>atyap1</i> ). Esto se realizó por Análisis de Northern a diferentes tiempos en horas (15, 18, 21, 24, 36, 48, 72, 96) (h), tanto en FL panel A) como en FS panel B). Para cada uno de los genes se muestra el control de carga de rRNA (EtBr) como control de carga. La intensidad de las bandas (señales) fueron cuantificadas por densitometría (A.D) empleando el software ImageJ (versión 1.43u) y los resultados se normalizaron con la carga de rRNA (teñido con bromuro de etidio). Los resultados de la normalización de los tratamientos se presentan como fracción, considerando que la banda correspondiente a la muestra control (0) es 1 (es decir, el 100%).....	79
<b>Figura 34.</b> Sensibilidad de estrés oxidativo en micelio en <i>Δatyap1</i> y la cepa parental (P) en medio PDA a diferentes concentraciones de por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Con un inculo a diferentes concentraciones de esporas 106, 105, 104 y 103.....	81
<b>Figura 35.</b> Fenotipo de esporulación de <i>Δatyap1</i> (T5) comparado con la cepa parental (P), en medio PDA, a diferentes horas. ....	82
<b>Figura 36.</b> Cinética de esporulación de <i>Δatyap1</i> ■ y la cepa parental ♦ en Fermentación sólida FS.....	82
<b>Figura 37.</b> Cinética de producción de lovastatina de <i>Δatyap1</i> ■ y la cepa parental ♦ en A) Fermentación líquida FL y B) Fermentación sólida FS. Donde se muestra la cinética de pH, la biomasa, biosíntesis de lovastatina y acumulación de EROs (URF: Unidades Relativas de flourecencia). ....	83
<b>Tabla 1.</b> Controles para la transformación de <i>pGdpPki-RNAi-yap1</i> , en electrocompetentes de <i>E.coli</i> .....	49
<b>Tabla 2.</b> Controles para la transformación de <i>pGdpPki-RNAi-yap1</i> , en protoplastos de <i>A. terreus</i> .....	50
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de oligos empleados para sondas.....	60
<b>Tabla 4.</b> FL con adición de soporte en diferentes conformaciones*.....	69
<b>Tabla 5.</b> Resumen de resultados de la FL con adición de soporte en diferentes conformaciones.....	71

## ABREVIATURAS

FS	Fermentación en estado sólido
FL	Fermentación sumergida tradicional o Fermentación líquida
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
EOX	Estrés Oxidativo
PUF	Poliuretano
AOX	Enzima mitocondrial oxidasa alternativa
MS	Masa seca (de la FS: biomasa, soporte y restos del medio).
MA	Matraz Abierto
MC	Matraz Cerrado
C	Columna

### Sistemas de humedad en MA

M1	MA con 1 vaso de medio 2.5x
M2	MA con 2 vasos de medio 2.5x
M3	MA con 3 vasos de medio 2.5x
N1	MA con 1 vaso de NaCl 3.5 g/L
N2	MA con 2 vasos de NaCl 3.5 g/L
N3	MA con 3 vasos de NaCl 3.5 g/L
A1	MA con 1 vaso de agua destilada
A2	MA con 2 vasos de agua destilada
A3	MA con 3 vasos de agua destilada

(Vaso de plástico de 2 cm de diámetro y 4 ml de la solución correspondiente).

### Sistemas de FL con la adición de PUF

1A	FL con PUF en todo el líquido
2A	FL con un círculo de 6 cm de diámetro y 1cm de grosor
3A	FL con un círculo PUF de 3 cm de diámetro y 1cm de grosor
3B	FL con 0.3 g de PUF en cubos de 1 cm <sup>2</sup>
2B	FL con 0.2 g de PUF en cubos de 1 cm <sup>2</sup>
1B	FL con 0.1 g de PUF en cubos de 1 cm <sup>2</sup>
R1	FL con 0.2 g de PUF en forma de un rectángulo de 3x1x 1cm
R2	FL con 0.2 g de PUF en forma de un rectángulo de 5x1x1 cm
R3	FL con 0.2 g de PUF en cubos de 1 cm <sup>3</sup>
R4	FL con 0.2 g de PUF en cubos de 0.5 cm <sup>3</sup>
R5	FL con 0.2 g de PUF en cubos de 1 cm <sup>3</sup>



## RESUMEN

La producción convencional de lovastatina y otros metabolitos secundarios se ha llevado a cabo mediante la FL, sin embargo en años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés por la FS, como una alternativa a la FL. Lo anterior debido a que se pueden utilizar sustratos económicos, se requiere poco procesamiento y se utiliza menos potencia. Un factor muy importante es que presentan altas productividades y rendimientos generalmente más altos que en FL. Además, existen metabolitos secundarios que sólo pueden producirse en FS, a pesar de que el hongo productor también crece en FL

Otras ventajas que presenta la FS es la baja actividad del agua, que ayuda a evitar las contaminaciones además de que genera menos efluentes. La FS se caracteriza también por poder utilizar altas concentraciones de sustrato que permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación, debido a todas estas ventajas la FS es un método de cultivo alternativo que se ha vuelto cada vez más atractivo para la investigación y para la industria.

A pesar de que las principales ventajas de La FS provienen de un comportamiento diferente al presentado en FL, la fisiología especial que presentan los microorganismos en FS no está bien caracterizada, aunque ya se ha acuñado el término de fisiología del medio sólido. De hecho, son poco conocidos los estímulos que el hongo percibe al encontrarse en medio sólido, y que inducen una fisiología diferente.

La FS presenta diferencias significativas con la FL, la más importante y la más atractiva es la sobreproducción que presenta de enzimas y metabolitos secundarios. Sin embargo para poder aplicar y desarrollar sistemas de fermentación que aprovechen las particularidades de la FS es necesario comprender qué estímulos son los que propician las altas producciones además de las diferencias fisiológicas que surgen durante el crecimiento de células microbianas en los dos tipos de sistemas de cultivo.

En un trabajo anterior del grupo se identificó al contacto directo con el aire como el estímulo de más impacto en la producción de lovastatina, y en segundo lugar a los estímulos generados por el soporte. En otro trabajo previo del grupo, se encontró una acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante la idiofase en ambos sistemas de cultivo. Más tarde, se demostró que las EROs regulan, a nivel transcripcional, los genes de lovastatina, encontrando que estos niveles eran más bajos y más constantes en FS. Esos niveles de EROs estaban aparentemente relacionados con el estímulo de contacto directo con el aire en FS. Quedaba la pregunta de cómo incide el nivel de aireación en FS sobre esta acumulación de EROs.

Esta tesis se dedicó al estudio de estímulos de la FS: contacto directo con el aire y del soporte, así como a la aplicación de estos en FL. También se estudió el mecanismo por el que las EROs regulan la producción de lovastatina en *A. terreus*. Esto se realizó a través del silenciamiento de uno de los factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo.

En el presente trabajo se estudio cómo la aireación influye en la acumulación de EROs, demostrándose que la forma general del perfil de acumulación de EROs, en la FS de lovastatina, es independiente del grado de aireación. Además se estudió este efecto en diferentes tipos de FS: en soporte inerte artificial (espuma de poliuretano) y soporte inerte natural (bagazo de caña). También en el soporte más utilizado en la industria, que es FS en sustrato sólido (salvado de trigo).

Los resultados demostraron que, en cualquier sistema de FS (en soporte inerte o en sustrato sólido), a mayor nivel de aireación hay una menor acumulación de EROs, con lo que se obtiene una menor producción de lovastatina, pero una mayor generación de biomasa.

Otro aspecto que este trabajo abordó fue el estudio de la adición, en la FL, de estímulos de la FS: el soporte, el contacto con el aire y la adición de peróxido de hidrogeno (Agente oxidante). Se comprobó que éstos

logran inducir en cierto grado, la fisiología del medio sólido provocando un aumento en la producción de lovastatina en la FL. En la adición de soporte a la FL se demostró que la cantidad de biomasa en el cultivo líquido depende de la cantidad de soporte que se añade. También se encontró que a menor tamaño de partícula de soporte utilizada, se obtiene una mayor cantidad de biomasa y por lo tanto una mayor producción de lovastatina (volumétrica).

Cabe destacar que en todas las condiciones (o sistemas) ensayados de soporte en FL, la producción específica fue muy superior (de 49 - 88  $\mu\text{g}/\text{mg}$  biomasa) a la encontrada en FL (29  $\mu\text{g}/\text{mg}$  biomasa), lo cual indica un cambio en la fisiología. En cuanto a la producción volumétrica, todos los sistemas, excepto uno, mostraron una mayor producción que la de FL (de 537 a 1,195  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El que produjo menos, fue ligeramente menor que el control de FL, pero fue el que tenía muy poca cantidad de soporte (1B) por lo que sólo se produjo un tercio de la biomasa del control.

Por otro lado, con la adición de peróxido de hidrógeno a la FL se logró adelantar la acumulación de EROs y en consecuencia adelantar la biosíntesis de lovastatina. Esto confirma que las EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.

Debido al papel que juegan las EROs en la fisiología de los organismos como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales, en la presente tesis se consideró que Yap1p puede ser el nexo entre las EROs y los genes de lovastatina. Para evaluar esta hipótesis, se silenció el gen *atyap1*, a través de un sistema de RNAi, que ha demostrado ser una herramienta rápida y efectiva para suprimir la expresión de un gen de interés.

El silenciamiento del gen *atyap1* provocó: la disminución de la expresión del gen *atyap1*, pero también la de *sod1*. Esto ocasionó el inicio precoz e incremento en la acumulación de EROs. Así, la cepa silenciada ( $\Delta\text{atyap1}$ ) presentó sensibilidad a estrés oxidativo, el adelanto e incremento de la expresión del gen *lovE*, y el inicio precoz e incremento en la producción de lovastatina debido a que produce, aunque a una tasa similar, pero por más tiempo.

Resulta importante que la cepa  $\Delta\text{atyap1}$  mostró un incremento en la producción de lovastatina de 70 % en FS y también 60 % en FL. Esto demuestra que Yap1 (AtYap1) no es un regulador positivo de los genes de lovastatina.

Por otro lado, el adelanto en la acumulación de EROs también adelantó e incrementó la expresión de *brlA*, lo cual ocasionó el inicio precoz y un aumento importante de la esporulación.

Esto sugiere que Yap1 podría estar actuando como un regulador negativo de *lovE* y los genes de biosíntesis, así como de *brlA* (y así a los genes relacionados con la esporulación) en *A. terreus*. Pero regula positivamente a los genes que combaten la acumulación de EROs como *sod1*. Así, el factor transcripcional Yap1p podría ser el nexo entre las EROs y la lovastatina.

Sin embargo, también es posible que esto sea un efecto indirecto debido a la acumulación prematura de EROs, induciendo la lovastatina por medio de otro factor transcripcional de respuesta a estrés oxidativo.

Con estos resultados se obtuvo una visión más amplia e integrada de la fisiología del medio sólido, e incluso parte de la fisiología y mecanismos moleculares en medio líquido que no se conocen.

## ABSTRACT

The conventional production of lovastatin and other secondary metabolites has been carried out through submerged fermentation (SmF), however in recent years; researchers have demonstrated a growing interest for solid-state fermentation (SSF), as an alternative for SmF. This is because more economic substrates can be utilized, little processing is required and it requires less power. A very important factor is that SSF have high productivities and yields generally higher than in SmF. In addition, there are secondary metabolites that can only be produced in SSF even though the fungus that produces them also grows on the SmF.

Other advantages that the SSF presents are the low water activity, which helps avoid the contaminations and it also generates less effluent. The FS is also characterized for its ability to utilize high concentrations of substrate that permits the use of smaller reactors in comparison with the ones utilized in other types of fermentation, due to all of these advantages SSF is an alternative method of cultivation that every time has become more attractive to investigation and the industry.

Even though that the principal advantages of the SSF come from a different behavior presented in SmF the special physiology that the microorganisms present in SSF is not well characterized, even though it has been coined the term of physiology of the solid medium. Actually, there are few stimuli that the fungus perceives when found in a solid medium and that induce a different physiology.

The SSF has the most important differences with SmF, and the most attractive features are the overproduction of enzymes and secondary metabolites. However to implement and develop fermentation systems that exploit these features of the SSF is necessary to understand what are the stimuli that promote high yields in addition to the physiological differences that arise during the growth of microbial cells in both types of culture systems. In a previous work of the group direct contact with air was identified as the environmental factor with more impact on the production of lovastatin, and secondly, the stimuli generated by the support.

In a previous work of the group, an accumulation of reactive oxygen species (EROs) was found during the idiofase in both culture systems. Later, it was demonstrated that EROs regulate, at the transcriptional level, lovastatin genes, finding that these levels were lower and more constant in SSF.

These levels of EROs were apparently related to the stimulus of direct contact with the air in SSF. There remained the question of how is this this EROs accumulation affected by the level of aeration in SSF.

This thesis has been dedicated to the study of stimuli of the SSF: direct contact with air and the support, just as the application of these in SmF. We also studied the mechanism by which ROS regulate the production of lovastatin in *A. terreus*. This was accomplished through the silencing of one of transcriptional factors of oxidative stress response.

We also studied how the aeration influences the accumulation of EROs demonstrating that the overall shape of the profile of accumulation of EROs, in the SSF of lovastatin, is independent of the degree of aeration. This effect was also studied in different types of SSF: Artificial inert support (polyurethane foam) and natural inert support (bagasse). Also I used the FS is in solid substrate (wheat bran).

The results showed that, in any SSF system at greater levels of aeration there are lower levels of EROs, and lower yields of lovastatin, are obtained, but a greater generation of biomass.

Another aspect of this work was the study of the addition of stimuli of SSF to SmF: support, contact with the air and the addition of peroxide (EROs). It was found that they induce a certain degree of the physiology of solid

medium, causing an increase in the production of lovastatin in SmF. In relation to adding support to the SmF, it was shown that the amount of biomass in the liquid culture depends on the amount of support. We also found that the smaller particle size of the support used, the larger the amount of biomass obtained, and therefore a higher production of lovastatin (volumetric).

It is noteworthy that in all conditions (or systems) tested (support in SmF), the specific production was quite superior (of 49-88  $\mu\text{g} / \text{mg}$  biomass) in relation to the one found in SmF (29  $\mu\text{g}/\text{mg}$  biomass), which indicates a change in the physiology. Regarding the volumetric production, all systems, except one showed higher yield than the control (from 537 to 1,195  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). The one which produced less, was slightly lower than the control SmF, but it was the one that had very little support (1B) so there was only a third of the biomass of control.

On the other hand, with the addition of peroxide of hydrogen to the SmF, EROs were accumulated earlier and as a result premature biosynthesis of lovastatin was obtained. This confirms that the EROs regulate the biosynthesis of lovastatin.

Due to the role carried out by the EROs as second messengers in signal transduction pathways, in this thesis it was found that Yap1p may be the link between ROS and genes of lovastatin. To test the hypothesis, the Yap1 gene was silenced through RNAi system, which has proven to be a fast and effective way to suppress the expression of the gene of interest.

Yap1 silencing provoked: decreasing *yap1* gene expression, but also the *sod1* gene. This caused an early start and increased accumulation of ROS. Thus, the silenced strain ( $\Delta\text{atyap1}$ ) showed sensitivity to oxidative stress, premature and increased gene expression of *lovE* and early onset and increased lovastatin production.

It is important that the strain  $\Delta\text{atyap1}$  showed increase in the production of lovastatin of 78% in FS, and also 78% in FL.

On the other hand, this premature accumulation of EROs also caused an early and increased expression of *brlA* which caused the early initiation and significant increment in sporulation.

This suggests that Yap1 could be acting as a negative regulator of *lovE* and biosynthetic genes, as well as *brlA* (and thus genes related to sporulation) in *A. terreus*. But positively regulating the genes that combat the accumulation of EROs like *sod1*. Thus, the transcription factor Yap1p might be the link between ROS and lovastatin.

However, it is also possible that this is an indirect effect due to the premature accumulation of ROS, inducing lovastatin through another transcriptional factor in response to oxidative stress.

With these results, a more comprehensive and integrated physiology of solid medium, and even part of the physiology and molecular mechanisms in liquid medium that are unknown.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (FS) es un método de cultivo alternativo para la producción de metabolitos primarios, secundarios, enzimas entre otros; que ha despertado el interés de la ciencia así como de la industria, debido a que esta presenta importantes ventajas en comparación con la fermentación sumergida tradicional (FL).

Estas ventajas presentadas en ciertos sistemas de producción son los mayores rendimientos, purificación y extracciones más sencillas y menos costosas, en algunos casos sólo se pueden producir en FS el metabolito de interés. Algunas de las enzimas producidas en FL son intracelulares y en FS son extracelulares. Otras ventajas que presenta la FS es la baja actividad del agua requerida, esto es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras; las altas concentraciones de sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Es posible un ahorro de agua debido a los bajos requerimientos de esta, además de que hay una menor generación de aguas residuales (Barrios-González, 2012).

Muchas de estas ventajas están relacionadas con la fisiología especial mostrada por hongos en el FS; referido como "fisiología de medio sólido", las razones moleculares y fisiológicas que subyacen a este comportamiento no están bien caracterizadas en la actualidad, aunque hay varios informes recientes que están contribuyendo a su comprensión.

Estos avances demuestran mayores productividades y menos predisposición a problemas con la inhibición de sustrato; además hay muchos casos en que las enzimas producidas en FS difieren de los producidos en FL, y que las cepas silvestres o mutantes seleccionadas para los procesos de FS son diferentes a las seleccionadas para los procesos de FL, es decir, muy rara vez son cepas eficiente en ambos sistemas. Sin embargo pocos trabajos han estudiado las diferencias fisiológicas que surgen durante el crecimiento de células microbianas en los dos tipos de sistemas de cultivo (Barrios-González, 2012).

En nuestro grupo se investigó y desarrolló un proceso de FS novedoso en espuma de poliuretano, donde la producción fue 30 veces más alta que en FL de lovastatina por *A. terreus* (Baños- Mejía 2010).

Para conocer los eventos que causan estas diferencias, nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios bioquímicos y moleculares que muestran que existen ciertos estímulos ambientales que sólo se encuentra en medio sólido, estos son detectados y traducidos para así generan una respuesta fisiológica o molecular; el aumento de la producción de lovastatina ha sido relacionado con una mayor transcripción de los genes biosintéticos (Barrios-Gonzalez et al. 2010). Algunos de estos estímulos ambientales detectados por el micelio en FS han sido identificados como estímulos de la fisiología de medio sólido, entre estos se incluyen el contacto directo con el aire y el estímulo del soporte en la producción de lovastatina por *A. terreus* (Ávila Cisneros, 2009).

Una de las variables de mayor significación en la FS es el contacto con el aire a través de la aireación, la que se utiliza para mantener la concentración de oxígeno imprescindible para el crecimiento del microorganismo; además de que permite regular la temperatura y la humedad del sustrato dentro del reactor (Ruíz-Leza, 2007).

Ávila Cisneros (2009) demostró que cuanto más tiempo se expone el micelio al aire la biosíntesis de lovastatina aumenta, lo que indica que el contacto con el aire es un importante estímulo al que responde el micelio para definir las condiciones de cultivo. Sin embargo, estudios realizados por Baños, 2010 en FS han demostrado que una baja aireación es más compatible con la biosíntesis de lovastatina. Estos resultados contrastan con el efecto de la aireación en otros sistemas de cultivo, tales como FS de salvado de trigo e incluso FL, en el que la aireación elevada favorece la producción de metabolitos (Valera et al. 2005); esto se cree que es porque el soporte de poliuretano (PUF) de la FS difiere de los otros sistemas FS ya que la fase líquida es más vulnerable al secado, porque el medio líquido en la estructura polimérica está en contacto directo con el flujo de aire.

Como ya se ha visto, la aireación es necesaria para el crecimiento y desarrollo de muchos hongos en la producción de metabolitos secundarios, sin embargo esta aireación genera especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden llegar a generar estrés oxidante. A pesar de conocer estos efectos en FS desde hace décadas, y que ahora se siguen utilizando estos sistemas para la producción de múltiples metabolitos secundarios; no están todavía suficientemente caracterizados a nivel fisiológico y genético el efecto que ejerce la aireación en FS ni en FL; especialmente en relación con sus respuestas fisiológicas al estrés. Hay cierta evidencia que sugiere que el estrés oxidativo impone efectos significativos sobre cultivos en los sistemas de producción, en términos de morfología, velocidad de crecimiento, el metabolismo y secreción (Li et al. 2011).

Sorprendentemente, se ha encontrado que la acumulación de EROs incrementa justo antes de iniciar la biosíntesis de lovastatina, las concentraciones de EROs en Idiofase son mayores en FL que en FS, sin embargo las EROs mantienen un nivel mucho más estable en FS, estas diferencias fisiológicas están asociadas a alta producción de lovastatina en FS (Miranda et al. 2013).

En este trabajo se realizó el estudio de sistemas de fermentación con aireación y usando diferentes soportes sólidos con el objetivo de entender cómo se lleva a cabo la acumulación de EROs y qué efecto tiene sobre la fisiología del hongo en la biosíntesis de lovastatina por *A. terreus*.

El estímulo del soporte que da lugar a la exploración del micelio forma parte y contribuye a las señales ambientales que en su conjunto dan origen a las características de la fisiología del medio sólido, siendo esto lo que probablemente se halla relacionada con los altos niveles de producción de metabolitos secundarios y enzimas, particularmente lovastatina (Ávila Cisneros, 2009).

Estos estímulos encontrados de la fisiología del medio sólido, contacto directo con el aire y soporte, podrían ser utilizados y aplicados a la FL, induciendo al micelio esta especial fisiología a través de las señales ambientales de estos estímulos. Es este trabajo se desarrollaron novedosos sistemas de fermentación líquida a los que se le adicionó soporte y se modificó el contacto directo con el aire, así como también se adicionó un generador de EROs a la FL.

Por otro parte, la biosíntesis de lovastatina está relacionada con las EROs, las cuales son controladas por genes reguladores del estado oxidativo de la célula. Se encontró en el análisis *in silico* del promotor del gen *lovE* (factor transcripcional de la vía biosintética de lovastatina), que posee varios sitios probables de unión de proteínas que funcionan como factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo, entre los cuales, se encontró un sitio de unión putativo para Yap1p (Miranda et al. 2013), por lo que la biosíntesis de lovastatina podría estar relacionada con las EROs las cuales son reguladas vía Yap1p. Por esta razón se llevó a cabo el silenciamiento del gen *atyap1*, lo que generó valiosa información sobre su relación con la biosíntesis de lovastatina.

Es importante entender estos estímulos del medio sólido, que el hongo percibe y con los cuales cambia los patrones de expresión génica, a nivel molecular, bioquímico y fisiológico, pues además de su interés científico, esto permitirá en un futuro, diseñar mejores sistemas de producción de enzimas, metabolitos secundarios y sistemas racionales para construir cepas mejoradas genéticamente. Esto no sólo es necesario para un mejor control y dirección de la formación de productos en FS, si no que esta información también será de vital importancia para el diseño de producciones eficaces e incluso para crear nuevas tecnologías.

En este proyecto se estudio cómo los estímulos del ambiente sólido (de la FS) dan lugar a esta especial fisiología de medio sólido. En particular, el estímulo del contacto directo con el aire, y los estímulos del soporte.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ESTATINAS

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, tan sólo en el 2005, cerca de 17.5 millones de personas murieron por esta causa, representando aproximadamente el 30% de la mortalidad global. Esto se relaciona con altos niveles de colesterol en sangre, siendo la hipercolesterolemia el factor de riesgo primario para la aterosclerosis y enfermedades coronarias (Kannel et al. 1961).

Del colesterol total del cuerpo, solamente una tercera parte proviene de la dieta, las otras dos terceras partes son sintetizadas por el hígado (Furberg et al. 1999; Alberts et al. 1980). Debido a esto, la inhibición de la biosíntesis del colesterol, es una estrategia importante para reducir los niveles de colesterol en sangre (Manzoni y Rollini 2002; Barrios-González y Miranda 2010).

Las estatinas son un grupo de medicamentos que inhiben a la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la regulación de la biosíntesis de colesterol. Es en esta forma, que estas moléculas disminuyen los niveles de colesterol en sangre. Además, mediante ensayos clínicos, las estatinas han demostrado prevenir enfermedades cardiovasculares, y se han descubierto nuevas actividades farmacológicas potenciales, por ejemplo en el tratamiento en enfermedades como cáncer, Alzheimer, esclerosis múltiple, etc. (Barrios-González y Miranda 2010).

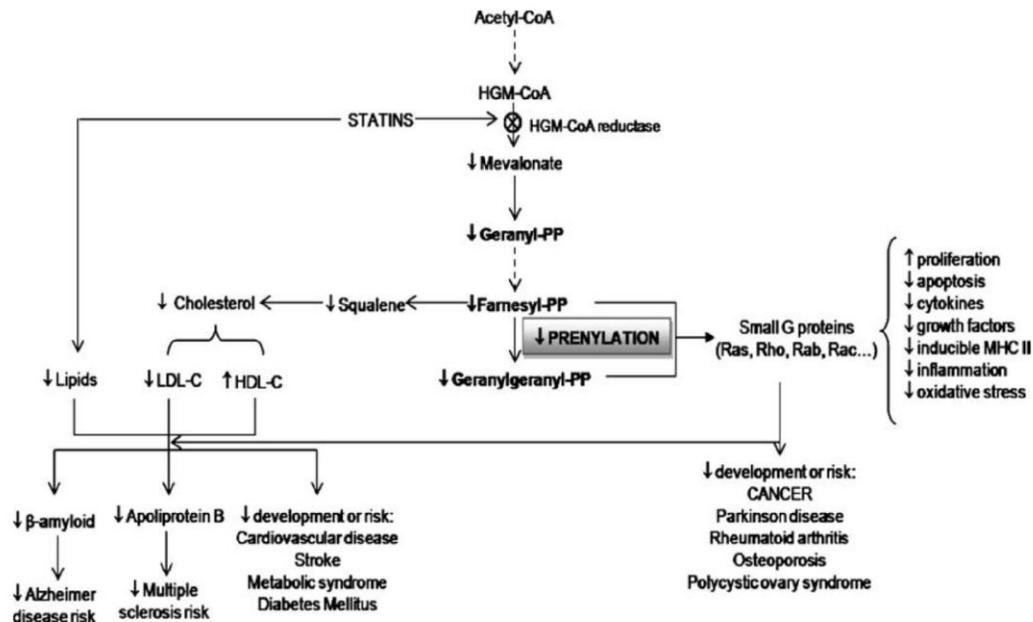


Figura 1. Modelo que explica la gran variedad de efectos biológicos de las estatinas; y por tanto, los usos actuales y potenciales. La inhibición de la HMG-CoA reductasa, no solamente reduce los niveles de colesterol, sino también los intermediarios isoprenoides, afectando la prenilación de las proteínas G (i.e., Ras). Esto puede resultar en la modulación de la transducción de señales de los receptores hacia la expresión de los genes, que directa o indirectamente afectan el balance proliferación/apoptosis, quimiosinas inflamatorias, y mensajeros citogenéticos, todos mediados por proteínas G (Barrios- González y Miranda 2010).

Esto explica el gran éxito de las estatinas en el mercado farmacéutico. Tan sólo en el 2006, encabezaron la lista de los medicamentos más vendidos en Estados Unidos, con ventas de hasta 8.4 billones de dólares anuales (Barrios-González y Miranda 2010).

Actualmente son 5 estatinas las utilizadas en el ámbito clínico: dentro de este grupo podemos encontrar estatinas naturales (lovastatina y pravastatina), semisintéticas (simvastatina) y sintéticas (atorvastatina y fluvastatina) (Barrios-González y Miranda 2010). Estos compuestos disminuyen los niveles de colesterol; particularmente las lipoproteínas de baja densidad o colesterol de baja densidad (conocido popularmente como el colesterol malo); con un ligero aumento de las lipoproteínas de alta densidad (colesterol bueno), por consiguiente, previenen la acumulación de la placa de colesterol dentro de las arterias (Alberts et al. 1980; Manzoni et al. 1998).

Las estatinas naturales son muy similares en estructura química, ya que poseen en común un policétido principal, un sistema de anillos de hidróxido-hexahidro-naftaleno, el cual es diferente en los lados de la cadena, en la posición del C8 (R1) y del C6 (R2), (Figura 2) (Manzoni y Rollini 2002).

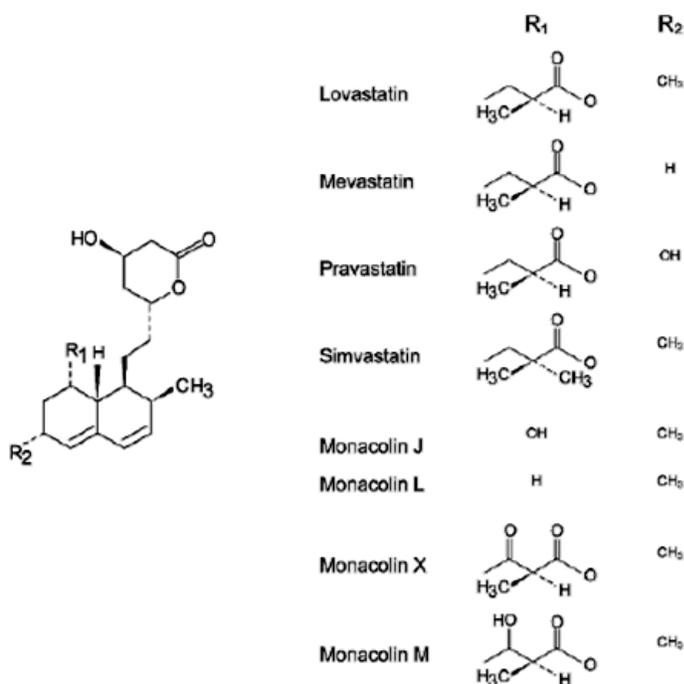


Figura 2. Estructura base de las estatinas (izquierda). Cadenas ligadas al C8 (R1) y al C6 (R2) de la estructura base (derecha) (Manzoni y Rollini 2002).

De todas las estatinas, la lovastatina fue el primer medicamento hipocolesterolémico en ser aprobado por la FDA de EU y en años recientes, se le ha encontrado uso como agente potencial terapéutico para el tratamiento de varios tipos de tumores (Valera et al. 2005; Barrios-González y Miranda, 2010).

### 2.1.1 LOVASTATINA.

La lovastatina actúa como un inhibidor de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA reductasa) (Figura 3), la cual cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato durante la síntesis del colesterol (Hajjaj et al., 2001). Se ha encontrado que un numero de organismos tales como *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* y ciertas especies de *Penicillium* y *Trichoderma*, producen lovastatina como metabolito secundario (Valera et al., 2005).

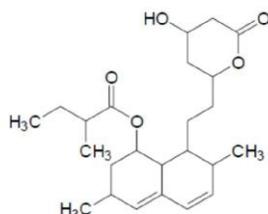


Figura 3. Estructura química de la lovastatina (Rollini 2002).

La lovastatina es un metabolito secundario derivado de la Acetil-CoA; los metabolitos secundarios son compuestos producidos principalmente por hongos y actinomicetos, usualmente en la fase tardía de crecimiento llamada idiofase, son compuestos con una variedad en estructuras químicas sofisticadas (Pandey et al. 2001; Barrios-González et al. 2005). La producción de metabolitos secundarios inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de un nutriente clave: carbono, nitrógeno o fósforo (Barrios-González et al., 1988).

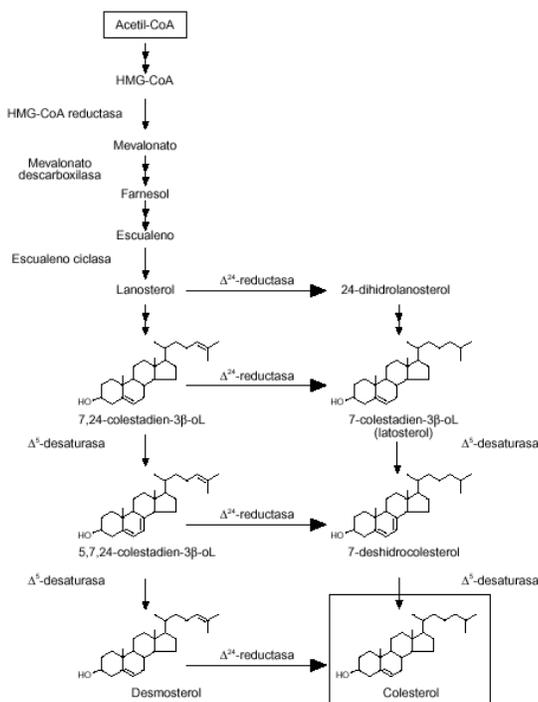


Figura 4. Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández et al. 2003).

### 2.1.1.1 BIOSÍNTESIS.

La ruta biosintética de la lovastatina se ha investigado por resonancia magnética nuclear y espectroscopia de masas (Figura 5) (Yoshizawa et al. 1994; Hendrickson et al. 1999). Estos estudios concluyeron que la lovastatina está compuesta de dos cadenas de policétidos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas por la Policétido Sintasa, resultados que provienen de la clonación y la parcial caracterización del *clúster* de genes biosintéticos de lovastatina de *A. terreus* (Hajaj et al. 2001). El *clúster* de genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos de lectura abiertos (open reading frames u ORFs), 2 de los cuales codifican para proteínas reguladoras, *lovE* y *lovH* (Figura 6) (Rollini 2002).

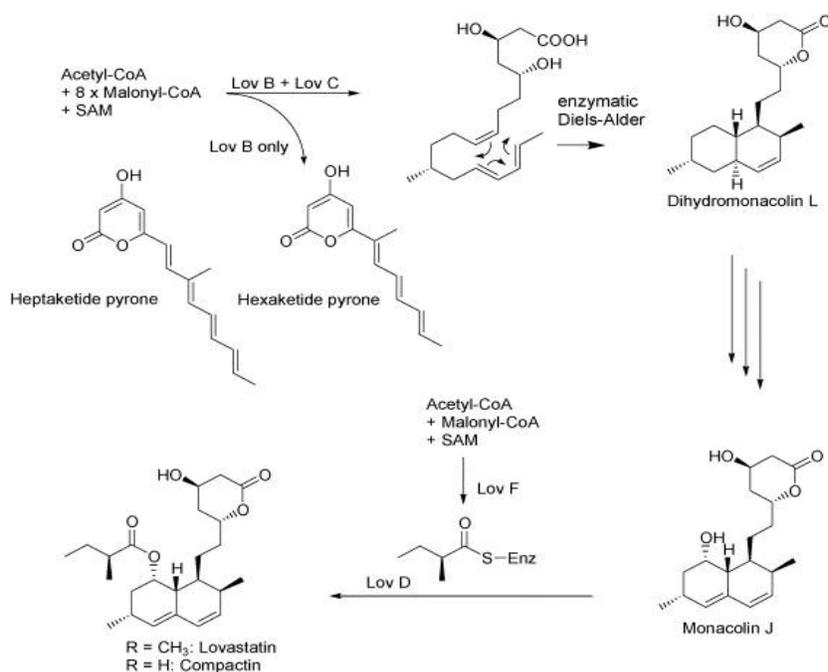


Figura 5. Ruta biosintética de la lovastatina (Manzoni et al., 2002).

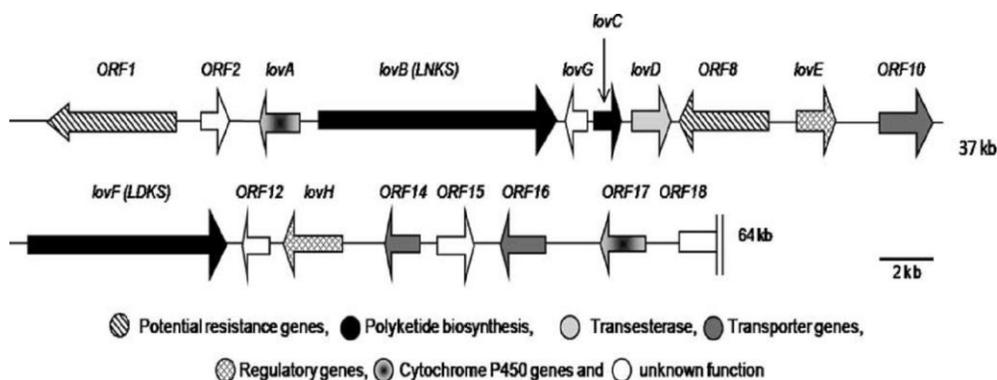


Figura 6. *Clúster* biosintético de la lovastatina: *lovB* y *lovF* biosíntesis de policétidos; *lovC* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lovE* y *lovH* genes reguladores; *ORF2* y *ORF17* genes del citocromo P-450; *ORF1* y *ORF10* genes potenciales de resistencia; *ORF12* y *ORF16* genes de transporte; *lovG*, *ORF12*, *ORF15* y *ORF18* función desconocida) (Rollini et al. 2002).

### 2.1.1.2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LOVASTATINA.

Las investigaciones llevadas a cabo desde 1970 han indicado la posibilidad de obtener un amplio rango de estatinas, tanto como los productos finales e intermediarios del metabolismo microbiano secundario. Se han desarrollado procesos a gran escala solamente para pocas de las estatinas descritas en la literatura. Para otras moléculas, la investigación todavía está en curso y por lo tanto son susceptibles de desarrollo. Estos estudios han resultado en un profundo entendimiento de los diferentes aspectos relativos a los mecanismos involucrados en la producción de las estatinas, lo que ha generado el conocimiento necesario para el desarrollo de proceso a gran escala (Barrios-González y Miranda 2010).

La lovastatina (llamada mevinolina) fue la primera estatina en ser aprobada por la FDA de EU en 1987 y puesta a disposición para el mercado farmacéutico como un medicamento antiolesterolémico. Esta estatina fue obtenida de una cepa aislada del suelo y clasificada como *Aspergillus terreus* en los Laboratorios CIBE en Madrid (España) y de *Monascus ruber* (llamada monacolina K) por Endo (2008). Pocos años después la lovastatina también fue obtenida de 17 cepas de diferentes especies de 124 cepas probadas de *Monascus*, en particular, *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus*, y *M. pubigerus* (Hajjaj et al. 2001; Rollini 2002).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante FL. Sin embargo en años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés por la FS, como una alternativa potencial a la FL, dado que se pueden utilizar sustratos económicos (como residuos agrícolas), se requiere poco procesamiento y las etapas de transmisión continua, utiliza menos potencia y genera menos efluentes. Además, la FS tiene una alta productividad y ofrece mejor estabilidad de producto (Rollini 2002).

