

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**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**

TESIS
para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA
I.B.I. Jesús Gabriel Baños Mejía

Mayo de 2010

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**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**

TESIS
para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA
I.B.I. Jesús Gabriel Baños Mejía

Director
Dr. Javier Barrios González

Mayo de 2010

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

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”

México D.F. a 6 de mayo de 2010

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

**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.**

Que presentó:

JESÚS GABRIEL BAÑOS MEJÍA

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesor: Dra. Adriana Garay Arroyo

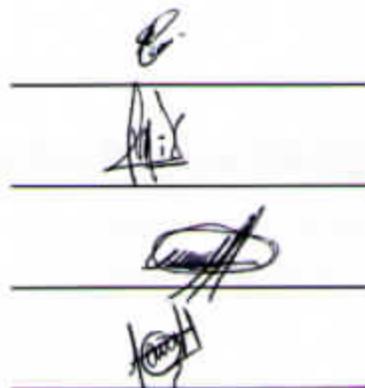
Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocoso

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dra. Alba Mónica Montiel González

Vocal: Dra. Carolina Campos Muñiz



The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature above it. The signatures are: 1. A stylized signature above the first line. 2. A signature that appears to be 'Armando' above the second line. 3. A signature that appears to be 'Alba' above the third line. 4. A signature that appears to be 'Carolina' above the fourth line.

A mis padres:

Gracias por confiar en mí y por todos los esfuerzos que realizaron para que pudiera llegar tan lejos. Gracias por pensar que en esta vida nada es difícil y por hacerme entender eso. Gracias por los buenos y los malos momentos, al final estas experiencias resultan aprendizajes. Los quiero mucho.

A mi esposa Yuri:

Gracias amor, por compartir este sueño desde un principio y sabes que esto aún no termina, es sólo un respiro para poder compartir y disfrutar más de esos momentos inolvidables, que a tu lado siempre lo son. Gracias por esos dos hijos maravillosos que son el más grande regalo.

TE AMO

A mis hijos Caro y Santi:

Ustedes nacieron dentro de este proyecto de mi vida, son lo más grande que tengo y el motivo por el cual esta historia se seguirá escribiendo. Los quiero mucho.

Quiero darle las gracias al Dr. Javier Barrios González por todos los consejos y la orientación que me dio durante el desarrollo de este trabajo experimental.

Al Dr. Armando Mejía y la Dra. Adriana Garay, quienes me apoyaron con sus comentarios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Araceli Tomasini, quién me orientó cuando empezaba a realizar mis primeros experimentos en el laboratorio y de quién aprendí gran parte de los conocimientos que hoy tengo del laboratorio.

Al Dr. Francisco José Fernández, por todo el apoyo y los consejos que me dio durante mi estancia en el laboratorio. Gracias Paco.

A mi casi hermano Jaime, que siempre que necesité algo siempre estuvo ahí para apoyarme y ayudarme cuando algún experimento no me salía bien.

A Victor, Edgar, Ángel, Arturo con quienes compartí muy buenos momentos en la UAM y a quienes agradezco el apoyo incondicional durante mi estancia en el Distrito Federal.

A todos mis compañeros del laboratorio: Sandra, Karla, Tania, Paola, Roxana, Ana, Vicky, Luis Alberto, Hugo y Octavio, por todos esos gratos momentos.

A todos quienes de alguna u otra forma me ayudaron en este proceso.

GRACIAS

Resumen.

En este estudio, desarrollamos un novedoso proceso de Fermentación Sólida (FS), para la producción de lovastatina, utilizando espuma de poliuretano (PUF, por sus siglas en inglés) como soporte inerte artificial. Los resultados indican que, una aireación forzada no es conveniente para la producción de este metabolito, debido a que reduce el contenido de humedad del medio sólido. Las mejores producciones se obtuvieron en matraces cerrados (MC), es decir, matraces sin recambio de aire; producciones que alcanzaron los 7,500 μg de lovastatina por gramo de soporte seco ($\mu\text{g/gss}$), lo que equivale a una producción específica de 493 $\mu\text{g/mg}$ de micelio. Sin embargo, debido a que el crecimiento depende de la aireación, los MC presentaron la más baja concentración de micelio: 15.19 mg/gss ; el reto fue incrementar la concentración de biomasa, pero sin perder la alta productividad. El aumento en la concentración del medio 2.5X y el contenido de humedad inicial 85%, permitió un aumento en la concentración de biomasa (24.4 mg/gss). Los resultados también indican que la densidad del PUF, es un factor clave en la producción de lovastatina por FS; las más altas producciones sólo se obtuvieron sobre PUF de 17 y 20 kg/m^3 de densidad. La producción obtenida después de ajustar estos parámetros fue de 19,950 $\mu\text{g/gss}$, con una producción específica de 815 $\mu\text{g/mg}$ de micelio. En un estudio comparativo, la producción de lovastatina en FS-PUF fue dos veces más alta que para la FS-BAG, que es un soporte inerte natural ya conocido y estudiado para la producción de metabolitos secundarios. Además, la producción de lovastatina sobre FS-PUF fue 35 veces más alta que la obtenida en Fermentación Líquida (570 $\mu\text{g/ml}$) y la producción específica 15 veces mayor.

Además, en este trabajo de investigación, se desarrolló un sistema de selección racional para obtener mutantes hiperproductoras de lovastatina para FS o para FL. El método consiste en una primera fase donde se aíslan mutantes resistentes a estrés osmótico o estrés oxidativo (o mixto) y una segunda fase donde se seleccionan las mejores productoras de lovastatina por un método sencillo de fermentación en cilindro de agar (FCA). Aplicando este método y al caracterizar las mutantes resistentes a estrés oxidativo se encontró que el 46% de las mutantes seleccionadas fue sobre productoras de lovastatina en

FS, mientras que sólo el 15% fue sobre productora en FL; con el restante 85% exhibiendo drásticas disminuciones en producción en este último sistema.

Estos resultados sugieren que en la FS los microorganismos enfrentan a un mayor estrés oxidativo (que en FL) y que éste está relacionado de alguna manera con la producción de lovastatina en este sistema. Otros datos que apoyan lo anterior es que las cinco mejores productoras de lovastatina (sobreproductoras) en FS provinieron del grupo de mutantes resistentes al estrés oxidativo; las cuales presentaron incrementos en la producción de 16.1% a 62%. De hecho, la mejor mutante (OXRC 9) presentó una producción de 27,890 µg/gss. En contraste, todas las mutantes sensibles a estrés oxidativo mostraron fuertes disminuciones en producción en FS (de hasta 58%), pero no en FL, donde estas mutantes mantuvieron nivel de producción cercano o igual al de la parental. Además, las peores productoras en FL fueron mutantes resistencia a estrés oxidativo, con disminución en la producción.

Al caracterizar las mutantes resistentes a estrés osmótico se encontró que el 100% fueron sobre productoras en FS, con incrementos en la producción del 10 al 15%. También el 100 % de estas mutantes fueron sobreproductoras en FL, pero con incrementos mayores, del 46% hasta un 80.9%, siendo este último el mayor incremento en FL (mutante OSR 23).

Otros datos que complementan lo anterior es que seis de las siete mejores mutantes sobre productoras en FL fueron mutantes resistentes a estrés osmótico. Estas mostraron incrementos en la producción de 29.6% a 80.9%. La mejor productora de lovastatina para FL, la mutante OSR 23 produjo 0.837 mg de lovastatina/ml. En cuanto a las mutantes sensibles a estrés osmótico todas mostraron una disminución de la producción en FS (promedio -44%), mientras que estas mismas mutantes no mostraron disminución de la producción en FL.

Estos resultados indican que la resistencia a estrés osmótico representa una mayor ventaja para producir en FL. Sin embargo, la capacidad normal para contender con el estrés oxidativo es indispensable para la producción de lovastatina en FS.

Abstract.

In this study, we developed a novel solid state fermentation process (FS), for the production of lovastatin using polyurethane foam (PUF) as an artificial inert support. The results indicate that forced aeration is not suitable for the production of this metabolite, because it reduces the moisture content of the solid medium. The best yields were obtained in closed flasks (MC), reaching a production level of 7,500 μg of lovastatin per gss, and a specific production 493 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of mycelium. However, because growth depends on aeration, the MC culture showed the lowest mycelium concentration: 15.19 mg/gss. The challenge was to increase the biomass concentration, but without losing the high productivity. The increase in medium concentration (2.5X) and initial moisture content (85%), led to an increase in the concentration of biomass (24.4 mg/gss). Results also indicated that the density of the PUF, is a key factor in the production of lovastatin by FS, the highest yields were obtained only on PUF of 17 and 20 kg/m^3 density. Lovastatin production obtained after adjusting these parameters was 19,950 $\mu\text{g}/\text{gss}$, with a specific production of 815 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of mycelium. In a comparative study, the production of lovastatin in PUF-FS was two-fold higher than for the FS on sugar cane bagasse, which is a natural inert support already known and studied for the production of secondary metabolites. Moreover, the production of lovastatin on PUF-FS was 35 times higher than that obtained in FL (570 $\mu\text{g}/\text{ml}$), showing a 15-fold higher specific production.

In the second part of this thesis we developed a rational selection system to obtain lovastatin hyper producing mutants, suited for FS or for FL. The method consists of an initial stage where mutants resistant to osmotic stress or oxidative stress (or mixed) are isolated; and a second stage, where the best producers of lovastatin are selected by a simple method of agar-plug fermentations (FCA). Applying this method it was found that 46% of the oxidative-stress-resistant mutants were lovastatin overproducers in FS; while only 15% were lovastatin overproducers in FL. The remaining 85% exhibited drastic production decreases in the latter system.

These results suggest that the microorganisms in FS face an increased oxidative stress (compared with FL) and it is related somehow to the production of lovastatin in this system. Other data supporting this is that the top five producers of lovastatin (overproducers) in FS came from oxidative stress-resistant mutants, which showed increases in production from 16.1% to 62%. In fact, the best mutant (OXRC 9) reached a record lovastatin production of 27,890 $\mu\text{g/gss}$. Conversely, all mutants sensitive to oxidative stress showed strong declines in production in FS (up to 58%), but not in FL, where these mutants maintained production levels near or equal to the parental. Moreover, the worst producers in FL were oxidative-stress resistant mutants.

When characterizing the osmotic stress-resistant mutants it was observed that 100% were overproducers in FS, with relatively small increases in the production (10 to 15%). Also 100% of these mutants were overproducers in FL, but with larger production increases (46 to 80.9%), the latter being the largest increase in FL for the mutant OSR 23.

Other data that complement the above is that six of the seven top-producing mutants for FL were osmotic-stress-resistant mutants, with important production increases (29.6 to 80.9%). The highest lovastatin production for FL was the 837 $\mu\text{g/ml}$ (mutant OSR 23). Interestingly, all the osmotic-stress-sensitive mutants showed dramatic production decreases in FS (mean -44%), whereas the same mutant showed no production decrease in FL.

These results indicate that resistance to osmotic stress represents a major advantage to produce in FL. However, the normal ability to contend with oxidative stress is essential for the production of lovastatin in FS.

Índice general.

A	Índice de figuras	xvi
B	Índice de tablas	xix
C	Abreviaturas	xxiii
1.	Introducción.	1
2.	Antecedentes.	4
2.1.	Colesterol.	4
2.2.	Estatinas.	6
2.2.1.	Lovastatina.	8
2.2.2.	Producción.	8
2.3.	Estrés Oxidativo.	11
2.3.1.	Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.	13
2.3.2.	Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.	14
2.4.	Estrés Osmótico.	15
2.4.1.	La vía de HOG MAPKinasa.	16
2.4.2.	Síntesis y acumulación de glicerol.	16
3.	Hipótesis.	17
4.	Objetivos.	18
4.1.	Objetivo general.	18
4.2.	Objetivos específicos.	19
5.	Materiales y Métodos.	20
5.1.	Microorganismos utilizados.	20
5.2.	Conservación de cepas.	20
5.3.	Medios de cultivo.	21
5.3.1.	Medios de esporulación.	21
5.3.2.	Medios para fermentación líquida.	23
5.3.3.	Medios para fermentación sólida.	23
5.3.4.	Medio para fermentación en cilindro de agar.	24

5.3.5.	Medio para bioensayo.	25
5.3.6.	Medios para la selección de mutantes sensibles a estrés osmótico.	25
5.4.	Condiciones de cultivo para fermentación en cilindro de agar, fermentación líquida y fermentación sólida.	26
5.4.1.	Fermentación en cilindro de agar.	26
5.4.2.	Fermentación líquida.	26
5.4.3.	Fermentación sólida.	26
5.4.3.1.	Soporte sólido.	26
5.4.3.2.	Pre tratamiento de la espuma de poliuretano y del bagazo de caña	26
5.4.3.3.	Inoculación del medio sólido	27
5.4.3.4.	Empaquetamiento de las columnas	27
5.4.3.5.	Fermentación en matraces	27
5.5	Efecto de la aireación	27
5.6	Efecto del contenido inicial de humedad	28
5.7	Efecto de la concentración del medio.	28
5.8	Efecto de la composición del medio	28
5.9	Efecto de la densidad de PUF	29
5.10.	Generación y selección de mutantes.	29
5.10.1.	Mutagénesis y curva de sobrevivencia.	29
5.10.1.1.	Inoculación y cosecha de esporas.	29
5.10.1.2.	Radiación con luz UV.	30
5.10.1.3.	Curva de sobrevivencia.	30
5.10.2.	Mutantes resistentes a estrés oxidativo.	30
5.10.3.	Mutantes resistentes a estrés osmótico.	31
5.10.4.	Mutantes resistentes a estrés mixto.	31
5.10.5.	Mutantes sensibles a estrés oxidativo y osmótico.	32
5.10.5.1.	Estrés oxidativo.	32

5.10.5.2.	Estrés osmótico.	32
5.11.	Fermentación en cilindro de agar (FCA).	32
5.11.1.	Realización del bioensayo.	33
5.12.	Técnicas analíticas.	33
5.12.1.	Extracción de lovastatina.	33
5.12.2.	Cuantificación de lovastatina.	34
5.12.3.	pH.	34
5.12.4.	Biomasa.	34
5.12.5.	Azúcares totales.	35
5.12.6.	Contenido de humedad final.	35
5.12.7.	Actividad enzimática de catalasa.	35
5.12.8.	Actividad enzimática de súper óxido dismutasa.	35
6.	Resultados.	36
6.1.	Extracción de lovastatina: espuma de poliuretano y bagazo de caña.	36
6.2.	Cuantificación de lovastatina por HPLC.	37
6.3.	Estableciendo condiciones de inicio para la FS sobre espuma de poliuretano.	39
6.4.	Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina en espuma de poliuretano.	39
6.5.	Efecto del contenido de humedad inicial y la concentración del medio sobre la producción de lovastatina.	41
6.6.	Efecto de la adición de glucosa al medio de producción.	45
6.7.	Efecto de la densidad del poliuretano sobre la producción de lovastatina	46
6.8.	Efecto de la concentración del medio de producción en cultivos con matraces con recambio(MA) y sin recambio de aire (MC).	48
6.9.	Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina creciendo <i>Aspergillus terreus</i> sobre bagazo de caña.	50

6.10.	Comparación de los sistemas de producción de lovastatina: FL vs FS.	51
6.11.	Estrés osmótico. Determinación de la dosis mínima inhibitoria.	54
6.12.	Estrés oxidativo. Determinación de la dosis mínima inhibitoria.	55
6.12.1.	Estrés inducido por Paraquat.	55
6.12.2.	Estrés inducido por peróxido de hidrógeno.	56
6.12.2.1.	Estrés aplicado a esporas.	56
6.12.2.2.	Estrés aplicado al micelio en trofofase (36 horas).	57
6.12.2.3.	Estrés aplicado al micelio en idiofase (48 horas).	58
6.12.3.	Estrés mixto.	59
6.13.	Generación de mutantes.	59
6.14.	Selección de mutantes resistentes.	60
6.14.1.	Estrés osmótico (NaCl).	61
6.14.1.1.	Selección de mutantes sensibles a estrés osmótico.	63
6.14.2.	Estrés oxidativo.	65
6.14.2.1.	Selección de mutantes resistentes a estrés inducido por Paraquat.	65
6.14.2.2.	Selección de mutantes sensibles a estrés inducido por Paraquat.	68
6.14.2.3.	Selección de Mutantes Resistentes a estrés oxidativo (H ₂ O ₂). Estrés aplicado a esporas	70
6.14.2.4.	Selección de Mutantes Resistentes a estrés oxidativo (H ₂ O ₂). Estrés aplicado a micelio en trofofase (36 horas)	72
6.14.3.	Estrés Mixto.	74
6.14.3.1.	Generación y selección de Mutantes Resistentes a estrés Mixto.	74
6.15.	Crecimiento radial y su relación con el método de selección de mutantes.	76
6.16.	Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl).	81

6.17.	Producción de lovastatina en FL, por las mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo: paraquat.	81
6.18.	Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes a estrés oxidativo: H ₂ O ₂ .	83
6.18.1.	Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de esporas.	83
6.18.2.	Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de micelio en trofofase.	84
6.19.	Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes a estrés mixto.	84
6.20.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl).	85
6.21.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo: paraquat.	86
6.22.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes a estrés oxidativo: H ₂ O ₂ .	87
6.22.1.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de esporas.	87
6.22.2.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de micelio en trofofase.	88
6.23.	Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes a estrés mixto.	89
6.24.	Evaluación de los sistemas de selección de mutantes (FCA), con respecto a la producción de lovastatina en FL y FS.	90
6.24.1.	Actividad enzimática para catalasa y super óxido dismutasa en FS y FL.	97
7.	Discusión.	99
7.1.	Extracción de lovastatina de la espuma de poliuretano y del bagazo de caña.	99

7.2.	Cuantificación de lovastatina por HPLC.	100
7.3.	Estableciendo condiciones de inicio para la FS sobre espuma de poliuretano.	101
7.4.	Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina.	101
7.5.	Efecto del contenido de humedad inicial y la concentración del medio sobre la producción de lovastatina.	103
7.6.	Efecto de la adición de glucosa al medio de producción.	105
7.7.	Efecto de la densidad del poliuretano sobre la producción de lovastatina	105
7.8.	Comparación de los sistemas de producción: FL vs FS (FS-BAG y FS-PUF)	106
7.9.	Generación de mutantes: Dosis mínima inhibitoria.	108
7.10.	Morfología de las mutantes seleccionadas.	110
7.11.	Fermentación en cilindro de agar (FCA).	112
7.12.	Fermentación Líquida (FL).	112
8.	Conclusiones.	116
9.	Perspectivas.	118
10.	Bibliografía	119
11.	Anexos	130

A. Índice de figuras

Figura 2.1. Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández y col. 2003).

Figura 2.2. Estructura base de las estatinas (izquierda). Cadenas ligadas al C8 (R_1) y al C6 (R_2) de la estructura base (derecha) (Manzoni y col, 2002).

Figura 2.3. Estructura molecular de la Lovastatina (Manzoni y col, 2002).

Figura 2.4. Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de di oxígeno (Folch-Mallol, 2004).

Figura 6.1. Producción específica de lovastatina después de cinco días de fermentación sobre espuma de poliuretano (Δ), utilizando diferentes niveles de aireación. Concentración final de biomasa (\square), contenido de humedad final (\circ). La producción específica de los matraces sin recambio de aire (\dagger), es significativamente diferente ($p < 0.001$), de las demás producciones específicas ($\ddagger, \S, *, \S\S$), de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. MA: Matraz con recambio de aire; MC: Matraz sin recambio de aire.

Figura 6.2. Perfil de producción de lovastatina en matraces con recambio de aire (A) y biomasa (B), bajo diferentes condiciones de humedad inicial (75, 80 y 85%) y concentraciones de medio de producción (2X y 2.5X).

Figura 6.3. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad (17 kg/m^3), después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 75% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

Figura 6.4. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad (17 kg/m^3), después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 80% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

Figura 6.5. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad, después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 85% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

Figura 6.6. Producciones máximas de lovastatina (A) y biomasa (B). Por *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de diferentes densidades (13, 17, 20 y 24 kg/m³), en matraces con recambio de aire.

Figura 6.7. Cinéticas de producción de lovastatina y pH. (A) Producción por fermentación sólida en matraces sin recambio de aire utilizando como soporte espuma de poliuretano (○), fermentación sólida en matraces sin recambio de aire utilizando como soporte bagazo de caña (□), fermentación líquida medio 1X (Δ) y perfil de pH para la fermentación sólida usando como soporte la espuma de poliuretano (x). (B) fermentación líquida (Δ), notar que la escala fue modificada.

Figura 6.8. Determinación de la dosis mínima inhibitoria para el micelio en idiofase (48 horas de crecimiento) de *Aspergillus terreus*, utilizando NaCl como agente estresante.

Figura 6.9. Determinación de la dosis mínima inhibitoria de las esporas de *Aspergillus terreus*.

Figura 6.10. Determinación de la dosis mínima inhibitoria para las esporas de *Aspergillus terreus*, utilizando peróxido de hidrógeno a 15 minutos (◆) y 20 minutos (■) de exposición.

Figura 6.11. Curva de sobrevivencia. Esporas viables y porcentaje de sobrevivencia para cada tiempo de exposición. Se consideró el tiempo cero como el 100%.

Figura 6.12. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes resistentes a estrés osmótico, NaCl 2.5 M (arriba) y mutantes sin selección a estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.13. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes resistentes a estrés osmótico NaCl 2.5M (arriba) y mutantes sensibles al mismo estrés, NaCl, 2.0M (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.14. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo (Paraquat 7mM, arriba) y mutantes sin selección por estrés (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.15. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo por paraquat, 7mM, (arriba) y mutantes sensibles, 5 mM, al paraquat (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.16. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo, seleccionadas para la fase de esporas (H_2O_2 180mM) (arriba) y mutantes sin estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.17. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo (arriba), para el micelio en trofofase (H_2O_2 1200mM). Mutantes sin estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

Figura 6.18. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés mixto (NaCl 2.5M – Paraquat 7mM) (arriba), mutantes sin estrés (abajo) y los datos estadísticos de las poblaciones (derecha).

Figura 6.19. Crecimiento radial (morfología) de la cepa parental y de mutantes resistentes (OXR, OSR y MR) y sensibles (OXS y OSS) seleccionadas, que presentaron un crecimiento diferente al de la cepa parental.

Figura 6.20. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes seleccionadas; resistentes a estrés oxidativo (OXRA, OXRB y OXRC), osmótico (OSR) y mixto (MR) y sensibles (OSS y OXSA).

Figura 6.21. Actividad de catalasa en fermentación sólida  y fermentación líquida  , para las mutantes resistentes a estrés osmótico, oxidativo, mixto y de las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo.

Figura 6.22. Actividad de la súper óxido dismutasa en fermentación sólida  y fermentación líquida  , para las mutantes resistentes a estrés osmótico, oxidativo, mixto y para las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo.