Por otro lado, se ha producido lovastatina empleando *Aspergillus flavipes* mediante FS usando diferentes sustratos sólidos, tales como salvado de trigo, harina de soya, salvado de grano, desechos frutales y sus combinaciones. Se encontró que empleando salvado de trigo se llegaba a producir hasta 13.49 mg/g de lovastatina en camas estancadas y 16.65 mg/g de lovastatina en camas agitadas aireadas, después de 6 días de fermentación (Valera et al. 2005).

Biocon (Biocon, Bangalore, India) es una de las compañías que ha obtenido la aprobación para la producción de lovastatina por el FDA de EU (enero 2001). Fue la primera compañía hindú en obtener esta aprobación para moléculas derivadas de fermentación para uso farmacéutico. El proceso de producción de lovastatina está basado en una tecnología propia de fermentación, el Plafractor, un biorreactor a gran escala de matriz sólida (Mazumdar y Suryanaraya, 2003; Barrios-Gonzalez et. al, 2003).

## **2.2 ESTRÉS OXIDATIVO (EOX).**

Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, o al exponer las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. A pesar de las condiciones oxidantes de la vida aeróbica y de los distintos ataques ambientales, los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidativo (EOX) (Barrios-González et al. 2008).

Los EROs están siendo generados constantemente en todas las células que crecen aeróbicamente junto con un conjunto bioquímico de antioxidantes y enzimas que facilitan la descomposición de estos y así mantener la célula en un estado de equilibrio redox, cuando este equilibrio se altera por el aumento de EROs se produce entonces un estado de EOX (Barrios-González et al. 2008).

En las células eucariontes el estrés oxidativo, se debe a la generación de EROs por la reducción química del oxígeno realizada a través de oxidasas celulares, peroxidasas, monooxigenasas, dioxigenasas, por la exposición a los rayos UV u otros agente ambientales y por la reducción incompleta del oxígeno a agua en la cadena respiratoria mitocondrial (Barrios-González et al. 2008).

Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del  $O_2$ , daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular (Storz et al. 1987). Dado que el EOX puede ocurrir rápidamente, la ruta de respuesta de los hongos debe ser similarmente rápida. La célula debe ser capaz de detectar el balance redox alterado, modular la actividad de reguladores transcripcionales apropiados, y entonces inducir la expresión de los genes requeridos (Bai Z et. al, 2003a). Los hongos usan diferentes estrategias para controlar la expresión de los genes activados por el redox, y una característica común es la necesidad de una respuesta transcripcional a los cambios oxidativo (Moye-Rowley et al. 2003).

### **2.2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs).**

Las EROs son derivadas del oxígeno más reactivo que el  $O_2$  en su estado basal. El  $H_2O_2$  es un oxidante débil; sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos ( $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  respectivamente) forma al radical hidroxilo ( $HO\bullet$ ) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad. En el ion peróxido los dos átomos se encuentran unidos por un sólo enlace débil, de tal forma que al aceptar un par de electrones extra, este enlace se elimina totalmente (Folch-Mallol et al. 2004).

El dióxígeno singulete ( $1O_2$ ) a diferencia de las EROs mencionadas, no es producto de la reducción parcial del dióxígeno basal. En aerobiosis, la principal fuente de EROs es la cadena de transporte electrónico mitocondrial, que acopla la reducción del  $O_2$  a la generación de ATP. La ubiquinona y el citocromo C son las moléculas encargadas de transportar los electrones desde un complejo al siguiente en la cadena respiratoria. Cualquiera de estas moléculas es susceptible de donar un electrón al O en lugar de al siguiente componente de la cadena, generándose así el ión  $O_2^-$  (Miranda et al. 2008).

Existen xenobióticos que interaccionan con los componentes de la cadena de transporte electrónico y que provocan un aumento en la producción de  $O_2^-$  a través de dos mecanismos: bloqueando el transporte electrónico en algún punto de la cadena, o funcionando como aceptores de electrones de algún transportador y donadores de estos electrones al  $O_2$  generando  $O_2^-$  en un mecanismo conocido como *redox-cycling*. Existen más fuentes de electrones, a nivel mitocondrial, que pueden reducir parcialmente al oxígeno, como la glicerol-fosfato deshidrogenasa o la monoamino oxidasa, que cataliza la desaminación oxidativa de aminas biogénicas, generando  $H_2O_2$ . (Miranda 2008).

La exposición a radiaciones X y/o UV también promueve la formación de EROs. La producción de EROs puede ser enzimática, como es el caso de los enzimas destoxicadoras SOD, las NADPH oxidasas, localizadas en la membrana celular de macrófagos, células polimorfonucleares y células endoteliales así como de las oxigenasas dependientes del citocromo P450. Durante el metabolismo de las purinas, las enzimas xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa son otra fuente de EROs (Turrens, 2003).

Existen fuentes de  $H_2O_2$  independientes de la producción de  $O_2^-$ ; es el caso de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, catalizada por la acil-CoA oxidasa, que se da a nivel peroxisomal en células eucariotas (Chance *et al.* 1979).

Junto con las fuentes de EROs mencionadas anteriormente, son más de tres enzimas que producen EROs en las células fúngicas y están involucradas en la regulación del desarrollo en eucariotes, la NADPH oxidasa, la glioxal oxidasa y la NO sintasa (Belozerskaya y Gessler 2007; Aguirre et al. 2006). La NADPH oxidasa fue el primer ejemplo de enzima dedicada a la producción de EROs y fue descrita en animales y plantas. El reciente descubrimiento de enzimas NADPH oxidasas en microorganismos eucarióticos, expande el rango de posibilidades de las funciones de esta enzima sobre la regulación (Aguirre et al. 2006).

### 2.2.2 RESPUESTA A EOX.

Para contender con el EOX y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las EROs, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente en moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico. Estos en general actúan atrapando algunas de las EROs y son: glutatión, poliaminas, ácido eritroascorbico, metalotioneinas, flavohemoglobinas, glutarredoxinas y tiorredoxinas (Miranda et al. 2008).

Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de eliminar EROs, entre ellas están: la catalasa (CAT) que transforma el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ . Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas abundantes presentes en muchos de los organismos aeróbicos y anaeróbicos. Su actividad conocida es la dismutación del radical superóxido,  $O_2^-$ , para dar dióxigeno y peróxido de hidrógeno, las enzimas de la ruta de las pentosas, la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa, la tiorredoxina peroxidasa y las peroxirredoxinas (Garrido y Grant 2002; Delaunay et al. 2002).

Las células fúngicas también deben tratar con una amplia variedad de cambios ambientales potencialmente tóxicos durante el curso de su proliferación. Un ejemplo importante de un desafío ambiental al que los hongos se enfrentan es precisamente a estos altos niveles de EROs. Una característica crítica en esta respuesta al EOX es la necesidad para señalar rápidamente al nuevo ambiente estresante, lo cual a su vez conduce a la reprogramación de la expresión de genes y a sus productos requeridos para contrarrestar la elevación letal de las EROs (Miranda et al. 2008).

Existen varios estudios respecto a la respuesta provocada por el EOX, pero se ha encontrado que ésta ocurre a nivel transcripcional, y que existe superposición entre las respuestas provocadas ante una condición de EROs y aquellas observadas a otros tipos de estrés. Las diversas condiciones de estrés (térmico, osmótico, salino, etc.) generan conjuntamente una condición hiperoxidante. Es evidente la selección de diferentes moléculas reguladoras que le dan cierta especificidad a las vías de transducción de señales. Esto nos dice que existe una íntima interacción entre cada una de las diferentes vías. Mientras que combatir a las EROs es una necesidad común para el hongo, en diferentes organismos se hace uso de diferentes mecanismos para detoxificarse de las EROs y asegurar la supervivencia (Folch-Mallol et al., 2004).

En estudios realizados por Miranda et al. 2013, en donde se estudio la generación de EROs y el estado oxidativo de la célula, se encontró sorprendentemente que las concentraciones de EROs en Idiofase eran 10 veces mayores en ambos sistemas de fermentación: en otras palabras, la acumulación de EROs coincide con el inicio de la producción de lovastatina es decir las EROs contribuyen en la señalización para iniciar la idiofase de FS y FL (Figura 7) (Miranda et al. 2013).

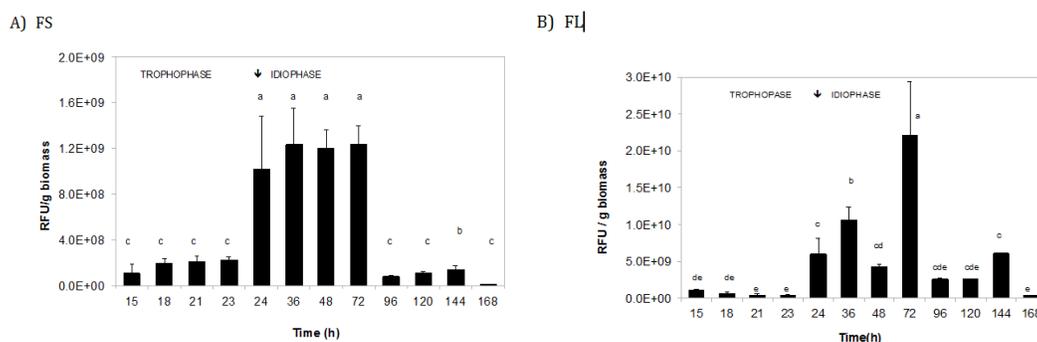


Figura 7. Acumulación de EROs en FL y FS en la producción de lovastatina por *A. terreus* (Miranda, et al. 2013).

Otra aportación importante de este trabajo fue que los niveles bajos y controlados de EROs parecen ser importantes para un buen nivel de producción como los encontrados en FS: a diferencia de la FL, en FS era menor la acumulación de EROs, aunque mucho más estable a lo largo de la idiofase. Estas diferencias fisiológicas podrían estar asociadas a la alta producción de lovastatina en FS (Figura 7) (Miranda et al. 2013).

### 2.2.3 EROs MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS.

Como segundos mensajeros, las EROs están involucrados en procesos de desarrollo en plantas y en mecanismos de defensa contra patógenos y estrés abiótico (Apel y Hirt 2004; Jones 1994). Efectos similares se han observado en mamíferos, donde niveles apropiados de EROs estimulan las reacciones antioxidantes, la modulación del sistema inmune y la regulación de la proliferación celular (Bokoch y Knaus 2003). Asimismo, estudios recientes han revelado que las rutas de señalización son reguladas por el estado intracelular redox (Kamata y Hirata 1999).

Existe evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como los aniones superóxido y el peróxido de hidrogeno, funcionan como segundos mensajeros intracelulares (Finkel, 1998). Otra trabajo que muestra evidencia de esto es el de Halliwell y Gutteridge, 1999, en donde se propone que las EROs regulan varios procesos celulares aunque también resultan nocivas para los organismos.

Esto se ve reflejado en los estudios realizados con el hongo *Neurospora crassa* que indican que hay un breve periodo transitorio de incremento de EROs al comienzo de cada etapa morfogénica (Toledo et al. 1995). Kreiner et al. 2000, estudiaron el efecto de la tensión de oxígeno disuelto y la concentración de oxígeno en la tasa de crecimiento del hongo *A. niger* B1-D y en la producción de una enzima recombinante en FL; encontraron que existía una mayor actividad de las enzimas SOD y CAT al final de la fase estacionaria y el inicio de la fase de decaimiento de una FL (Bai Z et. al, 2003b).

Es interesante notar que estudios sobre la producción de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* indicaron que hay un estado oxidativo que coincide con la transición entre trofofase e idiofase; y que las cepas más aflatoxigénicas muestran un EROs en ese punto mucho más intenso que las cepas no toxigénicas. Indicando que la intensidad del EROs puede estar relacionada con el nivel de producción de la cepa (Jayashree et al. 2000).

Se ha propuesto que la diferenciación celular es una respuesta al EOX. De acuerdo a esto, el crecimiento y los estados diferenciados, son condiciones estables en las cuales los niveles de EROs son mantenidos por un balance en la generación de EROs (i.e. por mitocondria y NOX) y la eliminación (por enzimas antioxidantes) (Cano-Domínguez et al. 2008). Un cambio entre estos dos estados ocurre cuando un incremento trasciende en los niveles de EROs, además de su capacidad celular de neutralizarlas (Aguirre et al. 2006).

El estrés por superóxido en *Aspergillus nidulans* conduce a cambios en la expresión de genes e inicia la diferenciación del cleistotecio (órgano de reproducción sexual) (Bai Z et. al, 2004). La deficiencia del radical superóxido perjudica el proceso sexual y la germinación de las ascosporas en el ascomiceto *Podospora anserina* y en *Neurospora crassa* (Belozerskaya y Gessler 2007).

El carácter transitorio de esta respuesta es debido en parte al hecho de que niveles elevados de EROs resultan en una alta expresión de enzimas que las descomponen. Además, varios reportes en diferentes microorganismos eucarióticos han mostrado una correlación entre los procesos de desarrollo y la regulación de enzimas antioxidantes específicas, tales como las superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas y peroxirredoxinas (Aguirre et al. 2006).

La importancia de relación entre la acumulación de EROs y la producción de lovastatina se determinó empleando el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) que redujo los niveles de EROs, resultando así la disminución de la biosíntesis de lovastatina, esto en consecuencia de una disminución en el nivel de transcritos de los genes de la vía por efecto del antioxidante (Miranda, et al. 2013).

#### 2.2.4 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA AL EOX.

Los mecanismos que regulan la respuesta fúngica en el cambio oxidante, pueden ser clasificados en dos tipos:

a) Control por Localización Nuclear.

La compartimentación del ADN genómico dentro de la membrana nuclear provee un importante mecanismo para la regulación de las proteínas regulatorias sintetizadas transcripcionalmente. La barrera de la membrana nuclear permite el acceso de factores de transcripción hacia sus genes blanco para controlar la regulación a través de la localización de estas proteínas moduladoras clave. Estos genes reguladores, como todas las proteínas con un sitio de acción nuclear, deben cruzar la membrana nuclear a través del poro nuclear (Moye- Rowley 2003).

b) Regulación de la Actividad Vía Fosforilación.

Uno de los sistemas más ampliamente estudiados, involucra un serie de proteínas quinasas que actúan secuencialmente, referidas como la cascada de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase). Este módulo de señalización, consiste de un MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) corriente arriba que es activada para fosforilar su objetivo, una MAPK quinasa (MAPKK). La fosforilación de MAPKKK hacia MAPKK permite que esta quinasa fosforile al último objetivo quinasa en la ruta, que es la MAPK, conduciendo a la activación de esta molécula de señalización clave. MAPK fosforilada y activa, puede entonces regular corriente abajo moléculas efectoras, conduciendo a los efectos regulatorios apropiados. Las rutas de MAPK han sido implicadas en la tolerancia al EOX en células animales y ciertas especies fúngicas (Moye-Rowley 2003).

Ciertas rutas, tales como la modulación de la proteína quinasa Sty1 en *Schizosaccharomyces pombe*, son influenciadas por estos dos tipos de mecanismos regulatorios (Roze, L.V., 2011). Otros factores de respuesta oxidante, tales como Yap1p o Hsf1p de *S. cerevisiae*, parecen ser regulados a nivel de localización nuclear o fosforilación (Reverberi et al. 2007).

#### 2.2.5 FACTORES TRASCRIPCIONALES EN RESPUESTA A EOX.

Se han logrado identificar varios factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al EOX, que en algunos casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés:

- Factores transcripcionales tipo bZip: Yap1p, Yap2p, Gcn4p.
- Factores transcripcionales que unen a cobre: Ace1p, Mac1p.
- Factores transcripcionales con dedos de zinc: Hap1p, Hap2p, Hap3p y Hap4p.

En las especies de *Aspergillus* por lo menos existen tres vías de señalización que están implicadas en la dirección de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo: a) proteína quinasa (MAPK), b) SrrA (Skn7 en la levadura) y c) Yap1. Este último es un factor de transcripción que actúa como un sensor redox que se activa directamente por el aumento de niveles de EROs.

El análisis *in silico* del promotor del gen *lovE* (factor transcripcional del tipo dedos de zinc (Zn2Cys6) de la vía biosintética de lovastatina (Kennedy 1999; Bok & Keller 2004), reveló que el promotor es rico en posibles sitios de unión que en su mayoría responde a EOX como Skn7, Ap-1 (homólogo de *atyap1*), Msn2/4, Nrf2 y NF-K-B (Factores Transcripcionales de respuesta a EOX en mamíferos), lo cual sugiere que este tipo de estrés puede regular a través de *lovE* la biosíntesis de lovastatina (Figura 8) (Miranda et al. 2013).

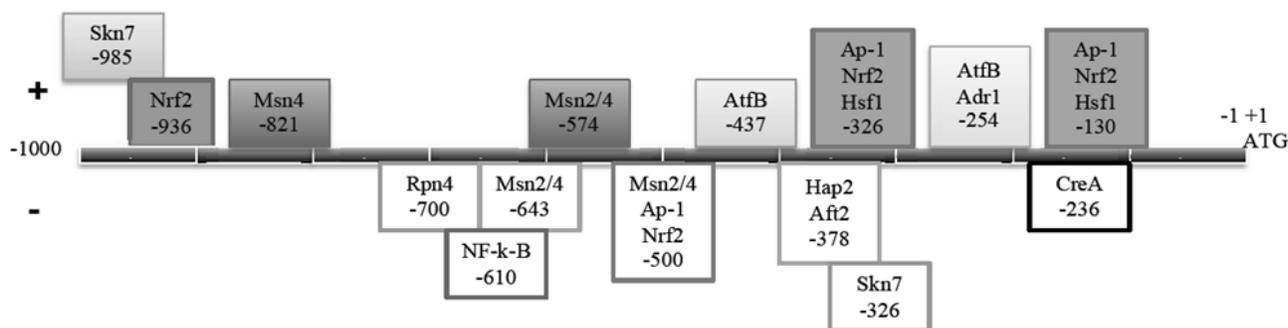


Figura 8. Posibles sitios de unión de Factores Transcripcionales (que responden a diferentes tipos de estímulos) en el promotor del gen *lovE*. Nótese que en su mayoría, son Factores Transcripcionales que responden a EOX (Skn7, Nrf2, Msn2/4, AtfB, Ap-1, Aft2 y NF-kB) y algunos más que responden a estrés nutricional (CreA, Adr1, Rpn4). Algunos sitios de unión se encontraron sobre la cadena principal (+, sobre la línea) y algunos otros, se encontraron en la cadena antisentido (-, debajo de la cadena) (Miranda, et al. 2013).

En base a toda la evidencia encontrada se propuso en el trabajo de Miranda et al. 2013, que existe una alta probabilidad de que el mecanismo por el cual las EROs pueden señalar la biosíntesis de lovastatina sea a través de Factores Transcripcionales que responden a EOX.

### 2.2.5.1 Yap1p.

Yap1p es un factor de respuesta antioxidante del tipo bZip, que parece ser regulado a nivel de localización nuclear y fosforilación. Una cremallera de leucina o factores de transcripción bZip es un motivo estructural súper-secundario de proteínas que crea fuerzas de adhesión a través de hélices alfa en paralelo. Es un dominio de dimerización común en proteínas involucradas en la expresión génica. La familia de factores de transcripción bZip consiste en una región básica que interacciona con el surco mayor de la molécula de ADN a través de enlaces de hidrógeno, y una región hidrofóbica de cierre, que es la responsable de la dimerización (Moye-Rowley 2003).

En levaduras se conoce a la familia de las proteínas AP-1 (Yeast AP1 ó Yap1p) que es necesaria para la respuesta transcripcional a estrés oxidativo; éstas son los sensores del estado redox de la célula y se activan directamente por condiciones de estrés oxidativo. En forma análoga, en hongos filamentosos se conocen ortólogos de Yap1p que son proteínas bZIP que contienen factores que comparten homología con el complejo de mamíferos AP-1; y se unen a los sitios de secuencia de ADN muy similares, también esta Pap1 en *Schizosaccharomyces pombe*, Cap1 en *Candida albicans* y Kap1 en *Kluvermyces lactis* (Reverberi et al. 2007).

En *Aspergilli*, se identificaron ortólogos para Yap1p en *A. nidulans*, *A. fumigatus* y *A. parasiticus*. En *A. nidulans*, NapA (ortólogo Yap1p) se informó que desempeña un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo, tales como el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido. NapA ha demostrado ser un activador transcripcional de los genes de estrés oxidativo asociado tales como *CatB* (-micelios específica catalasa), *trxB* (tiorredoxina reductasa), *thiO* (tiorredoxina), *glrA* (glutación reductasa) en respuesta a peróxido de hidrógeno (Mulford y Fassler 2011).

La proteína Yap1p está regulada por la localización subcelular; Yap1p se asocia con proteínas Importin, este complejo se lleva al núcleo, y el complejo importina-Yap1p se disocia. Bajo condiciones sin estrés, Yap1p puede asociarse con el exportin Crm1p y Gsp1p GTP-cargado, que son receptores de las exportaciones, el complejo Yap1-Crm1p se mueve a través del poro nuclear y lo escolta desde el núcleo hasta el citoplasma, donde es disociado. Yap1p ahora puede ser obligado por la importina y ser reclutado de nuevo en el núcleo (Reverberi et al. 2007).

En las condiciones de estrés oxidativo, Yap1p se modifica en una manera oxidante, este cambio varía dependiendo de la señal inducida: por ejemplo, diamida o peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$ . La señal de peróxido de hidrógeno es inicialmente detectada por la peroxidasa Gpx3p, este traduce la señal, en la formación de un enlace disulfuro de Yap1p, provocando cambios conformacionales, que impiden la interacción con Crm1p, formando un intermedio transitorio de disulfuro Yap1p-Gpx3p, lo que provoca la acumulación nuclear de Yap1p, esto conduce a una mayor expresión del gen diana con aumentos asociados en las funciones antioxidantes que actúan para devolver el potencial redox de la parte posterior de la célula a un rango normal (Figura 9). Aproximadamente la mitad de las 71 proteínas inducidas por estrés oxidativo depende de Yap1 (Mulford y Fassler 2011).

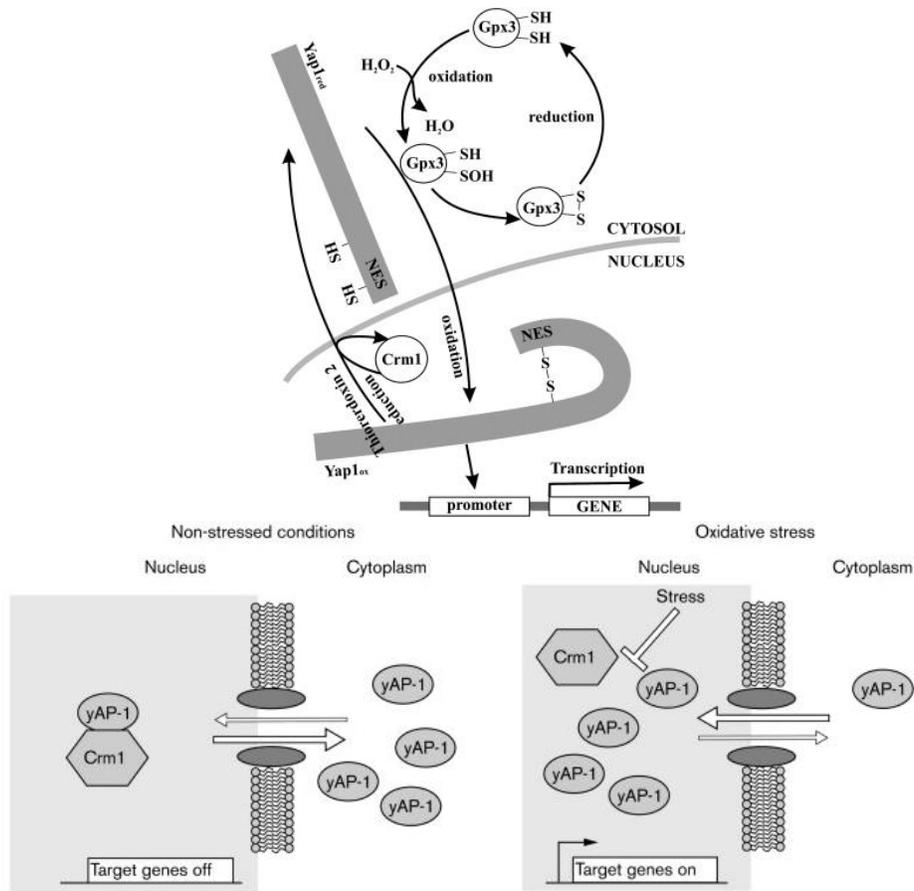


Figura 9. Mecanismo de regulación de Yap1p frente a estrés oxidativo (Paulsen et al. 2009).

Los factores de transcripción individuales cumplen funciones de señalización distintas pero a menudo se solapan. Por ejemplo, Yap-1, Nap-1, y APyap1 - todos pertenecen a la familia AP-1 de los factores de transcripción. Estos factores de transcripción muestran facciones superpuestas relacionadas con la señalización de EROs en levaduras y hongos filamentosos y la activación de los genes diana antioxidantes. Por otro lado, en hongos filamentosos estos factores llevan a cabo una única tarea adicional, que es co-regulación de metabolismo secundario (Mulford y Fassler 2011).

Estos resultados comienzan a mostrar un panorama de que el metabolismo secundario está relacionado con el EOX, sin embargo, pocos son los reportes que comienzan aportar sobre cuál o cuáles son los mecanismos por los que puede llevar a cabo estas interacciones (Sung-Ypng et al. 2013).

El trabajo de Sung-Ypng et al. 2013, propone un modelo para la activación transcripcional de genes de biosíntesis de aflatoxina por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo. Donde se propone que el aumento de los niveles intracelulares de EROs en las células fúngicas regula por disminución la vía de señalización de AMPc-PKA (Figura 10). Esto promueve la unión a sitios STRE en promotores de genes antioxidantes por su proteína quinasa activada (SAPK / MAPK) cascadas de señalización a través del sistema de etapas múltiples de fosforilación (Sung-Ypng et al. 2013).

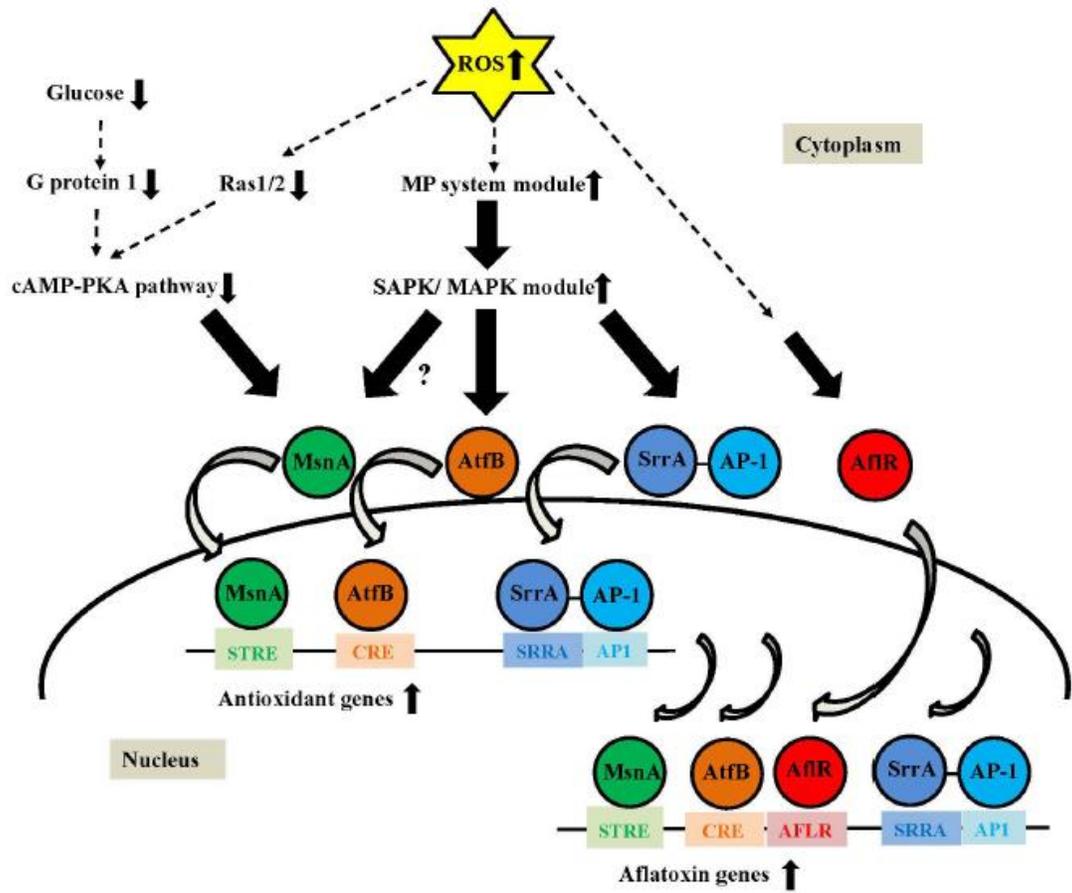


Figura 10. Modelo para la activación transcripcional de genes de biosíntesis de antioxidantes y de aflatoxina por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo (Sung-Ypng et al. 2013).

La presencia de probables sitios de unión a AP-1 en el promotor de *aflR*, sugirió que el EOX puede regular la biosíntesis de aflatoxinas. Mutantes  $\Delta ApyapA$  (ortólogo de AP-1) en *Aspergillus parasiticus*, mostraron un incremento en el EOX, conidiogénesis y biosíntesis de aflatoxinas prematura (Reverberi et al. 2007). Por lo que se cree que su homólogo en *Aspergillus terreus* juega un papel importante en la biosíntesis de lovastatina y más aún en la fisiología especial de la FS (Miranda et al. 2013).

## **2.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.**

La fermentación en estado sólido (FS) se define como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida en la ausencia de agua libre. La FS ha sido ampliamente utilizado desde la antigüedad, para la producción de alimentos fermentados como el miso y la salsa de soja en el Lejano Oriente (Barrios- González 2012).

### **2.3.1 TIPOS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.**

Se distinguen principalmente dos tipos de sistemas de FS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada: el más comúnmente utilizado involucra un sistema de cultivo sobre material natural y el menos frecuentemente utilizado, un cultivo que involucra un soporte inerte impregnado de medio de cultivo (Aidoo et al., 1982; Barrios Gonzales 2010).

#### **2.3.1.1 FS SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS NATURALES.**

La fermentación sólida sobre soportes sólidos naturales es el sistema más común mente usado para el cultivo de microorganismos sobre productos agrícolas tales como el arroz, salvado de trigo, etc. El cultivo sobre este tipo de materiales, sirve tanto como soporte así como fuente de nutrientes. Estos sistemas de cultivo, tienen la ventaja de utilizar materiales crudos que son baratos y que están moderadamente procesados. Sin embargo tiene la desventaja de que la fuente de carbono constituye parte de su estructura física. Durante el crecimiento de microorganismos, el medio sólido puede ser parcialmente degradado y da como resultado, el cambio de sus características físicas, particularmente en cultivos largos para fermentaciones de metabolitos secundarios. Como resultado, la transferencia de calor y masa se reducen (Oojikaas et al. 2000; Barrios Gonzales y Mejia, 1996).

#### **2.3.1.2 FS SOBRE SOPORTE INERTE IMPREGNADO.**

Estos sistemas involucran el cultivo de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con medio líquido. En esta fermentación, el soporte sirve exclusivamente como un reservorio de nutrientes de la fase líquida, pero también como un punto de anclaje para los microorganismos (Oojikaas et al. 2000; Baños 2010). Estas características pueden convertirse en desventajas para el sistema de producción y pueden superarse empleado soportes que permitan mejorar el control de transferencia de calor y masa. Una ventaja de este tipo de sistemas, es que hace menos complicado la recuperación del producto.

Este último tipo de sistema de FS se utilizó inicialmente para estudios básicos, ya que la composición del medio podría ser diseñado y su constitución determinado en cualquier momento del cultivo; además de que la concentración de biomasa es más fácil de cuantificar (Barrios- González 2012).

El sistema permite el diseño de un medio de producción adecuado, y es más fácil de desarrollar balances de masa para modelar procesos más avanzados y controlarlos, ya que se conocen las concentraciones de todos los nutrientes en el medio de producción. Por otra parte, se han empleado dos variantes en este tipo de sistema: FS sobre soportes inertes naturales, tales como bagazo de caña y FS sobre soportes inertes artificiales, tales como espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, agrolita, vermiculita, perlita, partículas de pozolano (material volcánico) y granulos de arcilla (Oojikaas et al. 2000; Baños et al, 2010).

### **2.3.2 FISIOLÓGÍA DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA.**

La FL es el sistema de producción más usado y mas estudiado actualmente, para la mayoría de productos biotecnológicos debido a su disponibilidad de tecnología y comprensión de esta; sin embargo en los últimos años ha habido un creciente interés en la FS ya que las producciones de enzimas y metabolitos secundarios en este sistema son grandes y muy frecuentemente superan a las secretada en FL. Las ventajas más importantes de la FS son una consecuencia de la fisiología mostrado por hongos y otros microorganismos sobre un sustrato sólido, en relación con la presentada en la FL; curiosamente, todos estos sistemas de FS muestran una fisiología especial que se denomina “fisiología de medio sólido”.

La fisiología es la ciencia que estudia las funciones orgánicas por las cuales la vida se manifiesta y se mantiene en su forma individual. Para los hongos filamentosos la vida se manifiesta bajo diferentes formas importantes:

- Morfológicas: multiplicación del micelio, conidiogénesis, liberación de las esporas, etc.
- Bioquímicas: producción de metabolitos primarios y secundarios.
- Respirométricas: producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> durante el crecimiento.

Entre las principales diferencias que se han encontrado entre FL y FS son las mayores productividades y menor tendencia a problemas con la inhibición de sustrato en FS. Además, hay muchos casos en que las enzimas producidas en FS difieren de los producidos en FL: enzimas con diferentes características como una mayor temperatura óptima o mayor estabilidad del pH, diferentes parámetros cinéticos o incluso las enzimas que no se secretan al medio en FL se secretaron en FS (Barrios-González, 2012).

Existen reportes donde se manifiesta con claridad esta fisiología especial del medio sólido, ya que en algunos casos se ha encontrado que enzimas que se producen en forma intracelular en FL, son de tipo extracelular en FS, y que ambas muestran peso molecular y características cinéticas diferentes. También se ha encontrado que los hongos contienen distintos genes que codifican para una misma clase de enzima, y que estos genes equivalentes son regulados diferencialmente dependiendo del medio donde se encuentren. Estos hechos sugieren que, el hongo recibe señales que indican que está en uno u otro sistema de cultivo y que esto hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferencial (Hisada et al. 2005).

Esta diferente fisiología se cree que se debe a que la evolución de los hongos superiores y actinomicetos se llevó a cabo sobre sustratos de crecimiento sólidos; en otras palabras, estos organismos pasaron su historia evolutiva como terrestre, han desarrollado un metabolismo más específico y tal vez hasta más completo para el uso en sustratos sólidos húmedos, pero no en los sistemas líquidos (Barrios-González, 2012).

En relación a los metabolitos secundarios de producción por la FS, una clara diferencia con la FL es el mayor rendimiento, a menudo en períodos más cortos. Además, a veces el metabolito se produce sólo en FS, a pesar de que el organismo también muestra un buen crecimiento en FL (Barrios-González, 2012).

Por ejemplo, en FS en salvado de trigo producida de *Aspergillus oryzae* se han obtenido rendimientos 500 veces mayores de proteína heteróloga (quimosina) que en FL, además que se observó que este sistema tiene ventajas que permite la reducción de problemas debidos a procesos posteriores durante la extracción del producto (Barrios-González 2012).

El caso de la alta productividad de glucoamilasa por *A.oryzae* en FS es un caso especial de un mecanismo bien estudiado a nivel molecular. Los estudios (Hata et al. 1997) revelaron que la enzima glucoamilasa era producida en mucha mayor cantidad por FS. Después, los autores descubrieron que la glucoamilasa producida en FS era distinta a la producida en FL, por lo que determinaron la secuencia de aminoácidos de ambas, pudiendo así clonar los genes. Mediante un análisis de expresión encontraron que el gen *glaB* se expresaba exclusivamente en medio sólido.

Baños et al. (2010), diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakacs et al. 1998). La producción de esta cepa, en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue solamente de 0.62 mg/mL. Esta cepa también fue probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.61 mg/g. Estos estudios muestran que la producción de lovastatina obtenida en el sistema en FS fue más alta que en cualquier sistema de FS o FL reportado (Baños et al. 2010).

La “fisiología especial” del medio sólido se manifiesta con claridad aquí ya que se ha encontrado que al producir lovastatina por *Aspergillus terreus* en FS, empleando poliuretano como soporte inerte usando un medio más concentrado 2.5X, se alcanzó una producción 30 veces mayor que en FL. El emplear este tipo de soporte, permitió conocer la producción específica, obteniendo un parámetro comparable con respecto a lo obtenido en FL, y se encontró que esta era 13 veces mayor en FS con respecto a FL (Baños et al. 2010).

Estudios desarrollados en nuestro grupo de trabajo (Barrios-González et al. 2008) al producir lovastatina utilizando *A. terreus*, revelaron que en FS los genes de la vía (relacionados con la biosíntesis de lovastatina) se expresan más intensamente en este sistema sólido en comparación con la FL. Esto sugiere que en FS, el hongo recibe señales que le indican que está en un medio

sólido y que generan una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferente (de medio sólido); y que una de sus características es la alta capacidad de producción de lovastatina.

Actualmente, la fisiología de la FS no está bien caracterizada, aunque se han realizado importantes avances en los últimos años. Estos avances demuestran mayores productividades y menos predisposición a problemas con la inhibición de sustrato. Además, hay muchos casos en que las enzimas producidas en FS difieren de los producidos en FL, y que las cepas silvestres o mutantes seleccionadas para los procesos de FS son diferentes a las seleccionadas para los procesos de FL. Es decir, muy rara vez son cepas eficientes en ambos sistemas. Sin embargo pocos trabajos han estudiado las diferencias fisiológicas que surgen durante el crecimiento de células microbianas en los dos tipos de sistemas de cultivo (Barrios-González 2012).

### **2.3.3 ESTÍMULOS DEL MEDIO SÓLIDO.**

Se ha desarrollado estudios que indicaron que existen ciertos estímulos ambientales que hacen notar al hongo que se encuentra en medio sólido. Estos estímulos deben ser detectados y entonces traducidos, disparando un número de eventos a nivel molecular, que a su vez generan una respuesta y con esto se desencadena la fisiología del medio sólido. (Barrios-González 2012).

Ávila Cisneros (2009), desarrolló estudios fisiológicos diseñados para evaluar la contribución de diferentes estímulos a la fisiología del medio sólido. Se identificaron al contacto con el aire como un estímulo muy importante, seguido por el estímulo del soporte, y un menor efecto de la baja actividad de agua y alta concentración de nutrientes. Estos hechos sugieren que, el hongo recibe señales que indican que está en uno u otro sistema de cultivo y que esto hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferencial.