B. Índice de tablas

Tabla 2.1. Principales productos de hongos con aplicación industrial (Bennett y col, 1998)

Tabla 5.1. Composición del medio Czapek.

Tabla 5.2. Composición del medio PMI.

Tabla 5.3. Composición del medio Power.

Tabla 5.4. Medio de producción propuesto por Szakács y colaboradores (1998) y medio de producción modificado para este estudio.

Tabla 5.5. Medios de producción utilizados para llevar a cabo las fermentaciones sólidas.

Tabla 5.6. Medio de producción 2.5X modificado más 1.5% de glucosa.

Tabla 5.6. Medio de producción 2.5X modificado más 1.5% de glucosa.

Tabla 5.8. Composición de los medios denominados: medio mínimo líquido (MML) y medio mínimo sólido (MMS).

Tabla 5.9. Composición del medio de producción. Adición de glucosa 1y 1.5%.

Tabla 5.10. Capacidad de retención de medio de cultivo del poliuretano y contenido de humedad inicial (Hi) para la fermentación sólida.

Tabla 6.1. Porcentajes de recuperación de lovastatina, utilizando dos solventes de extracción y tres concentraciones de lovastatina (Alto 10,000 $\mu\text{g/ml}$, Medio: 1,000 $\mu\text{g/ml}$, Bajo 10 $\mu\text{g/ml}$) para los soportes: Espuma de poliuretano (PUF) y Bagazo de caña.

Tabla 6.2. Obtención de las condiciones para la cuantificación de lovastatina por cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando dos métodos diferentes, dos fases móvil y dos longitudes de onda.

Tabla 6.3. Diseño factorial al azar de tratamientos. Tres niveles de humedad inicial x dos niveles de concentración del medio, con dos repeticiones para cada factor probado.

Tabla 6.4. Producción de lovastatina y contenido de humedad final (Hf) en matraz con recambio de aire, 85% de humedad inicial y concentración del medio de producción 2.5X,

suplementado con 1% de glucosa y 1.5% de glucosa, después de siete días de fermentación. La adición de glucosa se compensó con una disminución en lactosa.

Tabla 6.5. Efecto de la densidad de la espuma de poliuretano sobre la producción de lovastatina, biomasa, producción específica y contenido de humedad final (Hf) en matraces con recambio de aire.

Tabla 6.6. Producción máxima de lovastatina sobre espuma de poliuretano, con diferentes concentraciones de medio, en matraces con recambio de aire y matraces sin recambio de aire. Además concentración de biomasa y contenido final de humedad (Hf).

Tabla 6.7. Producción de lovastatina en bagazo de caña utilizando diferentes niveles de aireación. Además biomasa, producción específica y el porcentaje de humedad final (Hf). En columnas (150 mm de largo x 21 mm de DI) y matraces con recambio de aire (MA) (1 minuto una vez al día) y matraces sin recambio de aire (MC), después de 8 días de fermentación.

Tabla 6.8. Producción de lovastatina en fermentación sólida: poliuretano de alta densidad (PUF) y bagazo de caña, y en fermentación líquida. Además de biomasa y producción específica para cada sistema. Se muestran las producciones máximas de lovastatina para cada sistema de fermentación.

Tabla 6.9. Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria para H₂O₂. Micelio en trofofase (36 hrs) y micelio en idiofase (48 hrs), utilizando la técnica del rasurado de micelio.

Tabla 6.10. Mutantes resistentes a estrés osmótico (NaCl), seleccionadas con base en el incremento de la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA), con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.11. Mutantes sensibles a estrés osmótico (NaCl), seleccionadas con base en el incremento en la producción observada en fermentación en cilindro de agar (FCA), con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.12. Selección de mutantes resistentes a estrés oxidativo (paraquat), con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA).

Tabla 6.13. Mutantes sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Selección de mutantes sensibles en base a la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA).

Tabla 6.14. Mutantes resistentes a estrés oxidativo. Selección de mutantes resistentes, con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, a partir de esporas.

Tabla 6.15. Selección de mutantes resistentes a estrés oxidativo para el micelio en trofofase, con base en el incremento en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.16. Mutantes resistentes a estrés Mixto (MR). Selección de mutantes resistentes con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, utilizando NaCl y Paraquat.

Tabla 6.17. Relación entre la morfología y los métodos de selección de mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo, osmótico y mixto.

Tabla 6.18. Producción de lovastatina en FL por las mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl). Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.19. Producción de lovastatina en FL por las mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.20. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo, utilizando la fase de esporas como método de selección. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.21. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo, utilizando micelio en trofofase como método de selección. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.22. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés Mixto. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental, utilizando NaCl y paraquat como agentes estresantes.

Tabla 6.23. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.24. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.25. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés oxidativo (H_2O_2), utilizando esporas como medio de selección. Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.26. Producción de lovastatina en fermentación sólida (FS) por mutantes resistentes a estrés oxidativo (H_2O_2), utilizando micelio en trofofase como medio de selección. Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.27. Producción de lovastatina en fermentación sólida (FS) por mutantes resistentes a estrés Mixto (NaCl + paraquat). Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Tabla 6.28. Comparación de los métodos de selección de mutantes sobre productoras de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA).

Tabla 6.29 Proporción de las mutantes seleccionadas por el método de selección racional (resistencia y producción en FCA) que fueron sobre productoras en FL.

Tabla 6.30. Las mejores mutantes productoras de lovastatina en FL, su origen y su desempeño en FS. Incremento en la producción de lovastatina, con respecto a la cepa parental (FL y FS).

Tabla 6.31. Proporción de las mutantes seleccionadas por el método de selección racional (resistencia y producción en FCA) que resultaron sobre productoras en FS.

Tabla 6.32. Las mejores mutantes productoras de lovastatina en FS, su origen y su desempeño en FL. Incremento en la producción de lovastatina, con respecto a la cepa parental (FS y FL).

Tabla 6.33. Efecto del tipo de selección de mutantes, sobre la producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), fermentación sólida (FS) y fermentación líquida (FL). Incrementos en la producción con respecto a la cepa parental.

C. Abreviaturas.

CAT	Catalasa
DI	Diámetro interno
DMI	Dosis mínima inhibitoria
FCA	Fermentación en cilindro de agar
FL	Fermentación líquida
FS	Fermentación sólida
FS-BAG	Fermentación sólida sobre bagazo de caña
FS-PUF	Fermentación sólida sobre espuma de poliuretano
gss	Gramo de soporte seco
Hf	Humedad final
Hi	Contenido de humedad inicial
l g⁻¹ h⁻¹	Litros de aire por gramo de soporte por hora
MA	Matraces con recambio de aire una vez al día
MC	Matraces sin recambio de aire
µg	micro gramo
µg lov/mg biomasa	Producción específica de lovastatina
MML	Medio mínimo líquido
MMS	Medio mínimo sólido
MR	Mutantes resistentes a estrés mixto (NaCl + Paraquat)
OSR	Mutantes resistentes a NaCl (estrés osmótico)
OSS	Mutantes sensibles a NaCl
OXRA	Mutantes resistentes a paraquat (estrés oxidativo)
OXRB	Mutantes resistentes a H ₂ O ₂ en fase de esporas
OXRC	Mutantes resistentes a H ₂ O ₂ en micelio en trofofase
OXSA	Mutantes sensibles a paraquat
PUF	PolyUrethane Foam, espuma de poliuretano
SOD	Súper óxido dismutasa
TUB	Technical University of Budapest

1. Introducción

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte. En el año 2005, alrededor de 17.5 millones de personas murieron a causa de este tipo de enfermedades, lo que representa aproximadamente el 30% de las muertes en el mundo. La hipercolesterolemia es la acumulación de colesterol en el plasma sanguíneo, que provoca la aterosclerosis (obstrucción de las arterias), propiciando el desarrollo de enfermedades coronarias y ataques cardíacos (Kannel y col. 1961; Valera y col, 2005). Del colesterol total, sólo una tercera parte es derivada de los alimentos que consumimos, mientras que los otros dos tercios son sintetizados por el hígado y en menor cantidad por otros órganos (Furberg, 1999; Alberts y col. 1980). Por esta razón, el control del colesterol mediante la inhibición de su biosíntesis, es una estrategia importante para reducir los niveles de colesterol en sangre (Manzoni y col. 2002).

Las estatinas son un grupo de fármacos que inhiben selectivamente la HMG-CoA reductasa (3-hidroximetil-3-metilglutaril-coenzima A), que es la enzima reguladora y limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol. Dentro de este grupo podemos encontrar estatinas naturales (lovastatina y pravastatina), semi-sintéticas (simvastatina) y sintéticas (atorvastatina y fluvastatina) (Manzoni y col. 2002). Estos compuestos disminuyen los niveles de colesterol; particularmente las lipoproteínas de baja densidad o colesterol de baja densidad (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 y col. 1980; Manzoni y col 1999). Además, las estatinas han surgido como medicamentos preventivos de vanguardia, por que reducen la tasa de

reinfarto, la mortalidad en pacientes con colesterol elevado, entre otros (Downs y col, 1998). En el año 2006, dos estatinas fueron consideradas por la revista *Forbe's*, dentro de la lista de los 20 medicamentos más vendidos en Estados Unidos, con 8.4 y 4.4 billones de dólares anuales (Barrios-Gonzalez y col, 2010).

De las estatinas, la lovastatina (mevinolina), fue el primer fármaco hipocolesterolémico aprobado por la FDA (Food and Drugs Administration), USA. En los últimos años, la lovastatina se ha descrito como un potencial agente terapéutico para el tratamiento de diversos tipos de tumores, por que detiene el crecimiento tumoral in vivo debido a la inhibición de la síntesis de compuestos isoprenoides no esteroideos (Jones y col 1994; Newman y col 1994).

La lovastatina se genera como metabolito secundario, por algunas especies de hongos, tales como: *Penicillium sp*, *Monascus ruber*, *Trichoderma sp*. y *Aspergillus terreus* (Valera y col. 2005). La producción industrial de lovastatina se lleva a cabo en tanques agitados (FL); pero en los últimos años, ha aumentado el interés en la producción de lovastatina por FS, como una alternativa de producción de lovastatina. Dentro de la FS se pueden distinguir dos tipos, basados en la naturaleza del soporte utilizado: a) FS sobre soportes naturales y b) FS sobre soportes inertes impregnados con medio de cultivo (Barrios-González y col 1996). Recientemente la compañía Biocon produce lovastatina a gran escala, utilizando una cepa de *Aspergillus flavipes*, utilizando salvado de trigo como soporte natural (Valera y col 2005). El segundo tipo de FS, es el desarrollado en este estudio de investigación, en donde utilizamos espuma de poliuretano como soporte inerte artificial (Baños y col 2009).

Por otro lado, la mejora continua de la productividad de un microorganismo industrial, es esencial para el éxito comercial de un proceso de fermentación. Dicha mejora abarca el aumento en la productividad del producto, manteniendo las características deseadas y eliminando cometabolitos indeseados (Vinci y col 1991).

Estrategias para la obtención y selección de mutantes sobre productoras de lovastatina han sido reportadas para *Aspergillus terreus* y *Monascus ruber* (Miyake y col 2006; Vilchez y col 2005; Vinci y col 1991). Estas estrategias de mejora continua, contemplan la generación de poblaciones modificadas genéticamente, que abarcan mutaciones dirigidas y mutaciones aleatorias. Estas últimas pueden seleccionarse en forma también aleatoria o en forma racional. La selección racional se define como la selección (o preselección) por una característica diferente a la que buscamos, pero que se sabe que está relacionada de alguna manera con esta. En el presente trabajo se diseñaron y probaron métodos de selección racional para la obtención de mutantes sobre productoras de lovastatina. Se generaron mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico y oxidativo, así como mutantes sobre productoras resistentes a estrés mixto.

2.- Antecedentes.

2.1. Colesterol

El colesterol es un lípido (esterol) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Se presenta en altas concentraciones en el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro (Furberg y col, 1999).

Los seres humanos obtienen colesterol a través de las siguientes vías: **a)** Vía exógena o absorción, el colesterol se encuentra exclusivamente en los alimentos de origen animal, entre ellos los lácteos, hígado, cerebro y músculo esquelético (carne roja); **b)** Vía endógena o síntesis de *novo*, es la síntesis de colesterol en las células animales a partir de su precursor, el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A.

Entre los años 50 y 60, se descubrió la ruta de biosíntesis del colesterol en los humanos. En esta ruta intervienen más de 30 enzimas, las que funcionaron como un claro objetivo en la búsqueda de fármacos que la inhibieran, para detener la síntesis del colesterol. Uno de los primeros fármacos ensayados fue el triparanol, que inhibía la enzima Δ^{24} reductasa, en el último paso de la ruta de biosíntesis del colesterol. Este fármaco fue introducido en el mercado a mediados de los años 60 y retirado poco después debido a fuertes reacciones adversas a la piel por la acumulación de desmosterol, un precursor de la síntesis de colesterol (Fredrickson and Steinberg, 1957; Steinberg y col, 1961).

Después de este primer fracaso la enzima objetivo fue la HMG-CoA reductasa (3-hidroxiacetil-CoA reductasa). El argumento para la selección de esta enzima fue que regula uno de los pasos limitantes en la síntesis del colesterol y además, por tener un sustrato de fácil eliminación, el hidroximetilglutarato, que es soluble en agua y puede ser metabolizado en otras rutas bioquímicas, reduciendo con esto los efectos secundarios del inhibidor, al facilitar su eliminación y evitar su acumulación (Tobert y col, 2003).

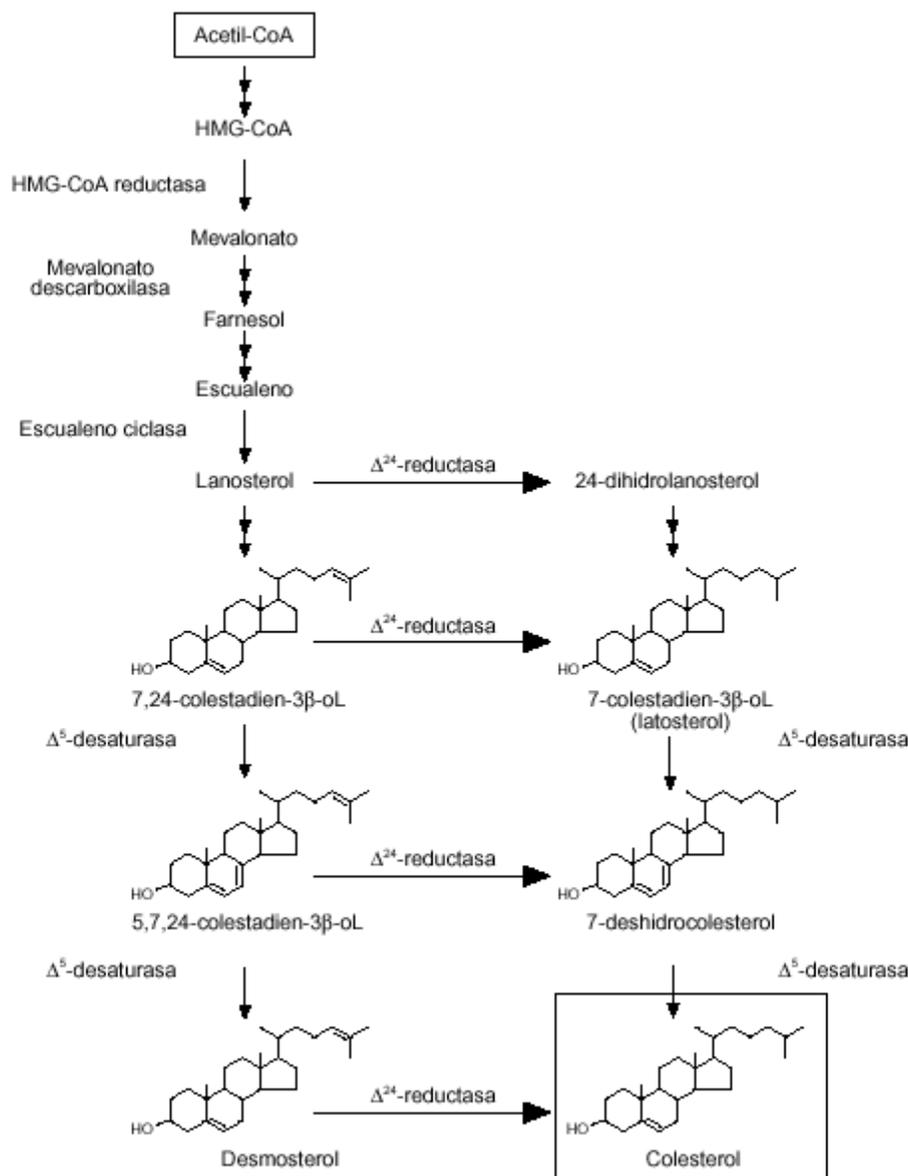


Figura 2.1. Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández y col. 2003).

El primer inhibidor de la HMG-CoA reductasa, fue descubierto por el microbiólogo japonés Akira Endo en los años 70, mientras buscaba sustancias antimicrobianas en fermentaciones de *Penicillium citrinum*. Este inhibidor recibió el nombre de compactina. La compactina presentó efectos secundarios adversos en animales, deteniéndose los ensayos

clínicos en septiembre de 1980. Actualmente, la compactina se utiliza como precursor de la pravastatina, otra estatina usada para la reducción del nivel de colesterol (Endo y col., 1976a; Endo y col., 1976b).

La HMG-CoA reductasa es la enzima que regula la velocidad de síntesis del colesterol en el hígado y otros tejidos. Su estructura es un tetrámero; los cuatro monómeros que la componen son idénticos y todos contribuyen al sitio activo de la enzima. El colesterol y otros productos intermediarios llamados isoprenoides, ejercen un control negativo sobre la expresión del gen encargado de codificar la enzima HMG-CoA reductasa.

En el año 1978 en los laboratorios Merck, Alberts y colaboradores (1980), descubrieron un potente inhibidor de la HMG-CoA reductasa, obtenido a partir de fermentaciones, utilizando *Aspergillus terreus*. A este compuesto lo llamaron mevinolina, al que posteriormente se denominó lovastatina.

2.2. Estatinas

Entre los fármacos hipolemiantes, las estatinas tienen un papel preponderante por su eficiencia y seguridad, basando su acción reductora del colesterol en la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa. Actualmente se comercializan siete estatinas: lovastatina, pravastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina y rosuvastatina. La cerivastatina, una estatina que estuvo en el mercado hasta 2001, fue retirada por el laboratorio Bayer, debido a su asociación con la rabdomiolisis (disolución del músculo esquelético y se caracteriza por la pérdida del contenido de las células musculares).

En ensayos clínicos se ha encontrado que la simvastatina y la pravastatina, además de la disminución del colesterol, reducen la tasa de re infarto y la mortalidad en pacientes de ambos sexos, menores de 70 años con colesterol elevado (Downs y col, 1998). Análogamente, la pravastatina y la lovastatina reducen la incidencia de cardiopatía isquémica en prevención primaria. Para la lovastatina se ha demostrado que actúa sobre una glucoproteína expresada por los leucocitos, resultando con esto en un efecto benéfico en contra de la artritis reumatoide y el rechazo de homoinjertos (Kallen y col, 1999).

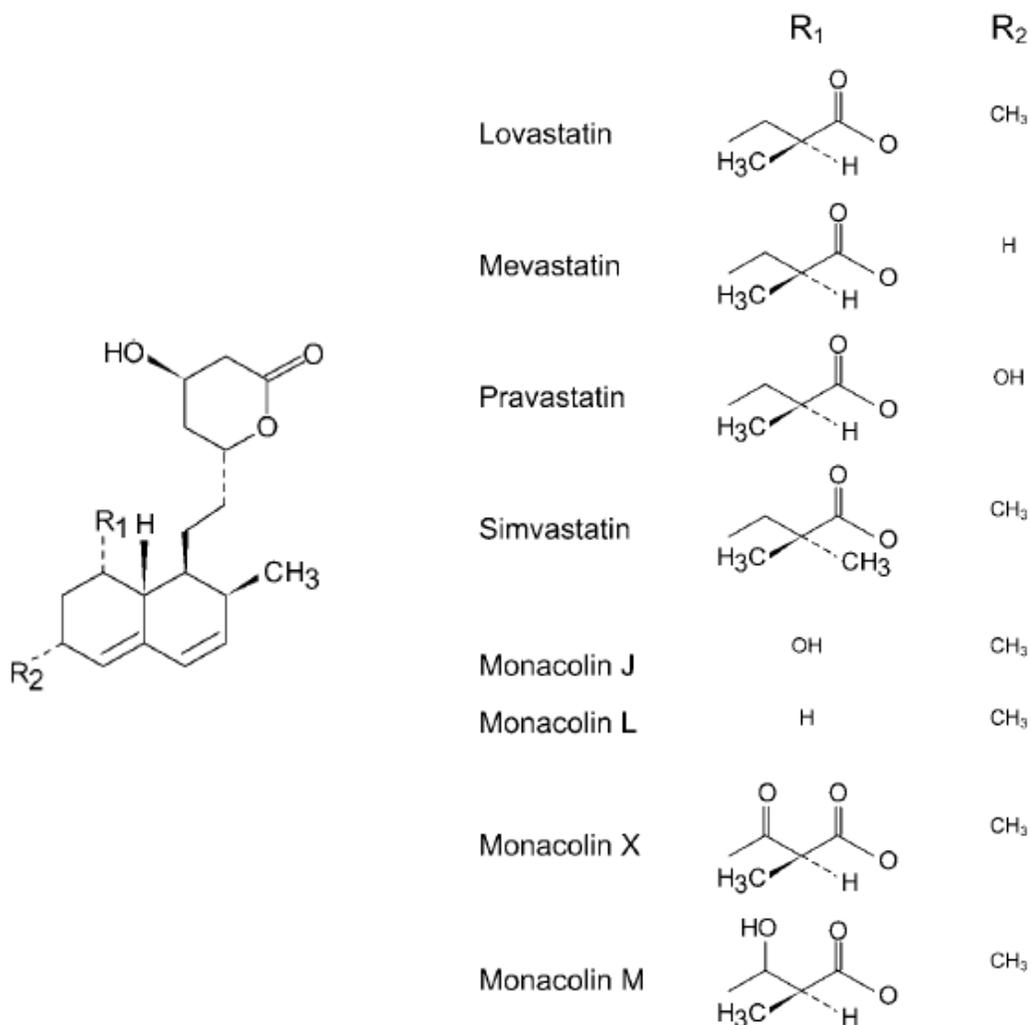


Figura 2.2. Estructura base de las estatinas (izquierda). Cadenas ligadas al C8 (R₁) y al C6 (R₂) de la estructura base (derecha) (Manzoni y col, 2002).