#### **2.3.3.1 ESTÍMULOS DEL SOPORTE.**

Actualmente no se conoce a ciencia cierta el porqué se da un aumento en la producción en el sistema de FS en comparación con FL durante la producción de metabolitos. Sin embargo se han encontrado evidencias de que el soporte influye como un estímulo para el desarrollo de la fisiología en FS.

Ishida et al. 1998, trataron de comprender la fisiología de medio sólido, su investigación les permitió obtener observaciones importantes, diseñando un novedoso sistema de fermentación que se trató de un cultivo diseñado sobre agar en placa, este cultivo involucraba el uso de una membrana; los resultados encontrados sugieren una relación entre la producción y el tamaño de poro de membrana utilizada, esta evidencia asegura la existencia de un estímulo presente a la hora de colocar la membrana que puede ser el de ramificación y exploración, involucrado en la fisiología del medio sólido.

Otra aportación interesante es la realizada por Nakanishi et al. (2004), quienes realizando estudios con *A. oryzae* en diferentes tipos de cultivo, observaron de manera directa el estímulo de barreras físicas a las que se enfrenta el hongo cuando está presente alguna membrana o soporte en el medio (medio de agar en caja de Petri).

Otros estudios que aportan cierta información acerca de esto son los de Bigelis et al. 2006, los cuales revelaron que el uso de soportes poliméricos en FL influyen en el crecimiento, morfología y producción de metabolitos secundarios bioactivos (pirrocidinas y acremonidinas) en plantas. Ellos sugieren que durante el desarrollo del sistema de FL para la producción de dichos metabolitos, la variante de su sistema de producción, consistió en la adición de un disco de nitrocelulosa al medio de cultivo lo que ocasionó un perfil de producción distinto al esperado en FL convencional, pues esto desencadenó una serie de estímulos ambientales que se manifestaron en el crecimiento y diferenciación del hongo.

Ávila Cisneros 2009, realizó un estudio donde se inmovilizó el micelio en una banda de PUF rodeando la cara interna del matraz en FL, los resultados obtenidos con respecto a la producción de lovastatina total, presentaron un comportamiento positivo, pues la producción se vio incrementada hasta en más del doble de su valor; Esto indica que existe una diferencia significativa entre uno y otro sistema de producción y no sólo eso, sino que el estímulo planteado esta presente y estimula la producción de lovastatina.

En el modelo desarrollado por Avila 2009, para estudiar el estímulo de exploración confirmó el efecto del estímulo de soporte que induce la de exploración del micelio; Se observó un incremento en la producción específica al poner barreras al crecimiento (membrana) que estimula la necesidad de explorar del micelio. El hallazgo más importante fue que en el sistema con membrana, hubo un aumento significativo en la producción de lovastatina en comparación con la producción obtenida e sistemas sin membrana. Esto demostró de forma muy similar a lo obtenido en cultivo líquido inmovilizado que el estímulo de inmovilización influye de manera importante en un aumento de la producción de lovastatina.

### **2.3.3.2 ESTIMULO: CONTACTO DIRECTO CON EL AIRE.**

El contacto directo con el aire fue uno de los estímulos de la fisiología del medio sólido encontrados por Ávila (2009); realizó experimentos en donde varió el tiempo de contacto con el aire. Los resultados obtenidos muestran que entre más tiempo se expone el micelio al aire la producción aumenta lo que indica que el contacto aire es un importante estímulo al que responde el micelio para ajustar su fisiología.

Una vez que se determino la importancia e influencia del contacto con el aire como estímulo de la fisiología del medio sólido, surgió la duda de cómo es que se lleva a cabo la señalización para el

desarrollo de esta fisiología. Aportaciones importantes surgen a partir de la investigación realizada por Baños et al. (2007), en donde *A. terreus* (TUB F-514) fue mutada y una cepa resistente a estrés oxidativo (EOX), fue elegida por métodos de selección racional, la nueva mutante presentó resistencia a estrés oxidativo y un aumento en la producción de lovastatina (Baños et al. 2010).

Estos resultados indican que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* está relacionada con su capacidad de responder a el EOX. Esto indica que el Estrés oxidativo tiene una mayor intensidad en FS, en relación con FL, y que los mecanismos de adaptación al EOX no solo son valiosos para el hongo creciendo en medio sólido, sino que probablemente inducen una mayor producción de lovastatina y otras características de la fisiología del medio sólido (Baños et al. 2007).

Hay cierta evidencia que sugiere que el EOX impone efectos significativos sobre cultivos de hongos en los sistemas de bioproducción, en términos de morfología, velocidad de crecimiento, el metabolismo, y la secreción de proteína (Li Q. et al. 2011).

El panorama comenzó a surgir que tanto el contacto con aire como el estrés oxidativo son factores importantes en fermentaciones sólidas, sin embargo no es aún muy clara esta relación. Lo que se propuso entonces fue que un estímulo que potencialmente puede ser detectado por el micelio en FS, incluye el contacto directo con el aire, y es posible que este contacto pueda estimular la biosíntesis a través del EOX o por la formación de Especies Reactivas de oxígeno (EROs).

## **2.4 PARÁMETROS DE LA FS.**

El cultivo de microorganismos sobre diferentes sustratos o soportes sólidos depende de diferentes parámetros y factores ambientales como son: el tipo de microorganismo y la cantidad de inóculo; la humedad y la actividad de agua; la aireación y la transferencia de oxígeno; la regulación de la temperatura y del pH.

Para medir el crecimiento de los microorganismos, se puede recurrir a la respirometría para el análisis de la biomasa con diferentes métodos indirectos (proteínas, quitina, ácidos nucleicos) o por la producción de diferentes metabolitos (Raimbault y Alazard 1982).

### **2.4.1 ACTIVIDAD DEL AGUA Y HUMEDAD.**

El papel del agua en los procesos de FS es múltiple: componente dominante en la composición de la biomasa, el agua sirve además de vehículo para las enzimas y los nutrientes, además de facilitar los intercambios gaseosos. Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y una alta contaminación. Al contrario, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato.

Varios autores demostraron la importancia del agua en los procesos de FS para controlar el crecimiento y el metabolismo de microorganismos. El aumento de la humedad y de la disponibilidad del agua causa un aumento de la tasa del crecimiento, de la producción de biomasa y de la biosíntesis de enzimas (Raimbault et al. 1982).

#### **2.4.2 TEMPERATURA Y PH.**

Los hongos filamentosos que se utilizan en los procesos de FS son por lo general mesófilos y crecen a temperaturas óptimas entre 29 y 35°C. Sin embargo, la producción de calor metabólico durante los procesos de FS causa un aumento importante de la temperatura y si este calor no se elimina rápidamente del medio de cultivo, puede causar el paro definitivo del crecimiento de los microorganismos. Diferentes autores proponen estrategias para la regulación de la temperatura. Frecuentemente se utiliza la aireación y la evaporación del agua para controlar automáticamente la humedad y la temperatura en los procesos de FS. (Narahara et al. 1982)

Los hongos filamentosos crecen en medios ácidos y pueden tolerar importantes cambios del pH (2.5 hasta 7.5). Sin embargo la medida del pH *in situ* durante los procesos de FS es particularmente difícil. Para evitar una disminución importante del pH, se ha utilizado con éxito una mezcla de sulfato de amonio y de urea en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno (Raimbault et al. 1982).

#### **2.4.3 AIREACIÓN.**

Por lo general, en los procesos de FS se utilizan microorganismos aerobios por lo que la aireación de los medios de cultivo es de sumo interés para el desarrollo de los microorganismos, ya que permite realizar diferentes funciones:

- Abastecimiento en oxígeno para los cultivos
- Regulación de la humedad.
- Regulación de la temperatura
- Eliminación de metabolitos volátiles (CO<sub>2</sub>, alcoholes)

El efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub> en la fase gaseosa sobre el crecimiento y el metabolismo de *Aspergillus oryzae* para la producción de amilasas y proteasas en FS fue estudiado. Se demostró que la producción óptima de amilasas se obtiene durante la fase exponencial de crecimiento con bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> (de 2% a 5%) y, al contrario, para la producción de proteasas se necesita una concentración elevada de CO<sub>2</sub> (5%) durante la fase estacionaria. Por otro lado, se ha confirmado que el crecimiento apical y la producción de biomasa por *Rhizopus oryzae* están relacionados con la concentración del CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa de los medios de cultivo (Narahara et al. 1982).

De la misma manera la producción de biomasa de *Schwanniomyces castellii* depende directamente de la tasa de aireación de los cultivos en FS. El mismo autor demostró que el control del metabolismo de esta levadura puede llevarse a cabo con la monitoreo de la tasa de CO<sub>2</sub> presente en la fase gaseosa durante el proceso de FS. Así mismo, las concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (16-22%) estimulan la producción de micelio de *Pleurotus* (Perraud-Gaime 1995).

Los cultivos mixtos de bacterias lácticas y hongos filamentosos para la conservación y la decafeinación de la pulpa de café son otro ejemplo del efecto de la aireación sobre el cambio de metabolismo y de estructura de la microflora natural. Se ha demostrado que la población de microorganismos cambia en función de la aireación de los cultivos. Aunque las poblaciones microbianas aumentan o disminuyen según la aireación, estas mismas poblaciones pueden desarrollarse de nuevo después de que las condiciones ambientales cambien (Narahara et al. 1982).

#### **2.4.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA AIREACIÓN.**

Una de las variables de mayor significación en la FS es el contacto directo con el aire a través de la aireación, la que se utiliza para mantener la concentración de oxígeno imprescindible para el crecimiento del microorganismo; además, permite regular la temperatura y la humedad del sustrato dentro del reactor (Ruíz-Leza et al. 2007).

Estudios realizados en FS han demostrado que una baja aireación es más compatible con la producción de lovastatina, debido a que conserva mejor la humedad en el sistema de producción (Baños et al., 2009). Los cultivos con aireación limitada o sin aireación tuvieron los mayores rendimientos de lovastatina, a pesar de que estos cultivos presentaron menor concentración de biomasa (Baños et al., 2009). Estos niveles de lovastatina eran superiores debido a la mayor producción específica (mg de lovastatina/mg de micelio seco), quizás alentados por la mejor conservación de la humedad en cultivos con aireación limitada o nula.

Estos resultados contrastan con el efecto de la aireación en otros sistemas de cultivo, tales como FS de salvado de trigo e incluso FL, en el que la aireación elevada favorece la producción de metabolitos (Valera et al. 2005). El soporte de poliuretano (PUF) de la FS difiere de los otros sistemas FS ya que la fase líquida es más vulnerable al secado porque que el medio líquido en la estructura polimérica está en contacto directo con el flujo de aire.

En el trabajo de Baños et al., 2009, se muestra que la producción con medio con medio 2.5X, es decir medio más concentrado, resultó ser más eficiente en cuanto a la producción de lovastatina y biomasa, sin embargo este medio no se ha probado con diferente nivel de aireación, por lo que queda la incógnita si se hubiera comportado de la misma manera que los anteriores modelos o se produjera más biomasa lo que generaría más humedad y evitara que la aireación fuera desfavorable en la producción de lovastatina usando soporte de poliuretano.

Desde entonces en el grupo de trabajo la FS de lovastatina en PUF se realiza tapada para evitar la pérdida de humedad que es muy rápida en este sistema. Por lo tanto, se realiza con bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. Entonces, es ahora importante confirmar que este perfil de acumulación de EROs en idiofase no es producto de la baja aireación, sino que es típico de este u otros sistemas de FS. Aunque la parte metodológica de esto ha sido complicada por la dificultad de mantener % de humedad comparables.

Esto implica que hay un mecanismo fisiológico para contener las EROs, es decir que asegura que los EROs se mantendrán bajos en FS, sistema con muy alto contacto con el O<sub>2</sub>. Este mecanismo no sería a través de enzimas antioxidantes pues ya demostramos que éstas bajan en idiofase (Miranda et al. 2013).

El estrés oxidativo en general ejerce un impacto negativo en el crecimiento de hongos. Una posible explicación para muchas de estas observaciones es el compromiso de la respiración alternativa, uno de cuyas funciones putativas es disminuir la producción de EROs, pero a expensas de la generación de ATP a debido su falta de bombeo de protones naturaleza (Li Q. et al. 2011).

Otra explicación posible es la inhibición específica de enzimas metabólicas clave por EROs. La sobreexpresión de gen *sod1* de *Kluyveromyces lactis* (klsod1) aumentó la producción de dos diferentes proteínas heterólogas de *K. lactis*, albúmina de suero humano (HSA) y la glucoamilasa de *Arxula adenivorans* (Raimondi et al. 2008). Esto se cree que es debido a la reducción del el estrés oxidativo causado por el daño sostenido retículo endoplásmico durante la producción de proteína recombinante (Li Q. et al. 2011).

A la inversa, el estrés oxidativo puede contribuir al aumento de producción de la enzima en determinadas circunstancias, por ejemplo, una mayor actividad lacasa extracelular se encuentra como parte de la respuesta del sistema de hongos de pudrición blanca, *Trametes versicolor* y *Biennis abortiporus* (Jaszek et al. 2006).

## 1. JUSTIFICACIÓN.

Además de diferentes aplicaciones de gran utilidad en otros campos, los sistemas modernos de fermentación sólida (FS) tienen un record de aplicaciones exitosas para la producción de enzimas microbianas y metabolitos secundarios.

Sin embargo son poco conocidos los estímulos que el hongo percibe al encontrarse en medio sólido, y que inducen una fisiología diferente: fisiología del medio sólido, la cual se manifiesta a menudo en una mayor producción del metabolito secundario y enzimas (Barrios-González, 2012).

Se sabe que en un sistema de producción de lovastatina por *A. terreus* que consistía en un matraz con cubos de poliuretano (FS) hay mayor contacto con el aire que en FL, y si este sistema se somete a diferentes niveles de aireación se ve afectada la producción de lovastatina (Baños G., 2009 et al.). Miranda et al. 2013, encontraron que los EROs funcionan como segundos mensajeros y que contribuyen a la regulación de la biosíntesis de lovastatina, tanto en FS como en FL de acuerdo con Miranda et al. 2013.

Sin embargo, esta FS de lovastatina se realiza en condiciones de muy baja (o nula) aireación, ya que se utilizan matraces sellados con papel aluminio y parafilm, por lo que no queda claro si estos resultados sobre las diferencias de concentración de EROs (y balance redox en general) entre sistemas serán extrapolable a sistemas de FS más usuales, los cuales tienen un mayor contacto con el O<sub>2</sub>. Por lo tanto queda la incógnita de por qué en un sistema donde hay mayor contacto con el aire, hay menor cantidad de EROs, surgen dudas de ¿Qué relación tiene el contacto del aire con la formación de EROs? y ¿Cómo influye éste en la producción de metabolitos secundarios en hongos?, Entonces, la pregunta clave sería ¿la concentración de EROs en la FS de lovastatina depende del grado de aireación del cultivo, o las defensas la mantienen a un mismo nivel?

Resolver estas preguntas sería de gran importancia básica, además de un aporte para el diseño, innovación y el mejoramiento en la productividad y eficiencia de sistemas de FL y FS. Por eso se pretende realizar la cuantificación de EROs a diferentes niveles de aireación en FS comparando la producción de lovastatina y otros parámetros.

Se encontró que en FS hay una menor acumulación de EROs en idiofase, aunque en concentraciones muy estables, lo cual al parecer está relacionado con la mayor producción de lovastatina obtenida en FS. De acuerdo con los avances que reportan Miranda et al. 2013, la acumulación de EROs se lleva a cabo al iniciar la idiofase y estos se pueden inhibir al usar antioxidantes (NAC), e incluso inducir por el uso de oxidantes como peróxido de hidrogeno en cajas de Petri; sería de gran importancia e interés industrial poder aplicar y determinar el funcionamiento de este estímulo de la FS en la FL.

Se ha demostrado que el segundo estímulo del medio sólido, en importancia, era el “estímulo del soporte,” desarrollando cultivos modelo para estudiar el efecto, sobre la producción de lovastatina, del micelio obligado a fijarse (adhesión) y a explorar un medio sólido. Hasta ahora solo se tiene indicios de cómo funciona o como podría funcionar este estímulo, por lo que es necesario ahora, profundizar en los mecanismos por los que estos estímulos son traducidos y cómo modifican la fisiología del hongo.

Debido al papel que juegan las EROs en la fisiología de los organismos como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales, el presente proyecto pretende demostrar que las EROs juegan un papel trascendental en la biosíntesis de lovastatina, al regularse vía Yap1p. Para lograrlo, se busca silenciar el gen, que además de ser una alternativa al *knock-out*, ha demostrado ser una herramienta rápida y efectiva para suprimir la expresión del gen de interés (Marcial 2011), además que existen pocos reportes de silenciamiento en hongos, y menos aun sobre el silenciamiento en *Aspergillus terreus*.

Con estos resultados se obtendrá una visión más amplia, integrada y profunda de la fisiología del medio sólido, e incluso parte de la fisiología y mecanismos moleculares en medio líquido que no se conocen. Este conocimiento aclararía e integraría el nexo entre los estímulos del medio sólido con los cambios fisiológicos y genéticos que llevan a la fisiología del medio sólido, y por ende a una mayor producción de lovastatina. Muy probablemente estos principios regirán también la producción de otros metabolitos secundarios por este y otros sistemas de fermentación sólida.

Aunque es más complicado trabajar con microorganismos productores de uso industrial y no organismos modelo, así como directamente en sistemas de producción real, la gran ventaja es que todo el conocimiento es exacto sobre este binomio y los descubrimientos son rápida y directamente aplicables.

Así, estos conocimientos podrán aplicarse rápidamente al diseño de sistemas novedosos (sólidos avanzados o híbridos FS-FL) de producción de lovastatina, y otros metabolitos secundario, más efectivos. Claramente también servirán para identificar blancos para el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento genético para desarrollar cepas especiales para FS ó, alternativamente cepas para FL.

## 2. HIPÓTESIS.

- El perfil de acumulación de EROs en la FS de lovastatina es independiente del grado de aireación.
- El soporte y el contacto con el aire de la FS induce la fisiología del medio sólido, diferentes conformaciones del soporte y contacto con el aire adicionados a la FL provocara diferentes fisiologías, semejantes a la FS.
- Los EROs regulan la biosíntesis de lovastatina, con la adición de peróxido de hidrogeno en la FL se podrá manipular la biosíntesis de lovastatina.
- El factor transcripcional Yap1p es el nexo entre EROs y lovastatina; por lo que el silenciamiento de *atyap1* afectará a la acumulación de EROs y producción de lovastatina.

## 3. OBJETIVOS.

### 5.1 OBJETIVO GENERAL.

“Estudiar los mecanismos por los que los estímulos del medio sólido: contacto directo con el aire y estímulo del soporte, generan la fisiología del medio sólido, caracterizada entre otras cosas, por una mayor producción de metabolitos secundarios. Utilizando la fermentación de lovastatina por *A. terreus*”.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el efecto del grado de aireación sobre la acumulación de EROs, utilizando diferentes soportes, en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus* TUB F-514.
- Adicionar en la FL estímulos de la FS y determinar el papel que juega el soporte, el contacto con el aire y la adición de peróxido (EROs) para inducir la fisiología del medio sólido.
- Silenciar el gen *yap1* de *A. terreus* TUB F-514 y caracterizar las transformantes en cuanto a producción de lovastatina, resistencia/sensibilidad a estrés oxidativo, esporulación, crecimiento y expresión génica de *brlA*, *sod1*, *lovE*.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 APARATOS Y/O EQUIPOS EMPLEADOS.

Balanza analítica OHAUS Explorer.

Cámaras de electroforesis: Electrophoretic Gel System E-C Minicell EX370 M y EC 350.

Centrifuga 5415, Eppendorf.

DTX 880 Multimode Detector (Beckman-Coulter, Inc, Brea, CA, USA)

Electroporador 2510, Eppendorf.

Espectrofotometro UV-1201 Shimadzu.

Eppendorf Biophotometer.

Gel DOC 2000 BIO-RAD.

Incubadora Environ-Shaker 3597.

Horno de microondas SANYO.

Microscopio Olympus CH30.

Potenciómetro Orion mod.525 A.

Termociclador Mastercycle Personal, Eppendorf.

Transiluminador de luz UV, BIORAD.

Ultracentrifuga AVANTI 30 BECKMAN.

Ultracongelador -20°C Revco.

Ultracongelador -70°C Forma Scientific.

### 6.2 MICROORGANISMOS.

#### 6.2.1 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

La cepa es utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse en ella (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por microgramo de ADN) (Narahara, 1982). Entre sus características más útiles está la de poseer una delección en el gen Z del operon *lacZ*, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.

#### 6.2.2 *Aspergillus terreus* TUB-F514.

La cepa TUB F-514 utilizada para la producción de lovastatina fue aislada previamente del suelo en el desierto de Irak, por el Dr. György Szakács y pertenece a la colección de la Technical University of Budapest, Hungría. Esta cepa fue la mejor productora de lovastatina en FL. Esta cepa es considerada de alta producción (Szakács et al. 1998).

## 6.3 VECTORES.

### 6.3.1 pJet1.2/blunt (ThermoScientific®).

El kit de clonación de PCR CloneJET™ es un sistema de selección positivo avanzado para la clonación de alta eficiencia de los productos de PCR generados con cualquier ADN polimerasa termoestable. Además, cualquier otro fragmento de ADN de extremo romo o cohesivo se puede clonar. El kit es ideal para fragmentos de ADN fosforilados o no fosforilados. La ligación en el vector de selección positiva incluido tarda sólo 5 minutos y produce más de 99% de clones recombinantes.

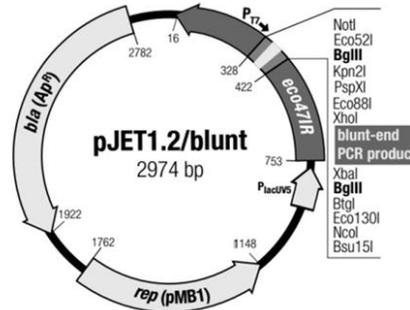


Figura 11. Vector pJet1.2 (ThermoScientific®)

### 6.3.2 pGdpPki-RNAi.

El plásmido pGdpPki-RNAi (Fig. 14) fue obtenido del plásmido pJL43-RNAi (Ullán et al. 2008) y modificado por Marcial *et al.* 2011. El vector pGdpPki-RNAi contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdh*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). Además, este vector posee los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato quinasa), en sentidos opuestos y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*, donde se insertó un fragmento de ADN (553 pb del gen *atyap1*).

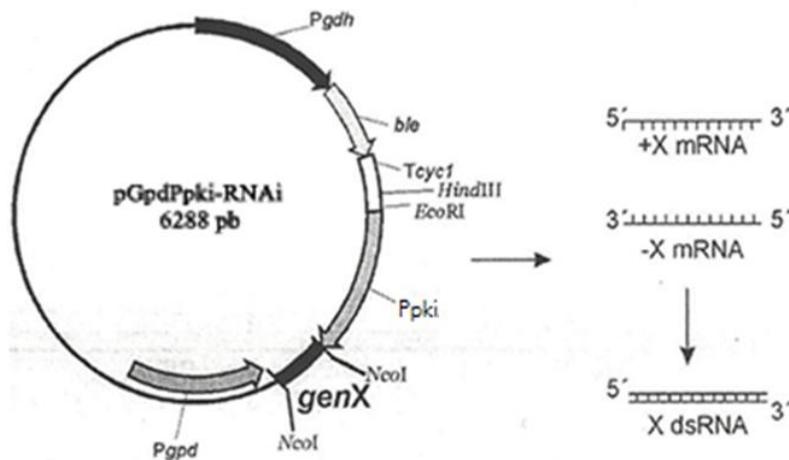


Figura 12. Vector pGdpPki-RNAi empleado para silenciar *atyap1* de *A. terreus* (Marcial *et al.* 2011).

La interferencia por RNA es una nueva y poderosa herramienta molecular para silenciar genes a nivel post-transcripcional, es utilizada como herramienta para reducir o bloquear la expresión de genes para la búsqueda de las funciones asociadas a estos. La interferencia por RNA proporciona una estrategia fácil y rápida para degradar los RNA mensajeros mediante la introducción de un RNA pequeño de doble cadena homólogo (siRNA) al RNA mensajero celular de interés. La interferencia por RNA con la cual se puede reducir (*knock-down*) o perder (*knock-out*) la expresión de un gen, se logra, mediante la introducción a nivel celular de un ARN de doble cadena pequeño (siRNA), el cual es reconocido a nivel celular por una maquinaria que media la degradación o supresión específica de los mRNA(s) que contiene la secuencia complementaria al siRNA formado, produciéndose principalmente una degradación del mRNA citoplasmático y una disminución de la traducción del mensaje.

La interferencia por RNA, es mediada por RNAs de doble cadena (siRNA), estos se pueden producir intracelularmente a través de pequeñas horquillas que son transcritas por una RNA polimerasa III a partir de un sistema de expresión plasmídico que son transformados a siRNA por DICER, y los siRNA producidos activan a RISC, un complejo multienzimático capaz de remover la hebra pasajera y dejar al complejo RISC activo con la hebra antisentido, listo para producir silenciamiento específico del RNA mensajero de secuencia complementaria al siRNA, produciendo la degradación específica del mRNA, por la enzima Ago2 capaz de degradar esta hibridación de la hebra pasajera y el RNA mensajero.

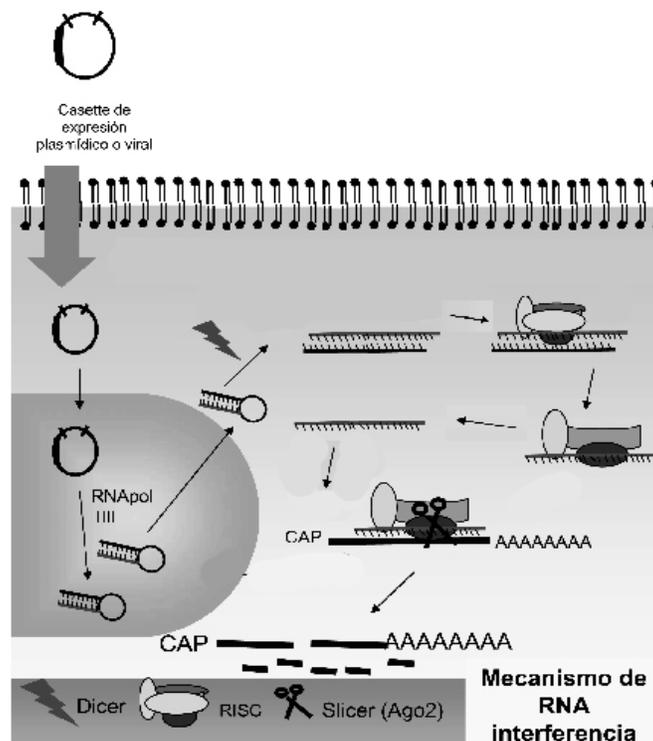


Figura 13. Mecanismo de interferencia por RNA (Marcial *et al.* 2011).

Para poder evaluar el efecto del silenciamiento del gen *atyap1* en la producción de *lovastatina* en *Aspergillus terreus*, se realizó la construcción de un fragmento del gen *atyap1* con el vector pGdpPki-RNAi.

## 6.4 MEDIOS DE CULTIVO.

### 6.4.1 Medio de cultivo para *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 6.4.1.1 Medio Luria-Bertani (LB).

	g/L
Bacto-triptona	10
NaCl	10
Extracto de Levadura	5
Agar (para medio solido)	20

Se ajusto el pH a 7.5 con NaOH al 10% y se añadió agua destilada hasta el volumen deseado. Se esterilizo en autoclave durante 15 min a 120°C.

#### 6.4.1.2 Antibióticos suplementados.

Se empleo Ampicilina (Sigma®) para selección de transformantes y mantenimiento del plásmido con resistencia a este, el stock se preparo en una concentración de 100 mg/mL. Se esterilizo por filtración, al emplear membranas de 0.20mm de poro marca Millipore. Se guardo en alícuotas de 500 mL a -20°C. En el caso necesario, el medio LB fue suplementado con Ampicilina en una concentración de 100 mg/mL.

### 6.4.2 Medios de cultivo para *Aspergillus terreus*.

#### 6.4.2.1 Medio Czapek.

	g/L
Sacarosa	30.0
NaNO <sub>3</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01

De esporulación y mantenimiento (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.2 Medio Czapek/sorbitol.

	g/L
Sacarosa	30.0
NaNO <sub>3</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	1 o 2
Sorbitol	182.17
pH	7

Medio para la producción de protoplastos (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.3 Medio PMI

	g/L
Balto peptona	5.0
Lactosa	5.0
NaCl	4.0
Sólidos de maceración	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.060
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.050
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.003
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.001

Medio de esporulación y mantenimiento (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.4 Medio Power

Medio PMI	50%
Medio CZAPEK	50%
Agar	2%

De esporulación y mantenimiento (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.5 Solución de sales 20x (SS20X).

	g/L
NaNO <sub>3</sub>	120.0
KCl	10.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4

Guardar a temperatura ambiente (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.6 Solución de elementos traza (SET).

	g/100mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	1.1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
CoCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11
Na <sub>4</sub> EDTA	5.0

Se fueron adicionando los sólidos en orden, a 80 mL de H<sub>2</sub>O destilada, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 100 mL (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.7 Medio completo para *A. terreus*.

SS20X	5 mL
SET	100 µL
Glucosa	1 g
Peptona	1 g
Extracto de Levadura	0.05 g

Se llevo a 100 mL de volumen y se ajusto el pH a 6.5 con KOH al 10%.

Medio para obtención de micelio. En un matraz erlenmeyer de 125 mL, se colocaron 35 mL de medio completo, se esterilizo 15 min a 120°C. Se inoculo con una asada de esporas y se incubo a 30°C durante 18 h (Aguirre *et al.* 2005).

#### 6.4.2.8 Medio Papa Agar Dextrosa PDA (BD Bioxon®).

Es un medio común de cultivo microbiológico, está hecho a partir de infusión de patata y dextrosa. Se utiliza como medio de esporulación y conservación. Se prepara a 39 g/L y se esteriliza a 15 min a 120°C. Se utilizo para la preparación en cajas de Petri con 40 ml/caja.

#### 6.4.2.9 Medio de producción de lovastatina.

Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento de la cepa *Aspergillus terreus* TUB F-514, de la colección de cepas de la Technical University of Budapest, fue crecida sobre medio Power durante 4 días a 30°C para esporulación. Las esporas fueron colectadas con una solución de tween 80 al 0.02% y usadas para inocular en condiciones estériles las fermentaciones de lovastatina a una concentración de  $2 \times 10^6$  esp/ml. Para todos los tipos de fermentación, cada punto de muestreo, se realizó por triplicado

##### 6.4.2.9.1 En poliuretano.

###### Medio de cultivo

1X	%
Glucosa	0.6
Lactosa	3.4
Harina de soya	0.3
KNO <sub>3</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
NaCl	0.05
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05
Elementos traza	0.125

pH 6.5 se ajusta con NaOH 0.1 M, este medio se utiliza en dos concentraciones 1X(FL) y 2.5X (FS) (Baños *et al.*, 2005).

###### Soporte

Se cortó el PUF ( $\delta$ :20 kg/m<sup>3</sup>) de acuerdo a la conformación requerida, estos se lavaron con agua destilada, se exprimieron y se remojaron durante 10 min en una solución de HCl al 10% v/v, se enjuagaron con agua destilada hasta neutralizar; se exprimieron y se remojaron durante 10 minutos más en una solución de NaOH al 4% p/v, se enjuagaron con agua destilada hasta neutralizar. Se secaron a 60°C durante 24 horas y se almacenaron en bolsas negras hasta que se utilizaron. Se esterilizó a 15 lb/in<sup>2</sup>, durante 15 min (Baños *et al.* 2009).

#### 6.4.2.9.2 En bagazo de caña.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>g/L</u>
Glucosa	15
Lactosa	85
Harina de soya	7.5
KNO <sub>3</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.5
NaCl	1.25
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.25
Elementos traza	3.125
pH	6.5

#### Soporte

El bagazo se trituró con un molino, se recolectó lo retenido en el tamiz #30 y #40, este se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente, se almacenó para su uso posterior. Después se realizó un pre-tratamiento, con el 35% del agua disponible para preparar el medio de cultivo y se llevó a 3 lb/in<sup>2</sup> (101°C), utilizando la autoclave, durante 60 min. Se esterilizó a 15 lb/in<sup>2</sup>, durante 15 min (Baños et al. 2009).

#### 6.4.2.9.3 En salvado de trigo.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>g/L</u>
Glucosa	11
Glicerol	16
MgSO <sub>4</sub>	0.75
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HSO <sub>4</sub>	2.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Maltosa	5
pH	7

#### Soporte

El salvado de trigo (Naturista®, comprado en SuperNaturista) se humedeció con el 35% del agua disponible para preparar el medio de cultivo y se llevó a 3 lb/in<sup>2</sup> (101°C), utilizando la autoclave, durante 60 min. Se esterilizó a 15 lb/in<sup>2</sup>, durante 15 min (Barrios et al. 1988).

#### 6.4.2.9.4 Solución de elementos traza para la producción de lovastatina.

<u>Elemento</u>	<u>g/L</u>
MnSO <sub>4</sub>	1.6
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3.4
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	2
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5

Se fueron adicionando los sólidos en orden, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen el volumen (Baños et al. 2005).

## 6.5 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA FS.

### 6.5.1 Matraz Abierto (MA) y Matraz Cerrado (MC) en poliuretano.

#### Matraz Cerrado MC (Fermentación Solida Convencional)

Se utilizó una concentración de 2.5 veces del medio de producción de lovastatina (2.5X). El soporte utilizado fue en cubos de 1 cm<sup>3</sup>, 0.21 g de soporte por matraz Erlenmeyer de 250 mL, estos fueron impregnados con 6 mL del medio inoculado (humedad del 85 %), los cuales fueron cubiertos con papel aluminio y parafilm (Pechiney Plastic Pacaging, Menasha, Wi, USA) como lo describió Baños et al. 2005. Fueron incubadas a 30 °C a una humedad controlada del 80% usando la Incubadora RH520 ExTech®.

#### Matraz Abierto MA

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el MC, a excepción de en lugar de ser selladas con papel aluminio y parafilm; se utilizó un tapón de tres capas de gasa sostenido con una liga, el cual facilita la transferencia de gases sin que se contamine el medio (Baños et al. 2005).

### 6.5.2 Control de Humedad en MA.

Se realizó la fermentación en MA con un sistema que controlara la humedad; estos consistían en la adición dentro del matraz de vasos de plástico de 2 cm de diámetro interno que contenía 4 mL de distintas soluciones:

	Numero de Vasos con 4 mL
Medio de producción 2.5X (Aw 0.9775):	1, 2, 3
NaCl 3.5gr/L (Aw 0.9775):	1, 2, 3
Agua Destilada Estéril:	1, 2, 3

### 6.5.3 Matraz Cerrado y Columna Aireada en diferentes soportes.

#### 6.5.3.1 Matraz cerrado.

En el caso del sistema de matraz: matraces Erlenmeyer de 250 mL, se llenaron con el soporte correspondiente con el tratamiento antes descrito para cada uno, posteriormente se inocularon los medios de cultivo  $2 \times 10^6$  esp/ml, para impregnar el medio correspondiente en el soporte correspondiente. Finalmente fueron cubiertos con papel aluminio y parafilm. Fueron incubadas a 30°C a una humedad del 80 % usando la Incubadora RH520 ExTech®.

#### 6.5.3.2 Columnas.

Para la preparación de todas las columnas: se prepara previamente en un matraz el soporte (tratamiento antes descrito para cada tipo de soporte), en donde se le impregna del medio inoculado y posteriormente se empacaron las columnas estériles.

En campana para empacar las columnas, se colocaron en el fondo de la columna una base de 1cm de algodón estéril seguido por un filtro de 0.20 mm, posteriormente se colocó el soporte húmedo inoculado con cuidado de evitar su compactación, y finalmente se colocó un filtro y una base de algodón de 1 cm.

Las columnas que se utilizaron fueron de 150 mm de largo x 21mm de DI, con un volumen de 52 cm<sup>3</sup> y se empacaron a una densidad de 0.144 g/cm<sup>3</sup>, considerando que el volumen para el empaquetamiento fue de 41.5 cm<sup>3</sup>.

A las columnas empacadas, se les adaptó un burbujeador de vidrio con agua destilada estéril, por donde se hizo pasar aire húmedo a un flujo de 0.05 L/gh (Litro de aire por gramo de soporte húmedo por hora). Las columnas con los burbujeadores, se colocaron en un baño de agua a 30°C. Para el caso particular de la columna de poliuretano, el soporte se cortó en cilindros de 21 mm de diámetro por 1 cm de grosor, para dar el mismo pre-tratamiento al PUF que antes se menciona.

En todos los sistemas tanto en columna como en matraz se utilizó 6 g de soporte húmedo (impregnado con medio de producción), sin embargo la cantidad de soporte varió de acuerdo a la capacidad de retención de líquido del soporte utilizado.

SOPORTE	Capacidad de retención ml/g de soporte	g de soporte por matraz y columna requerido para 6ml de Medio de cultivo
POLIURETANO	28.6	0.21
BAGAZO DE CAÑA	23.6	0.252
SALVADO DE TRIGO	19.04	0.315

## 6.6 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL.

### 6.6.1 Fermentación líquida convencional.

En la FL, se utilizó 50 mL de medio de producción de lovastatina 1X, por matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos fueron inoculados a una concentración de  $2 \times 10^6$  esporas/mL e incubados a 30°C a una agitación de 230 r.p.m.

### 6.6.2 Fermentación líquida con la Adición de soporte.

En este caso se cortó el soporte PUF a las medidas requeridas para cada tratamiento, para posteriormente ser pre-tratado como se describe anteriormente. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml que se esterilizaron junto con la cantidad y conformación de soporte correspondiente al tratamiento. Después se impregnó con 50 mL de medio de cultivo de producción de lovastatina 1X ya inoculado. Se incubó a 30°C a una agitación de 230 r.p.m.

### 6.6.3 Fermentación líquida con Adición de peróxido de hidrogeno.

En este caso se emplearon sistemas de fermentación líquida convencional, previo a la inoculación se adicionó la cantidad de peróxido de hidrogeno (9.8 M)\* (Sigma-Aldrich), necesario para alcanzar la concentración requerida, es importante adicionar esta después de esterilizar el medio de cultivo y una vez que el medio estuvo frío, ya que el peróxido es sensible al calor, se procedió a inocular el medio inoculados a una concentración de  $2 \times 10^6$  esporas/mL e incubar a 30°C a una agitación de 230 r.p.m.