Las estatinas se pueden clasificar dependiendo de la forma en que se obtienen: a) estatinas naturales (lovastatina y pravastatina), se obtienen de manera directa por fermentación. b) estatinas semi-sintéticas (simvastatina), se obtienen a partir de las estatinas naturales. c) sintéticas (atorvastatina y fluvastatina), se obtienen por síntesis química. Las estatinas tienen una estructura química muy similar, poseen un policétido principal, un sistema de anillos de hidroxi-hexahidro-naftaleno, siendo la principal diferencia es que derivan en las cadenas laterales unidas a los carbonos 8 (R₁) y carbono 6 (R₂), (Manzoni y col., 2002) (figura 2.2).

2.2.1. Lovastatina.

La lovastatina es generada a través de la ruta de síntesis de los policétidos, su fórmula molecular es $C_{24}H_{36}O_5$, con un peso molecular de 404.5 g/mol y su estructura se presenta en la figura 2.3. Está fué la primer estatina desarrollada para uso clínico y aprobada por la US FDA (United States Food and Drug Administration), para el tratamiento de la hipercolesterolemia el 31 de agosto de 1987 (Tobert y col, 2003).

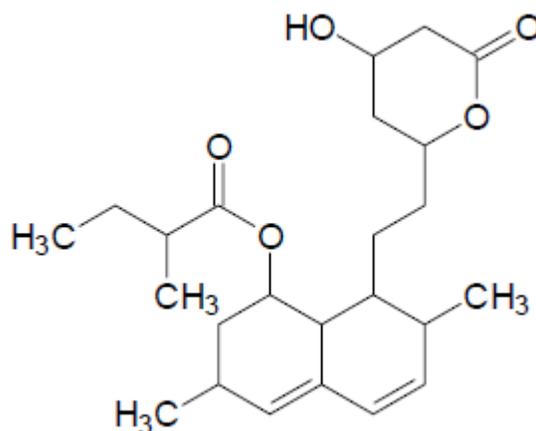


Figura 2.3. Estructura molecular de la Lovastatina (Manzoni y col, 2002).

2.2.2. Producción

Los hongos tienen una gran importancia económica, no sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Son responsables de gran cantidad de enfermedades, como por ejemplo, la más común del género *Aspergillus*: la Aspergillosis, la cual es ocasionada principalmente por los hongos *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus* (Chamilos y col, 2005).

Sin embargo, los efectos perjudiciales de los hongos son contrarrestados por los usos que les damos a nivel industrial (tabla 2.1). Los hongos son los organismos más utilizados en

la realización de fermentaciones para la producción de algunos alimentos orientales, por ejemplo el miso, shoyu y temphe, entre otros. Los hongos son también fuente de muchas enzimas comerciales: amilasas, proteasas, pectinasas, peroxidasas, entre otras; así como también de ácidos orgánicos: cítrico y láctico (Crueger y Crueger, 1982); también son útiles en la producción de antibióticos: penicilina, cefalosporina; hipolemiantes como las estatinas, entre otros ingredientes activos utilizados en medicina (Bennett y col, 1998).

Tabla 2.1. Principales productos de hongos con aplicación industrial (Bennett y col, 1998)

PRODUCTO	ORGANISMO
ANTIBIÓTICOS Y OTROS FÁRMACOS	
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Ciclosporina	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Alcaloides	<i>Claviceps purpurea</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i>
ENZIMAS	
α - Amilasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus orizae</i>
Celulasas	<i>Penicillium funiculosum, Humicola insolens</i>
Glucoamilasas	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar</i>
Lacasas	<i>Coriolus versicolor</i>
Pectinasas	<i>Aspergillus terreus, Aspergillus orizae</i>
Peroxidasas	<i>Trametes versicolor</i>
Lipasas	<i>Aspergillus terreus</i>
ÁCIDOS ORGÁNICOS	
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido cítrico	<i>Aspergillus terreus</i>
Ácido cítrico	<i>Rhizopus arrhizus</i>

La lovastatina es un metabolito secundario, por lo tanto su producción está asociada a la fase estacionaria de crecimiento o idiofase, una fase de no crecimiento del hongo o de limitación de algún nutrimento, que principalmente puede ser carbono o nitrógeno.

La lovastatina (mevinolin o monacolin K) se obtuvo por primera vez de una cepa aislada del suelo y clasificada como *Aspergillus terreus* por los laboratorios CIBE en Madrid, España (Alberts y col 1980); esta también puede ser producida por *Monascus ruber* (llamada monacolin K). Años después, la lovastatina se obtuvo de 17 cepas de diferentes especies del género *Monascus* (en particular *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus* y *M. pubigerus* (Negishi y col 1986).

La producción comercial de lovastatina por *Aspergillus terreus* se ha realizado de manera tradicional por FL (Szakács y col, 1998; Manzoni y col, 1999; Kumar y col, 1999), y en los últimos años se ha visto la enorme posibilidad de realizar la producción por FS (Baños y col, 2009; Szakács y col, 1998; Hölker y col, 2005). Recientemente la compañía Biocon India Ltd, produce tres metabolitos secundarios de origen fúngico por FS a nivel industrial, aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) en Estados Unidos.

El cultivo de *Aspergillus terreus* para la producción de lovastatina se realiza principalmente por FL y son llevadas a cabo en temperaturas aproximadas a los 28°C y pH de 5.8-6.3, niveles de oxígeno disuelto mayores al 40% de saturación y con una máxima producción de lovastatina a los 10 días de cultivo (Kumar y col. 1999). Los medios de cultivo contienen básicamente fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, y fuentes de fosfatos y sulfatos. La composición de los medios de cultivo y su efecto en la producción de lovastatina han sido ampliamente estudiados (Szakács y col, 1998; Hajjaj y col, 2001; Buckland y col, 1989; Shindia y col, 2001).

Szakács y colaboradores (1998), estudiaron la influencia de las fuentes de carbono, nitrógeno (orgánico e inorgánico) y fosfato sobre la producción de lovastatina por una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* (TUB F-514). El mejor medio de cultivo contenía lactosa como fuente de carbono, harina de colza como fuente de nitrógeno orgánico y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno inorgánica, así como una solución de elementos traza y obtuvieron

una producción de lovastatina cercana a los 400 $\mu\text{g/ml}$. Este medio de cultivo y esta cepa son utilizados en el presente estudio.

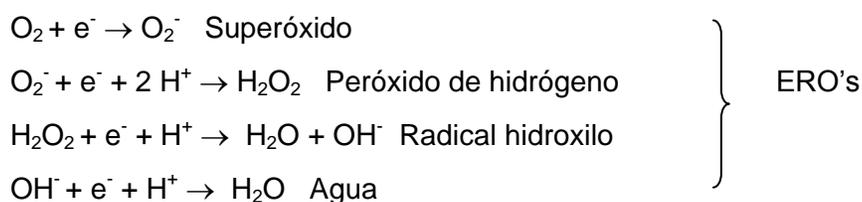
La FS ha emergido y se considera como una tecnología potente para obtener altas producciones de metabolitos secundarios. Muchos estudios comparativos han mostrado que la FS presenta ventajas sobre la FL, incluyendo altos rendimientos y menor tiempo. Otra característica muy importante es el poco consumo de agua necesario para llevar a cabo este proceso (reduciendo los costos de producción) (Hölker y col, 2005; Robinsons y col, 2001; Balakrishnan y col, 1996; Suryanarayan y col, 2003).

Se conocen dos tipos principales de FS, dependiendo de la fase sólida utilizada: a) fermentación sólida sobre soportes naturales, que es el tipo más utilizado. b) fermentación sólida sobre soportes inertes impregnados con medio de cultivo, que también se puede dividir en: soportes naturales (bagazo de caña) y soportes artificiales (espuma de poliuretano). El primer tipo es el utilizado por Biocon y el segundo tipo, se utilizó en el desarrollo de este estudio.

2.3. Estrés Oxidativo

Todos los microorganismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (O_2) durante la respiración para la obtención de energía, sin embargo al mismo tiempo deben enfrentar los efectos tóxicos que esto produce, como lo es la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's), en las que se incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot), todos ellos producidos durante el proceso de reducción del oxígeno hasta agua durante la respiración (Angelova y col, 2005).

- Reducción de oxígeno hasta agua mediante la incorporación secuencial de electrones:



Las ERO's son derivados del oxígeno más reactivo que el O_2 en su estado basal. La molécula de di oxígeno es un birradical libre, esto es, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital π de anti unión (π^*) (figura 2.4). En esta molécula los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el O_2 oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro contrario o aceptar un solo electrón a la vez (limitación del giro o "spin"). Si un solo electrón se adiciona al di oxígeno, éste se localizará en uno de los orbitales π^* de anti unión y el producto será el radical superóxido (O_2^-). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido el cual se protona rápidamente en el ambiente celular y se produce el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2). 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 fierro o el cobre reducidos (Fe^{2+} o Cu^+ respectivamente) forma el radical hidroxilo (HO^\cdot) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad. En el ión peróxido los dos átomos se encuentran unidos por un solo enlace débil, de tal forma que al aceptar un par de electrones extra, este enlace se elimina totalmente. La protonación de este producto genera agua (Folch-Malloi, 2004).

Las ERO's 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 β -oxidación de ácidos grasos, o al exponer las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o metales pesados (Storz y col, 1987).

Si la concentración de las ERO's sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estrés oxidativo. Para contender con el estrés oxidativo y proteger los componentes celulares, al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las ERO's, los organismos utilizan una serie de compuestos antioxidantes conformados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

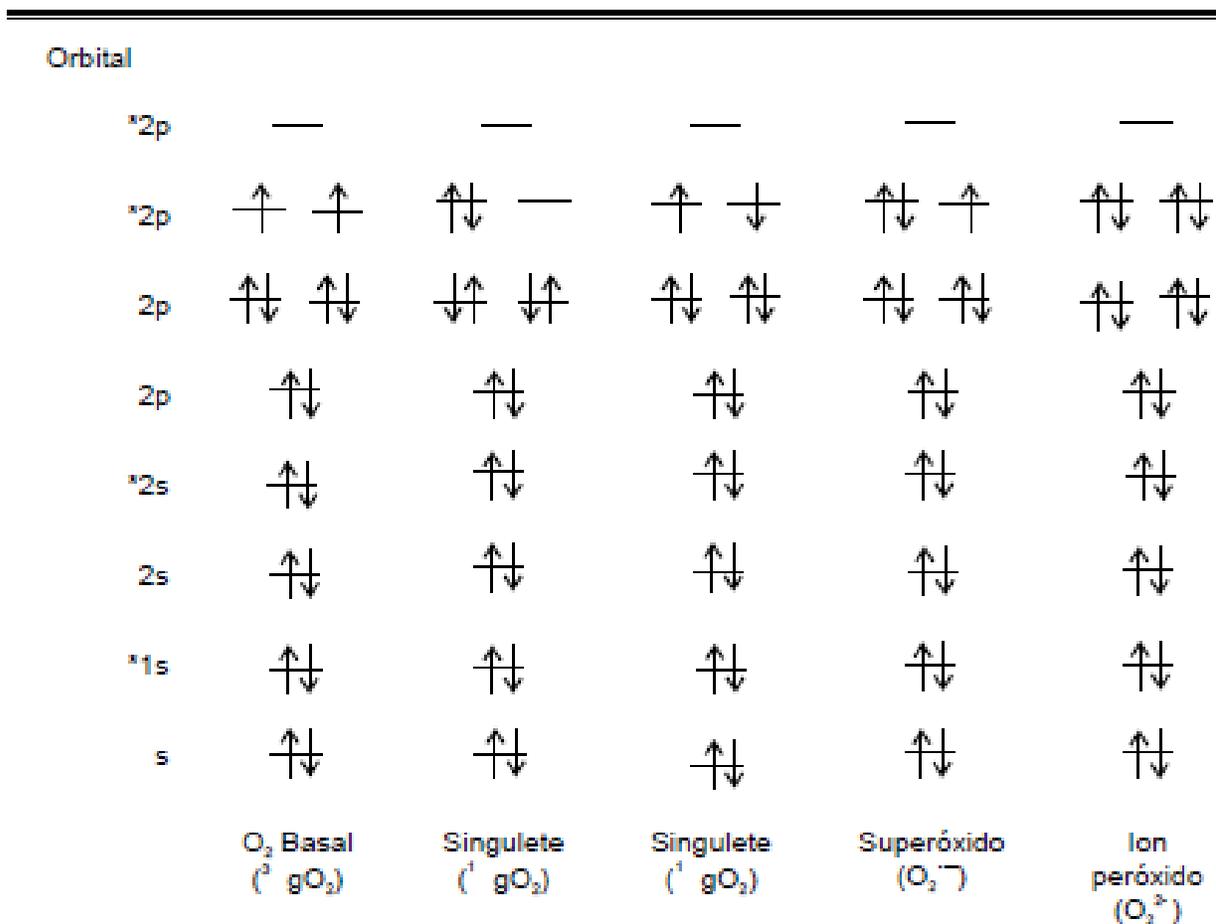


Figura 2.4. Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de di oxígeno (Folch-Mallol, 2004).

2.3.1. Sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos.

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente de moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico. Estos actúan en general como atrapadores de algunas de las ERO's. Entre estos sistemas se encuentran:

- El glutatión (GSH)
- Las poliaminas

-
- El ácido eritroascórbico
 - Las metalotioneínas
 - Las flavohemoglobinas
 - Las glutarredoxinas
 - Las tiorredoxinas

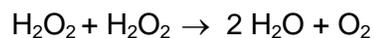
2.3.2. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.

Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de remover las ERO's. Dentro de estos sistemas se incluyen:

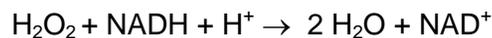
- La catalasa
- La superóxido dismutasa
- Las enzimas de la ruta de las pentosas
- La glutatión reductasa y peroxidasa
- La thiorredoxina peroxidasa y reductasa
- Las perredoxinas

Los mecanismos de acción de algunas de las enzimas encargadas de contrarrestar los efectos nocivos de las ERO's se muestran a continuación:

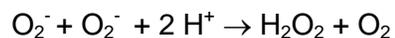
a) Catalasa:



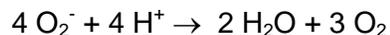
b) Peroxidasa:



c) Superóxido dismutasa:



d) Superóxido dismutasa/catalasa en combinación:



Hasta ahora, las respuestas al estrés oxidativo, han sido extensamente estudiadas en bacterias, incluyendo *Escherichia coli* y *Salmonella typhimorium*, así como en levaduras. Sorpresivamente, a pesar de su amplio y constante uso industrial se han realizado pocos estudios acerca de los sistemas de defensa antioxidantes presentes en los hongos filamentosos. Kreiner y colaboradores (2002), estudiaron la respuesta al estrés oxidativo en una cepa recombinante de *Aspergillus niger*, utilizando menadiona y H₂O₂; los resultados indicaron cambios en la actividad intracelular de las enzimas catalasa y súper óxido dismutasa. En otro estudio, se determinó el efecto de dos agentes generadores de ERO's paraquat (PQ) y H₂O₂ sobre el crecimiento celular y la inducción de enzimas antioxidantes en 12 especies de hongos filamentosos entre los que se incluyeron *Aspergillus niger*, *A. argilaceum*, *A. oryzae* (Angelova y col, 2005). En este estudio se determinó la actividad extracelular de las enzimas catalasa y súper óxido dismutasa, para la cepa silvestre como para sus mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo y osmótico en FL y FS.

2.4. Estrés osmótico

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular; la proliferación celular se reanuda después de un período de aclimatación, el cual varía dependiendo de un número de factores, como pueden ser el tipo y la severidad del estrés, del estado de crecimiento, entre otros (Blomberg y col, 2000).

Al mismo tiempo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además se induce la expresión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Rep y col, 1999). Dichos mecanismos se detallan a continuación.

2.4.1. Vía de HOG MAP kinasa.

La vía HOG (High Osmolarity Glicerol), se activa principalmente bajo condiciones de estrés hiperosmótico y regula la transcripción de genes, muchos de los cuales a su vez se inducen por la vía general de respuesta a estrés (Causton y col, 2001; Gasch y col, 2000).

La vía HOG es una de las vías de MAP kinasas (Proteínas kinasas activadas por mitógenos) mejor caracterizadas. Las MAP kinasas son unidades de señalización altamente conservadas en eucariontes, donde juegan un papel esencial en la respuesta a factores ambientales, hormonas, factores de crecimiento o citocinesis. Estas vías controlan el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación y muchas de las vías de respuesta a estrés. En cualquiera de estas vías de señalización hay tres MAP kinasas secuenciales y esenciales, una MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK o MEKK), una MAP cinasa-cinasa (MAPKK o MEK) y una MAP cinasa (MAPK). La MAPKKK fosforila y activa a la MAPKK que, subsecuentemente, fosforila y activa a la MAPK; normalmente esta última fosforilación lleva a la MAPK hacia el núcleo, donde fosforila a sus blancos (Hohmann y col, 2003).

2.4.2. Síntesis y acumulación de Glicerol

La vía de HOG regula la síntesis de glicerol, el cual forma parte de un grupo de moléculas conocidas como “osmolitos compatibles”. Estos compuestos se acumulan en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación causada por el estrés hiperosmótico y tienen la característica de acumularse en grandes cantidades sin afectar el funcionamiento de la célula. Existe una gran variedad de osmolitos compatibles utilizados por los organismos: iones, azúcares, polioles de estos azúcares así como aminoácidos y sus derivados (Yancey, 1982).

El glicerol puede ser utilizado como fuente de carbono y energía, así como para proteger a la célula contra altas temperaturas, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. El glicerol es un alcohol poli hídrico que se sintetiza a partir de fosfato de dihidroxiacetona, un intermediario de la glucólisis.

3.- Hipótesis.

1. El sistema de fermentación en medio sólido de dos fases, presenta una alternativa conveniente para la producción de lovastatina con *Aspergillus terreus* TUB F-514.

2. El estrés osmótico y el estrés oxidativo, son condiciones distintivas del ambiente que encuentran los hongos, cultivados en fermentación sólida de dos fases, y contribuyen a inducir la fisiología observada en *Aspergillus terreus*, cultivado en este sistema (alta producción de lovastatina en poco tiempo), por lo que las mutantes resistentes a estrés osmótico y/u oxidativo son mejores productoras de lovastatina en fermentación sólida.

4.- Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Establecer las condiciones para la producción de lovastatina, en sistemas de fermentación sólida de dos fases, con soporte inerte artificial y comparar la producción con un soporte mejor estudiado, el bagazo de caña, como soporte inerte natural. Además, establecer si la capacidad de contender con el estrés osmótico y/o el oxidativo, le da ventajas a *Aspergillus terreus*, para producir lovastatina en fermentación sólida.

4.2. Objetivos específicos.

1. Poner a punto el método de extracción de lovastatina en poliuretano y bagazo de caña, así como el método de cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución.
2. Determinar el efecto de la aireación, contenido de humedad inicial, concentración del medio, composición del medio y la densidad del poliuretano, sobre la producción de lovastatina en fermentación sólida de dos fases.
3. Comparar las cinéticas de producción de lovastatina en ambos sistemas de producción, fermentación en medio sólido y fermentación en medio líquido.
4. Determinar la dosis mínima inhibitoria, de los compuestos causantes del estrés en *Aspergillus terreus* y generar las mutantes por radiación con luz UV.
5. Seleccionar las mutantes resistentes a estrés oxidativo, estrés osmótico y mutantes con resistencia a estrés mixto.
6. Determinar la producción de lovastatina, en fermentación en cilindro de agar (sistema de fermentación miniaturizado), de las diferentes poblaciones de mutantes y compararla con la cepa parental. Seleccionar las mejores mutantes.
7. Determinar la producción de lovastatina, en fermentación en medio sólido y fermentación en medio líquido, de las mejores mutantes productoras de lovastatina en fermentación en cilindro de agar.

5. Materiales y Métodos.

5.1. Microorganismos utilizados.

- ***Aspergillus terreus*.**

La cepa TUB F-514 utilizada para la producción de lovastatina fue aislada de suelo proveniente del 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 fermentación líquida estudiada por Szakács y col, 1998.

- ***Neurospora crassa*.**

La cepa FGSC 4200 (Fungal Genetics Stock Center), fue utilizada para la realización del bioensayo, debido a la sensibilidad que presenta a la forma activa de la lovastatina, la β -hidroxiácida, descrito por Kumar y col. (1999).

5.2. Conservación de cepas.

Aspergillus terreus se propagó en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) en matraces Erlenmeyer, se incubó a 30°C durante 5-6 días, las esporas se colectaron en viales de 1.8 ml con glicerol al 25% p/v y se almacenaron a -20°C.

Neurospora crassa se propagó en medio SDA (Sabouraud's dextrosa agar), en matraces Erlenmeyer, se incubó a 30°C durante 10 días, las esporas se colectaron en viales de 1.8 ml con glicerol al 25% p/v y se almacenaron a -20°C.

5.3. Medios de cultivo.

5.3.1. Medios de esporulación.

Aspergillus terreus. Para cada variable estudiada, se utilizaron esporas frescas, los matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio PDA se inocularon con 0.2 ml de suspensión de esporas, de los viales almacenados a -20°C. Los matraces se incubaron a 30°C durante 5-7 días. Se cosecharon las esporas con 10 ml de solución tween 80 al 0.1 % y 2 g de perlas de vidrio; se agitaron constantemente durante 3 minutos; las esporas extraídas se contaron en la cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 1×10^8 esporas/ml, para la fermentación sólida y 2×10^6 esporas/ml para la fermentación líquida.

Neurospora crassa. Se propagó en medio Power durante 8-10 días, se cosecharon las esporas con 10 ml de tween 80 al 0.1% y 2 g de perlas de vidrio, los matraces se mantuvieron con agitación constante durante 3 minutos; las esporas extraídas se contaron en la cámara de Neubauer. El medio Power (Tabla 5.3) está compuesto por dos medios, uno de esporulación y otro de mantenimiento: medio Czapek (Tabla 5.1) y medio PMI (Tabla 5.2), respectivamente.

Tabla 5.1. Composición del medio Czapek.

Medio Czapek	
Sacarosa	30 g/l
NaNO ₃	2 g/l
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l
MgSO ₄	0.5 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g/l
pH	Ajustar a 5.5

Tabla 5.2. Composición del medio PMI.

Medio PMI	
Bacto peptona	5 g/l
Lactosa	5 g/l
NaCl	4 g/l
Sólidos de Maceración de Maíz	1 g/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	50 mg/l
FeCl ₃ .6H ₂ O	3 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mg/l
pH	Ajustar a 5.5

Tabla 5.3. Composición del medio Power.

Medio Power	
Medio PMI	500 ml
Medio Czapek	500 ml
Agar bacteriológico	2% p/v
pH	Ajustar a 5.5

5.3.2. Medios para fermentación líquida.

El medio de cultivo utilizado para realizar la FL fue el medio reportado por Szakács y colaboradores 1998, modificado para este estudio (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Medio de producción propuesto por Szakács y colaboradores (1998) y medio de producción modificado para este estudio.