Para medir la concentración del stock de  $H_2O_2$  y emplearlo a la concentración deseada, se empleó su coeficiente de extinción molar ( $E=43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), y empleado la fórmula  $A=E \cdot M \cdot L$ , donde A= Absorbancia a 240 nm, M=molaridad y L=Longitud del haz (=1).

## 6.7 SILENCIAMIENTO DEL GEN *atyap1*.

### 6.7.1 Diseño de oligos del gen *atyap1* para el silenciamiento.

Para el diseño de los oligos, se localizó el gen *atyap1* en las bases de datos NCBI del microorganismo *Aspergillus niger*: se encontró en el gen 1934. Se realizó un análisis dentro del genoma de *Aspergillus terreus*, tipo BLASTn buscando el gen *atyap1*, y se encontró una posible proteína con el número de acceso Genbank: ATEG\_06718.1 para el gen, a partir de esta se diseñaron los primers, usando el Exon 2 buscando regiones que no tuvieran corte de *NcoI* dentro del fragmento; ese corte sí se incorporó en los primers diseñados, para poder clonar el fragmento amplificado dentro del vector de silenciamiento que tiene un corte para esa enzima (Anexo A).

#### YAP1RNAiF:

TTCCGCTATCAATGCCATGGCCGGAGC

#### YAP1RNAiR:

GATTCCTGCCCATCCATGGTGTATAGG

### 6.7.2 PCR para la obtención del fragmento del gen *atyap1*.

Se realizó un PCR con gradiente de temperatura, para determinar la temperatura óptima de obtención del fragmento del gen *atyap1* para realizar el silenciamiento, con las siguientes condiciones:

H <sub>2</sub> O grado Biología Molecular (MoBio Laboratorios)	80.0 µL	Programa en el termociclador
Buffer 10X	10.0 µL	1. 94°C @ 3min Desnaturalización
MgSO <sub>4</sub> 100uM	2 µL	2. 94°C @ 30seg Desnaturalización
dNTPs 10uM	2 µL	3. 63 - 70 °C @ 50seg Hibridación
YAP1RNAiF 10mM Fower	2.5 µL	4. 72 °C @ 1.30 minutos Elongación
YAP1RNAiR 10mM Reversa	2.5 µL	5. GOTO 2-4 Repetición 30 veces
ADN genómico (1ug/ul)	1.0 µL	6. 72°C @ 5 minutos Elongación Final
ADN polimerasa Vent (BioLabs)	0.5 µL	7. HOLD @ 4.0°C
<hr/> Total	<hr/> 100 µL	

El producto de este se corrió en un gel de electroforesis y se determino la temperatura optima el PCR. Posteriormente se realizó un PCR con la temperatura óptima (68.5°C) con las condiciones antes mencionadas, el producto de este se purifico con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, posteriormente se corrió en un gel de electroforesis y se determino la concentración usando el Nanodrop2000 Thermo Scientific ®. El producto obtenido se mando secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular UAM Iztapalapa.

### 6.7.3 Ligación de gen *Atyap* al vector *pJet 1.2/blunt*.

El producto de PCR purificado se clonó dentro del vector *pJet1.2/blunt* (ThermoScientific®) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de la ligación, se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α12. Las transformantes obtenidas se analizaron por la técnica de Lisis Alcalina.

### 6.7.4 Digestión con *NcoI* del vector *pJet -atyap1*.

El inserto de *atyap1* (553 pb) con extremos *NcoI*: se obtuvo por digestión del ADN plasmídico de *pjet-yap1* con la enzima *NcoI* Invitrogen® (enzima sin actividad star) (5'CCATGG3'), el cual se purificó con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, posteriormente se corrió en un gel de electroforesis y se determinó la concentración usando el Nanodrop 2000 Thermo®.

Condiciones de Digestión:

H <sub>2</sub> O BM°	16.0 µL
Buffer Tango 10X	2.0 µL
ADN ( <i>pJet-yap1</i> ) (45 ng/ul)	2.0 µL
Enzima <i>NcoI</i> Fermentas®	1.0 µL
<hr/>	
Total	20.0 µL

A 37°C durante toda la noche, finalizada la reacción se guarda a -20°C.

### 6.7.5 Amplificación del vector *pGdpKi-RNAi*.

Se realizó la transformación del vector de *pGdpPki-RNAi*, en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α a través de la electroporación obteniéndose varias colonias las cuales se seleccionaron y aislaron. Se obtuvo el ADN plasmídico de estas colonias por lisis alcalina para su análisis.

### 6.7.6 Digestión con *NcoI* del vector *pGdpKi-RNAi*.

El ADN plasmídico obtenido se analizó a través de la digestión con *NcoI* Invitrogen® (enzima sin actividad star), para llevar a cabo la linealización del vector, finalmente el producto se purificó (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System), obteniéndose así el vector con extremos *NcoI* purificado el cual se corrió en un gel de electroforesis y se determinó la concentración usando el Nanodrop2000 Thermo Scientific®.

Condiciones de Digestión:

H <sub>2</sub> O BM°	14.0 µL
Buffer Tango 10X	2.0 µL
ADN ( <i>pGdpKi-RNAi</i> ) (47ng/ul)	2.0 µL
Enzima <i>NcoI</i> Fermentas®	1.0 µL
<hr/>	
Total	20.0µL

A 37°C durante toda la noche, finalizada la reacción se guarda a -20°C.

### 6.7.7 Desfosforilación del vector *pGdpKiRNAi/ NcoI*.

Con el fin de evitar la religación del vector, se realizó la desfosforilación de *pGdpPki-RNAi* con extremos *NcoI* purificado, eliminado un grupo fosfato del extremo 5', con las siguientes condiciones:

H <sub>2</sub> O BM°	12.5 µL
Buffer 10X	2.0 µL
ADN ( <i>pGdpKiRNAi/ NcoI</i> ) (5mg/ul)	5.0 µL
SAP (Thermo Scientific ®)	0.5 µL
Total	20.0 µL

A 37°C durante 3horas.

Finalizando la reacción se inactivo la enzima por calor a 65°C por 5 minutos, la reacción se guarda a -20°C, después se corrió 2µl de la reacción para observar que el vector no esté degradado.

### 6.7.8 Ligación vector - inserto *pGdpKiRNAi-yap1*.

Se realizó la ligación entre el vector *pGdpPki-RNAi* (digerido con *NcoI* y desfosforilado) con la sonda de *atyap1* (553pb) (digerido con *NcoI* y purificado) usando una relación de 20 a 1, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Proporcion} \frac{\text{Incerto}}{\text{Vector}} = \frac{\frac{\text{ng Incerto}}{\text{Kb Incerto}}}{\frac{\text{ng Vector}}{\text{Kb Vector}}}$$

$$\text{ng Incerto} = \frac{\text{ng Vector} * \text{Kb Incerto}}{\text{Kb Vector}} * \frac{\text{Incerto}}{\text{Vector}}$$

Donde el vector *pGdpPki-RNAi* es de 6.3Kb y el fragmento *atyap1* tiene 553pb o 0.553kb. La reacción se llevo a 10°C durante 24h con las siguientes condiciones:

H <sub>2</sub> O BM°	1 µL
Buffer 5X	2 µL
Vector (5ng)	4 µL
Inserto (8ng)	2 µL
Ligasa T4 DNA Invitrogen®	1 µL
<hr/>	
Volumen Final	10

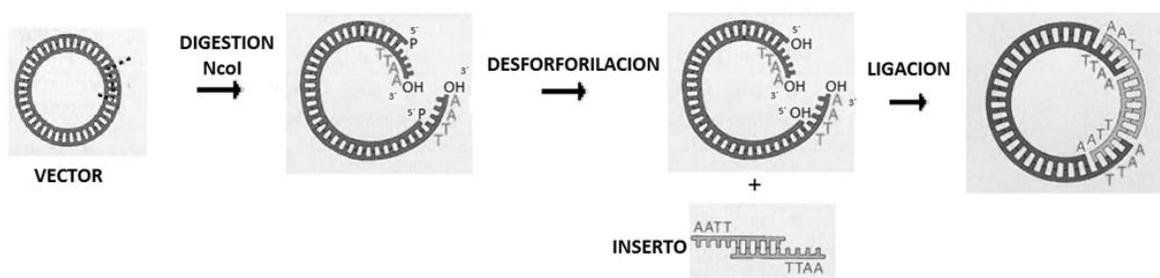


Figura 14. Diagrama de la construcción de *pGdpKiRNAi-yap1*.

### 6.7.9 Transformación *pGdpKiRNAi-yap1*.

Se realizó la transformación de la ligación de *pGdpPki-RNAi-yap1*, en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ 12 a través de la electroporación utilizando los siguientes controles:

Tabla 1. Controles para la transformación de *pGdpPki-RNAi-yap1*, en electrocompetentes de *E.coli*

Tratamiento	Objetivo	Observaciones
Electrocompetentes Medio: sin ampicilina	VERIFICA ELECTROCOMPETENTES	Si crece indica que las células electrocompetentes son viables Al contrario si no hay crecimiento las células electrocompetentes no son funcionales y se tiene que proseguir a elaborar nuevas.
Electrocompetentes medio: con ampicilina	VERIFICA MEDIO DE CULTIVO	Si no crece indica que el medio contiene la ampicilina necesaria para inhibir el crecimiento de células sin vector. Si crece puede indicar que el medio no tiene la suficiente ampicilina para inhibir el crecimiento o que la ampicilina ya no sirve se ha degradado o que las células electrocompetentes tengan ya la resistencia a ampicilina. Para solucionarlo se elabora nuevo medio de cultivo con ampicilina funcional si se sigue observando el mismo comportamiento se pueden analizar las electrocompetentes para verificar que no tenga algún plásmido que les confiera resistencia así mismo elaborar nuevas células electrocompetentes.
Transformantes con resistencia a ampicilina Medio: con ampicilina	VERIFICA MEDIO DE CULTIVO	Si crecen verifica que el medio permite el crecimiento para aquellas que tienen resistencia y que la inhibición del crecimiento sea por la ampicilina y no por algún otro factor como alguna carencia de algún factor nutricional. Si no crece se puede deber a que medio contenga un exceso de ampicilina o que las transformantes ya han perdido la resistencia a la ampicilina o no son viables. Para solucionarlo se prosigue a verificar con otras transformantes el medio de cultivo si se observa de nuevo que no hay crecimiento, se puede sembrar en nuevo medio con y sin ampicilina para ver su comportamiento.
Transformantes con vector sin digerir Medio: con ampicilina	VERIFICA TRASFORMACIÓN Y VECTOR	Si ha crecimiento verifica la viabilidad del vector así como que la transformación se llevo a cabo correctamente. Si no hay crecimiento se puede llevar a cabo la prueba con otro vector o en otras condiciones la transformación para verificar cuál de estos factores está fallando.
Transformantes con vector digerido Medio: con ampicilina	VERIFICA DIGESTIÓN	Si no crece es que todo el vector esta lineal, esto implica que la digestión del vector se llevo a cabo correctamente. El numero de colonias que crezcan nos indica la cantidad de vector circular ya sea por recircularizacion o que no se digirió. Si hay crecimiento es que el vector no se digirió correctamente o que se esta recircularizando. En general la digestión se tiene que purificar y verificar que el vector este linealizado antes usarlo.
Transformantes con vector digerido y ligado Medio: con ampicilina	VERIFICA LIGACIÓN	Si hay crecimiento quiere decir que la ligasa está funcionando adecuadamente, se tiene que observar la misma cantidad de colonias que en la caja del vector sin digerir. Si no hay crecimiento se puede deber a que el vector no sea viable se haya degenerado o que la reacción de la ligasa tenga alguna deficiencia esta puede ser el Buffer que no contenga ATP, el tiempo de reacción sea insuficiente, la temperatura no sea la adecuada o que la ligasa haya perdido su actividad.
Transformantes con vector digerido y desfosforilado Medio: con ampicilina	VERIFICA DESFOSFORILACIÓN FONDO DE LA LIGACIÓN CON VECTOR DESFOSFORILADO	Si no hay crecimiento es que la desfosforilación es óptima y no hay recircularización del vector. Si hay crecimiento es que el vector se está recirculando, para ello hay que mejorar las condiciones de la reacción de la desfosforilación: temperatura tiempo y concentración.
Transformantes con vector digerido desfosforilado y ligado Medio: con ampicilina	VERIFICA DESFOSFORILACIÓN FONDO DE LA LIGACIÓN VECTOR- INSERTO	Si no hay crecimiento es que la desfosforilación es óptima y no se religa el vector con sí mismo. Entre menor sea el numero de colonias nos garantiza mejores condiciones para la ligación vector-inserto. Si un gran número de colonias (mayor a 30) es que las condiciones de la desfosforilación no son las correctas y la ligasa sigue religando al vector.

Una vez que se llevo a cabo la transformación de la ligación de *pGdpPki-RNAi-yap1*, las colonias se aislaron y se analizaron por lisis alcalina. El ADN plasmídico obtenido de colonias se analizó a través de la digestión de con *NcoI* Invitrogen® (enzima sin actividad star), se corrió en un gel de electroforesis para verificar la ligación esperándose el vector y el fragmento insertado.

Condiciones de Digestión:

H <sub>2</sub> O BM°	14.0 µL
Buffer Tango 10X	2.0 µL
ADN (pGdpKi-RNAi) (47ng/ul)	2.0 µL
Enzima <i>NcoI</i> Fermentas®	<u>1.0</u> µL
Total	20.0 µL

A 37°C durante toda la noche, finalizada la reacción se guarda a -20°C.

Una vez que se encontró las colonias que contenían el vector de la ligación de *pGdpPki-RNAi-yap1*, se purifico el producto de la lisis alcalina utilizando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, después este se cuantifico en el Nanodrop2000 Thermo Scientific®. El producto de la digestión obtenido se mando secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular UAM Iztapalapa.

Las condiciones de transformación en *A. terreus*, están descritas en 6.3.7 técnicas moleculares, empleando fleomicina como marcador de selección respectivamente, en donde se lleva a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria de fleomicina para protoplastos de la cepa parental. Después se procede a realizar el protocolo para transformación de *A. terreus* por protoplastos utilizando los siguientes controles:

Tabla 2. Controles para la transformación de *pGdpPki-RNAi-yap1*, en protoplastos de *A. terreus*.

TRATAMIENTO	Objetivo
MEDIO: sin fleomicina, Inoculo: protoplastos	Verificar la viabilidad de los protoplastos
MEDIO: con fleomicina, Inoculo: protoplastos	Verifica sensibilidad fleomicina
MEDIO: con fleomicina, Inoculo: con transformantes con el vector pGdpKiRNA	Verifica que la transformación se lleve a cabo correctamente, así como el funcionamiento de la resistencia a fleomicina proporcionada por del vector.
MEDIO: con fleomicina Inoculo: con transformantes con el vector pGdpKiRNA- <i>yap1</i>	Se obtienen las transformantes con el gen <i>yap1</i> silenciado.

Una vez obtenidas las transformantes se seleccionan y aíslan en medio con fleomicina, posteriormente se obtienen esporas en medio Power que se guardan en glicerol al 80% para después proceder a su análisis.

#### **6.7.10 Selección de las transformantes *Δatyap1*.**

Una vez que se obtienen las transformantes *Δatyap1* se tiene que seleccionar aquellas que prometan tener las diferencias o las características más sobresalientes de acuerdo al comportamiento esperado, para ellos se estableció parámetros para poder seleccionar la transformante más característica del silenciamiento de *atyap1* los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- Sensibilidad a peróxido de hidrogeno
- Crecimiento radial
- Esporulación
- Inicio en la producción de lovastatina

#### **6.7.11 Sensibilidad de las esporas para Peróxido de hidrógeno.**

De las transformantes a analizar y de la cepa parental se obtienen esporas frescas usando medio Power, estas se cuantifican usando la cámara de Neubauer, se procede a preparar una solución de  $1 \times 10^4$  esporas/mL por cada transformante obtenida junto con la cepa parental usando solución isotónica.

Se preparan soluciones de  $H_2O_2$  de 0 a 180  $\mu$ M. En una serie de tubos eppendorf se adicionar lo siguiente:

Tomar 0.1 mL (100  $\mu$ L) de la solución de esporas ajustada a  $1 \times 10^4$  esporas/mL.

Adicionar 0.9 mL (900  $\mu$ L) de la concentración correspondiente de  $H_2O_2$  mM.

Esto para cada transformante a analizar, se dejar reposar durante 15 minutos. Una vez finalizado el tiempo se tomo 0.1 mL (100  $\mu$ L) de esta solución y se sembraron en cajas de petri de 10 cm conteniendo 40 mL de medio PDA, por duplicado, se extiende con un asa de vidrio sobre la caja petri. Se Incubo a 30°C durante 24 horas. Finalmente se cuenta el número de colonias presentes por caja.

#### **6.7.12 Crecimiento radial.**

De las transformantes a analizar y de la cepa parental se obtienen esporas frescas usando medio power, estas se cuantifican usando la cámara de Neubauer, se procede a preparar una solución de  $10^4$  esporas/mL por cada transformante obtenida junto con la cepa parental usando solución isotónica. De estas se siembra en cajas con 40 mL de medio PDA, sumergiendo un palillo en la solución de esporas y después pinchando el medio en el centro de la caja, esto para cada cepa a realizar por duplicado. Se monitorea el crecimiento radial midiendo el diámetro en cm a través del tiempo.

### 6.7.13 Esporulaci3n.

De las transformante a analizar y de la cepa parental se obtienen esporas frescas usando medio Power, estas se cuantifican usando la c3mara de Neubauer, se procede a preparar una soluci3n de  $10^6$  esporas/mL por cada transformante obtenida junto con la cepa parental usando soluci3n isot3nica, se siembran 50  $\mu$ L de esta soluci3n en matraces con 40 mL de medio Power esparciendo la soluci3n sobre la superficie del medio con ayuda de una asa de vidrio, se Incubo a 30°C, se cuantifica el crecimiento de esporas usando la c3mara de Neubauer.

### 6.7.14 Confirmaci3n de la integraci3n del vector al genoma de *A. terreus*.

Para este an3lisis se realiz3 el dise1o de los primer's que amplificaran una regi3n del vector (Promotor pki), as3 como una parte del fragmento insertado (*atyap1*), con este fragmento se realiza una hibridaci3n con el ADN de las transformantes y la cepa parental a traves de las t3cnica de Southern blot.

Primers pki1

Fower

5' GTGCCTGAGGATGTAGTGG 3'

Tm 66.4°C

Tama1o: 787pb

Reversa

5' TTGCGGTGTTGAGAGAATCC3'

Tm 64.8°C

Se realiza la extracci3n de ADN gen3mico de las transformantes a analizar as3 como de la cepa parental como se menciona en t3cnicas moleculares. A partir de estos se realizaron PCR usando los dos juegos de primer's bajo las siguientes condiciones:

H <sub>2</sub> O BM°	80 $\mu$ L	Programa en el termociclador
Buffer 10X	10 $\mu$ L	
MgSO <sub>4</sub> 100uM	2 $\mu$ L	
dNTPs 10uM	2 $\mu$ L	
Fower 10mM	2.5 $\mu$ L	
Reversa 10mM	2.5 $\mu$ L	
ADN gen3mico (1ug/ul)	1.0 $\mu$ L	
ADN polimerasa Vent (BioLabs)	0.5 $\mu$ L	
Total	100 $\mu$ L	
		8. 94°C @ 3min Desnaturalizaci3n
		9. 94°C @ 30seg Desnaturalizaci3n
		10. 63 - 67 °C @ 50seg Hibridaci3n
		11. 72 °C @ 1.30 minutos Elongaci3n
		12. GOTO 2-4 Repetic3n 30 veces
		13. 72°C @ 5 minutos Elongaci3n Final
		14. HOLD @ 4.0°C

## **6.7.15 CARACTERIZACIÓN DE LAS TRANSFORMACIÓN *atyap1*.**

### **6.7.15.1 Sensibilidad del micelio al peróxido de hidrógeno.**

De las transformantes a analizar y de la cepa parental se obtienen esporas frescas usando medio Power, estas se cuantifican usando la cámara de Neubauer. Se procede a preparar una solución de  $10^8$  a  $10^2$  esporas/ml por cada transformante y la cepa parental. Se prepara cajas de petri con medio PDA usando diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno de 0 a 800  $\mu$ M. Nota el peróxido de hidrogeno es sensible al calor por lo que se adiciona al medio estéril y frio antes de verterlo en las cajas petri.

Se marcaron las cajas por la concentración y la ubicación de cada transformante a sembrar. Se toman 15  $\mu$ L de la solución de esporas correspondiente y se colocaron en la posición asignada. Se realizar esto para cada transformante en cada caja con la concentración de peróxido, por duplicado.

### **6.7.15.2 Producción de lovastatina, Expresión de Genes, Biomasa, Humedad, pH y EROs.**

Se compara la producción de lovastatina de la transformante seleccionada del silenciamiento de *atyap1* con la cepa parental de *A. terreus*, en FL (fermentación líquida convencional) y FS (matraz cerrado) por duplicado usando la metodología antes mencionada para este tipo de fermentaciones. En el caso de la comparación de la Expresión de Genes, Biomasa, Humedad, pH y EROs, se realiza como se describe en las técnicas analíticas y moleculares, tanto para la transformante  $\Delta$ *atyap1* así como para la cepa parental.

## **6.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS.**

### **6.8.1 Lovastatina.**

#### **EXTRACCIÓN DE FS.**

Se peso 1 g de soporte húmedo, al cual se le adiciono 10 mL de acetonitrilo al 50% con agua, con agitación durante 30 min a 250 rpm y después 30 min en el sonicador (Branson 120), la muestra se paso a través de una membrana de 0.40 mm de poro (Millipore). Las muestras se guardaron en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

#### **EXTRACCIÓN DE FL.**

Se tomaron dos tipos de muestra, una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo, al cual se le adicionaron 2 mL de acetonitrilo al 50 %; la otra proveniente del micelio, se peso 1 g de micelio húmedo el cual se paso a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo al 50 %, seguida de una agitación en el vortex durante 2 min. Los tubos se colocaron en el sonicador durante 30 min, la muestra se paso a través de una membrana Millipore de 0.40 mm de poro. Todas las muestras fueron guardadas en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

## CUANTIFICACIÓN.

Se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4 mm), con una fase móvil de acetonitrilo: ácido fosfórico 0.1 % (50% v/v), la velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min, y la forma  $\beta$ -hidroxiácida se determinó a 238.

## CURVA PATRÓN.

Se utilizó el procedimiento que se describe en Miranda et al. 2013, con las siguientes modificaciones, se realizó una conversión de la lovastatina de su forma Lactona a su forma  $\beta$ -hidroxiácida, se usó lovastatina (Fermic S.A. de C.V.), se disolvieron en 50 mL de NaOH 0.1:25% ACN, se incubó a 45°C durante 1h y después se ajustó a pH 7.7 con HCl 0.1 N:ACN, finalmente se guardó en alícuotas a -20°C. Este proceso asegura un 98% de conversión de la forma lactona a la forma  $\beta$ -hidroxiácida (Yang & Hwang 2006), sin embargo, hubo que confirmarlo mediante HPLC, para obtener una curva patrón con las concentraciones reales de la forma  $\beta$ -hidroxiácida.

### 6.8.2 Determinación de Biomasa y humedad.

En FL, la biomasa y la humedad se determinó por peso seco, filtrando todo el contenido de un matraz a través de un papel filtro de peso conocido, y secando a 80 °C durante 48 h, hasta peso constante.

En el caso de FS, se determinó indirectamente usando el contenido de glucosamina. Se tomaron unos cubos de soporte húmedo y se secaron al horno a 60 °C durante 48 h; por diferencia de peso se conoció la humedad. La biomasa se determinó por el método de Glucosamina (Marcial et al. 2011).

### 6.8.3 Cuantificación de pH.

FS: Se tomó 1 g de soporte húmedo en 10 mL de agua. La mezcla fue sometida al vortex durante 2 min, el pH fue medido directamente en el líquido resultante.

FL: Se tomó directamente del caldo de fermentación después de haber filtrado el micelio. En las fermentaciones híbridas se toma el pH del caldo.

### 6.8.4 Cuantificación de EROs.

Se utilizó el procedimiento que se describe en Miranda et al. 2013, con las siguientes modificaciones. Los derivados de fluoresceína como el dichlorofluoresceína, (DCFH), no son fluorescentes después de ser oxidada por varios oxidantes, se convierten en DCF y emiten fluorescencia. La producción de EROs intracelular se detecta utilizando una sonda fluorogénica, no fluorescente que es permeable para las células, diacetato 2'-7'-dichlorofluoresceína (DCFH-DA). DCFH-DA es hidrolizado por esterasas intracelulares y luego oxidada por los EROs a un compuesto fluorescente 2'-7'-DCF. Las placas negras reducen el ruido de fondo la contaminación cruzada lumínica entre pocillos en ensayos de fluorescencia.

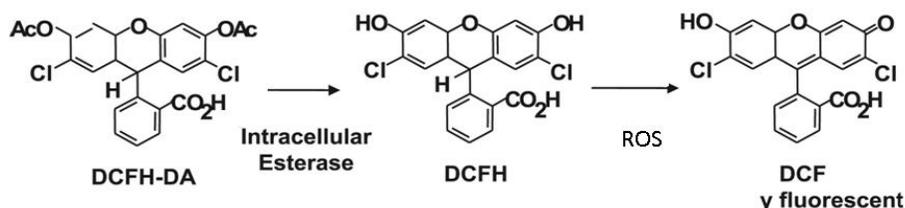


Figura 15. Mecanismo de reacción de la DCF (Sigma-Aldrich).

La oxidación de la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA (Sigma-Aldrich) por las EROs, se midió a través de una cinética. A 10 mL de PBS<sup>1</sup> con una concentración de 20 mM H<sub>2</sub>DCF-DA, se le adicionaron 50 mg de micelio de FL o en su caso, 0.5 g de cultivo sólido de FS. La reacción se incubó en condiciones de oscuridad y en hielo durante 40 min. Transcurrido el tiempo, cada muestra se filtró, se lavo con 100 mL de PBS<sup>1</sup>, se congeló y se molió con N<sub>2</sub> líquido (con ayuda de mortero y pistilo) todo en condiciones de oscuridad.

Aproximadamente 500 mg del polvo (micelio molido y congelado), se adicionaron a un microtubo de 1.5 mL negro (o ámbar) previamente pesado, y a éste se le adicionó 1 mL de PBS<sup>1</sup> frío todo en condiciones de oscuridad. El tubo fue vortexeado durante 20 seg y centrifugado a 12,000 x g a 4°C por 15 min, se guardan a 4°C. A las 48h se tomaron 200 µL del sobrenadante y se colocaron sobre un placa de 96 pozos para fluorescencia, la cual se leyó en el lector multimodal DTX 880 Multimode Detector (Beckman-Coulter, Inc, Brea, CA, USA), empleando 485 nm de excitación y 530 nm de emisión todo en condiciones de oscuridad.

Se realizó el mismo procedimiento, pero sin emplear la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA (control negativo), al final a la fluorescencia emitida en las muestras tratadas con la sonda, se les restó la fluorescencia del control negativo. La normalización de la Fluorescencia (dado en Unidades Relativas de Fluorescencia o URF) se obtuvo al dividir éste resultado entre el contenido de biomasa, en FL por peso seco y en FS por glucosamina. Todo se realizó por triplicado.

#### **6.8.5 Muestreo para expresión de genes.**

FS: En una bolsa de aluminio de 5x5 cm etiquetado, se colocaron de 5 cubos de soporte húmedo, los cuales se congelaron con N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

FL: Una vez separado por filtración el caldo del micelio, se tomo el micelio se coloco dentro de una bolsa de aluminio de 5x5 cm etiquetada y se congelo con N<sub>2</sub> liquido. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

<sup>1</sup>PBS: NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mmol/L, pH 7.4 se esteriliza y se guarda en refrigeración.

## 6.9 TÉCNICAS MOLECULARES.

### 6.9.1 Extracción de ADN genómico de *Aspergillus terreus*.

Se pusieron a germinar esporas frescas de *A. terreus* sobre medio completo. Se incubaron a 30°C durante 20h. El micelio producido se recogió y se colocó en una caja de Petri para luego ser congelado con N<sub>2</sub> líquido. El micelio se guardó a -70°C hasta su procesamiento. El micelio congelado se molió y se hicieron alícuotas de 0.5mL del volumen del tubo eppendorf. A cada tubo, se le adicionaron 800 µL de BE<sup>2</sup>, se incubó a 68°C durante 30 min. Se centrifugó 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregó 50 µL de acetato de potasio 5M pH 4.2, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 10min. Se centrifugó 5min. Del sobrenadante se tomaron 700 µL y se le adicionaron 700 µL de isopropanol. Se centrifugó 5min, se resuspendió en 400 µL de TE<sup>3</sup>, y se le adicionaron 40 µL de acetato de sodio 3M pH 7.0. La mezcla se calentó a 68°C durante 1 h. Para solubilizar, se mezcló por agitación en vortex. Se le adicionó 1 mL de etanol al 95% y se centrifugó durante 5 min. La mezcla se lavó 2 veces con 800 µL de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100 µL de TE<sup>3</sup> con 100 mg/mL de RNAsa. La mezcla se incubó a 37°C durante 1.5h. Después, se le adicionaron 300 µL de TE<sup>3</sup>. Se extrajo con 1 volumen de CIA<sup>4</sup>. Se centrifugó durante 5 min. Se le agregó 1 µL por cada 10 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2, más 700 µL de etanol frío (2.5 vol.). Se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70%. Se secó y resuspendió en 30 µL de H<sub>2</sub>O desionizada (Miranda et al. 2008).

### 6.9.2 Preparación de electrocompetentes *E.coli* DH5α.

Se sembraron células de *E.coli* DH5α en cajas con medio LB durante 16 h y 37°C. De una colonia aislada, se inocularon 10 mL de medio LB y se incubaron a 37°C a 150 r.p.m., hasta que se obtuvo una densidad de 0.5 a 0.6 a 600 nm (aproximadamente 2 h). Cuando se llegó a la densidad requerida, los matraces se incubaron en un baño de hielo por 15 min y posteriormente se centrifugaron 10 min a 5000 rpm. El sobrenadante fue decantado y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de agua helada. Se agregaron 500 mL de agua helada y se centrifugaron 10 min a 5000 rpm, el sobrenadante fue retirado y la pastilla se volvió a resuspender en 5 mL de agua fría, posteriormente se añadió 250 mL de agua helada, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se retiró y la pastilla fue resuspendida en 20 mL de glicerol al 10% (frío). Se mezcló bien y todo se transfirió a un tubo falcón de 50 mL. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró y se resuspendió en 2 mL de glicerol frío al 10%. Se formaron alícuotas de 40 mL por tubo eppendorf previamente enfriados con N<sub>2</sub> líquido y se guardan a -70°C (Miranda et al. 2008).

### 6.9.3 Transformación en *E. coli* DH5α.

Se empleó el método de electroporación, para lo cual se prepararon células electrocompetentes. Se emplearon celdas de 0.1 cm, y se realizó lo siguiente: 60 mL de células electrocompetentes se colocaron en el fondo de la celda, se adicionaron 3 mL de mezcla de ligación. Esta mezcla se colocó dentro del electroporador, y se le dio un voltaje de 1100 V. Las transformantes obtenidas fueron recogidas y resembradas en medio de LB con ampicilina.

<sup>2</sup>BE: Buffer de extracción: EDTA 50 mM y SDS 0.2%.

<sup>3</sup>TE: Tris-EDTA pH 8.0 (EDTA 1mM y Tris-HCl 10mM 1:1)

<sup>4</sup>CIA: Cloroformo- Alcohol Isoamílico 24:1

#### 6.9.4 Lisis alcalina: técnica para obtener ADN plasmídico.

Se utilizó el procedimiento que se describe en Miranda et al. 2013, con las siguientes modificaciones. Se colocaron cultivos de una noche de las células a analizar. Se centrifugaron 1.5 mL de cultivo durante 2 min a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con ayuda del vortex en 200  $\mu$ L de la solución I<sup>5</sup> hasta la homogeneidad. Se le adicionaron 200  $\mu$ L de la solución II<sup>6</sup> (preparada al momento) mezclando por inversión durante 5 min hasta que el lisado estuviera claro. Se agregó también 200  $\mu$ L de la solución III<sup>7</sup>, se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 15 min. Se adicionan 300  $\mu$ L de cloroformo (para precipitar proteínas), se mezcló bien por inversión durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante se volvió a transferir a otro tubo, adicionándole 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión durante 5 min y dejando a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm para bajar el ADN. El sobrenadante fue removido y desechado, el tubo se secó y se le agregó 1 volumen de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó durante 3 min, se desechó el sobrenadante. La pastilla de ADN se secó y resuspendió en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>BM</sub> y se trató con RNAsa. Se guarda finalmente a -20°C.

#### 6.9.5 Electroforesis y cuantificación de ADN.

Para la cuantificación se empleó el Nanodrop2000 (Thermo Scientific®) se empleó el programa de ADN usando a 260, 230 y 280 nm de absorbancia. La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa al 0.8%, Tampón de carga 6X<sup>8</sup>, en TAE 1X<sup>9</sup> a 80V. Como marcador de tamaño utilizado fue el de 1kB de Fermentas®. Para revelar el gel uso Bromuro de etidio (500  $\mu$ g/ $\mu$ L) durante 30 min, se utilizó el Gel DOC EZ Imagen BioRad® para tomar las imágenes.

<sup>5</sup>Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM TRIS pH 8.0 y 10 mM EDTA pH 8.0.

<sup>6</sup>Solución II. 400 ml H<sub>2</sub>O; 50ml SDS 10% y 50ml NaOH 2N.

<sup>7</sup>Solución III: 5 M Acetato de Potasio, ácido acético glacial.

<sup>8</sup>Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25%, Sacarosa al 40% y xileno cianol al 0.25%. Se esteriliza por 20 min a presión. Se guarda a 4°C.

<sup>9</sup>TAE50X: 57.1ml Ácido acético glacial, 100ml de EDTA 0.5 M pH 8, 0.242g Tris-base y agua destilada hasta completar 1 L, se guarda en la oscuridad.

### 6.9.6 Transformación por protoplastos.

Las condiciones de transformación en *A. terreus*, fueron las mismas empleadas y descritas por Aguirre *et al.* 2005, con las siguientes modificaciones:

Producción de protoplastos de *A. terreus*, condiciones estériles.

En un tubo falcón se agregaron 10 mL de SP2X<sup>10</sup> y se pone en hielo, después se agrega 150 mg de enzimas líticas Invitrogen® con espátula estéril en papel aluminio. Se agito en vortex y se dejo reposar por 5 min, se filtraron con milipore en microfiltro de 0.22  $\mu$ m, se deja la solución en hielo. El cultivo de micelio en medio completo se monitorea a las 20 horas (10  $\mu$ l), Cuando se observo en el microscopio poca ramificación, se junto el micelio en un solo matraz para después filtrarlo. Se lavo con 100 mL de NaCl 0.9%, enjuagando los matraces, y finalmente lavo el micelio en el filtro. Una vez lavado el micelio se pasa del filtro al papel absorbente para secarlo poniendo en contacto el papel por encima y por debajo del micelio. En la campana se peso 1g de micelio seco, se coloco en un matraz de 250 mL y se agrego 10 mL de SP2X/Enzimas líticas hecha anteriormente. Se incubo a 30°C a 80 rpm y se monitoreo 10  $\mu$ L cada hora en el microscopio para observar la formación de protoplastos, la reacción se para duro aprox. 3 horas: cuando se observaron protoplastos aislados el igual que conglomerados sin membrana, se filtro nuevamente el micelio, en el filtrado se encuentran a los protoplastos. El filtrado se centrifugo a 4000 rpm por 10 min a TA, se desecho el sobrenadante dejando 5mL con el pellet del fondo (protoplastos). Esta se resuspendió por inversión, para distribuir 1mL por tubo eppendorf; estos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min a TA, se tirar el sobrenadante. Se agrego al pellet 500  $\mu$ L de SP2X<sup>10</sup>, se resuspendió por inversión y centrifugo a 6000rpm por 7min a 4°C, se desecho el sobrenadante. Y se agrego nuevamente 500 $\mu$ L de SP2X<sup>10</sup>, se resuspendió por inversión y se centrifugo a 6000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavo el pellet con 1 mL de KCM<sup>11</sup>, se centrifugo a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Se tiro el sobrenadante dejando únicamente de 100 o 200  $\mu$ L para resuspender por inversión nuevamente el pellet y agregar 20  $\mu$ l de PCM<sup>12</sup>.

Transformación de protoplastos con DNA.

En hielo, en tubos nuevos de eppendorf, se agrego 15  $\mu$ L de DNA (plásmido con inserto) y a estos añadió 100  $\mu$ L de protoplastos, se mezclo por inversión y se deja reposar 20 minutos en hielo, se tomo uno como control donde no haya ADN. Se agrego 600  $\mu$ L de PCM<sup>12</sup>, mezclar por inversión y reposar 20 min a TA. Se agregar 600  $\mu$ L de KCM<sup>11</sup>, se mezclar bien dejar a TA hasta la extensión de la placa.

Extensión en placa.

Se preparo en tubos falcón estériles el medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) junto con su respectiva fleomicina, en placas petri chicas (5 cm), se vació 5 mL de medio a 50°C y dejar solidificar. En tubos falcón estéril se agrego el medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) junto con su respectiva fleomicina y 300  $\mu$ L de mezcla de trasformación por cada 5 mL de medio, vaciar en cajas de petri con bases anteriormente hechas y se dejo solidificar. Se incubo a 30°C por 5 días, monitoreo cada día.

<sup>10</sup>SP2X: KCl1.1M Acido Cítrico 0.1M pH 5.8 con KOH 1.1 M.

<sup>11</sup>KCM: KClO.7M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MES Monohidrato Cristalino 10 mM. pH 5.8 ajustar con HCl

<sup>12</sup>PCM: CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MES 10mM, PEG Polietilenglicol 8000 30% pH 5, ajustar con HCl

### 6.9.7 Northern-blot.

Se utilizó el procedimiento que se describe en Miranda et al. 2013, con las siguientes modificaciones.

#### Extracción de RNA.

Reactivo TRIZOL es un reactivo listo para el uso, diseñado para aislar el ARN de alta calidad total (así como el ADN y las proteínas) a partir de muestras de células y tejidos de origen humano, animal, vegetal, de levadura, o de origen bacteriano, dentro de una hora. El TRIZOL es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN de tamaño molecular grande o pequeño, este reactivo mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad de RNAsa, mientras que interrumpe las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de la muestra.