	Szakács	Modificado
Lactosa	4%	4%
Harina de nabo silvestre	0.3%	0
Harina de soya	0	0.3%
KNO ₃	0.2%	0.2%
KH ₂ PO ₄	0.3%	0.3%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05%	0.05%
NaCl	0.05%	0.05%

*Los medios de producción fueron suplementados con una solución de elementos traza, cuya composición en g/l fue: 1.6 de MnSO₄, 3.4 de ZnSO₄.7H₂O, 2 de CoCl₂.6H₂O y 5 de FeSO₄.7H₂O. El pH se ajustó a 6.5 para cada uno de los medios.

5.3.3. Medios para fermentación Sólida.

El medio de cultivo utilizado para realizar la FS, fue el medio modificado (tabla 5.4) para este estudio, el cual se nombró 2X y 2.5X, por el número de veces en que se aumentó la concentración (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Medios de producción utilizados para llevar a cabo las fermentaciones sólidas.

	Modificado (1X)	2X	2.5X
Lactosa	4%	8%	10%
KNO ₃	0.2%	0.4%	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.3%	0.6%	0.75%
Harina de soya	0.3%	0.6%	0.75%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05%	0.1%	0.125%
NaCl	0.05%	0.1%	0.125%

*Los medios de producción fueron suplementados con una solución de elementos traza: 1.6 g/l de MnSO₄, 3.4 g/l de ZnSO₄.7H₂O, 2 g/l de CoCl₂.6H₂O y 5 g/l de FeSO₄.7H₂O. El pH de los medios se ajustó a 6.5.

5.3.4. Medio para fermentación en cilindro de agar.

Para la elaboración de los cilindros de agar, se utilizó el medio de producción 2.5X, con 1.5% de glucosa (tabla 5.6), el aumento de glucosa se compensó con una disminución de lactosa.

Tabla 5.6. Medio de producción 2.5X modificado más 1.5% de glucosa.

	Medio 2.5X	Medio 2.5X con glucosa
Lactosa	10%	8.5%
Glucosa	0	1.5%
KNO ₃	0.5%	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.75%	0.75%
Harina de soya	0.75%	0.75%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.125%	0.125%
NaCl	0.125%	0.125%
Agar bacteriológico	0	2% p/v

5.3.5. Medio para Bioensayo.

Para la realización del bioensayo se utilizó medio SDA (Sabouraud's dextrosa agar), cuya composición es:

Tabla 5.7. Composición medio Sabouraud's dextrosa agar (SDA).

Glucosa	40 g/l
Peptona	10 g/l
Agar	20 g/l
pH	Ajustar a 5.6

5.3.6. Medios para la selección de mutantes sensibles a estrés osmótico.

Se utilizó un medio mínimo, cuya composición se muestra en la tabla 5.8. Este medio fue nombrado MML y medio mínimo sólido MMS, cuando a la composición se le adicionó agar bacteriológico.

Tabla 5.8. Composición de los medios denominados: medio mínimo líquido (MML) y medio mínimo sólido (MMS).

	MML (g/l)	MMS (g/l)
Glucosa	30	30
NaNO ₃	2	2
K ₂ HPO ₄	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	0.5
KCl	0.5	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	0.01
Agar bacteriológico	0	20
pH	Ajustar a 6.5	Ajustar a 6.5

5.4. Condiciones de cultivo para fermentación en cilindro de agar, fermentación líquida y fermentación sólida.

5.4.1. Fermentación en cilindro de agar.

Los cilindros de agar inoculados, se colocaron dentro de una caja petri de 10 cm y se incubaron a 30°C durante 5-7 días o hasta que se observó esporulación en el cilindro de agar. Ver anexo 2.

5.4.2. Fermentación líquida.

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de producción, se inocularon con 2×10^6 esporas/ml y se incubaron a 30°C, con agitación de 200 rpm.

5.4.3. Fermentación sólida.

5.4.3.1. Soporte sólido.

Se utilizaron dos soportes, un soporte natural, bagazo de caña, y, un soporte artificial, PUF. El bagazo de caña se tamizó en mallas No. 30 y 50, utilizando únicamente el material retenido entre éstas mallas. El PUF que se utilizó, fue de 4 diferentes densidades, 13, 17, 20 y 24 kg/m³, que se cortaron en cubos de 1 cm³.

5.4.3.2. Pre tratamiento de la espuma de poliuretano y del bagazo de caña.

Los cubos de PUF se lavaron con agua destilada, se exprimieron y se remojaron durante 10 minutos 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. (Tomasini y col, 1997).

El bagazo se pre trató, con el 35% del agua disponible para preparar el medio de cultivo y se llevó a 3 lb/in² (101°C), utilizando un autoclave, durante 60 minutos. Se esterilizó a 15 lb/in², durante 15 minutos. (Barrios y col, 1988).

5.4.3.3. Inoculación del medio sólido.

El medio de producción se inoculó con 1×10^8 esporas/ml. Se impregnó en los soportes (bagazo de caña y PUF) de manera que el medio quedará completamente embebido en el soporte.

5.4.3.4. Empaquetamiento de las columnas.

Se utilizaron 6 g de soporte húmedo (impregnado con medio de producción), en columnas de 150 mm de largo x 21 mm de DI, con un volumen de 52 cm³ y se empacaron a una densidad de 0.144 g/cm³, considerando que el volumen para el empaquetamiento fue de 41.5 cm³.

A las columnas empacadas, se les adaptó un burbujeador de vidrio con agua destilada, por donde se hizo pasar aire húmedo a un flujo de 0.04, 0.08 y 0.16 l g⁻¹h⁻¹. Las columnas con los burbujeadores, se colocaron en un baño de agua a 30°C.

5.4.3.5. Fermentación en matraces.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 6 g de soporte impregnado con medio de producción, se taparon con aluminio y se cerraron con parafilm. Se incubaron a 30°C durante 6-8 días.

5.5. Efecto de la aireación.

Para ambos soportes, PUF y bagazo de caña, se probaron 3 niveles de aireación para las columnas empacadas, 0.04, 0.08 y 0.16 l g⁻¹h⁻¹. Para probar niveles más bajos de aireación, se utilizaron matraces aireados, un minuto una vez al día en campana de flujo laminar (MA) y matraces sin recambio de aire (MC).

5.6. Efecto del contenido inicial de humedad (Hi).

Para el PUF el contenido de Hi, se fijó en 3 niveles, 75%, 80%, y 85% el nivel de máxima capacidad de retención del soporte. Tabla 5.10.

5.7. Efecto de la concentración del medio.

En un primer estudio, las concentraciones del medio fueron de 2X y 2.5X veces el medio de producción. Para tener una visión más amplia del comportamiento de este factor, se estudiaron concentraciones de medios de 1.5X, 2X, 2.5X, 3X, 3.5X y 4X; utilizando matraces con recambio de aire y matraces sin recambio de aire.

5.8. Efecto de la composición del medio.

Se estudió el efecto de la adición de glucosa al medio de producción en dos niveles, 1% de glucosa y 1.5% de glucosa para el medio 2.5X. El aumento de glucosa fue compensada con una disminución de lactosa (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Composición del medio de producción. Adición de glucosa 1y 1.5%.

	Medio 2.5X	2.5X + 1%	2.5X + 1.5%
Lactosa	10%	9%	8.5%
Glucosa	0%	1%	1.5%
KNO ₃	0.5%	0.5%	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.75%	0.75%	0.75%
Harina de soya	0.75%	0.75%	0.75%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.125%	0.125%	0.125%
NaCl	0.125%	0.125%	0.125%
pH	6.5	6.5	6.5

5.9. Efecto de la densidad de PUF.

Se utilizaron 4 diferentes densidades de PUF 13,17, 20 y 24 kg/m³. Dependiendo de la densidad del soporte fue la capacidad de retención del medio de producción (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Capacidad de retención de medio de cultivo del poliuretano y contenido de humedad inicial (Hi) para la fermentación sólida.

Densidad Kg/m ³	Capacidad de retención (ml)	% Hi
13	9.1 ± 0.4	75
17	21.1± 0.6	85
20	21.3 ±0.9	85
24	15.4 ±0.5	80

5.10. Selección de mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo, osmótico y mixto.

5.10.1. Mutagénesis y Curva de Supervivencia.

5.10.1.1. Inoculación y cosecha de esporas.

Se inocularon matraces con 0.2 ml de la suspensión de esporas de *Aspergillus terreus* de la cepa TUB F-514, dichos matraces contenían 50 ml de medio power. Después de 6 días de incubación a 30°C, se cosecharon las esporas con 10 ml de solución tween 80 al 0.1% y 2g de perlas de vidrio. La suspensión de esporas, se filtró con fibra de vidrio estéril, con el fin de eliminar el micelio que pudiera haberse desprendido durante la cosecha de las esporas.

5.10.1.2. Radiación con luz UV.

La suspensión de esporas se ajustó a una concentración de 8×10^7 esporas/ml. Se colocaron 27 ml de esta suspensión en una caja petri estéril. Se realizó la mutagénesis con luz UV, con una intensidad de $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante 15 minutos, la suspensión se mantuvo con una agitación de 30 rpm. Se tomaron muestras de 1 ml por minuto, estas muestras fueron puestas en viales y se conservaron en glicerol al 25% v/v. Se guardaron en papel aluminio para mantenerlas en oscuridad y se almacenaron a -20°C .

5.10.1.3. Curva de sobrevivencia.

Se tomó 0.1 ml de las muestras obtenidas para cada uno de los tiempos de exposición a la luz UV, y se hicieron diluciones de 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6} esporas/ml. Se determinó la viabilidad de cada una de las muestras, mediante la técnica de siembra en placa. Por duplicado, se inocularon con 0.1 ml las cajas petri con medio PDA y se incubaron a 30°C , durante seis días (dentro de en una bolsa negra para evitar la foto-reparación del DNA); por último, se contó el número de colonias formadas.

5.10.2. Mutantes resistentes a estrés oxidativo.

Se probaron dos agentes generadores de estrés oxidativo: H_2O_2 y Paraquat. Para ambos compuestos, se probaron tres estadíos de *A. terreus*: esporas, micelio en idiofase (36 horas) y micelio en trofofase (48 horas).

Las DMI's para el tratamiento con H_2O_2 para las esporas fue de 180mM, 1200 mM para el micelio en trofofase y de 1800 mM para el micelio en idiofase. Por otro lado, para el Paraquat la DMI fue de 7 mM para los tres tratamientos. Ver anexo 3.

La concentración de esporas, se ajustó a 1×10^4 esporas/ml, se trataron con una concentración de 180 mM (DMI) de H_2O_2 , durante 15 minutos y se sembraron en cajas petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta que se observó esporulación. Ver anexo 3.

Para el micelio en trofofase, se sembraron en cajas petri con medio PDA 1×10^4 esporas/ml, y se incubaron a 30°C, pasado el tiempo de crecimiento (36 horas), se trataron con una concentración de 1200 mM (DMI) de H₂O₂, durante 15 minutos y se sembraron en cajas petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta que se observó esporulación. Ver anexo 3.

Para el micelio en idiofase, las esporas (1×10^4 esporas/ml) se sembraron en cajas petri con medio PDA y se incubaron a 30°C durante 48 horas, se trataron con 1800 mM (DMI) de H₂O₂ durante 15 minutos y se sembraron en cajas petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta que se observó esporulación de las colonias. Ver anexo 3.

Para el Paraquat, se prepararon cajas petri con medio PDA + 7 mM de Paraquat, se inocularon con 1×10^4 esporas/ml, se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta que se observó esporulación de las colonias. Ver anexo 3.