Cada muestra de micelio o soporte previamente congelada se trituró con N<sub>2</sub> líquido. Se llenaron los tubos a un volumen, para muestras de FL de 200 µL, y para el caso de muestras de FS de 400µL, los cuales se pusieron en N<sub>2</sub> líquido. A cada uno de estos tubos, se le adicionó 1 ml de TRIZOL (Invitrogen®), se mezcló por agitación con vórtex hasta su descongelación e incorporación total del reactivo. Para muestras de FS, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente (TA) y para muestras de FL, se incubaron durante 5 min a TA. Los tubos se centrifugaron a 4°C a 14000 rpm por 15 min. La fase acuosa se colectó y se colocó en un nuevo tubo. La precipitación se realizó con 500 µL de isopropanol y se almacenaron a -20°C durante 48h. Se centrifugó a 4°C a 14000 rpm por 30 min. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75%, se mezcló por agitación en vórtex y se centrifugó a 4°C a 7500rpm por 5 min. Finalmente el ARN se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC por cada tubo y se recolectó en un solo tubo.

#### Electroforesis en geles con Formaldehído.

Por cada 100 mL de solución de agarosa se necesitaron de 1.2 g de agarosa + 87 mL de agua (destilada estéril), la mezcla se fundió al microondas. Entre 50-55°C, se le agregaron 10mL de MAE10X<sup>13</sup>. En la campana de extracción, se le agregaron 3 mL de formaldehído al frasco. Tras gelificación, se colocaron dentro del tanque de electroforesis tampón MAE1X. Las muestras se colocaron dentro del pocillo del gel con Tampón de carga RNA 1.25<sup>14</sup> y se aplicó 80 volts durante 50 min. Las bandas se visualizaron con la luz ultravioleta, se tomó la foto y se procedió a la transferencia a membrana.

#### Cuantificación y Normalización del RNA.

Se cuantificó empleando el Nanodrop (Thermo Scientific) usando el programa para RNA a 260, 230 y 280nm de absorbancia. La normalización se lleva a cabo utilizando el programa de Imagen J (versión 1.43u) se calculan los pixeles de cada banda y se fija cual es la intensidad deseada ha alcanzar, sabiendo cuantos µL/ml por muestra.

<sup>13</sup>MAE10X: 0.2 M MOPS, 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA, ajustado a pH 7.0 con NaOH.

<sup>14</sup>Tampón de carga RNA x 1.25: 2.2mL formamida, 0.8 ml formaldehido, 0.5 mL de MAEx10, 0.4 ml de 80% glicerol, 0.1 mL de 2% azul de bromofenol, 20 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml) guardar a -20°C.

### Transferencia del RNA a Membrana Hybond-N+.

La transferencia se realizó por capilaridad como se describe a continuación: La cámara de transferencia se limpió con SDS 1% y se enjuagó con H<sub>2</sub>O-depc. Se colocó buffer SSC10X<sup>15</sup> en la cámara hasta los 2 bordes sin rebasarlos. Se colocó 1 tira larga de papel filtro 3MM<sup>16</sup> (Whatman) y se verificó que los extremos colgaran y fueran mojados por el buffer, enseguida se colocaron la 2da. y la 3er. tira. Con cuidado, se colocó el gel boca abajo (de manera que la transferencia se haga de la parte más plana), después se colocó la membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham, GE Healthcare), y después se colocaron los 3 cuadros de filtro 3MM<sup>16</sup> (al tamaño del gel), seguido de una torre de papel absorbente y/o papel periódico (altura aproximada de 15 cm). Se colocó un vidrio cuadrado (centrado) y un libro de aproximadamente 250 g. Se dejó O.N. Después la transferencia fue desmontada, quitando todo el peso hasta llegar a la membrana.

### Fijación del RNA a la membrana.

La membrana fue colocada sobre una placa o un soporte limpio con SDS al 1%. El RNA fue fijado mediante UV (UVC Crosslinker, Amersham Bioscience) empleando 70,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  de energía. La membrana se colocó dentro de SSC10X<sup>15</sup> y con ayuda de una lámpara de UV, se marcaron los ribosomales y carriles con lápiz.

### Marcaje de Sondas.

"Oligomarcaje" fue desarrollado como un método para etiquetar fragmentos de restricción de ADN a alta actividad específica para el uso como sondas de hibridación. El ADN para ser marcado es primero desnaturalizado y luego se mezcla con oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. Estos " oligómeros aleatorios " reconocen sitios al azar en el ADN y luego sirven como cebadores para la síntesis de ADN por una ADN polimerasa. Con el nucleótido dCTP marcado con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P y presente durante esta síntesis, se genera ADN altamente marcado.

Las sondas correspondientes a los genes *sod1*, *lovE*, *brlA*, *yap1*, fueron obtenidas por PCR, se calentó el tubo de la sonda (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) por 10 minutos, a 95°C (ebullición), después en hielo 5 minutos y se junto todo el líquido en la parte inferior del tubo con un pulso en centrifuga. Se adicionaron 45  $\mu\text{L}$  de la sonda (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) al tubo de marcaje kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham, GE Healthcare). Después se adiciono 5ul de marca radioactiva [<sup>32</sup>P]-dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), al tubo de marcaje y mezclar suavemente. Se incubo a 37°C por 30 minutos. Finalmente se adiciono 175  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1M para parar la reacción.

Tabla 3. Secuencias de oligos empleados para sondas

OLIGO	SECUENCIA	pb	Tm	REFERENCIA
<i>sod1</i>	TCCGTGGWGA CTCAARRTCWCCGG CKKCTTGGAGCCSWYGGMGTTACCC	281	72°C	Miranda et al. 2008
<i>brlA</i>	AACCGTCCCACTCCTATCCGGAAGG GCATGGTCGCGTAATGATGCATGGC	495	66°C	Miranda et al. 2008
<i>lovE</i>	GGGCCATGGCTGCGATCAAGGTATATTCA GCTGGATCCGTTTCATGGAGGAATATTGTT	1512	60°C	Barrios-González et al. 2008
<i>yap1</i>	TTCCGCTATCAATGCCATGGCCGGAGC GATTCTGCCATCCATGGTGTATAGG	553	68°C	Miranda et al. 2013

<sup>15</sup>SSC10X: NaCl 1.5 M + Citrato de sodio 0.15 M, ajustado a pH 7 con HCl 0.1N.

<sup>16</sup>Papel para cromatografía 3MM: velocidad de flujo 130 mm/30 min.

### Hibridación.

Las membranas se pre-hibridaron junto con los controles correspondientes con 10 mL de buffer PSE<sup>17</sup>, en el horno de hibridación a 65°C durante 2-3 horas. El PSE<sup>17</sup> de pre-hibridación se desechó y se le agregó 10 mL de PSE<sup>17</sup> nuevo al tubo de hibridación mas 225µL de la sonda marcada (50 µL sonda+175 µL de NaOH0.1 M), para posteriormente meterlos en el horno de hibridación a 65°C O.N.

### Lavados.

Se etiquetaron tubos falcón de 15 mL con el nombre de la sonda. Cada tubo de hibridación se saco del horno y se vació el líquido dentro del tubo falcón correspondiente, y posteriormente se guardó a -20°C. Por otra parte, al tubo de hibridación se le adicionaron 100 mL de SL<sup>18</sup>, el cual fue llevado nuevamente al horno de hibridación a 65°C durante 20 min, esta acción se realizó dos veces.

### Autorradiografía.

Las membranas se colocaron entre dos películas de acetato y fueron envueltos en egapack y puestos dentro de un cassette de exposición (Hypercassette de Amersham GE Healthcare), el cual contenía pantallas intensificadoras de la misma marca. La exposición se llevó a cabo sobre películas Kodak Scientific Imaging® Film, X-Omat Blue XB-1, de 18 x 24 cm, a -70°C. El tiempo de exposición fue directamente proporcional a la señal proporcionada por el contador Geiger-Muller.

### Revelado.

Las películas Kodak Scientific Imaging® Film antes de ser expuestas contienen cristales de haluro de plata que tienen un color lechoso. Después del tiempo de exposición recibe pequeñas cantidades de radiación durante la exposición, son tan pocos los átomos convertidos en plata metálica negra, que no se percibe ningún cambio de tono, pero la imagen ya está impresionada, es la imagen latente. Para amplificar el tamaño de estos puntos negros, se recurre a un baño químico conocido como revelador (Kodak Scientific Imaging®) que actúa transformando en plata metálica negra todos los cristales de haluro que poseen algún átomo de plata, estos pequeños puntos iniciales se denominan núcleos de revelado. Tenemos por tanto dos procesos: uno fotoquímico que transforma los haluros de plata en plata metálica al recibir un fotón, y otro químico mediante el que las sales de plata con núcleos de revelado, pierden su átomo de bromo, cloro o yodo y se reducen a plata metálica. Se establece una etapa entre el revelador y el fijador consistente en un baño que actúa como amortiguador del pH, es el llamado baño de paro. En la emulsión existen todavía cristales de haluro de plata que no han sido transformados en plata metálica y que si no los eliminamos ahora, cuando obtengamos el negativo se oscurecerá con la luz y estropearán los resultados. Estos cristales sin reducir, se disuelven en un medio ácido como el que llevan los fijadores (Kodak Scientific Imaging®). Al finalizar el proceso, la película sigue siendo ácida y se encuentra empapada productos y residuos químicos que conviene eliminar para conseguir una imagen estable, para ello se lleva a cabo una etapa de lavado.

### Densitometría.

Se utilizo el programa ImageJ (versión 1.43u) para normalizar las señales emitidas en la película, las cuales eran proporcionales a la cantidad de transcritos del gen de estudio. Se empleo como base de cálculo el RNA ribosomal en cada carril.

<sup>17</sup> PSE: 3ml de Fosfato sódico 1M, pH 7.2, 7mL de SDS 10%, y 20 µL de EDTA 0.5M.

<sup>18</sup> SL: Solución de Lavado: Por cada 1050 mL: Fosfato de sodio 1 M pH 7.2 (105 mL), SDA al 10% (70 mL) y 875 mL H<sub>2</sub>Od.

#### 6.9.8 Southern blot.

Se digirió con la enzima de restricción *HindIII* (ThermoScientific®) a 37°C durante 5 horas (Buffer 10X R, 2 µL de enzima); el ADN de la cepa parental y la transformante *Δatyap1*, aproximadamente 10 µg por cada muestra a analizar. Se concentró el ADN fragmentado de las muestras al finalizar la digestión por precipitación con etanol. Después se disolvió el ADN en 25 uL de H<sub>2</sub>O. Posteriormente se corrieron las digestiones en un gel de agarosa de 0.8% durante 6 h a 50 Volts. Se recirculó el TAE 1X a las 3 horas. Finalizado el tiempo de corrida se llevo a cabo la el lavado ácido con HCl 0.25 N, haciendo 2 lavados al gel, cada uno de 15 minutos. Se lavó posteriormente el gel con agua destilada. Se desnaturalizó el ADN, sumergiendo el gel en solución de NaOH 0.5 N, 1.5 M NaCl. 2 lavados, de 15 minutos cada uno. Se lavó con agua destilada. Se neutralizó el ADN, sumergiendo el gel 2 veces durante 15 minutos cada lavado en una solución Tris-HCl 0.5 M y NaCl 1.5 M (pH 7.4). Después se procedió al realizar una transferencia, fijación, marcaje (pki1), hibridación, lavados aurodigrafía y revelados como se menciona en el protocolo para 6.9.8 Northern-blot.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA FS.

#### 7.1.1 Comparación de Matraz Abierto (MA), Matraz Cerrado (MC) y Columna (C).

Se compararon diferentes sistemas de aireación: Matraz Cerrado (MC) donde la aireación es casi nula, es un sistema hermético que difícilmente permite el transporte de gases; Matraz abierto (MA) donde se facilita la trasporte de gases, y una Columna (C) donde existe un flujo de aire dentro del sistema. En este experimento se busca comparar y conocer el perfil de acumulación de EROs bajo el efecto de distintos nivel de aireación en la producción de lovastatina.

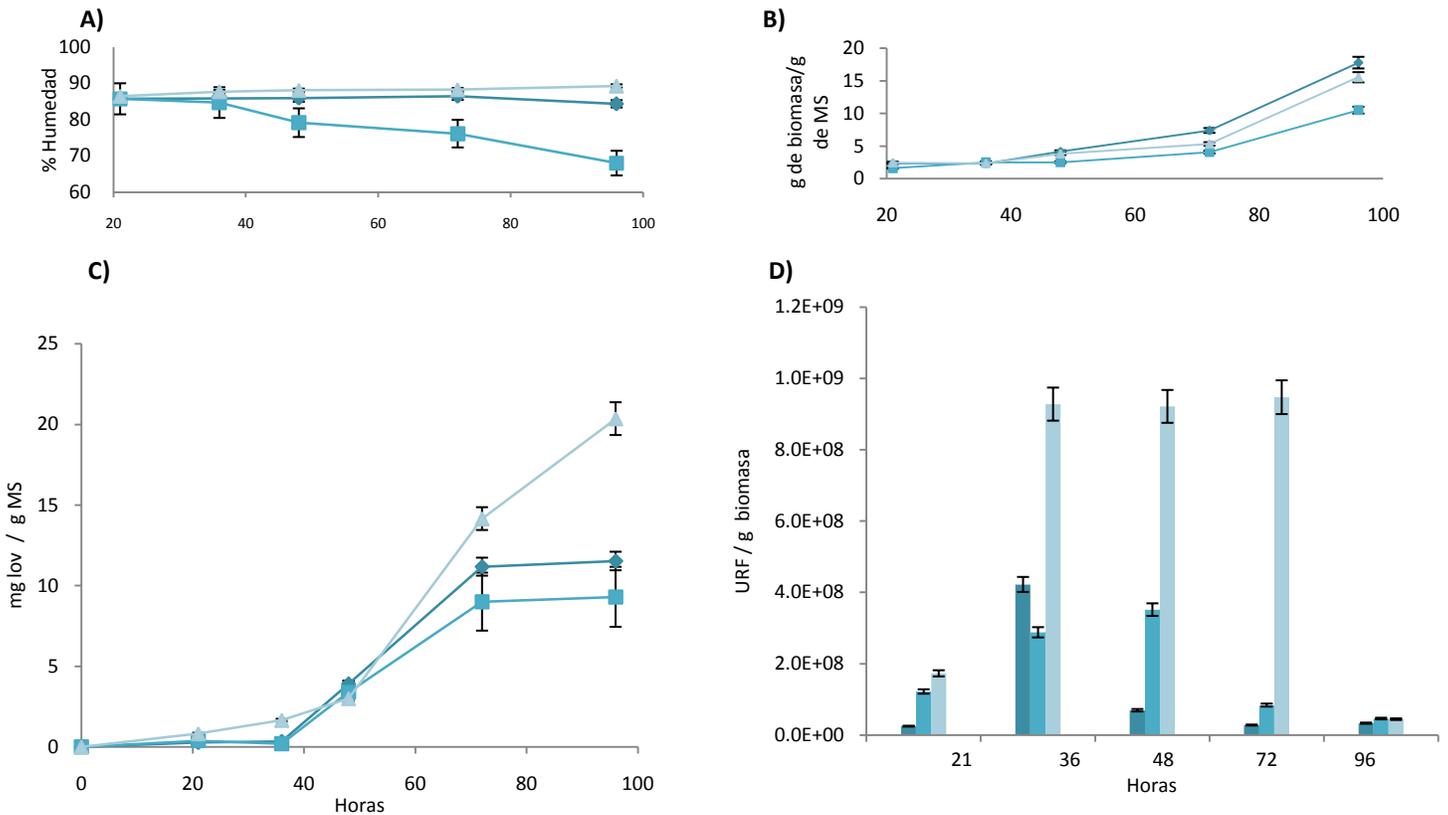


Figura 16. Cinética de producción de lovastatina en fermentación sólida a distintos niveles de aireación: Columna aireada con flujo de aireación de 0.04 L/g/h<sup>3</sup>, Matraz abierto (MA) ♦, Matraz cerrado (MC) ▲. En Panel A) Cinética de Humedad, B) Crecimiento, C) Producción volumétrica de lovastatina, D) Acumulación de EROs. (URF=Unidades Relativas de Fluorescencia).

Como se observa en la figura 16, la acumulación de EROs disminuye conforme se aumenta la aireación, aunque la explosión oxidativa comienza a las 36 h en los tres sistemas. Además, la producción de lovastatina es mayor en MC que en los sistemas aireados. En contraste, la producción de biomasa es mayor en el MA que en MC. El contenido (ó %) de humedad disminuye conforme se aumenta la aireación, mostrando mayor humedad en MC que en MA y que en C.

### 7.1.2 Control de Humedad en Matraz abierto.

Debido a que en el experimento pasado se tenía la humedad como una variable adicional no era posible atribuir el cambio de EROs solamente a la aireación. Para poder determinar si el cambio en la acumulación de EROs en sistemas aireados disminuye por el efecto de la aireación y no por el efecto de la humedad, se diseñaron sistemas que permitieron controlar la humedad a lo largo de la fermentación en MA.

Para ello se adicionó a los sistemas de MA un vaso con diferentes cantidades de soluciones que aportaron diferentes grados de humedad al sistema. El sistema a seleccionar fue a través de la comparación de la humedad de un MC con los otros sistemas, buscando el que tuviera menor diferencia con el MC y menor variación, esto de acuerdo a la prueba de comparación LSD ( $p < 0.05$ ).

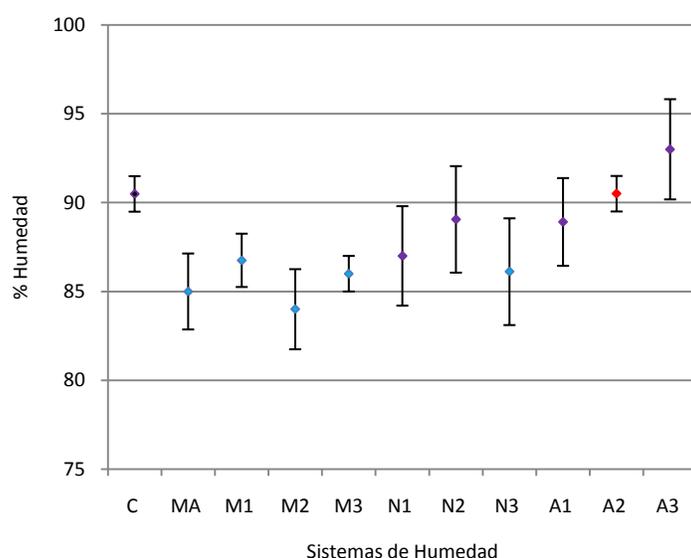


Figura 17. Humedad final en FSs de 96 h, con diferentes estrategias para controlar la humedad en MA. El control es un matraz cerrado (C)♦, Matraz Abierto (MA) sin sistema de humedad. Los sistemas con control de humedad son MA con medio de cultivo 2.5X ( $A_w$ : 0.9775) en: **M1** = 1 vaso, **M2** = 2 vasos, **M3** = 3 vasos; MA con NaCl 3.5 g/L ( $A_w$ : 0.9775) en: **N1** = 1 vaso, **N2** = 2 vasos, **N3** = 3 vasos; MA con Agua destilada en: **A1** = 1 vaso, **A2** = 2 vasos, **A3** = 3 vasos. En donde ♦ son los sistemas que no muestran diferencia significativa con el control, en la prueba de comparación LSD ( $p < 0.05$ ); y ♦ el sistema que no mostró diferencias significativas con el control, y además la menor desviación estándar.

De acuerdo con la figura 17, se encontraron diferentes casos donde no había diferencia significativa con el control, es decir MC y, a partir de esto se seleccionó aquel que tuvo menor desviación estándar. El sistema que se seleccionó como el de mejor control de humedad fue el de MA con 2 vasos con agua en el interior del matraz.

### 7.1.3 Producción de lovastatina y generación de EROS en: Matraz Abierto con control de Humedad y Matraz Cerrado.

Una vez que se logró controlar la humedad, se desarrolló un experimento para observar el efecto de la aireación sobre el perfil de acumulación de EROs. Para ello se comparó una fermentación en MC con una en MA-humedad controlada (2 vasos con agua destilada en el interior del matraz).

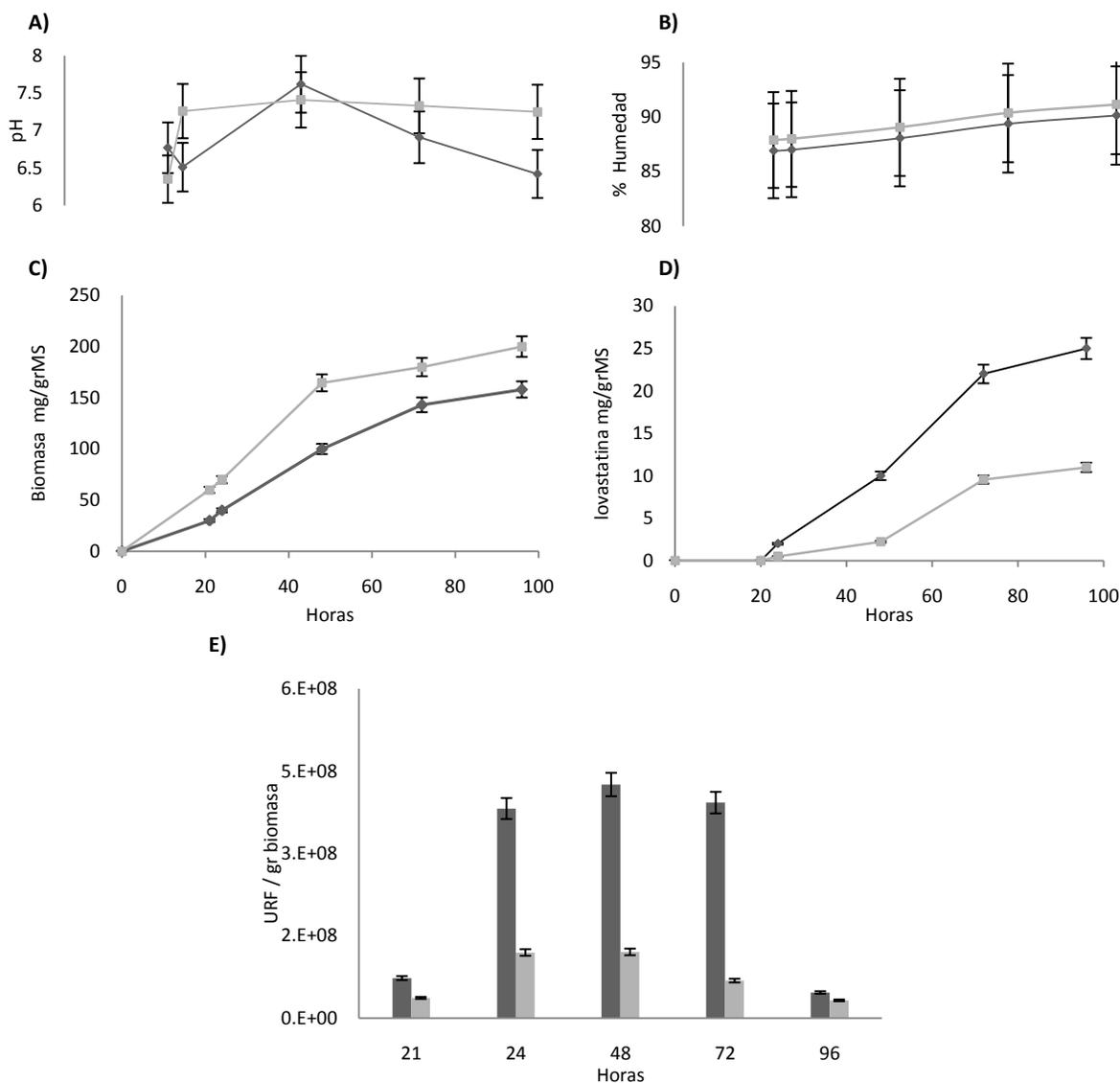


Figura 18. Cinética de producción de lovastatina en MC  $\blacklozenge$  y MA  $\blacksquare$  con humedad controlada. En donde A) Cinética de pH, B) % Humedad C) Crecimiento, D) Producción volumétrica de lovastatina E) Acumulación de EROs (URF: Unidades relativas de fluorescencia)

Como se observa en la figura 18, y como se había obtenido anteriormente en la figura 16, la acumulación de EROs disminuyó en sistemas con aireación. Se encontró una menor acumulación de EROs en MA, además de que la producción de lovastatina disminuyó en forma muy importante (56 %) en el sistema aireado. Esta misma disminución de la producción en sistemas aireados se había observado en el experimento anterior (Fig. 17). La explosión oxidativa comienza a las 24 horas en ambos sistemas, es decir se conserva el mismo perfil de EROs, aunque a niveles más bajos en el sistema con aireación. La humedad y el pH son similares en ambos sistemas.

#### 7.1.4 Biosíntesis de lovastatina usando diferentes soportes sólidos a diferentes grados de aireación.

Una vez que se comprobó que en la FS de lovastatina en PUF (poliuretano como soporte), el perfil de acumulación de EROs disminuye conforme se aumenta la aireación; nos preguntamos si esto pasaría en otros sistemas de fermentación sólida más tradicionales. Es decir los que usan soportes ó sustratos naturales, como por ejemplo bagazo de caña y salvado de trigo. Para ello se realizó un experimento en donde se comparaban diferentes soportes con diferente grado de aireación. Cabe aclarar que estos experimentos se realizaron sin control de humedad.

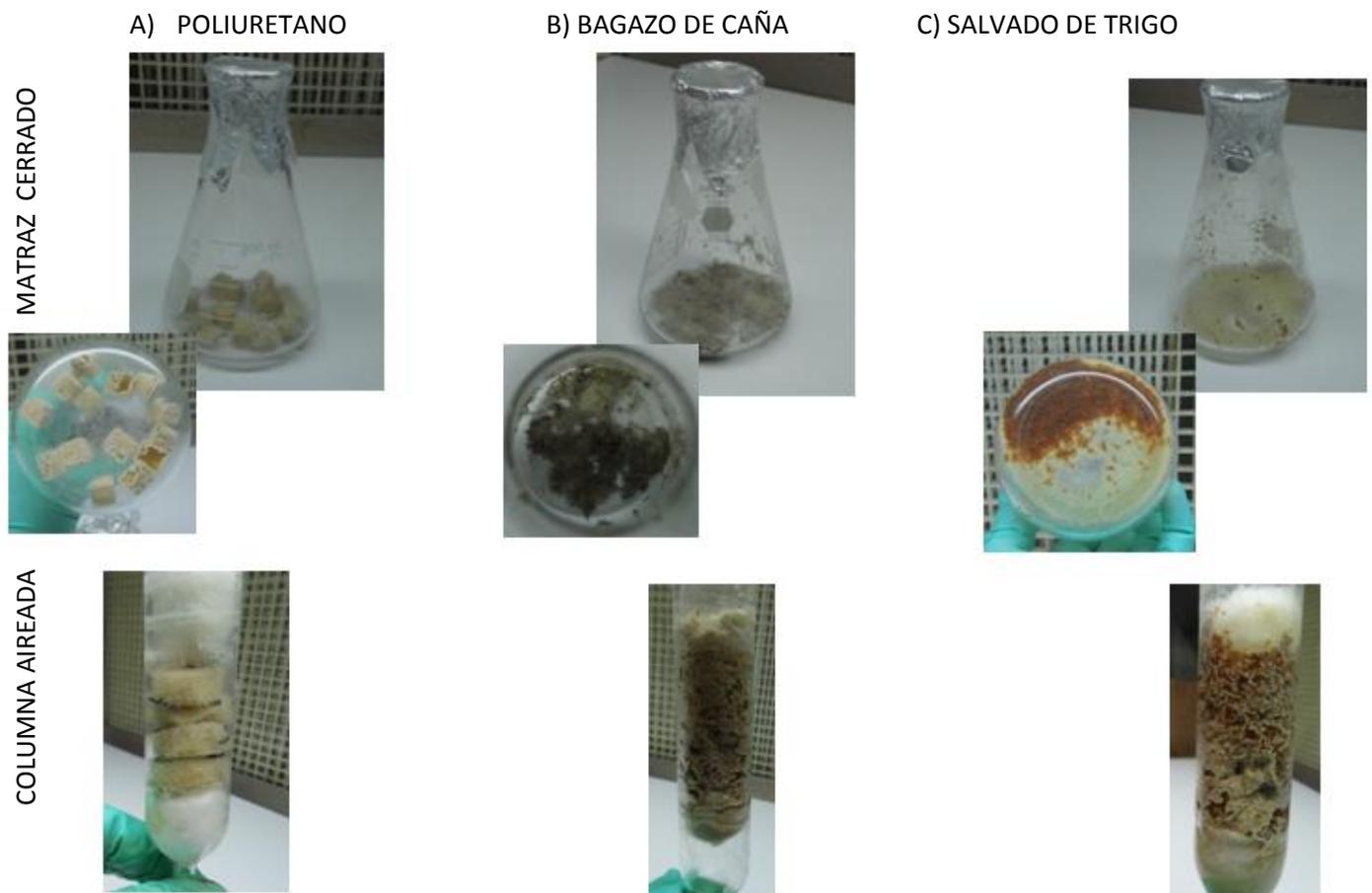


Figura 19. Sistemas de producción de lovastatina en FS: comparando diferentes soportes A) Poliuretano B) Bagazo de caña C) Salvado de trigo, con diferente nivel de aireación: Columna Aireada y Matraz cerrado.

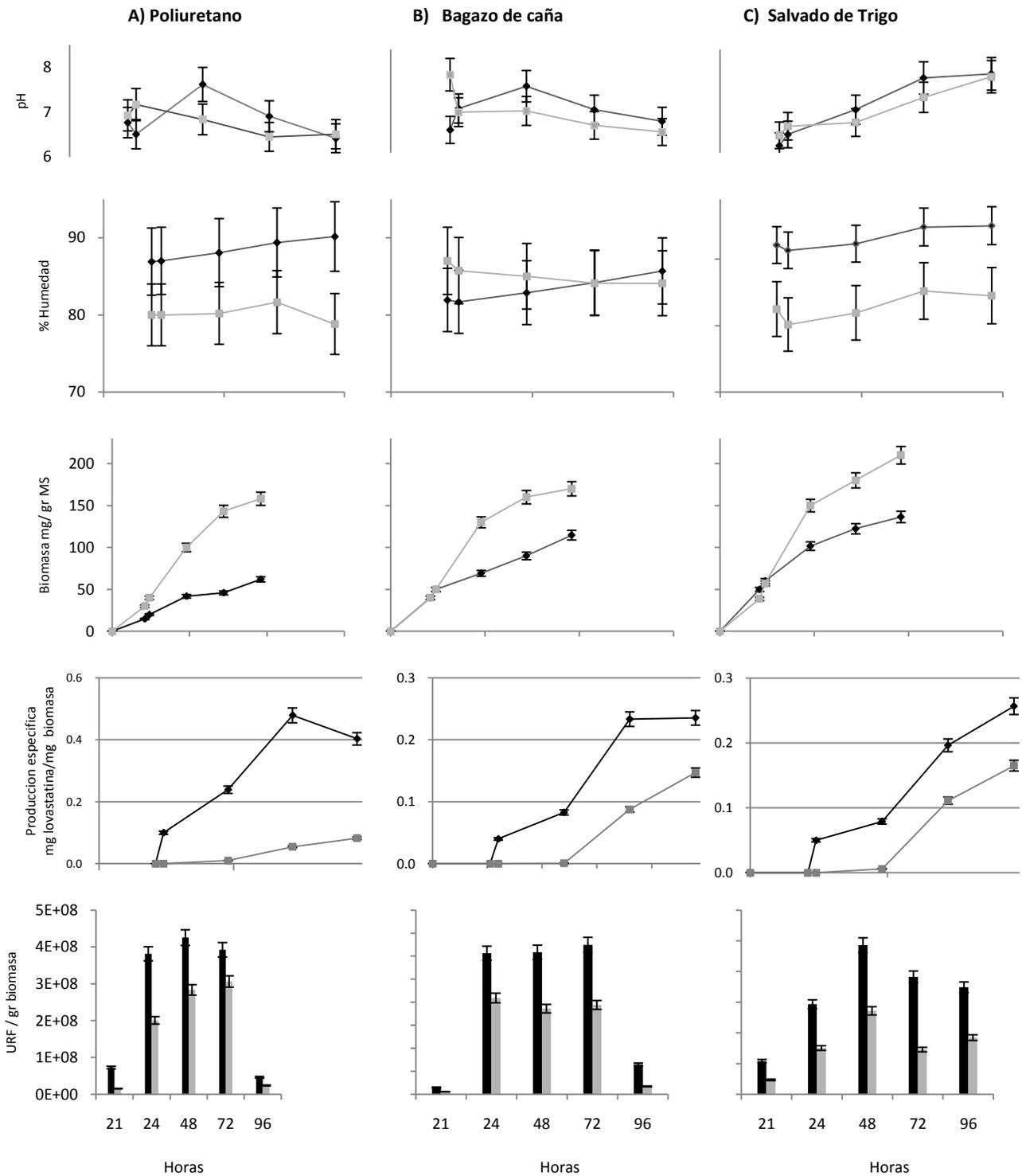


Figura 20. Cinética de producción de lovastatina en diferentes tipos de FS: A) Poliuretano B) Bagazo de caña C) Salvado de trigo. Se utilizaron diferentes niveles de aireación: Columna aireada □ y Matraz cerrado (MC)◆, evaluando los parámetros de pH, % de humedad, crecimiento, producción específica de lovastatina y Acumulación de EROs (URF: Unidades relativas de fluorescencia).

De acuerdo con la figura 20, el pH para todos los soportes se mantiene sin diferencias entre la columna y el MC, la humedad es menor y decrece más rápido para el caso de la columna en todos los soportes, así como el crecimiento de biomasa es mayor en la columna que en el MC en todos los casos.

Al aumentar el nivel de aireación en fermentación sólida disminuye la acumulación de EROs en la producción de lovastatina con *A. terreus* para todos los soportes. Como consecuencia al aumentar el nivel de aireación en fermentación sólida y disminuir las EROs, disminuye la producción específica de lovastatina como se observa en todos los sistemas usando diferente soporte.

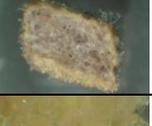
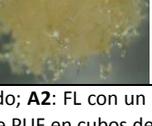
## **7.2 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL.**

Uno de los objetivos en el proyecto era evaluar los estímulos de la "fisiología de la fermentación sólida", para ello se realizó la adición de soporte a la FL y la adición de un generador de EROs (peróxido de hidrógeno) que propiciaría un ambiente con estrés oxidativo, para simular un ambiente como es el de la FS, en la FL.

### **7.2.1 FL con la adición de soporte.**

Se adicionó a la FL diferentes conformaciones de soporte, explorando aspectos del soporte que generen el estímulo de la fisiología de la FS. Así, también se probó el efecto del soporte junto con el contacto con el aire.

Tabla 4. FL con adición de soporte en diferentes conformaciones\*.

Sistema	Observaciones Macroscópicas	Observaciones Microscópicas 10x	Descripción
Crtl	 	-	Es la FL convencional es el control y el punto de comparación.
A1	 		<p><u>Parámetro:</u> Área de contactó con aire y Cantidad de soporte.</p> <p>En estos sistemas se varía el área de contacto del soporte con el aire, en donde A1 tiene mayor área que A2; y A2 mayor área que A3. El objetivo de la comparación de estos sistemas es observar la influencia del contacto con el aire como estímulo de la FS en una FL.</p>
A2	 		
A3	 		
3B, 2B, 1B			<p><u>Parámetro:</u> Cantidad de soporte</p> <p>En estos sistemas se varía la cantidad de soporte a volumen de medio constante. En donde 3B tiene mayor cantidad que 2B y a su vez 2B más que 1B.</p>
R1	 		<p><u>Parámetro:</u> Tamaño de partícula del soporte</p> <p>En estos sistemas se varía el área contacto del soporte con el medio de cultivo sin variar la cantidad de soporte. Esto, a través de diferente conformación ó tamaño de partícula. Todos los sistemas tienen 0.2gr de soporte, con un área de contacto de menor de R1 a mayor R5.</p>
R2	 		
R3	 		
R4	 		
R5	 		

\*CtI FL convencional; **A1** FL con Poliuretano en todo el líquido; **A2:** FL con un círculo de 6cm de diámetro y 1 cm de grosor; **A3:** con un círculo de 3cm de diámetro y 1cm de grosor; **3B:** con 0.3 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>; **2B:** con 0.2 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>, **1B** con 0.1 g de PUF en cubos de 1 cm<sup>2</sup>. Y sistemas con 0.2gr de PUF en las siguientes conformaciones: **R1:** un rectángulo de 3x1x1 cm, **R2:** un rectángulo de 5x1x1cm (0.24 g), **R3:** en cubos de 1cm<sup>3</sup>; **R4:** en cubos de 0.5 cm<sup>3</sup>, **R5:** picado en cubos aproximadamente de 0.1 cm<sup>3</sup>.

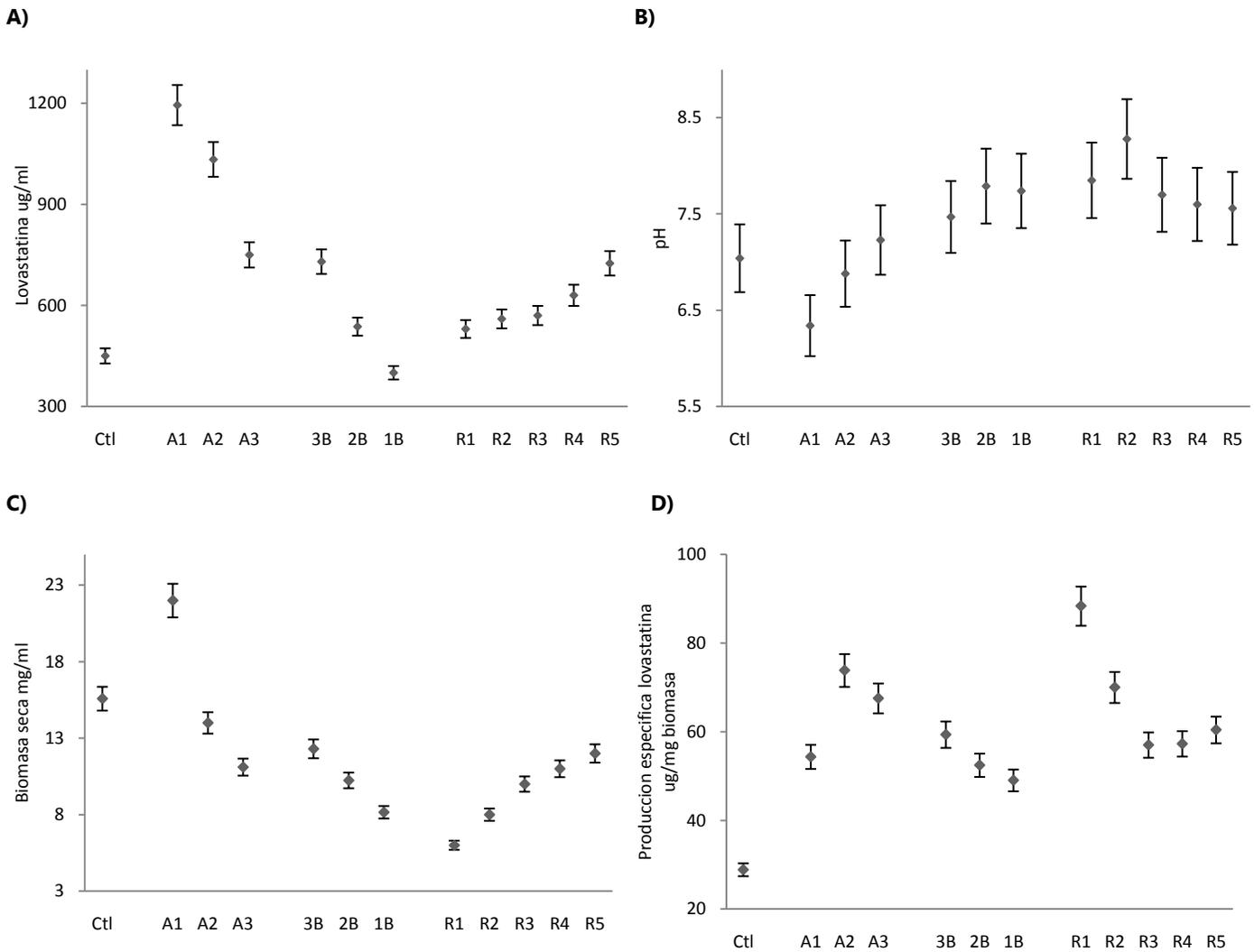


Figura 21. Producción de lovastatina en FL con adición de soporte en diferentes conformaciones a las 96h: **Ctl** FL convencional; **A1** FL con Poliuretano en todo el líquido; **A2**: FL con un círculo de 6cm de diámetro y 1cm de grosor; **A3**: con un círculo de 3 cm de diámetro y 1 cm de grosor; **3B**: con 0.3 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>; **2B**: con 0.2 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>, **1B** con 0.1 g de PUF en cubos de 1 cm<sup>2</sup>. Y sistemas con 0.2 gr de PUF en las siguientes conformaciones: **R1**: un rectángulo de 3x1x1cm, **R2**: un rectángulo de 5x1x1cm (0.24 g), **R3**: en cubos de 1cm<sup>3</sup>; **R4**: en cubos de 0.5 cm<sup>3</sup>, **R5**: picado en cubos aproximadamente de 0.1cm<sup>3</sup>. En donde en el panel A) producción volumétrica de lovastatina en B) pH, C) Biomasa y en D) producción específica de lovastatina.

Se observa de acuerdo a la figura 21, panel B), que los diferentes sistemas de FL con adición de soporte presentaron un cambio en su fisiología, ya que también presentan cambios en el pH.

En base al panel A) de la figura 21, en casi todos los casos de adición de soporte observamos que hay un aumento en la producción volumétrica de lovastatina a excepción del caso del sistema 1B en donde no hay efecto. En donde se determinó que a mayor cantidad de soporte mayor producción volumétrica, así como a mayor área de contacto con el aire mayor producción volumétrica y finalmente a mayor tamaño de partícula mayor producción volumétrica de lovastatina.

De acuerdo a la figura 21 panel C) y en la tabla12, hay cambio importante en la biomasa en cuando al crecimiento y forma de crecimiento, ya que en los sistemas de adición de soporte el principal crecimiento es sobre el soporte y sobre todo en el área superficial o más externa de éste, es un micelio que esta adherido al soporte. Una observación muy interesante es que una vez que el hongo ha detectado el soporte, se adhiere a este y sólo crece sobre este y ya no hay crecimiento en forma de pellets en el medio de cultivo.

De acuerdo a la figura 21 panel C) también se observa un efecto importante del crecimiento y el área de contacto del soporte con el aire, ya que a mayor área de contacto con el aire mayor producción de biomasa. Se encontró un efecto notable en cuanto a la cantidad de soporte: a mayor cantidad de soporte, en la FL, mayor crecimiento de biomasa. En relación al soporte, también se encontró que a menor tamaño de partícula (mayor área de contacto o área superficial) del soporte en el medio líquido, se produjo mayor cantidad de biomasa.

La adición de soporte en FL tuvo efectos importantes sobre la producción específica como se muestra en la figura 21, panel D). Se observa que, en todos los casos, de adición de soporte se aumenta la producción específica de lovastatina. A mayor área de contacto del soporte con aire en sistemas A2 y A3 hay una mayor producción específica de lovastatina. También de aquí se concluye que a mayor cantidad de soporte hay mayor producción específica de acuerdo a los sistemas 3B, 2B, y 1B. En caso del tamaño de partícula del soporte a menor tamaño de partícula mayor es la producción específica según se observa en los sistemas R1 al R5. Sin embargo, el crecimiento tiene un comportamiento inverso: ya que a menor tamaño de partícula menor biomasa.

Tabla 5. Resumen de resultados de la FL con adición de soporte en diferentes conformaciones\*.

SISTEMA	PARÁMETRO	RESULTADO	CONCLUSIÓN
A1, A2 Y A3	Cantidad de soporte Área de contacto con el aire	A mayor cantidad de soporte mayor cantidad de biomasa  A mayor área de contacto con el aire mayor biomasa y por lo tanto mayor producción volumétrica  Mayor producción específica en los sistemas A1, A2 y A3 que en el Ctrl.	La cantidad de biomasa depende o se limita por la superficie para adherirse.  Debida a la mayor cantidad de biomasa hay mayor producción volumétrica.  Todos los sistemas fueron más eficientes que la FL convencional.  El área de contacto con el aire favorece la producción de lovastatina.
3B, 2B y 1B	Cantidad de soporte sin contacto con el aire	A mayor cantidad de soporte mayor producción de biomasa  A mayor cantidad de soporte mayor producción volumétrica y un poco mayor producción específica.	Se confirma que a mayor cantidad de soporte mayor cantidad de biomasa.  Hay menor eficiencia que los que tienen contacto con el aire.
R1, R2, R3, R4, R5.	Tamaño de partícula del soporte. Misma cantidad del soporte.	A menor tamaño de partícula mayor producción volumétrica y biomasa.  A mayor tamaño de partícula mayor producción específica.	Se confirma que la biomasa depende o se limita por la superficie para adherirse.  Debida a la mayor cantidad de biomasa hay mayor producción volumétrica.  El soporte induce una diferente fisiología que favorece la producción de lovastatina.  El tamaño de partícula del soporte es un parámetro importante para inducir esta fisiología.

\*Ctl FL convencional; **A1** FL con Poliuretano en todo el líquido; **A2**: FL con un círculo de 6cm de diámetro y 1cm de grosor; **A3**: con un círculo de 3cm de diámetro y 1cm de grosor; **3B**: con 0.3 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>; **2B**: con 0.2 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>, **1B** con 0.1 g de PUF en cubos de 1cm<sup>2</sup>. Y sistemas con 0.2gr de PUF en las siguientes conformaciones: **R1**: un rectángulo de 3x1x1cm, **R2**: un rectángulo de 5x1x1cm (0.24g), **R3**: en cubos de 1cm<sup>3</sup>; **R4**: en cubos de 0.5 cm<sup>3</sup>, **R5**: picado en cubos aproximadamente de 0.1cm<sup>3</sup>.

### 7.2.2 FL con adición de peróxido de hidrógeno.

Para observar el efecto de la adición de un agente oxidante sobre la producción de lovastatina se realizaron FL de lovastatina con diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (hasta 4500  $\mu\text{M}$ ). Se monitoreó el comportamiento de biosíntesis de lovastatina así como de la acumulación de EROs durante el curso de esta FL de lovastatina, como se muestra en la figura 22.

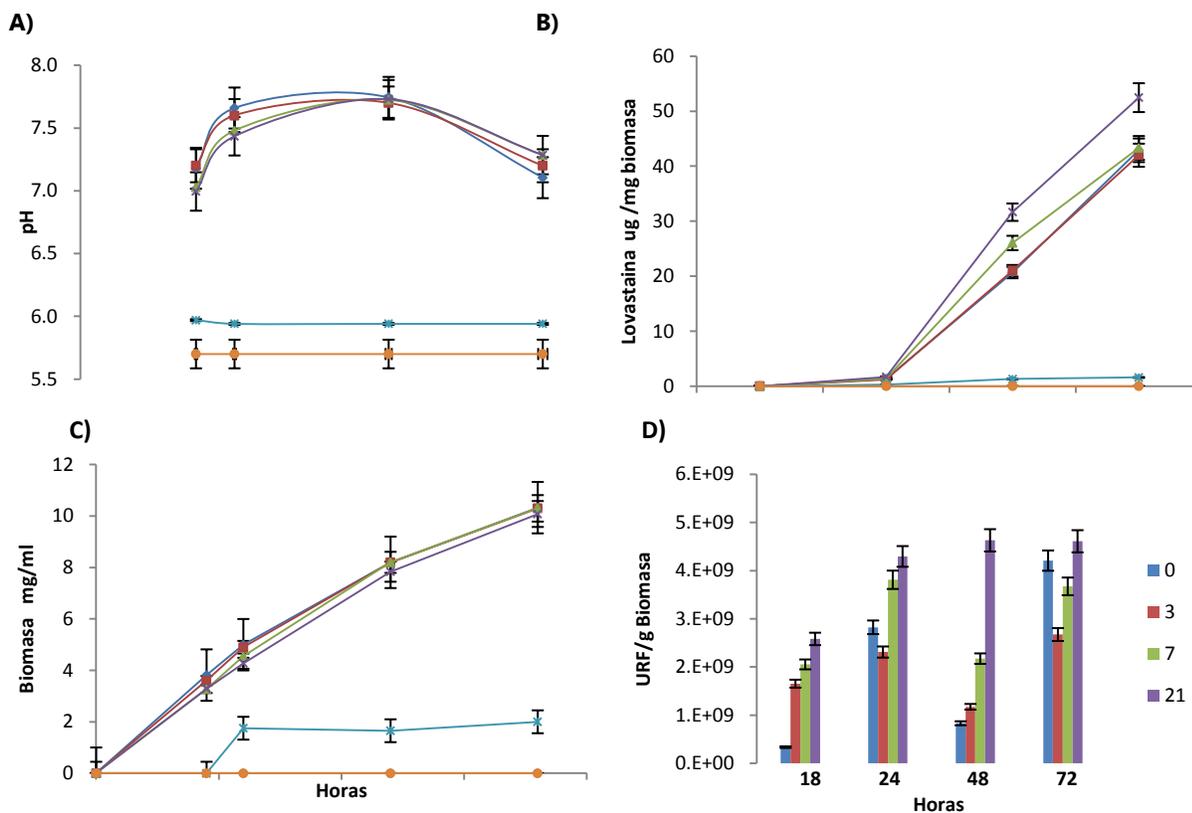


Figura 22. Cinética de una FL con adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en donde representan la concentración en  $\mu\text{M}$  de Peróxido de hidrogeno: 0  $\blacklozenge$ , 3  $\blacksquare$ , 7  $\blacktriangle$ , 21  $\times$ , 980  $\ast$ , 4500  $\bullet$ , respectivamente. Se observa en el panel A) cinética de pH, en el B) producción específica de lovastatina, C) Crecimiento y D) Acumulación de EROs.

De acuerdo a la figura 22, no se observó ningún cambio en las cinéticas de pH en la concentración de peróxido de 0, 3, 7 y 21  $\mu\text{M}$ , lo mismo sucede en cuanto a concentración de biomasa. Sin embargo, a concentraciones mayores de 21  $\mu\text{M}$  se observó un efecto negativo en el crecimiento y la producción de lovastatina, y cambio en el pH en los sistemas con 980 y 4500  $\mu\text{M}$ . En los sistemas con adición de peróxido de hidrogeno se observa un incremento y un adelanto en la acumulación intracelular de EROS El sistema que se seleccionó fue aquel en donde se produjo un efecto claro en el aumento de la producción de lovastatina, pero sin cambios en el crecimiento ni en el perfil de pH, es decir 21  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogeno.

Una vez seleccionada la concentración de peróxido a la cual se tiene un efecto positivo en la acumulación de EROs y producción de lovastatina se procedió a realizar un análisis más detallado. Para ello se realizó una cinética muestreando tiempos más cortos.

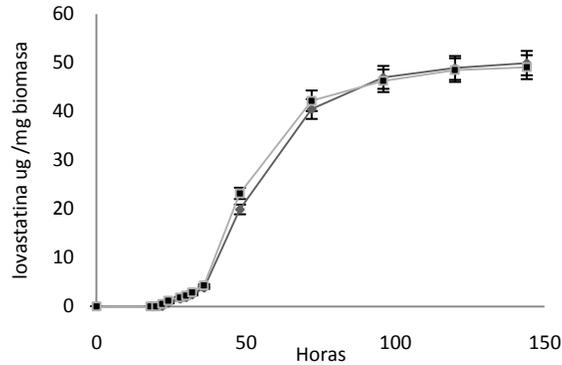


Figura 23. Cinética completa de la producción de lovastatina con adición de 21uM de peróxido de hidrogeno. Donde el  $\blacklozenge$  es el control FL convencional, y  $\blacksquare$  es el sistema con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En la figura 23 no fue posible observar si había un efecto sobre el inicio de la biosíntesis de lovastatina debido a la adición de peróxido en el medio de cultivo. Al incrementar la frecuencia de muestreo en el nuevo experimento (Fig. 24), podemos observar con más claridad el inicio precoz de la biosíntesis de lovastatina, causado por la adición de peróxido de hidrogeno.

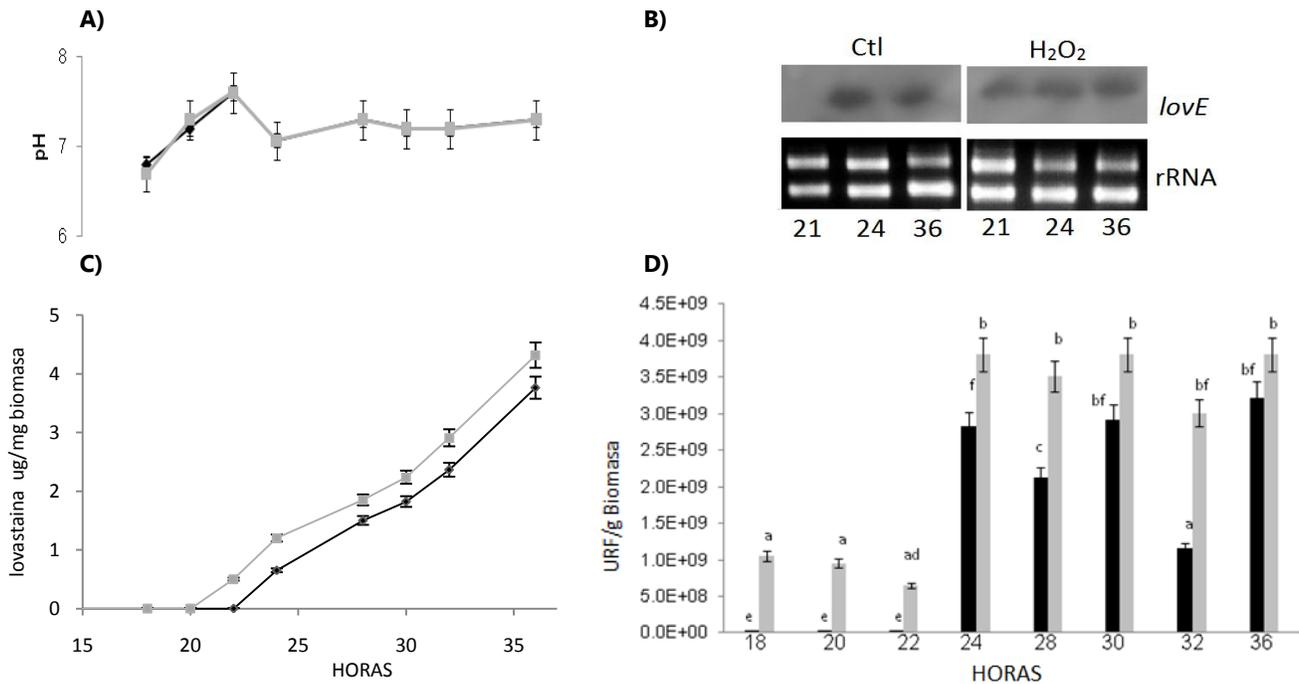


Figura 24. Inicio de la producción de lovastatina con adición de 21uM de peróxido de hidrogeno. Donde el  $\blacklozenge$  es el control FL convencional, y  $\blacksquare$  es el sistema con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En donde el panel A) muestra la cinética de pH, B) Northern Blot de lovE en la FL convencional o Ctl y la adición de peróxido en 21 24 y 36 horas, C) la producción específica de lovastatina y D) muestra la acumulación de EROs. El contenido de EROs con diferentes letras indica diferencias significativas del resto, esto de acuerdo a la prueba de comparación LSD (p<0.05).

En la Fig. 24 se observa una precoz acumulación de EROs en el sistema (Panel D) el cual causa un adelanto en la biosíntesis de lovastatina, la cual empieza a las 20 h, en lugar de a las 22 h. Esto generó una diferencia notable y significativa en el nivel de lovastatina, con respecto al control. Esta diferencia se mantuvo hasta las 100 h, aunque después se igualaron.

También se vio un adelanto en la expresión del gen *lovE*, factor transcripcional del cluster de biosíntesis. Es decir se encontró acumulación de transcritos desde las 21 h, mientras que en el control se detectó expresión a las 24 h.

Por otro lado, se realizó también la adición de peróxido a la FL en diferentes tiempos para observar su comportamiento sobre la producción de lovastatina a lo largo de una fermentación.

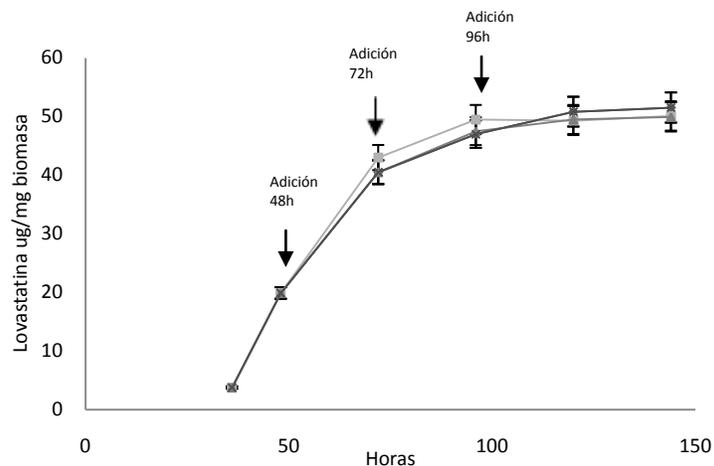


Figura 25. **Adición de Peróxido a la FL a diferentes tiempos.** Cinética de producción específica de lovastatina donde ◆ es el control FL convencional, donde se le adicióno peróxido ( $21 \mu\text{M}$ ) a las 48h ■, 72h ▲ y 96h X. No se encontraron diferencias significativas entre el la FL convencional y con adición de peróxido a diferentes tiempos.

### 7.3 SILENCIAMIENTO DEL GEN *atyap1*.

#### 7.3.1 Construcción de *pGdpKiRNAi-yap1*.

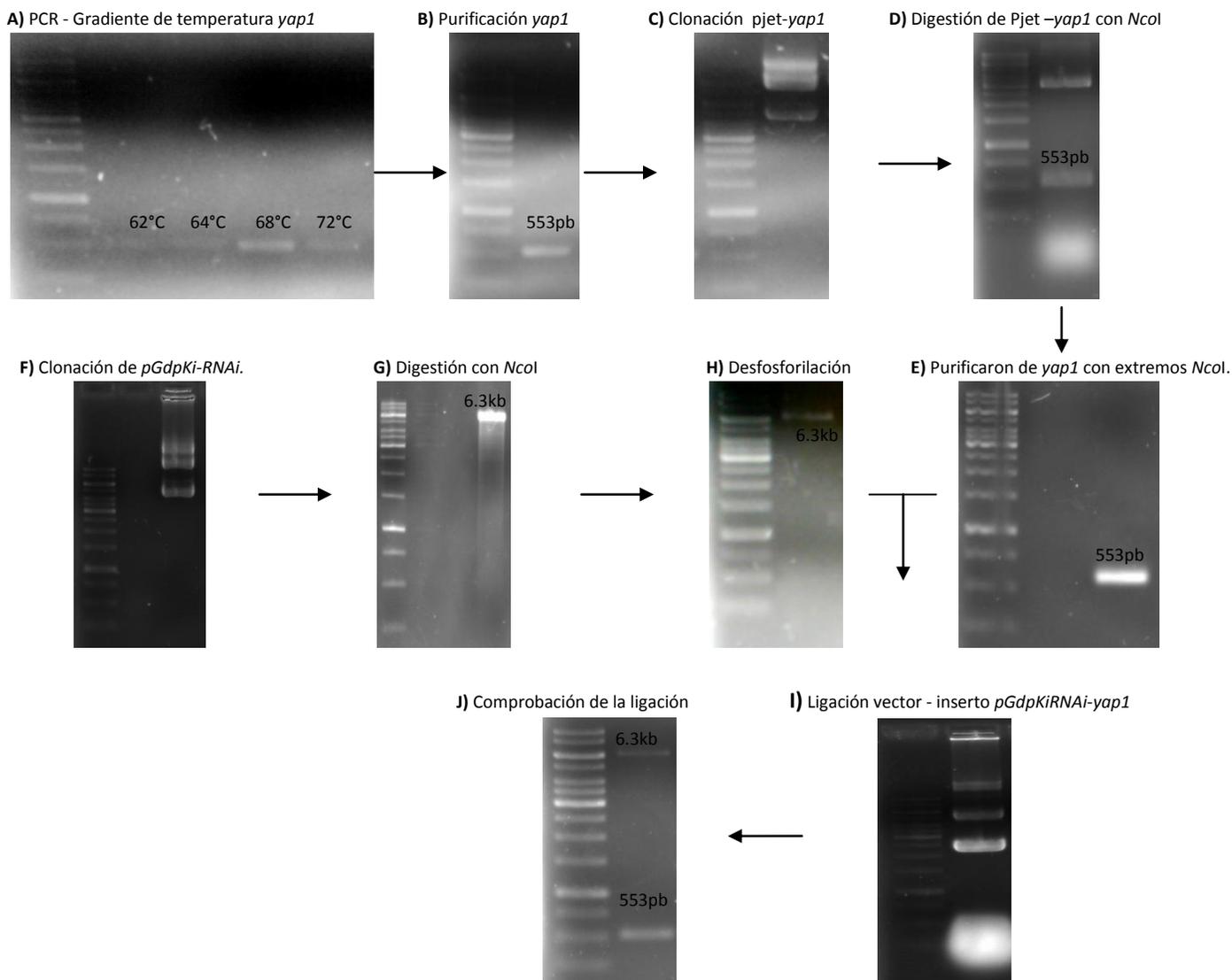


Figura 26. **Construcción de *pGdpKiRNAi-yap1***: **A)** PCR para la obtención del fragmento del gen *yap1*, selección de la temperatura óptima de amplificación 68°C, **B)** Purificación de *yap1* 553pb extremos romos, **C)** Clonación de *yap1* en vector pJet, lisis alcalina de las transformantes con la construcción, **D)** Digestión con *NcoI* del vector pJet -*yap1* **E)** Purificación de *yap1* con extremos *NcoI*, **F)** Clonación del vector *pGdpKi-RNAi*, lisis alcalina de las transformantes, **G)** Digestión con *NcoI* del vector *pGdpKi-RNAi*, **H)** Desfosforilación del vector *pGdpKiRNAi/ NcoI*, obtenidos de vector con extremos *NcoI* desfosforilados, **I)** Ligación vector - inserto *pGdpKiRNAi-yap1*, lisis alcalina de las transformantes obtenidas, **J)** Digestión de *pGdpKiRNAi-yap1* con *NcoI* comprobación de la construcción. Marcador 1kb (Invitrogen).

De acuerdo a la figura 26, en el panel A) PCR por gradiente, se logra obtener una mayor concentración y el tamaño de fragmento esperado a 68°C por lo que se determinó que esta es la mejor temperatura para realizar el PCR del fragmento *atyap1* de 553 pb. Se realizó un PCR con las condiciones anteriores utilizando la temperatura de hibridación de 68°C, el fragmento obtenido se purificó y el resultado se observa en el panel

B). Se clonó el fragmento de *atyap1*, dentro de pJet ambos con extremos romos, esta construcción de transformó en *E. coli* y se realizó una lisis alcalina. Los resultados se muestran en el panel C). En los resultados del panel D) se verifican la inserción del fragmento de *atyap1* en el vector pJet, ya que se obtuvieron dos bandas, la del vector linealizado y la de *atyap1* de 553pb, este se mandó secuenciar obteniendo un 97% de identidad con la secuencia esperada. Se cortó la banda de 553pb y se purificó.

Con esto se logró obtener un fragmento de *atyap1* con extremos *NcoI*, que es insertado dentro del vector de silenciamiento *pGdpKi-RNAi*, previamente digerido con *NcoI* y desfosforilado, como se observa en el panel F). En G) se corrobora que el vector este linealizado con extremos *NcoI* y en H) se corrobora que después de la desfosforilación el vector no ha sufrido algún cambio o degradación. Esta construcción se transformó en *E. coli* y después se purificó el plásmido de las transformantes por lisis alcalina, que es lo que se observa en el panel I). Finalmente se verificó la construcción haciendo una digestión con *NcoI* de los plásmidos obtenidos. Se observa (panel J) que se obtienen dos fragmentos uno correspondiente al vector y el otro al inserto, con lo que se comprueba que la construcción está conformada por estos dos.

### 7.3.2 Selección de las transformantes $\Delta$ *atyap1*.

Una vez que obtuvo y corroboró la construcción de *pGdpKiRNAi-yap1*, se transformaron protoplastos de *A. terreus* con el vector *pGdpKiRNAi-yap1*, obteniéndose 8 transformantes  $\Delta$ *atyap1* (T1-T8). Se procedió entonces a seleccionar aquellas que tuvieran las características más sobresalientes, de acuerdo al comportamiento esperado, los parámetros de selección ocupados fueron los siguientes:

- Sensibilidad a Peróxido de hidrogeno
- Crecimiento radial
- Esporulación
- Inicio en la producción de lovastatina

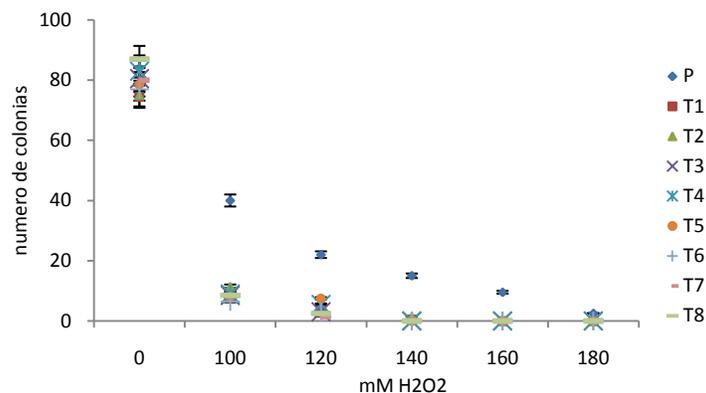


Figura 27. Sensibilidad a estrés oxidativo en esporas de las transformantes de  $\Delta$ *atyap1* (T1 – T8) causado por peróxido de hidrogeno a distintas concentraciones mM, donde P es la cepa parental. El conteo de esporas fue realizado a las 48 horas.

La caracterización de las transformantes comenzó con la resistencia o sensibilidad a estrés oxidativo. En el análisis de las transformantes de  $\Delta$ *atyap1* a sensibilidad a estrés oxidativo en esporas se observa en la figura 27. En donde, a concentración 0  $\mu$ M; peróxido de hidrogeno, todas las cepas crecen como el control positivo. Se observa también que todas las transformantes son sensibles al peróxido de hidrogeno ya que, a 140  $\mu$ M ya no presentan crecimiento, mientras que la parental si puede crecer bajo estas condición.

Sin embargo no hay una diferencia importante en cuanto las transformantes, es decir no hay unas más sensible que otra, todas disminuyen su crecimiento de igual manera a 100  $\mu$ M. Este experimento determina que las transformantes  $\Delta atyap1$  son sensibles a peróxido de hidrogeno en esporas y como consecuencia a estrés oxidativo. Sin embargo este experimento no ayudó a la selección de las transformantes más características del silenciamiento de *atyap1*.

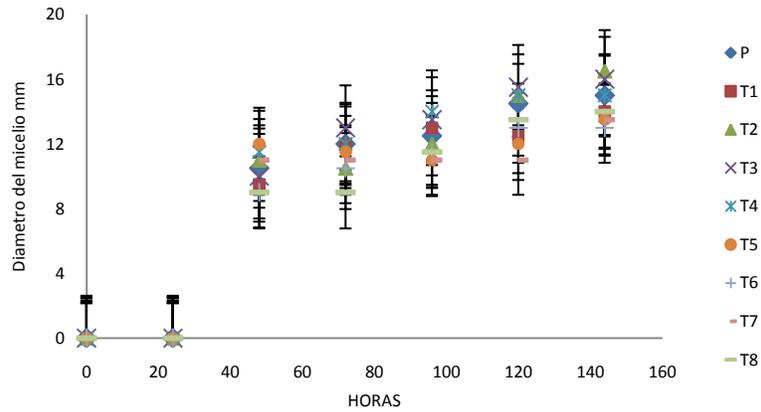


Figura 28. Cinética de crecimiento radial de las transformantes de  $\Delta atyap1$  (T1 – T8), donde P es la cepa parental.

El análisis de las transformantes en cuanto a crecimiento radial mostró que el silenciamiento de *atyap1* no tuvo efecto sobre el crecimiento radial, ya que como se muestra en la figura 28, no hay diferencia significativa de ninguna de las transformantes con respecto a la cepa parental.

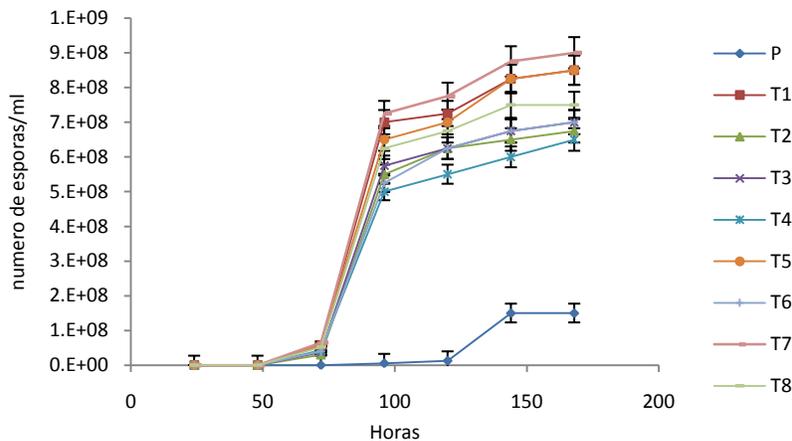


Figura 29. Cinética de esporulación de las transformantes de  $\Delta atyap1$  (T1–T8), Cepa parental (P), en medio Power.

En la figura 29 se muestra la cinética de esporulación de las transformantes de  $\Delta atyap1$ , en donde se observa un adelanto en el inicio de la esporulación de las transformantes con respecto a la parental. En cuanto al conteo final de esporas obtenidas a las 168 h se observa que en el caso de las transformantes de  $\Delta atyap1$  hay un aumento en la esporulación, en donde se alcanza hasta 6 veces más esporas que la cepa parental. Por lo tanto se determina que las transformantes de  $\Delta atyap1$  son sobreproductoras de esporas e inician antes la esporulación.

La esporulación sirvió también para seleccionar las transformantes más características del silenciamiento de *atyap1*, en donde se selecciono a las transformantes T7, T1, T8 y T5, ya que fueron las que al final de la

esporulación obtuvieron mayor número de esporas con respecto a la parental. Estas transformantes seleccionadas, se compararon posteriormente en cuanto al inicio de la producción de lovastatina.

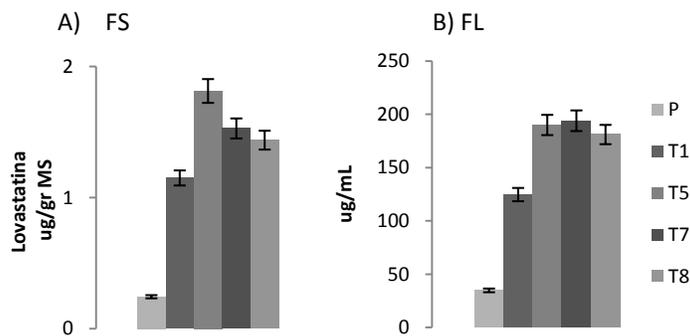


Figura 30. Producción de lovastatina a las 48 horas de las transformantes de  $\Delta atyap1$  (T1, T5, T7, T8), donde P es la cepa parental, en A) Fermentación Sólida FS (MC) y B) Fermentación líquida convencional FL.

En la figura 30, se hace la comparación del inicio de la producción de lovastatina en FS y FL de las transformantes previamente seleccionadas con la cepa parental. Se observa que a las 48 h la producción de las transformantes es mayor en ambos sistemas en FL y FS con respecto a la parental; con esto podemos concluir que el silenciamiento de *atyap1* provocó un adelanto en la biosíntesis de lovastatina. De este experimento también se seleccionó la transformante más prometedora en cuanto a la caracterización del silenciamiento del gen *yap1*, fue la transformante T5, la que se utilizó a partir de aquí para experimentos posteriores y se denominó como transformante de *atyap1*.

### 7.3.3 Confirmación de la integración del vector al genoma de *A. terreus*.

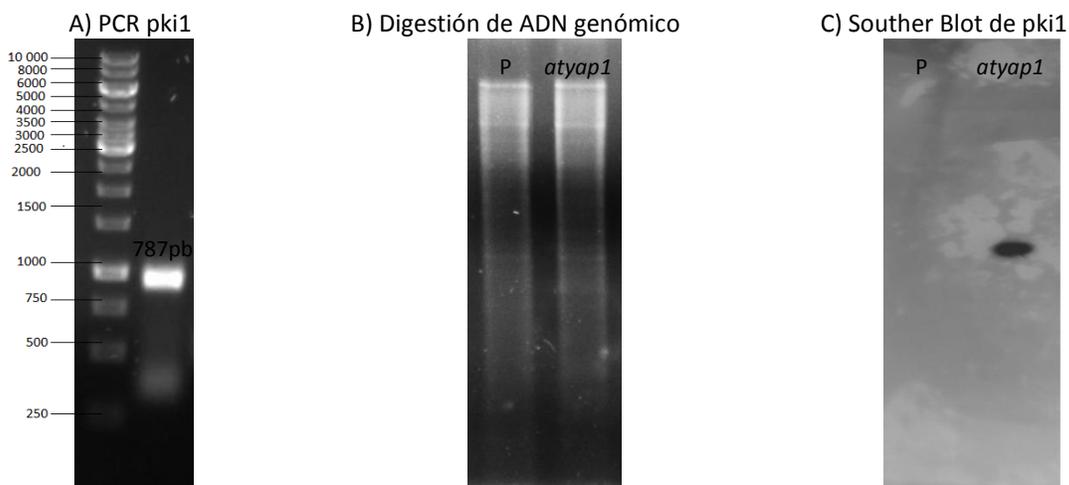


Figura 31. Confirmación de la integración del vector al genoma de *A. terreus* por PCR A) y por Southern blot B) y C). En donde P es la cepa parental y  $\Delta atyap1$  es la transformante con el gen *atyap1* silenciado, *pki1* es el fragmento del vector del silenciamiento.

En la figura 31 podemos observar que el fragmento del vector del silenciamiento *pki1* se encuentra dentro del genoma de las transformantes, y no de la cepa parental, ya que el Southern blot muestra una banda para este fragmento sólo en la transformante. Con esto se confirma la integración del vector pGdPkiRNAi dentro del genoma de la transformante *atyap1*.

### 7.3.4 Caracterización de la transformación de *atyap1*.

#### 7.3.4.1 Perfiles de expresión de genes en $\Delta$ *atyap1*.

Con el fin de confirmar que el gen *atyap1* se expresa menos en la transformante y de evaluar el efecto de este silenciamiento en otros genes relevantes, se realizó un análisis de Northern.

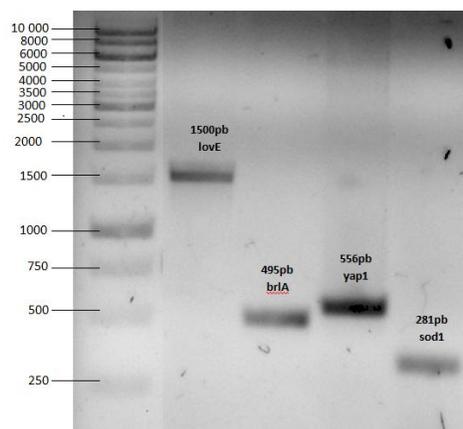


Figura 32. Purificación de las sondas de los genes *lovE*, *brlA*, *yap1* y *sod1* utilizadas para el análisis del Northern blot de silenciamiento *atyap1* (Marcador 1K Invitrogen).

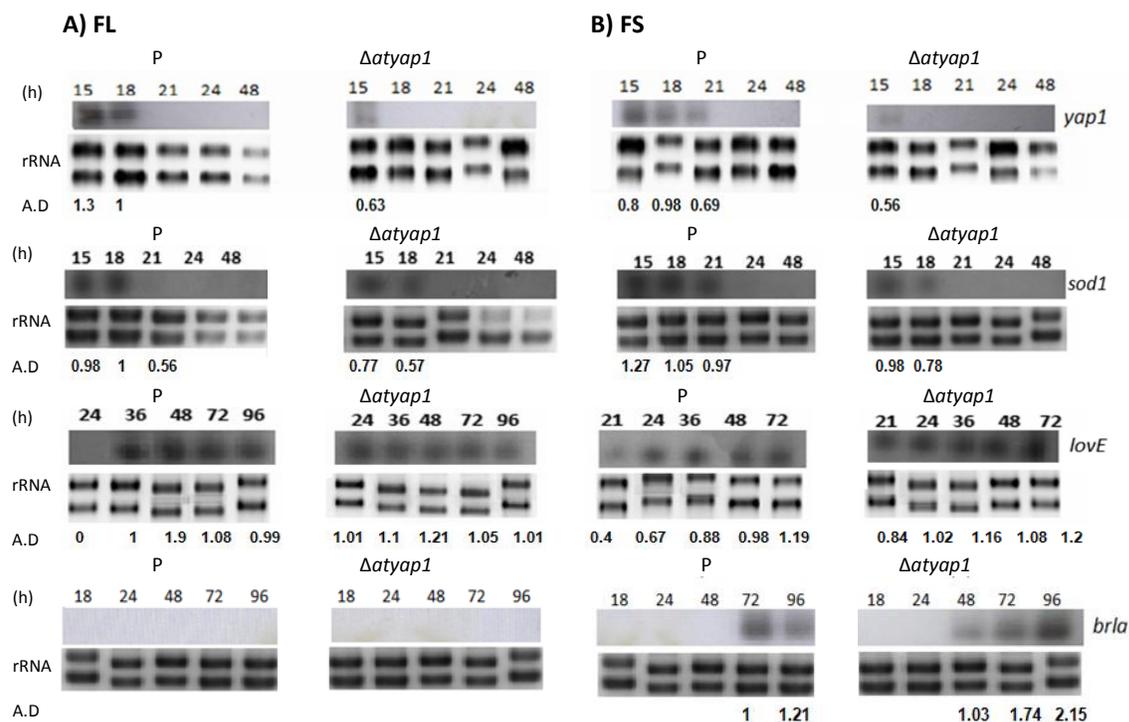


Figura 33. Comparación de la expresión de los genes *yap1*, *sod1*, *brlA* y *lovE* durante la FS y FL de lovastatina en: la cepa parental (P) con la cepa con el silenciamiento del gen *yap1* (*atyap1*). Esto se realizó por Análisis de Northern a diferentes tiempos en horas (15, 18, 21, 24, 36, 48, 72, 96) (h), tanto en FL panel A) como en FS panel B). Para cada uno de los genes se muestra el control de carga de rRNA (EtBr) como control de carga. La intensidad de las bandas (señales) fueron cuantificadas por densitometría (A.D) empleando el software ImageJ (versión 1.43u) y los resultados se normalizaron con la carga de rRNA (teñido con bromuro de etidio). Los resultados de la normalización de los tratamientos se presentan como fracción, considerando que la banda correspondiente a la muestra control (0) es 1 (es decir, el 100%).

Como se observa en la figura 33, tanto en FS como en FL se ve disminuida y acortada la expresión de *atyap1* en  $\Delta$ *atyap1*. En el análisis por Northern Blot del gen *atyap1*: Hay expresión a las 15, 18 y 21h en cepa parental en FS mientras que en la  $\Delta$ *atyap1* sólo a las 15h y con menor intensidad. En FL hay expresión a las 15 y 18h en la cepa parental mientras que en  $\Delta$ *atyap1* sólo a las 18h y con menor intensidad. Además, se ve que en FS es mayor la duración de la expresión de *atyap1* en la parental.

En el caso del gen *sod1*, hay expresión a las 15, 18 y 21 h en cepa parental en FS; en la transformante sólo a las 15h y 18h y con menor intensidad. En FL hay expresión a las 15 y 18 h en la cepa parental, igual que en  $\Delta$ *atyap1*, pero con menor intensidad. Es mayor la expresión de *sod1* y dura más en FS que en FL. Se puede decir que en FS y FL se ve disminuida y acortada la expresión de *sod1* en  $\Delta$ *atyap1*.

En el análisis del gen *brlA* se encontró que hay expresión a las 72 y 96h en cepa parental en FS; en  $\Delta$ *atyap1* inicia desde las 48h y continua hasta las 96h con mayor intensidad. Como era de esperarse, no hay expresión de *brlA* en FL ni en la parental ni  $\Delta$ *atyap1* (no esporula). Lo más importante es que hay un adelanto y aumento de la expresión de *brlA* en  $\Delta$ *atyap1*.

En el análisis de *lovE*, en FL en la cepa parental inicia la expresión a las 36h, mientras que en  $\Delta$ *atyap1* inicia a las 24h, aunque no se detectaron diferencias en la intensidad de expresión. En FS  $\Delta$ *atyap1* inicia la expresión con intensidad a las 21 h, mientras la parental muestra sólo una ligera acumulación de transcritos. Después, la  $\Delta$ *atyap1* mantiene una mayor expresión (24 y 36 h); por lo tanto la expresión de *lovE* se ve adelantada además de ser más intensa en las  $\Delta$ *atyap1*.

### 7.3.4.2 Sensibilidad en micelio para Peróxido de hidrogeno.

Para determinar la sensibilidad a estrés oxidativo así como la cantidad mínima inhibitoria a peróxido de hidrogeno de las transformantes  $\Delta atyap1$  se realizó una comparación con la cepa parental (P) en cajas de Petri con diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno.

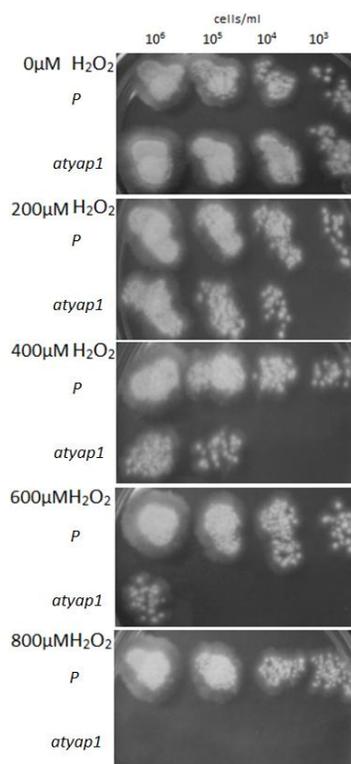


Figura 34. Sensibilidad del micelio al estrés oxidativo en  $\Delta atyap1$  y la cepa parental (P). Se inocularon, en forma de punto, diferentes concentraciones de esporas  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  en medio PDA, con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .

Como se observa en la figura 34, el micelio de la cepa de  $\Delta atyap1$  es sensible al peróxido de hidrogeno en comparación con la cepa parental, ya que esta sigue creciendo a concentraciones de peróxido de 800  $\mu M$  mientras que la cepa con  $atyap1$  silenciada presenta una inhibición en su crecimiento desde 200  $\mu M$   $H_2O_2$ . Esta sensibilidad ya se había visto en la figura 27, pero en esporas. Por lo que se puede concluir que el silenciamiento de  $atyap1$  afecta a la sensibilidad a estrés oxidativo tanto en esporas como en micelio.

### 7.3.4.3 Esporulaci3n en $\Delta atyap1$ .

Con el fin de determinar el efecto del silenciamiento del gen *atyap1* sobre la esporulaci3n se realiz3 la cuantificaci3n de esporas a diferentes tiempos, comparando la cepa  $\Delta atyap1$  con la cepa parental (P) obteni3ndose los siguientes resultados.

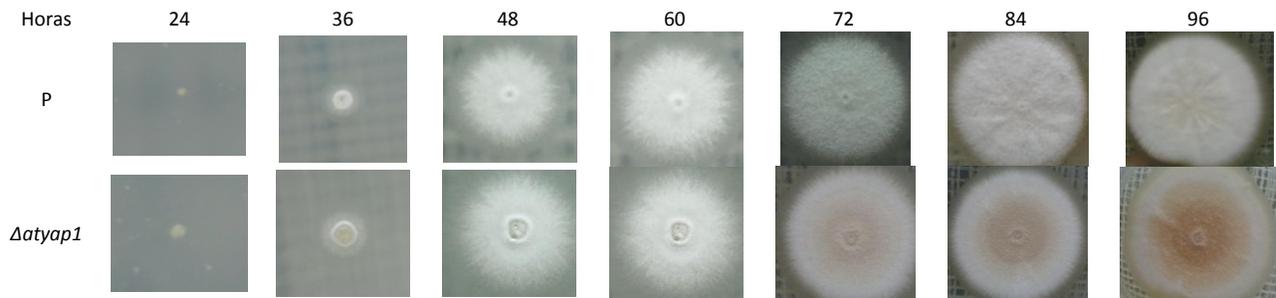


Figura 35. Fenotipo de esporulaci3n de  $\Delta atyap1$  (T5) comparado con la cepa parental (P), en medio PDA, a diferentes tiempos.

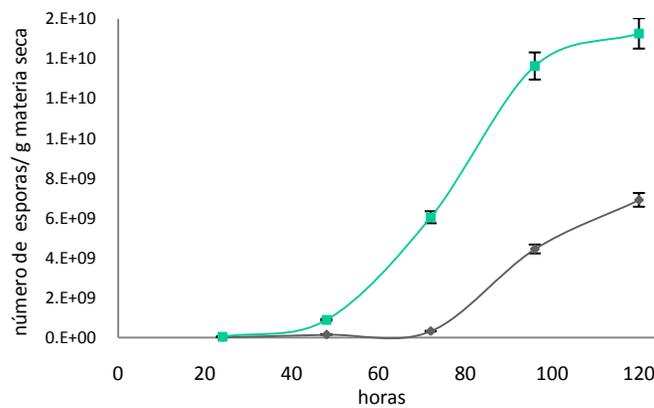


Figura 36. Cin3tica de esporulaci3n de  $\Delta atyap1$  y la parental en Fermentaci3n s3lida FS.

Como se observa en la figura 35 y ya se hab3a visto en la figura 29, el silenciamiento de *atyap1* provoca un fenotipo diferente de esporulaci3n, esto se comprueba con la figura 33 donde se puede ver que la cepa  $\Delta atyap1$  incrementa la cantidad de esporas producidas. Adem3s, se aprecia con claridad que la transformante inicia la esporulaci3n 24 horas antes; ya sea en medio Power (figura 29), medio PDA (figura 35) o FS (Figura 36).

### 6.3.4.4 Producción de lovastatina, Biomasa, pH y EROS en *Δatyap1*.

Como el punto central de la caracterización, se evaluó el efecto del silenciamiento de *Δatyap1* sobre la cinética de producción de lovastatina, la cinética de acumulación de EROS y sobre otros parámetros de fermentación.

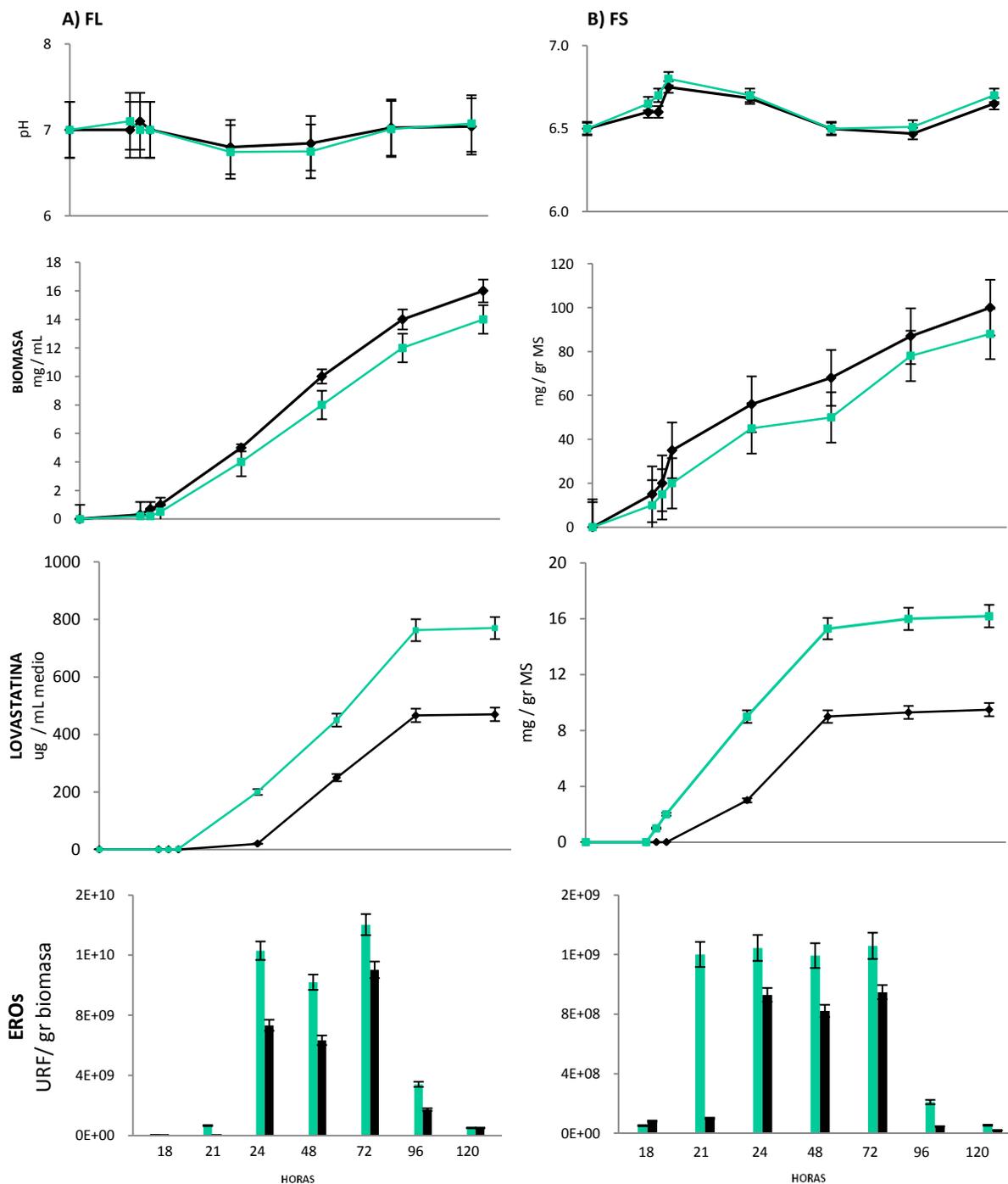


Figura 37. Cinética de producción de lovastatina de *Δatyap1* ■ y la cepa parental ♦ en A) Fermentación líquida FL y B) Fermentación sólida FS. Donde se muestra la cinética de pH, la biomasa, biosíntesis de lovastatina y acumulación de EROS (URF: Unidades Relativas de fluorescencia).

Como se observa en la figura 37, la producción de lovastatina inicia 24 horas antes en *Δatyap1* en comparación con la parental. Inesperadamente, también se encontró que la transformante sobreproducía lovastatina en ambas fermentaciones FL y FS con un incremento del 63% y 70% respectivamente. En sólido como en líquido podemos observar un comportamiento muy similar. La pendiente o velocidad de producción es muy similar en la parental y *Δatyap1* por lo que el mayor efecto se da principalmente en el adelanto de la producción, es decir produce más tiempo, pero a la misma tasa.

Es importante notar que la acumulación de EROs no sólo es mayor en *Δatyap1* que en la parental, sino que la explosión oxidativa inicia antes que en la parental, lo que está relacionado con la producción prematura así como el adelanto de la expresión de lovE en ambos sistemas (FL y FS).

En FS hay mayor producción de lovastatina, aunque en FL hay mayor acumulación de EROS. Sin embargo, en FS hay un nivel de EROs más constante a lo largo de la fase de producción mientras que en FL hay mucha variación.

En esta misma figura observamos que la cinética de pH es similar en ambas cepas, tanto en FS como en FL. Con respecto al crecimiento, no se detectaron diferencia significativa en FS; en el caso de la FL hubo diferencias a las 96 y 120h donde *Δatyap1* crece ligeramente menos que la cepa parental.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 EFECTO DE LA AIREACIÓN EN FS USANDO DIFERENTES SOPORTES SÓLIDOS.

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante FL, sin embargo en años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés por la FS, como una alternativa industrial a la FL. Esto porque se pueden utilizar sustratos económicos, se requiere poco procesamiento, las etapas de transmisión son continuas y se utiliza menos potencia.

Además, una característica muy importante, presentan altas productividades y rendimientos más altos que en FL, no sólo esto, sino que existen metabolitos que sólo se pueden producir en FS, hay muchos casos en que las enzimas producidas en FS difieren de los producidos en FL, por ejemplo en que el producto de interés es extracelular mientras que en FL es intracelular (Barrios- González, 2011).

Otras ventajas que presenta la FS es la baja actividad del agua requerida, esto es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras, además de que genera menos efluentes. La FS presenta menos predisposición a problemas como la inhibición de sustrato y se caracteriza por poder utilizar altas concentraciones de sustrato que permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Debido a todas estas ventajas, la FS es un método de cultivo alternativo que se ha vuelto cada vez más atractivo para la investigación y para la industria (Barrios- González, 2011).

La FS se define como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida en la ausencia de agua libre; actualmente, la fisiología de la FS no está bien caracterizada y son poco conocidos los estímulos que el hongo percibe al encontrarse en medio sólido, y que inducen una fisiología diferente: fisiología del medio sólido, la cual se manifiesta a menudo en una mayor producción del metabolito secundario y enzimas (Barrios-González, 2011).

La FS presenta diferencias significativas con la FL, la más importante y la más atractiva es la sobreproducción que presenta de enzimas y metabolitos secundarios. Sin embargo para poder aplicar y desarrollar sistemas de fermentación que aprovechen las particularidades de la FS es necesario comprender qué estímulos son los que propician las altas producciones además de las diferencias fisiológicas que surgen durante el crecimiento de células microbianas en los dos tipos de sistemas de cultivo.

Este proyecto se dedicó al estudio de estímulos de la FS: contacto directo con el aire y estímulos del soporte. Además de comenzar a investigar la posible aplicación de estos estímulos en la FL. También se dedicó a profundizar la investigación de los mecanismos que pueden regular el metabolismo secundario en la producción de lovastatina por *A. terreus*.

Ávila Cisneros (2009) desarrolló estudios fisiológicos diseñados para evaluar la contribución de diferentes estímulos a la fisiología del medio sólido donde se identificaron al contacto con el aire como un estímulo muy importante, seguido por el estímulo del soporte, y un menor efecto de la baja actividad de agua y alta concentración de nutrientes.

Uno de los parámetros de mayor significación en la FS es la aireación (contacto con el aire), la que se utiliza para mantener la concentración de oxígeno imprescindible para el crecimiento del microorganismo; además, permite regular la temperatura y la humedad del sustrato dentro del reactor (Ruíz-Leza et al., 2007).

Sin embargo, estudios realizados en la producción de lovastatina en FS en poliuretano han demostrado que una baja aireación es más compatible, debido a que conserva mejor la humedad y con ello facilita el crecimiento de biomasa (Baños et al., 2009). Estos resultados contrastan con el efecto de la aireación en otros sistemas de cultivo, tales como FS de salvado de trigo e incluso FL, en los que la aireación elevada favorece la producción de metabolitos (Valera et al. 2005).

De acuerdo con los resultados obtenidos inicialmente en la figura 16, donde se compararon diferentes sistemas de aireación, encontramos que una baja aireación favorece la producción de lovastatina como ya lo había mencionado Baños et al 2009. En nuestros resultados se obtuvo que la producción de lovastatina fuera mayor en MC (ó matraz cerrado) un sistema con aireación nula, esto en comparación con los demás sistemas aireados MA y C. La producción específica del MC fue de 1.3 mg lovastatina /g biomasa mientras que el sistema de MA fue de 0.64 mg lovastatina/g biomasa.

También se observó cómo la producción de biomasa es mayor en el MA que en MC, esto se debe que a la concentración de oxígeno es imprescindible para el crecimiento del microorganismo (Ruíz-Leza et al., 2007). El sistema de MA permite la transferencia de gases, es decir la entrada y salida de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y por ello favorece más el desarrollo de biomasa que en MC, donde el O<sub>2</sub> es limitado al espacio de cabeza del sistema, quizás con un intercambio muy reducido.

Una observación inesperada e importante de la figura 16, fue que la acumulación de EROs disminuyó conforme se aumentó la aireación. Sin embargo en este experimento no se puede concluir si esto se debe al efecto de la aireación o es un efecto en conjunto con la pérdida de humedad, ya que % de humedad disminuye conforme se aumenta la aireación, mostrando mayor humedad en MC que en MA y que en las columna.

La pérdida de humedad se explica debido a que el soporte de poliuretano (PUF) de la FS difiere de los otros sistemas FS ya que la fase líquida es más vulnerable al secado porque que el medio líquido en la estructura polimérica está en contacto directo con el flujo de aire. Aún utilizando medio más concentrado 2.5X, que produjo más biomasa, lo que genera más humedad por respiración, no evitó una menor humedad y que la aireación fuera desfavorable para la producción en estos sistemas con aireación MA y C.

En la figura 16, también se muestra el perfil de la acumulación de EROs a lo largo del tiempo, curiosamente resulta ser igual para los tres sistemas de aireación MC, MA y C. Es decir, aunque los niveles son distintos, el comportamiento se conserva: la acumulación inicia a la misma hora, se mantiene estable en la idiofase y decrece a la misma hora, lo que nos indica que el perfil de acumulación de EROs es independiente de la aireación. Indicando que la FS es un sistema en que el hongo necesita las EROs para funcionar con o sin aireación. Esto concuerda con lo descrito por Miranda et al. 2008 en donde señalan que la acumulación de EROs es un sistema de señalización desarrollado por *A. terreus*.

Para poder demostrar en forma contundente que el cambio en la acumulación de EROs en sistemas aireados disminuye por el efecto de la aireación, y no por el efecto de la humedad, se diseñaron sistemas que permitieron controlar la humedad a lo largo de la FS en MA. Estos sistemas se compararon con el MC y se seleccionó aquel que mostraba una cinética de humedad similar a la del MC. Este sistema consiste en un MA, con 2 pequeños vasos de precipitado con agua destilada en el interior. Así, la humedad desprendida por estos compensa la pérdida de humedad por la aireación.

Al comparar la FS de lovastatina en MC con la FS en MA con humedad controlada, se demostró (figura 18) que la acumulación de EROs disminuye en sistemas con aireación, encontrándose una menor acumulación de EROs en MA con humedad controlada. Así, se comprobó que este efecto es independiente de la humedad del sistema, ya que ésta se mantiene controlada a lo largo de la fermentación (figura 18).

La explosión oxidativa comienza a las 24 horas en ambos sistemas, aunque en los sistemas de aireación con niveles de EROs más bajos. Esto coincide con lo encontrado por Miranda et al. 2013, donde encuentra el mismo perfil de acumulación de EROs en FS y en FL, aunque el nivel de EROs se mantiene mucho más estable en FS y atribuye a estas diferencias fisiológicas que podrían estar asociadas a la más alta producción de lovastatina en FS.

La aireación está relacionada con la disponibilidad de oxígeno que varía de acuerdo al sistema de fermentación ya sea en MC, MA o FL. En teoría, en FL se tendría menor disponibilidad de oxígeno que en el sistema de MC, y el MC menor disponibilidad de O<sub>2</sub> que en MA. Curiosamente la acumulación de EROs es inversa, ya que en FL es mayor que en FS (Miranda et al. 2013) y en MC hay mayor acumulación de EROs que en MA. Así, estos resultados demuestran que, en FS de lovastatina con *A. terreus*, a menor aireación mayor acumulación de EROs en la idiofase.

Sin embargo el perfil de acumulación de EROs en FS ya sea MC o MA, es característico de las FS ya que en la idiofase se mantiene estable, a diferencia de la FL que, aunque muestra niveles más altos a lo largo de la idiofase, éstos no son estables. Esto indica que en sistemas de FS se favorece el mejor control de EROs, lo que probablemente favorece la producción de lovastatina.

Una vez que se comprobó, usando poliuretano como soporte, que el perfil de acumulación de EROs disminuye conforme se aumenta la aireación, nos preguntamos si esta era una fisiología general de la FS. Es decir, si esto pasaría en otros sistemas de fermentación sólida más tradicionales, como los usados con soporte natural como por ejemplo bagazo de caña o en sustratos naturales como el salvado de trigo. Para ello se realizó un experimento en donde se compararon diferentes soportes con diferente grado de aireación.

Como se observó en la figura 20, en donde se compara diferentes soportes: bagazo de caña, salvado de trigo y PUF en diferentes sistemas de aireación: MC y columnas, se encontró que la humedad es menor y decrece más rápido para el caso de los sistemas de columna en todos los soportes. Además, que el crecimiento de biomasa es mayor en columna que en el MC en todos los casos. Esto se debe a que a mayor nivel de aireación mayor disponibilidad de oxígeno y con ello mayor crecimiento de biomasa (Ruíz-Leza et al., 2007).

En cuanto a la producción específica final (96 h) mg de lovastatina/ mg de biomasa se obtuvieron en los sistemas con poliuretano 0.4 y 0.08 en matraz y columna respectivamente, en bagazo de caña 0.24 y 0.15 matraz y columna respectivamente, y usando salvado de trigo 0.26 y 0.16 matraz y columna; Con estos datos es muy claro el efecto sobre la fisiología y producción específica de lovastatina en donde a menor aireación mayor producción específica.

La observación más importante de este experimento (figura 20) es que, al aumentar el nivel de aireación, disminuye la acumulación de EROs en la FS de lovastatina con *A. terreus* en todos los sistemas utilizados: PUF, bagazo de caña y salvado de trigo. Es decir, el aumentar el nivel de aireación en fermentación sólida incide en la disminución de las EROs y esto parece inducir una disminución en la producción de lovastatina en todos los sistemas de FS utilizados.

Sin embargo, la disminución es general en PUF, pero en bagazo de caña y especialmente en salvado, el incremento en la producción es sobre todo en las primeras 72 h, aunque se empareja con el control el nivel de producción de lovastatina a las 96 h. No obstante, al graficar producción específica, es claro que el micelio con menor aireación y por lo tanto con mayor cantidad de EROs es mucho más productivo. Esto confirma que los EROs regulan la biosíntesis de lovastatina, como reportado por Miranda et al. 2013.

Lo anterior también indica que el nivel de EROs obtenido en MC genera una mejor señal para la producción de lovastatina, que los niveles menores. Este efecto es similar al descrito por Miranda et al. 2013 en FL, donde disminuyeron la concentración intracelular de EROs adicionando un agente reductor al medio y obtuvieron una menor producción de lovastatina y una menor expresión de los genes *lovE* y *lovF*.

Es evidente que las EROs juegan un papel muy importante como moléculas señalizadoras y que interactúan con las vías de transducción de señales, para dar una respuesta a las condiciones ambientales prevalentes, en este caso, un ambiente aireado o no aireado. Conforme a la

concentración de oxígeno las células realizan los cambios en expresión génica (fisiología en general) más convenientes para el hongo. Existe una íntima interacción entre cada una de las diferentes vías y que mientras que combatir a las EROs es una necesidad común para el hongo, en diferentes casos hace uso de diferentes mecanismos no sólo para detoxificarse de las EROs y asegurar supervivencia (Folch-Mallol et al., 2004) sino que también las EROs actúan como moléculas señalizadores del ambiente.

En estudios realizados por Miranda et al. 2013, se encontró que la acumulación de EROs coincide con el inicio de la producción de lovastatina, es decir las EROs contribuyen en la señalización para iniciar y sostener la idiofase. Nuestros resultados muestran también (figura 20) que efectivamente al iniciar la acumulación de EROs se inicia la producción de lovastatina, con lo que se corrobora que las EROs no sólo son moléculas dañinas sino que participan activamente señalizando diversos procesos en la fisiología del hongo, en particular la biosíntesis de lovastatina. Además, que esto sucede con un perfil de acumulación similar en FS y en FL.

Sin embargo, en contraste con el medio líquido, en FS se acumulan niveles menores pero mucho más estables de EROS en la idiofase. Se comprueba aquí que estos niveles menores son característicos de FS, y que se presentan en cualquier tipo de FS, en soporte inerte artificial o natural (bagazo de caña) o en salvado de trigo (FS en sustratos naturales agrícolas).

Otro hallazgo importante de este trabajo fue que los niveles bajos y controlados de EROs parecen ser importantes para un buen nivel de producción de lovastatina como los encontrados en FS. Esto debido a que entre más estable fue el perfil de acumulación de EROs en la idiofase mayores producciones encontramos (figura 20). Este es el caso del sistema de FS en PUF en donde son más estables las EROs que en los sistemas con bagazo de caña y salvado de trigo, y en el que se obtienen mayores producciones de lovastatina.

En plantas las EROs actúan como segundos mensajeros y están involucrados en procesos de desarrollo como ya se había visto por Apel y Hirt (2004), y Jones (1994) quienes observaron que las EROs eran requeridas en diferentes procesos fisiológicos

Efectos similares se han observado en mamíferos, donde niveles apropiados de EROs estimulan las reacciones antioxidantes, la modulación del sistema inmune y la regulación de la proliferación celular (Bokoch y Knaus 2003). Así mismo, estudios recientes han revelado que ciertas rutas de señalización son reguladas por el estado intracelular redox (Kamata y Hirata 1999).

Las EROs parecen no sólo regular en un punto de la fermentación sino que señalizan a lo largo de toda la fase. Encontramos que no sólo se incrementa la acumulación de EROs a las 24 h sino que se mantiene así durante toda la idiofase. Esto contrasta con los estudios realizados con el hongo *Neurospora crassa* que indican que hay un breve periodo transitorio de incremento de EROs al comienzo de cada etapa morfogénica (Toledo et al. 1995). Es decir, al parecer la conidiación y

otras transiciones morfogénicas suceden después de un período oxidativo, mientras que el metabolismo secundario se lleva a cabo durante el período oxidativo.

En estudios sobre la producción de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* también se encontró que hay un estado oxidativo que coincide con la transición entre trofofase e idiofase, y que las cepas más aflatoxigénicas muestran una concentración de EROs en ese punto mucho más alta que las cepas no toxigénicas. Indicando que la intensidad del EROs puede estar relacionada con el nivel de producción de la cepa (Jayashree y Subramanyam 2000).

Los resultados obtenidos en esta tesis, utilizando FS en bagazo de caña, salvado de trigo y PUF muestran que los cultivos con aireación limitada o sin aireación tienen mayores rendimientos de lovastatina. Es decir, a pesar de que los sistemas de MC (sin aireación) presentaron menor concentración de biomasa, mostraron la más alta producción del metabolito. Esto coincide con lo reportado por Baños et al. (2009) en donde los niveles de lovastatina y producción específica en FS en PUF fueron mayores en el sistema sin aireación.

Los resultados de esta tesis confirman que en la idiofase de la FS de lovastatina en PUF el perfil de acumulación de EROs no es producto de la baja aireación, sino que es típico de este y otros sistemas de FS. Esto implica que, en estos sistemas con muy alto contacto (o abundancia de O<sub>2</sub>) con el aire, hay un mecanismo fisiológico para contener las EROs. Es decir que asegura que las EROs se mantendrán bajas en FS. Este mecanismo no sería a través de enzimas antioxidantes pues ya se ha demostrado que éstas bajan en idiofase (Miranda et al. 2013).

Se concluye que el nivel de la concentración de EROs en la FS de lovastatina depende, en forma inversa, del grado de aireación del cultivo. No obstante, el perfil general de EROs es constante en al FS. Es decir el momento de inicio de la acumulación y el tiempo en el que decrece (fin de la idiofase) es el mismo, sin importar el grado de aireación o el soporte utilizado.

Aún queda la incógnita de cuál es el mecanismo por el que en un sistema donde hay mayor aireación, hay menor cantidad de EROs. Resulta interesante también conocer la relación entre el contacto del aire y la formación de EROs, y cómo regulan estos la producción de metabolitos secundarios en hongos.

Se ha propuesto que la diferenciación celular es una respuesta al estado de estrés oxidativo (EOX) y que el crecimiento y los estados diferenciados, son condiciones estables en las cuales los niveles de EROs son mantenidos por un balance en la generación de EROs y la eliminación (Cano-Domínguez et al. 2008). Las EROs se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, o al exponer las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados.

A pesar de las condiciones oxidantes de la vida aeróbica y de los distintos ataques ambientales, los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un EOX (Barrios-González et al. 2008). El EOX generalmente ejerce un impacto negativo en el crecimiento de hongos.

Volviendo a la conclusión de que el nivel de la concentración de EROs en la FS de lovastatina, dependen, en forma inversa, del grado de aireación del cultivo, una posible explicación para esto sería la activación de la respiración alternativa. Esto, debido a que una de sus funciones putativas es disminuir la producción de EROs, pero a expensas de la generación de ATP debido a la falta de bombeo de protones (Li Q. et al. 2011). Otra explicación posible sería la inhibición o daño de enzimas catabólicas muy sensibles a EROs, como la G3P deshidrogenasa y la aconitasa.

## **8.2 ADICIÓN DE ESTÍMULOS DE LA FS A LA FL**

En este proyecto se logró evaluar la adición de los estímulos de la "fisiología del medio sólido": soporte y contacto directo con el aire a la FL. Para ello se realizó la adición de soporte a la FL y, en forma separada, la adición de un agente oxidante que propiciaría un ambiente con estrés oxidativo, para simular un ambiente más estresante como es el de la FS en la FL.

### **8.2.1 FL CON ADICIÓN DE SOPORTE**

Actualmente no se conoce a ciencia cierta por qué se da un aumento en la producción en el sistema de FS, en comparación con FL, durante la producción de metabolitos. Sin embargo, se han encontrado evidencias de que el soporte influye como un estímulo para el desarrollo de la fisiología del medio sólido, y en particular una mayor producción específica (Ávila Cisneros, 2009).

Los resultados de esta tesis (figura 21 y tabla 4) muestran los resultados obtenidos de la adición de soporte en la FL. En cuanto al cambio en la biomasa se observó que la adición de soporte a la FL genera un cambio importante en cuanto a crecimiento y fisiología. En los sistemas con adición de soporte la totalidad del crecimiento es sobre el soporte y sobre todo en la parte más externa de éste. Es un micelio que está adherido al soporte, de hecho se observó que una vez que el hongo ha detectado el soporte, se adhiere a éste y sólo crece sobre éste y no hay crecimiento en forma de pellets en medio de cultivo como normalmente pasa en la FL. También se observa un efecto importante en la producción total de biomasa, se encontró que a mayor cantidad de soporte se produjo mayor cantidad de biomasa. Además que a mayor contacto del soporte con el aire, se genera una mayor producción de biomasa. También se encontró que a menor tamaño de partícula se produce mayor cantidad de biomasa.

En cuanto al área de contacto con el aire, ya se había visto que con mayor disponibilidad de oxígeno se favorece el crecimiento de la biomasa. Entonces, se identificó otro efecto en relación al soporte en FL: a mayor área de contacto con el aire mayor producción de biomasa.

Una observación importante es que la biomasa sólo creció sobre el soporte y no en el líquido, esto se podría deber a que a mayor superficie de adhesión del soporte habrá mayor espacio para la biomasa y con ello mayor producción de biomasa (aunque la concentración de nutrientes sea la misma). En relación a que la biomasa “prefiere” adherirse a la superficie de este soporte, es probable que la disponibilidad de nutrientes sea más alta ahí que en la matriz (regiones centrales) de soporte.

De acuerdo a la figura 21, los diferentes sistemas de FL con adición de soporte presentaron un cambio en su fisiología, ya que también presentan cambios en el pH, esto coincide con los diferencias en cuanto a producción de lovastatina, crecimiento y desarrollo de la biomasa.

En cuanto a la producción volumétrica se observó un aumento importante en todos los sistemas con adición de soporte, desde los que están en contacto con el aire así como los que tenían mayor cantidad de soporte así como los que el tamaño de partícula es variante, este es un efecto del crecimiento de biomasa, en donde a mayor cantidad de biomasa mayor producción de lovastatina.

La producción específica de lovastatina en estos sistemas reflejó en todos los casos de adición de soporte a la FL que se incrementó la producción específica de lovastatina, donde se encontraron incrementos hasta 3 veces más en este parámetro, en algunas variantes. También se encontró que a mayor cantidad de soporte en la FL, se obtiene mayor producción específica de lovastatina. Además, que en las áreas del soporte en contacto con el aire, hay una mayor producción de lovastatina.

Por lo tanto los resultados demostraron que, tanto en un ambiente líquido como en uno en contacto directo con el aire, los estímulos del soporte estimulaban fuertemente la biosíntesis de lovastatina. También se logra demostrar que no sólo el tiempo de exposición al contacto directo con el aire es importante para la producción de lovastatina (Ávila Cisneros 2009), sino también el área de contacto directo con el aire. Desde el punto de vista aplicado, se comprueba que estos estímulos de la FS son aplicables para el mejoramiento y evolución de los sistemas de FL.

Desde un punto de vista básico, los resultados de esta tesis, junto con los encontrados por Ávila (2009), demostraron que al inmovilizar el micelio ocurren cambios en la fisiología del hongo, es decir efectos importantes en la producción específica de lovastatina, obteniendo una diferencia muy importante en los sistemas de cultivo, aún en un ambiente líquido. Proponemos entonces, que el estímulo de adhesión del micelio, aún en un ambiente líquido, genera un cambio en la fisiología que empieza a parecerse más a la fisiología del medio sólido y por lo tanto tiene un efecto en la producción de lovastatina.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Ishida et al. (1998), en donde trataron de comprender la fisiología de medio sólido de *Aspergillus oryzae*, utilizando un modelo de cultivo de agar cubierto por una membrana. Su investigación sugieren una relación entre el nivel de

producción de enzimas y el tamaño de poro de membrana utilizada (donde pasan los nutrientes pero no puede pasar el micelio). Esta evidencia demuestra la existencia de un estímulo que puede ser el de exploración y colonización, involucrado en la fisiología del medio sólido.

Que el estímulo del soporte cambia la fisiología en FL hacia una más parecida a la del medio sólido también se puede observar en otros trabajos como el de Bigelis et al. (2006,). Los autores reportaron que el uso de diferentes soportes poliméricos influyen en el crecimiento, morfología y producción de metabolitos secundarios bioactivos, esto al trabajar con pirrocidinas y acremonidinas en hongos.

En estos experimentos, al sistema de FL para la producción de dichos metabolitos se le adicionó un disco de nitrocelulosa al medio de cultivo lo que ocasionó un perfil de productos distinto al esperado en FL convencional. Aparentemente, esto desencadenó una serie de estímulos que se manifestaron en el crecimiento y diferenciación del hongo. Con base a lo anterior y a los resultados obtenidos en esta tesis se concluye que el estímulo de soporte genera una fisiología diferente en el hongo.

En el trabajo de Ávila Cisneros (2009) antes mencionado, se realizó un estudio donde se inmovilizó el micelio en FL, los resultados obtenidos con respecto a la producción de lovastatina total, presentaron un comportamiento positivo, pues la producción se vio incrementada hasta en más del doble de su valor, esto indica que existe una diferencia significativa entre uno y otro sistema de producción y no sólo eso, sino que el estímulo planteado está presente y estimula la producción de lovastatina.

Además que al inmovilizar el micelio ocurren efectos importantes en la producción específica de lovastatina, obteniendo una diferencia muy importante en los sistemas de cultivo. Lo que señala que el estímulo de inmovilización del micelio en el sistema de fermentación líquida tiene un efecto en la producción de lovastatina, y además dicho estímulo pertenece al grupo de factores ambientales que inducen la fisiología del medio sólido (Ávila Cisneros, 2009).

En el modelo desarrollado por Avila Cisneros 2009, para estudiar el estímulo de exploración confirmó el efecto del estímulo de soporte que induce la de exploración del micelio; se observó un incremento en la producción específica al poner barreras al crecimiento (membrana) que estimula la necesidad de explorar del micelio. El hallazgo más importante fue que en el sistema con membrana, hubo un aumento significativo en la producción de lovastatina en comparación con la producción obtenida en sistemas sin membrana.

Esto señaló de forma muy similar a lo obtenido en cultivo líquido inmovilizado que el estímulo del soporte influye de manera importante en un aumento de la producción de lovastatina, sugiriendo que el estímulo que induce la exploración incide en la producción de lovastatina (fisiología).

Por otro lado, el contacto directo con el aire fue uno de los estímulos de la fisiología del medio sólido identificados por Ávila Cisneros (2009). Los autores realizaron experimentos en donde se varió el tiempo de contacto con el aire. Los resultados mostraron que, entre más tiempo se expone el micelio al aire (entre baños con medio líquido), la producción aumenta, demostrando que el contacto aire es el estímulo con mayor impacto en la fisiología del medio sólido, medida como incremento en la producción específica.

### 8.2.2 FERMENTACIÓN LÍQUIDA CON ADICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

En la investigación realizada por Baños et al. (2007), *A. terreus* TUB F-514 fue mutado y seleccionada una cepa resistente a estrés oxidativo (EOX). La nueva mutante presentó un importante aumento en la producción de lovastatina. Estos resultados indican que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* está relacionada con su capacidad de contenerse contra el EOX, ya que se encontró que las mutantes resistentes a este tipo de estrés, eran sobre productoras de lovastatina en FS, mas no en FL.

El panorama que comenzó a surgir es que este tipo de estrés tiene una mayor intensidad en FS, en relación con la FL, y que los mecanismos de adaptación al EOX no sólo son valiosos para el hongo creciendo en medio sólido, sino que probablemente inducen una mayor producción de lovastatina y otras características de la fisiología del medio sólido. Existe evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno, funcionan como segundos mensajeros intracelulares (Finkel, 1998).

Esto se ve reflejado en los estudios realizados con el hongo *Neurospora crassa* que indican que hay un breve periodo transitorio de incremento de EROs al comienzo de cada etapa morfológica (Toledo et al., 1995).

Es interesante notar que estudios sobre la producción de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* indicaron que hay un estado oxidativo que coincide con la transición entre trofofase e idiofase; y que las cepas más aflatoxigénicas muestran una concentración de EROs en ese punto mucho más intenso que las cepas no toxigénicas. Indicando que la intensidad de EROs puede estar relacionada con el nivel de producción de la cepa (Jayashree y Subramanyam 2000).

Las EROs son derivados del oxígeno más reactivo que el  $O_2$  en su estado basal. El  $H_2O_2$  es un oxidante débil; sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos ( $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  respectivamente) forma al radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad.

Como se mencionó antes, Miranda et al. (2013) encontraron una coincidencia entre el inicio de biosíntesis de lovastatina y la acumulación de EROs, y sugirieron que las EROs regulan la biosíntesis de lovastatina. Para establecer esta relación emplearon antioxidantes que fueron suplementados de manera exógena a los medios de cultivo. Usando el antioxidante NAC sobre cultivos en caja de

petri, FS y FL, se encontró una disminución en la producción de lovastatina en todos los sistemas, así como la acumulación de EROs.

El análisis a nivel transcripcional, reveló que la acumulación de transcritos de *lovE* y *lovF* en FS y FL se redujeron al disminuir los EROs (Miranda et al., 2014 en prensa), Barrios-González et al. 2008; Sorrentino et al. 2010). Estos experimentos demostraron que los EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.

En esta tesis se pensó que con el empleo de oxidantes, se obtendría el efecto contrario. Para observar el efecto de la adición de un agente oxidante sobre la producción de lovastatina, se adicionó peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) a la FL en diferentes concentraciones. Los resultados (figura 22), mostraron que a 21  $\mu M$  se obtiene un efecto claro sobre la producción de lovastatina así como en la acumulación de EROs.

A concentraciones más altas de  $H_2O_2$  se observa un efecto negativo en el crecimiento y a concentraciones más bajas no hay diferencias importantes sobre la producción de lovastatina, aunque observamos un adelanto en cuanto a la acumulación de EROs.

Con base en ese experimento (figura 22), se seleccionó la concentración de 21  $\mu M$  de  $H_2O_2$  para realizar un análisis más profundo, para ello se realizó una cinética muestreando tiempos más cortos a lo largo de 7 días. Como se observa en la figura 23, parece no haber un efecto a lo largo de la FL con la adición de peróxido en el medio de cultivo. Sin embargo, si ampliamos la sección del inicio de la biosíntesis de lovastatina (mayor frecuencia de muestreo) como se muestra en la figura 24, podemos observar con más claridad el efecto causado por la adición de peróxido de hidrogeno sobre las primeras horas de cultivo.

En la figura 24, se observa cómo la adición de peróxido causa un adelanto en la biosíntesis de lovastatina, donde el inicio normalmente es a las 24h y se adelanta a las 22h. Esto coincide con los niveles de expresión del factor transcripcional *lovE* que, como muestra la figura, también sufre un adelanto en su expresión a las 21 horas, cuando su expresión normal (y en el control) inicia a las 24 horas.

En la figura 24 también observamos cómo con el sistema de adición de  $H_2O_2$  ocurre una precoz acumulación de EROs, donde normalmente iniciaba a las 24 h y se adelanta desde las 18h con bajos niveles. Es decir no alcanza los niveles usuales de la idiofase, aunque parecen ser suficientes para señalar, con un adelanto de 2 horas, en la producción de lovastatina.

Sin embargo, el efecto del oxidante se pierde al continuar la fermentación, ya que más adelante las producciones se igualan. Así, se logró manipular fisiológicamente al hongo para adelantar la producción de lovastatina aunque no se logra el efecto de mejorar los niveles de producción final.

Estos resultados confirmaron lo obtenido por Miranda et al (2014 en prensa) y apoya con contundencia la conclusión de que los EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.

Por otro lado nuestros resultados contrastan por lo encontrado por Miranda (2013) donde, en el mismo sistema, utilizó tanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cómo paraquat en FL sin obtener efectos positivos. Esto seguramente es debido a que utilizó concentraciones mucho más altas del oxidante. Sin embargo, es interesante, que con esas concentraciones indujeron incrementos importantes del metabolito sólo en cultivos de agar en caja de Petri.

Otro antecedente son los experimentos realizados con *A. parasiticus*, donde se lograron incrementos en la producción de aflatoxinas, los cuales fueron dosis dependientes a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (Narasaiah et al. 2006).

### **8.3 SILENCIAMIENTO de *atyap1*.**

El trabajo de Song-Ypng et al. (2013) propone un modelo para la activación transcripcional de genes de biosíntesis de aflatoxina por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo. En *Aspergillus parasiticus*, también se encontró que las EROs se acumulaban durante la fase de producción de aflatoxinas (idiofase) (Jayashree y Subramanyam 2000; Narasaiah et al. 2006), indicando una relación entre las EROs y la biosíntesis de aflatoxinas.

Yap1p es un factor transcripcional que funciona como un sensor de EROs o del estado redox de la célula en paralelo a la cascada MAPK cinasas; y que en caso de incremento de ROS, la proteína entra al núcleo y participa en la transcripción de cientos de genes cuyos productos van a contender el estrés oxidativo (Reverberi et al. 2007).

La presencia de sitios probables de unión de Yap1 en el promotor de *afIR* (gen regulador del “cluster” de biosíntesis), sugirió que el EOX puede regular la biosíntesis de aflatoxinas. Mutantes con *yapA* interrumpido  $\Delta ApyapA$  (ortólogo de *yap1*) en *A. parasiticus*, mostraron un incremento en el EOX, conidiogénesis y biosíntesis de aflatoxinas prematura (Reverberi et al. 2007). Los autores sugirieron que *ApyapA* contribuye a la regulación de la síntesis de aflatoxinas.

Para establecer un mecanismo, por medio del cual los EROs inducen los genes de lovastatina, Miranda et al. (2014 en prensa) analizaron los promotores de los genes *lovF* and *lovE* e identificaron múltiples sitios putativos de unión para factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo, como Yap1.

En esta tesis, consideramos que en *Aspergillus terreus* Yap1 (ó *atyap1*) podría jugar un papel importante en la biosíntesis de lovastatina y más aún en la fisiología especial de la FS (Miranda et al. 2013). Para obtener información sobre el papel de *atyap1* en la FS y FL de lovastatina en este trabajo se realizó un análisis de expresión de este y otros genes relevantes. Además, se clonó un fragmento del gen *atyap1* y se construyó un vector de silenciamiento para el mismo.

Se comparó el comportamiento de la cepa parental y de la cepa silenciada en FS y FL, evaluando, entre otros parámetros, la expresión de algunos genes. En el análisis de Northern del gen *atyap1* en FS y FL (figura 33), se encontró que en la parental este gen se expresa a las 15, 18 y 21 h en FS mientras que en la cepa  $\Delta$ *atyap1* (silenciada) sólo a las 15h y con menor intensidad.

En el caso de la FL hay expresión a las 15 y 18h en la cepa parental y en  $\Delta$ *atyap1* sólo a las 18h y con menor intensidad. Es decir, en FS es mayor la duración de la expresión de *atyap1*. Pero más importante, tanto en FS como en FL se ve disminuida y acortada la expresión de *atyap1* en  $\Delta$ *atyap1*. Como se esperaba, la expresión del gen *atyap1* se ve disminuiría con el silenciamiento, esto además comprueba que el gen *atyap1* efectivamente está atenuado en la cepa  $\Delta$ *atyap1*.

En cuanto al gen *sod1*, se encontró que en FS, hay expresión a las 15, 18 y 21h en cepa parental y en  $\Delta$ *atyap1* sólo a las 15h y 18h y con menor intensidad. En FL hay expresión a las 15 y 18h en la cepa parental y en  $\Delta$ *atyap1* se expresa en las mismas horas pero con menor intensidad. La expresión de *atyap1* y *sod1* se ve disminuida en tiempo y intensidad en las transformantes y sugiere que *atyap1* controla a *sod1*, como ya se ha visto en otros hongos.

En la caracterización de las transformantes silenciadas también se encontró que éstas se vuelven sensibles al estrés oxidativo. Como se observa en la figura 34 y 27, el micelio y las esporas de  $\Delta$ *atyap1* son sensibles al peróxido de hidrógeno en comparación con la cepa parental. Esta sensibilidad seguramente se debe a que Yap1 regula muchos genes de defensa contra EROs como *sod1* (en  $\Delta$ *atyap1* disminuyen su expresión) y muy probablemente los genes de catalasa entre otros.

El hecho de que *sod1* y *yap1* (defensas de las EROs) tengan una disminución en su expresión provoca un cambio en el perfil de acumulación de EROs. Como se observa en la figura 37, donde el perfil de la acumulación de EROs es mayor en  $\Delta$ *atyap1* que en la parental. No sólo esto, sino que la explosión oxidativa inicia antes que en la parental adelantándose 3 horas en  $\Delta$ *atyap1*, debido a que las EROs no son contenidas o atenuadas normalmente por *sod1* y *yap1*, y se provoca un aumento y una precoz acumulación de las EROs.

Se esperaba que el cambio en el perfil de acumulación de EROs en  $\Delta$ *atyap1* tuviera consecuencias en la biosíntesis de lovastatina. Los resultados (figura 37) mostraron que se adelantó el inicio de la síntesis de lovastatina. El inicio de la producción fue 12 horas antes en  $\Delta$ *atyap1* en comparación con la parental. Un segundo efecto, este inesperado, fue que la transformante resultó sobreproductora para ambos sistemas de cultivo (FL y FS). El incremento fue de 60% y 70% respectivamente.

En FS como en FL podemos observar un comportamiento muy similar. La pendiente o velocidad de producción es muy similar en la parental y  $\Delta$ *atyap1*, por lo que la mayor producción se da

principalmente por el adelanto de la producción, es decir produce más tiempo, pero a la misma tasa.

El análisis de la expresión del gen *lovE* factor transcripcional de la ruta biosintética de lovastatina (figura 33), muestra que en FL, en la cepa parental se inicia la expresión de este gen a las 36h, mientras que en  $\Delta atyap1$  se inicia a las 24h. En FS se detectó la acumulación de transcritos a las 21 h, sin embargo en  $\Delta atyap1$  con mucha mayor intensidad.

Esto coincide con lo encontrado en la producción específica de lovastatina en donde observamos un adelanto en la producción. También concuerda con el adelanto de la explosión oxidativa de las EROs, que muy probablemente están regulando factores transcripcionales de la biosíntesis de metabolitos secundarios, como proponen Hong et al (2013) y Reverberi et al. (2007) para el caso de aflatoxinas.

En relación a la esporulación (o conidiación), el silenciamiento del gen *atyap1* tuvo un efecto espectacular. Las transformantes produjeron 6 veces más esporas que la parental. Se realizó un análisis de expresión del gen *brlA*, cuya proteína regula los genes de esporulación. El Northern blot (figura 33) mostró que en la parental hay expresión a las 72 y 96 h en FS, mientras que  $\Delta atyap1$  inicia desde las 48h y continua hasta las 96h con mayor intensidad. Por lo tanto hay un adelanto y aumento de la expresión de *brlA* en  $\Delta atyap1$ , lo cual se ve reflejado en la figura 35, 29 y 36 donde se observa que el silenciamiento de *atyap1* provoca un fenotipo diferente de esporulación, la cepa  $\Delta atyap1$  que inicia 12 horas antes la esporulación y llega a producir hasta 6 veces más esporas.

Estos resultados de adelanto en esporulación, acumulación de EROs y biosíntesis de lovastatina concuerdan con lo encontrado por Reverberi et al. (2008), quienes construyeron una cepa  $\Delta ApYap1$ , encontrando una acumulación precoz de EROs en el cultivo de aflatoxinas y una producción adelantada de aflatoxinas; e incluso la esporulación se presentó en forma precoz. Los autores propusieron que ApYap1 podría estar regulando en forma negativa los genes del metabolismo secundario. Sin embargo, también es posible que las EROs estén regulando estos genes por otro mecanismo, esto se relaciona por lo encontrado ya que *atyap1* no se expresa en la idiofase de FS ni en la FL.

Este conocimiento ayudará a comprender el nexo entre los estímulos del medio sólido con los cambios fisiológicos y genéticos que llevan a la fisiología del medio sólido, y por ende a una mayor producción de lovastatina. Muy probablemente estos principios regirán también la producción de otros metabolitos secundarios por este y otros sistemas de fermentación sólida.

## 9. CONCLUSIÓN

- La forma del perfil de acumulación de EROs en la FS de lovastatina es independiente del grado de aireación.
- En cualquier tipo de fermentación sólida (en soporte inerte o en sustrato sólido), a mayor nivel de aireación hay una menor acumulación de EROs, con lo que se obtiene una menor producción de lovastatina, pero una mayor generación de biomasa.
- Al introducir a la FL estímulos de la FS: el soporte, el contacto con el aire y la adición de peróxido (EROs), se inducen algunas características de la fisiología del medio sólido, principalmente mayor producción de lovastatina.

Se identificaron patrones que rigen el comportamiento del hongo en FL con adición de soporte:

- La cantidad de biomasa en el matraz depende de la cantidad de soporte a pesar de tener la misma cantidad de nutrientes. Es decir, se limita por la superficie para adherirse. Así, se obtiene una mayor producción (volumétrica) de lovastatina en cultivos con mayor cantidad de soporte.
- La producción específica fue, en todos estos casos, muy superior a la de FS convencional. Sobresale el disco con un área grande de contacto con el aire (A1), donde hubo esporulación y un valor de producción específica un poco menor.
- Cuando se suman los efectos de: soporte y contacto directo con el aire, se favorece aún más la producción de lovastatina.
- A menor tamaño de partícula del soporte, mayor cantidad de biomasa y por lo tanto mayor producción volumétrica.
- En cuanto a la producción volumétrica, todos los sistemas, excepto uno, mostraron una mayor producción que la de FL (de 537 a 1195  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El que produjo menos, fue ligeramente menor que el control de FL, pero fue el que tenía muy poca cantidad de soporte (1B) por lo que sólo se produjo un tercio de la biomasa del control.
- En todas las condiciones (o sistemas) ensayados de soporte en FL, la producción específica fue muy superior (de 49 a 88  $\mu\text{g}/\text{mg}$  biomasa) a la encontrada en FL (29  $\mu\text{g}/\text{mg}$  biomasa), lo cual indica un cambio en la fisiología.
- En FL el soporte induce una fisiología intermedia (FS-FL), que favorece la producción específica de lovastatina.

- Con la adición de peróxido de hidrógeno a la FL se logró adelantar la acumulación de EROs y en consecuencia adelantar la biosíntesis de lovastatina. Esto confirma que los EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.

El silenciamiento de *atyap1* provocó:

- La disminución de la expresión de *atyap1* pero también de *sod1*.
- Inicio precoz e incremento en la acumulación de EROs,
- Sensibilidad a estrés oxidativo,
- Adelanto e incremento de la expresión de *lovE*,
- Inicio precoz y fuerte incremento en la producción final de lovastatina,
- Adelanto e incremento de la expresión de *brlA*,
- Inicio precoz y fuerte aumento de la esporulación.

Se descarta entonces a Yap1 como regular positivo y se sigue que Yap1 podría estar actuando como un regulador negativo de *lovE* y los genes de biosíntesis, así como a *brlA* (y así a los genes relacionados con la esporulación) en *A. terreus*.

Pero regula positivamente a los genes que combaten la acumulación de EROs como *sod1*. Así, el factor transcripcional Yap1p podría ser el nexo entre los EROs y lovastatina.

Sin embargo, también es posible que *esto* sea un efecto indirecto debido a la acumulación prematura de EROs, induciendo la lovastatina por medio de otro factor transcripcional de respuesta a estrés oxidativo.

## 10. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren una amplia e interesante línea de investigación de los mecanismos que pueden regular el metabolismo secundario, particularmente lovastatina, en *A. terreus*. Estos conocimientos podrían aplicarse para mejorar el proceso de producción biotecnológica de este metabolito secundario u otros, ya sea por manipulación fisiológica (diseño de sistemas de producción novedosos, o por el mejoramiento genético de la cepa.

El presente trabajo ha establecido una relación entre la producción de EROs, la biosíntesis de lovastatina y la aireación en los diferentes tipos de FS. Se propone continuar con la investigación de los estímulos de FS y cómo estos inducen la fisiología del medio sólido, como la aireación está relacionada con la acumulación de EROs y cómo estos están relacionados con el EOx y la respiración alterativa.

Un aspecto importante que no se alcanzó a estudiar con profundidad en esta tesis fue el efecto de la humedad. Se propone estudiar a fondo el efecto de la humedad y actividad del agua sobre la producción de lovastatina por fermentación en medio sólido.

La información obtenida de los estímulos de la FS a la FL, además del aporte científico, servirá para poder diseñar en un futuro, mejores y novedosos sistemas de producción tanto de FS como de FL. Por ello se sugiere continuar con el desarrollo de estos sistemas así como de entender cómo es que estos logran inducir la fisiología del medio sólido en FL.

Este proyecto incursiona en modificación genética a través de silenciamiento de genes mediante el mecanismo de RNAi. Se demostró que el método de silenciamiento utilizado en esta tesis es efectivo para reducir considerablemente la expresión de genes blanco. Así, se puede obtener información sobre el papel de estos genes en la fisiología. Esta metodología es muy conveniente para, en un futuro cercano averiguar cuáles son los factores transcripcionales que regulan la biosíntesis de lovastatina. Esto sería mediante el silenciamiento de factores transcripcionales que responden a EOx, como SrrA, AtfA, AtfB, Msn2, etc.

Desde el punto de vista aplicado, esta metodología, junto con el conocimiento de las redes de regulación, podría emplearse como una estrategia de mejoramiento genético de las cepas de interés biotecnológicas.

El estudio de la fisiología del medio sólido se podrá aplicar al mejoramiento del proceso de producción de lovastatina y otros metabolitos secundarios. Basado en los conocimientos obtenidos en este trabajo y otros del grupo parece cercano el desarrollo de sistemas novedosos de producción en FS y aún en FL o sistemas híbridos.



## 11. REFERENCIAS

- Aguirre, J., Hansberg, W. & Navarro, R., 2006. Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 44(s1):101–107.
- Aguirre, J. et al., 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in microbiology*, 13(3):111–118.
- Aidoo, K. E., Hendry, R., & J.B. Wood. 1982. Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. 28: 201–237.
- Alberts AW, Chen J, Kurov G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirschfield J, Hoofsteen KJ, Liesch J, Springer J (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3957–3961
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1): 373–399.
- Ávila Cisneros Nayeli, “Efecto del contacto con el aire, el estrés osmótico y el estímulo de exploración del micelio sobre la producción de lovastatina en *A. terreus*” Dirección: Barrios-González Javier, Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.f. 2009.
- Bai Z, Harvey LM, McNeil B 2003a. Oxidative stress in submerged cultures of fungi *Crit Rev Biotechnol* 23:267-302.
- Bai Z, Harvey LM, McNeil B 2003b. Physiological responses of chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D) to simulated and actual oxidative stress. *Biotechnol Bioeng* 82:691-701.
- Bai Z, Harvey LM, White S, McNeil B 2004. Effects of oxidative stress on production of heterologous and native protein, and culture morphology in batch and chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Enzym Microb Technol* 34:10-21.
- Baños Mejía Jesús Gabriel, “Producción de lovastatina en fermentación sólida sobre soporte inerte artificial, por una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* (TUB F-514) y por sus mutantes resistentes a estrés osmótico y a estrés oxidativo” Dirección: Barrios-González Javier, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. 2010.
- Barrios-González, J, Tomasini A., Viniegra-González G & López J. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, 10(11): 793-798.
- Barrios-González, J., Fernández, F.J. & Tomasini, A., 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*, 2(3):322–333.
- Barrios-González, J. et al., 2005. Secondary metabolites production by solid state fermentation. *Malaysian J Microbiol*, 1:1–6.
- Barrios-González, J. 2008. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2):179–186.
- Barrios-González, J., & Miranda, R. (2010). Biotechnological production and applications of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 869–883.
- Barrios-González, 2012 “Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications” *Review Journal Process Biochemistry*, 47: 175–185.
- Belozerskaya, T.A. & Gessler, N.N., 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5):506–515.
- Bigelis R, He H, Yang H, Chang LP, Greenstein M. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33: 815-826.
- Bok, J. & Keller, N., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* 114 *Eukaryotic Cell*, 3(2):527.

- Bokoch, G.M. & Knaus, U.G., 2003. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends in biochemical sciences*, 28(9):502–508.
- Cano-Dominguez, N., 2008. NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 7(8):1352–1361.
- Chance, B., B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, and Y. Nakase. 1979. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 254: 4764-71.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., & M.B. Toledano. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19(19): 5157-66.
- Fernández J., Hernandez M., Rios G. y Gutierrez C. 2003. Cholesterol biosynthetic pathway *J. Antibiot.* 16:234-246.
- Finkel, T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology.* 10:248- 253.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & A.A. Covarrubias-Robles. 2004. La respuesta a estres en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia.* 46(1-2):24-46.
- Furberg CD (1999) Natural statins and stroke risk. *Circulation* 99:185–188
- Garrido, E., & C.M. Grant. 2002. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology.* 43(4):993-1003.
- Hajjaj, H., P. Niederberger & P. Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (6): 2596-2602.
- Halliwell, B. & M.C.Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* London. Oxford University Press.
- Hata Y, Ishida H, Kojima Y, Ichikawa E, Kawato A, Suginami K, et al. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and submerged culture. *J Ferment Bioeng* 1997; 84: 532–7.
- Hendrickson, L. , 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemistry & biology*, 6(7): 429–439.
- Hisada, H., Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe & O. Akita. 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 99(6):562-568.
- Ishida H., Hata Y., Ichikawa E., Kawato A., Abe Y., Suginami K., and Imayasu S. 1998. Regulation of the glucoamylase encoding gene (*glab*), expressed in solid state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 301-307.
- Jaszek M, Grzywnowicz K, Malarczyk E, Leonowicz A 2006. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochem Physiol* 85:147-154.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C., 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(10): 981–985.
- Jones, A.M., 1994. Surprising signals in plant cells. *Science*, 263(5144):183–184.
- Kamata, H. & Hirata, H., 1999. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cellular Signalling*, 11(1): 1–14.
- Kannel W.B., Dawber T.R., Kaban A., Revotskie S.J.L. 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease – six year follow up experience; the Farmingham study. *Ann Intern Med.* 40: 602-609.
- Kennedy, J., 1999. Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis. *Science*, 284(5418): 1368-1372.
- Kreiner, M., McNeil, B. & Harvey, L., 2000. “Oxidative stress” response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). *Biotechnology and Bioengineering*, 70(6):662–669.

Li Q., Bai Z., O'Donnell A., Harvey L.M., Hoskisson P.A., McNeil B. 2011. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration *Biotechnol Lett* 33:457–467  
Li Q, Harvey LM, McNeil B 2009. Oxidative stress in industrial fungi. *Crit Rev Biotechnol* 29 :199-213.

Lee, J. et al., 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), p.16040.

Manzoni, M. & M. Rollini. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 555-564.

Manzoni, M., Rollini, M., Bergomi, S., & Cavazzoni, V. (1998). Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnology Techniques*, 12(7), 529–532.

Marcial J. 2011. Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa. Tesis (Doctorado en Biotecnología), México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.

Mazumdar-Shaw, K. & S. Suryanarayan. 2003. Commercialization of a novel fermentation concept. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. 85: 29-42.

Miranda Labra Roxana, "Expresión del gen *sod1* durante la trofofase e idiofase de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida para la producción de lovastatina". Dirección: Barrios-González Javier, Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. 2008.

Miranda, Barrios-González, Gomez-Quiroz, Armando Mejia, 2013. Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (EROs) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged and solid state fermentations. *Fungal Biology* 1 – 9.

Moye-Rowley, WS. 2003. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxidant & Redox Signaling*. 4 (1):123-40.

Mulford and J. S. Fassler. 2011. Association of the *skn7* and *yap1* transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic cell*, 10 (6): 761–769.

Nakanishi Kazuhiro, Masakazu M., Hiroko S. , Natsuko Ishida 2004, Characteristics of  $\alpha$ -glucosidase production from recombinant *Aspergillus oryzae* by membrane-surface liquid culture in comparison with various cultivation methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98 (3): 200–206.

Narahara H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkuras, R. Ueda and H. Taguchi, 1982. *Jounal Fermentation Technology*. 60:311.

Narasaiah, K., Sashidhar, R. & Subramanyam, C., 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia*, 162(3):179–189.

Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J. & A. Rinzema. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 18:356-360.

Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & P. Nigam. 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology—Fundamentals and Applications*. Asia Tech Publishers, Inc. New Delhi: 100–221.

Paulsen, C.N, Kate S. Carroll 2009. Chemical Dissection of an Essential Redox Switch in Yeast *Chemistry & Biology* 16, (2): 217–225.

Perraud-Gaime I. 1995, Tesis de Doctorado, Universidad de Montpellier II, France, 209.

Raimbault M. y Alazard D. 1982. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 9: 199-209.

Raimondi S, Zanni E, Talora C, Rossi M, Palleschi C, Uccelletti D 2008. SOD1, a new *Kluyveromyces lactis* helper gene for heterologous protein secretion. *Appl Environ Microbiol* 74:7130-7137.

- Reverberi M., Zjalic S., Ricelli A.a, Punelli F., Camera E., Fabbri C., Picardo , Fanelli C., and A. Fabbri A., (2007), Modulation of Antioxidant Defense in *Aspergillus parasiticus* Is Involved in Aflatoxin Biosynthesis: a Role for the ApyapA Gene Eukaryotic Cell, 7 (6): 988–1000
- Rollini, M. M. M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 555–564. doi:10.1007/s00253-002-0932-9
- Roze, L.V., 2011. Stress-related transcription factor *AtfB* integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *Aspergilli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40):35137–35148. SocctI, C. 1992 Tesis de Doctorado, UTC Compiègne, France, 218.
- Ruiz-Leza H. A., R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera, J. C. Contreras-Esquivel y C. N. Aguilar (2007) “Bio-reactors desing for solid state fermentation” *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6 (1): 33-40.
- Sorrentino F., Ipsita R. & Keshavarz T. 2010. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:65–73
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. & B.N. Ames. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academic of Sciencies*. 84:8917-8921.
- Sung-Ypng Hong, Iudmila V. Roze and John E. Linz. 2013. Oxidative Stress-Related Trascription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins Journal* 5: 683-702.
- Szakács, G., G. Morovján Y R.P. Tengerdy. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*. 20(4): 411-415.
- Toledo, I., Rangel, P., & W. Hansberg. 1995. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 319 (2): 519-524.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335- 44.
- Ullán, R.V. et al., 2008. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: Validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *Journal of microbiological methods*, 75(2), pp.209–218.
- Valera, H.R, J. Gomes, S. Lakshmi, R. Gururaja, S. Suryanarayan & D. Kumar. 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:521–526.
- Yoshizawa, Y. 1994. Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinolin (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *Journal of the American Chemical Society*, 116(6):2693–2694.

# ANEXO A

## DISEÑO DE PRIMER'S PARA EL SILENCIAMIENTO DEL GEN YAP1

### EXÓN 1:

5'ATGACCGACT ACAACTCCCT GTACCAACAA GGCCTCTATC TTTCTCCCGA TCAACAGAGT CTCTTGCTTG CTGCGCTATC CTCCAACAAC  
CCTTCTCAA AACAGCCGCA AAATCAGTCC AAAACCCCTC AACCCAAGTC CGAACCTGAG TCCACCCCGG CCCAGCCATC CTCCGGCAGT  
TTTACCATGT CTCAGGGTT CAACCACTCC CGGAACCATT CCGGCGCCT TGGATTGCGC GATGATGAGA GCCCTTCTCT CGACTCAAC  
CCGGAGCTCG ATTTGCACTT TCACGGCACC GAGAATCTTA TCGGTGATAT ACCCGGAGTG CTTTCGGACG ACCACGAACC CGGTGAGAAG  
CGCAAGGATC TGGAGGGTCG TTCCGACTAC GACAATGAAG AATCCGGCAA GAAACGGAGG GAAAGTGACG ACAAACGGC CAAGAAGCCG  
GGCGCAAAC CGTGACTTC GGAGCCAAC TCGGTATGTCCAGTCTGC 3'

### EXÓN 2:

5'TGTAACCCC ACCAATCGTC TATTCTAAC CTGTTCTGTA GAAGCGCAAG GCGCAGAATC GTGCCGCTCA GCGTGCTTTC CGTGAACGCA  
AAGAAAAGCA CCTGAAGGAC CTGGAGACCA AGGTCGAAGA ACTGCAAAA GCCTCAGACA ACGCCAACCA GGAAAATGGC CTGCTGCGGG  
CCCAAGTCGAACGTCTGCAA GTAGAACTCC GGGAATATCG CAAGCGCTC TCCTGGGTGA CGAGTGGCAA CGGGCTTCC GCTATCAATG  
CCATTCGCGG AGCCCACTCC CGCGGAACGT ATGGCCTGAA TAACAACGAC TTCATGTTTG ATTTCCCAA GTTTGGTGAT CTCCTGGCT  
CGCACATCTT CAACAACAAC AACCAATTGC AGAAGATGAA CCAGAACAAG CCCAGGAAG GCCAGTCCCC CACCGCTCGG AGATCCGATT  
CCAACGTCCC GGGTGTGTTG AATCGGGATT CTCTAACAC CGCAAGGAA GCGGACTGT CCCCCTTAA GACGAATTCC CCTGCAGCCA  
CCTCGGTCCC ATCAACCAGA GGCACCCCA TCACTTCCA AGGGTCCACC AGGAGCCCGG CTCTGCCCAA GCCTTTTAC CATAGGGCGG  
CGACGTGAC AAACGATGCG TCGAATTCGG ACTCTCGTC ATCTTCGTC GATTACATC AAAGCCAGCT ACTGTCCTCG AGCGGCACAT  
CGCCGAGCC GTCGACCAAC TCTCCAGCCA ACAAGCCGCA GGACAACCAC CATCATACCT GTACCTATAA CACCATTGAT GGGCAGGAAT  
CCTTCTGCGC ACAGCTGGG CTCGCTGCG GCAACATCAA TAACCTATT CCAGCGGTGC GCAATAAGAG TCCAAGCGTC TCAAACACTC  
CCGCCAGGC CGGAGAAGCC GAACAGTTCC CCGACTCGA TTCTCTGACC CAGCAGAACG GAGGCAATT TGACCCGCTC CTGTTTGCGC  
ACTGGCGGGA GCCCAGGAT GCCATCCTGT CTCAGGATTT TGGCACTTTC TTTGACGATG CATTCCCCCT ACCGGATCTG GGTAGTCCTT  
CGCACAATT CAGCGAGTTG ATGCGGACATCAGC AACCAAGAA AGACCTGATT TCCTGATCG ACGACAAGCT GGATGAAGAC GAGGTGGTTC  
CGGAGAGGA CAAGACCCAG ATGCTCAGCT 3'

### EXÓN 3:

5'GCACGAAGAT ATGGTACGTT CTTTTCGCTC GTTGCTTGTG CCCAGTCTTC AGTCCAAACA GTCAGTACGACA TTCTTGACAG GGATCGTCTC  
CAGTCCATGG AAAAGTTCCG CAACGGCGAA ATCGACGTGC ACAATCTCTG TTCGGAGCTC CGCACCAAGG CCCGTTGCTC GGAGGGTGGC  
GTGGTCTGTA ACCAGAAGGA TGTCGACGAC ATCATGGGCC GCGCAACGCA CTGA 3'

### TAMAÑO DE LOS EXONES:

EXÓN 1: 1-483= 483 PB

EXÓN 2: 542-1714 = 1172 PB

EXÓN 3: 1782-1934 = 152 PB

### SE TOMO EL EXÓN 2 Y DISEÑAR LOS PRIMER'S CON SITIO DE CORTE: *Nco*I. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN:

Enzyme Recognition	frequency	Positions
<i>Nco</i> I C'CATG_G	1	1796

NOTA: CORTA DENTRO DEL EXÓN 3.

ENTONCES, LA SECUENCIA DEL EXÓN 2, ES: (SOMBREADO, EL POSIBLE SITIO DE CORTE CON *Nco*I).

AAGCGCAAGG CGCAGAATCG TGCCGCTCAG CGTGCTTTC GTGAACGCAA AGAAAAGCAC CTGAAGGACC TGGAGACCAA GGTCGAAGAA  
CTGCAAAAAG CCTCAGACAA CGCCAACCAG GAAAATGGCC TGCTGCGGGC CCAAGTCGAA CGTCTGCAAG TAGAACTCCG GGAATATCGC  
AAGCGCTCT CTGGGTGAC GAGTGGAAC GGGCTTCCG CTATCAATGC CATTCCCGGA GCCCACTCCC GCGGAACGTA TGGCCTGAAT  
AACAACGACT TCATGTTTGA TTTCCCAAG TTTGGTGATC TCCCTGGCTC GCACATCTT AACAACAACA ACCAATTGCA GAAGATGAAC  
CAGAACAAGC CCCAGGAAGG CCAGTCCCC ACCGCTCGGA GATCCGATT CAACGTCCC GGTGTTTGA ATCGGGATT TCTCAACACC  
GCAAGGAATG CCGACTGTC CCGCTTAAG ACGAATCCC CTGCAGCCAC CTCGGTCCA TCAACCAGAG GCACCCCAT CACTTCCAA  
GGTCCACCA GGAGCCCGG TCTGCCAAG CCTTTTACC ATAGGGCGG GACGTGACA ACGATGCTC GAATTCGGAC TCTCGTCAT  
CTTCGTCGA TTCACATCAA AGCCAGTAC TGTCTCGAG CGGCACATC CCGAGCCGT CGACCAACTC TCCAGCAAAC AAGCCGAGG  
ACAACCACTA TCATACCTGT ACCTATAACA CCATTGATGG GCAGGAATCC TTCTGCGCAC AGCTGGGCT CGCGTCCGCG AACATCAATA  
ACCTATTCC AGCGGTGCGC AATAAGAGTC CAAGCGTCTC AAACACTCCC GGCCAGGCCG GAGAAGCCGA ACAGTTCGCC GGAATCGATT  
CTCTGCCCCA GCAGAACGGA GGCAATTTG ACCCGTCTC GTTTGGCGAC TGGCGGGAGC CCCAGGATGC CATCTGTCT CAGGATTTG  
GCATTTCTT TGACGATGCA TTCCCTAC CGGATCTGG TAGTCTCTG CACAATTCA GCGAGTTGG ACATCAGCAA CCAAAGAAAG  
ACCTGATTTCT CCTGATGAC GACAAGCTGG ATGAAGACGA GGTGGTCCG GGAGAGGACA AGACCCAGAT GCTCAGTGC ACGAAGATAT GG

### **PRIMER YAP1RNAiF**

Posición inicial: 216

Secuencia original:

5'TTCCGCTATCAATGCCATTCCCGGAGC3'

Secuencia para reconocimiento de NcoI:

5'TTCCGCTATCAATGCCATGGCCGGAGC3'

Cálculo de la TM: C-G: 16X3=48 A-T: 11X2=22 TM=70°C

Análisis en Bioedit:

Len: 27 MW: 8236.18 T<sub>m</sub>: 81.52° C GC: 59.26% Sec. Str.: Strong Primer Dimer: No

### **PRIMER YAP1RNAiR**

Posición inicial: 742

Secuencia original:

5'CCTATAACACCATTGATGGGCAGGAAT3'

Secuencia para reconocimiento de NcoI:

5'CCTATAACACCATGGATGGGCAGGAATC3'

Reversa complementaria:

5'GATTCCTGCCCATCCATGGTGTTATAGG3'

Cálculo de la TM: C-G: 14x3=42 A-T: 14x2=28 TM=70°C

Análisis en Bioedit:

Len: 28 MW: 8606.48 T<sub>m</sub>: 73.22° C GC: 50% Sec. Str.: Weak Primer Dimer: No

### **PRIMER'S:**

**YAP1RNAiF:**

5'TTCCGCTATCAATGCCATGGCCGGAGC3'

**YAP1RNAiR:**

5GATTCCTGCCCATCCATGGTGTTATAGG3'

TAMAÑO DEL FRAGMENTO ESPERADO:

**769-216 = 553 PB**