5.10.3. Mutantes resistentes a estrés osmótico.

Se utilizó NaCl como el compuesto causante de estrés osmótico y se probaron tres estadios de crecimiento del hongo: esporas, micelio en trofofase y micelio en idiofase. Para todos los estadios la DMI se determinó en 2.5 M de NaCl. Ver anexo 3.

Se prepararon cajas petri con medio PDA + 2.5 M de NaCl, se inocularon con 1×10^4 esporas/ml, se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta que se observó esporulación en las colonias. Ver anexo 3.

5.10.4. Mutantes resistentes a estrés mixto.

Se determinó para los tres niveles de crecimiento: esporas, micelio en trofofase y micelio en idiofase y se utilizó paraquat y NaCl para estrés osmótico. Se utilizó la DMI de Paraquat (7 mM) + DMI NaCl (2.5 M). Ver anexo 3.

Se prepararon cajas con medio PDA + 2.5M de NaCl + 7 mM de Paraquat, se inocularon con 1×10^4 esporas/ml, se incubaron a 30°C durante 7 días o hasta la esporulación de las colonias resistentes. Ver anexo 3.

5.10.5. Mutantes sensibles a estrés oxidativo y osmótico.

5.10.5.1. Estrés oxidativo.

Se inocularon con 1×10^2 esporas/ml cajas petri con medio PDA. Las colonias formadas se sembraron en cajas petri con medio PDA + 7 mM y en otras cajas con PDA + 5 mM de Paraquat, las colonias que no crecieron en los medios con Paraquat y sí en las cajas con PDA, se seleccionaron como sensibles. Ver anexo 3.

5.10.5.2. Estrés osmótico.

En matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de MML, suplementados con 1.5, 2.0 y 2.5 M de NaCl, se inocularon 1×10^6 esporas/ml y se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 48 horas. El contenido de los matraces se filtró con fibra de vidrio. Las esporas no germinadas, presentes en el medio filtrado, se sembraron en MMS y se seleccionaron las mutantes sensibles a este estrés. Ver anexo 3.

5.11. Fermentación en cilindro de agar (FCA).

Las mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo, osmótico y mixto seleccionadas, se etiquetaron y sembraron en cilindros de agar, se incubaron a 30°C durante 6-7 días o hasta que esporularon. Cada colonia se sembró por duplicado, una se utilizó para la cuantificación de lovastatina y la otra se almacenó a -20°C en glicerol al 25% v/v. Ver anexo 3.

5.11.1. Realización del bioensayo.

La cosecha de esporas de *N. crassa*, se realizó 10 días después de la inoculación. Los 120 ml de medio SDA, se inocularon con 1.6×10^6 esporas/ml, se incubaron a 30°C y los halos de inhibición, se midieron después de 16-18 horas. Ver anexo 2.

5.12. Técnicas analíticas.

5.12.1. Extracción de Lovastatina.

Para la FL, la lovastatina se extrajo del micelio y del caldo de fermentación. Para la extracción del micelio, se pesaron 1 g de micelio, 5 g de perlas de vidrio y se midieron 10 ml de solvente de extracción (Acetonitrilo:Agua, 1:1), se colocaron en un tubo de ensaye de 15 ml, se agitaron en vórtex durante 2 minutos. Los tubos se sonicaron durante 30 minutos, el extracto se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.40 μm y se almacenó a 4°C hasta la cuantificación. Para la extracción a partir del caldo de cultivo, se tomaron 2 ml, se adicionaron 2 ml de solvente de extracción y se agitó vigorosamente durante 1 minuto, se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.40 μm y se almacenó a 4°C hasta su cuantificación.

Para FS, se pesó 1g de soporte cultivado (húmedo), 10 ml de solvente de extracción y se colocaron en un tubo de ensaye de 15 ml, se agitaron a 250 rpm durante 20 minutos, se colocó el tubo 30 minutos en el sonicador, las muestras se filtraron a través de una membrana con un tamaño de poro 0.40 μm y se almacenaron a 4°C hasta su cuantificación.

Para la FCA, en un tubo de ensaye de 5 ml, se colocó un cilindro de agar y 2 ml de acetato de etilo, se maceró el cilindro con una varilla de vidrio y se dejó reposar durante dos horas. El extracto se utilizó en el bioensayo. Ver anexo 2.

5.12.2. Cuantificación de lovastatina.

Para la fermentación líquida y sólida, la cuantificación de lovastatina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 mm x 3.9 mm, 4 μ m), una fase móvil de acetonitrilo: ácido fosfórico 0.1% (60:40), velocidad de flujo de 1.5 ml/min, con un volumen de inyección de la muestra de 20 μ l. Se cuantificó en ambas formas, la forma β -hidroxiácida en un tiempo de retención de 2.20 minutos y la forma lactona en un tiempo de retención de 3.8 minutos, a una longitud de onda de 238 nm, con un detector de arreglo de diodos.

Para la FCA, se determinó por medio de Bioensayo con *N. crassa*, utilizando las propiedades antifúngicas de la forma β -hidroxiácida. El extracto de los cilindros de agar se mantuvo en las cajas para bioensayos durante 16-18 horas y se midió el halo de inhibición. Ver anexo 2.

5.12.3. pH.

En FL, se midió de manera directa del filtrado del caldo de fermentación, utilizando un potenciómetro Jenco electronics.

Para FS, se pesó 1 g de soporte cultivado, se le adicionaron 10 ml de agua destilada, la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 minutos, el pH se midió del líquido resultante.

5.12.4. Biomasa.

En FL, el caldo de fermentación se filtró a través de papel Whatman # 1 (peso constante), el micelio retenido en el papel se secó en horno a 60°C hasta peso constante.

Para la estimación de la biomasa en FS, se utilizó la metodología propuesta por Tomaselli y col. 2001, en donde se cuantifica la glucosamina, un compuesto presente en la pared celular de los hongos. Se requiere de una hidrólisis ácida total para liberar la glucosamina de la pared celular de los hongos, la glucosamina liberada se combina con

acetil acetona para formar un compuesto pirrólico. Este reacciona con el reactivo para-dimetil amino benzaldehído (PDBA), para formar un compuesto estable de color rojo con un máximo de absorbancia a 530 nm. Ver anexo 1.

5.12.5. Azúcares totales.

Para ambas fermentaciones (FS y FL), los azúcares se determinaron en el filtrado del caldo de fermentación, utilizando el método de azúcares reductores propuesto por Miller (1956), como se describe en el anexo 4.

5.12.6. Contenido de humedad final.

Se colocaron 3 g de soporte cultivado húmedo a 60°C hasta peso constante, se determinó el porcentaje de humedad final mediante la siguiente relación:

$$\frac{\text{peso húmedo de la muestra} - \text{peso seco de la muestra}}{\text{peso húmedo de la muestra}} \times 100$$

5.12.7. Actividad enzimática de catalasa.

La actividad enzimática extracelular, se midió en micelio de 24 horas tanto para FS como para FL, por el método descrito por Beers y Sizer (1952) y propuesto por Sigma Aldrich (1994). La técnica se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno, medido por el tiempo requerido para una disminución en la absorbancia de 0.45 a 0.40 a una longitud de onda de 240 nm. Ver anexo 7.

5.12.8. Actividad enzimática de súper óxido dismutasa.

La actividad enzimática, se midió en micelio de 24 horas crecido en FS y FL, por el método de Winterbourn (1975). La técnica se basa en determinar el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT, para calcular el volumen que proporcionó la mitad de la máxima inhibición por la enzima. Ver anexo 8.

6. Resultados.

6.1. Extracción de lovastatina: espuma de poliuretano y bagazo de caña.

Para cuantificar la producción de lovastatina en FS, utilizando dos soportes (Bagazo de caña y espuma de poliuretano (PUF, por sus siglas en inglés polyurethane foam)), se estableció un método de extracción que nos permitió recuperar la mayor parte de lovastatina.

Szakács y colaboradores en 1998 utilizaron acetonitrilo (ACN) como solvente de extracción de una muestra de FS, utilizando pulpa de sorgo como sustrato. Para este estudio, se modificó la composición del solvente de extracción (acetonitrilo:agua, 1:1 v/v). Se utilizaron tres concentraciones de lovastatina: alta (10,000 $\mu\text{g/ml}$), media (1,000 $\mu\text{g/ml}$) y baja (10 $\mu\text{g/ml}$), estas concentraciones se añadieron al medio de cultivo (cada una por separado y por triplicado) y se impregnó el soporte con ésta mezcla.

Los porcentajes de recuperación encontrados para el PUF (tabla 6.1), utilizando el solvente de extracción ACN:H₂O, fueron más altos (96%, 95% y 60%) en comparación con los encontrados para éste mismo soporte, pero utilizando sólo ACN (87%, 42% y 0%). Las medias de los porcentajes de extracción para ambos métodos, fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$), para la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer, para las tres concentraciones de lovastatina probadas.

En lo que respecta al bagazo de caña, los porcentajes de recuperación (tabla 6.1), para el solvente de extracción modificado (ACN:H₂O 1:1 v/v), resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0.001$), de los obtenidos por el método propuesto por Szakács (1998), sólo para las dos concentraciones superiores (alta y media), utilizando la

prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer, mientras que para el nivel bajo no se encontró ninguna diferencia.

Tabla 6.1. Porcentajes de recuperación de lovastatina, utilizando dos solventes de extracción y tres concentraciones de lovastatina (Alto 10,000 $\mu\text{g/ml}$, Medio: 1,000 $\mu\text{g/ml}$, Bajo 10 $\mu\text{g/ml}$) para los soportes: Espuma de poliuretano (PUF) y Bagazo de caña.

Solvente de extracción	Extracción de lovastatina (%)		
	Alto	Medio	Bajo
Poliuretano de alta densidad (17 kg/m³)			
Acetonitrilo	87.76 \pm 8.65	42.1 \pm 12.2	0
Acetonitrilo : Agua (1:1)	96.2 \pm 4.3	95.65 \pm 7.38	60.25 \pm 9.47
Bagazo de caña			
Acetonitrilo	74.50 \pm 3.42	84.35 \pm 4.49	88.10 \pm 4.64
Acetonitrilo : Agua (1:1)	86.70 \pm 4.87	94.00 \pm 4.95	89.05 \pm 4.67

Con base en las diferencias de las medias de los porcentajes de recuperación encontradas (tabla 6.1), se utilizó el solvente de extracción modificado ACN:agua 1:1 v/v, para la extracción de lovastatina de las fermentaciones sólidas utilizando como soporte el bagazo de caña y el PUF.

6.2. Cuantificación de lovastatina por HPLC.

Se montaron dos métodos de cromatografía líquida de alta resolución, uno reportado por Szakács y colaboradores en 1998 y el otro por Casas-López y colaboradores en el 2003 (modificado para éste estudio). En estos métodos se usa diferente composición (tabla 6.2), el mismo flujo de 1.5 ml/min, diferente longitud de onda (235 y 238 nm) y diferente columna (Novapak C-18, 150 x 3.9 mm, 4 μm , y Beckman Ultrasphere ODS 250 x 4.6 mm, 5 μm). La columna utilizada para este estudio fue una Novapak C-18. La combinación de ambos métodos nos permitió encontrar un método de cuantificación más rápido.

Tabla 6.2. Obtención de las condiciones para la cuantificación de lovastatina por cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando dos métodos diferentes, dos fases móvil y dos longitudes de onda.

Método	Fase móvil	Tiempo de retención (min)		Longitud de onda (nm)	Columna
		β -Hidroxiácida	Lactona		
Szakács 1998	ACN:H ₃ PO ₄ 50 : 50	4.6	9.2	235	Novapack C-18
Casas López 2003	ACN:H ₃ PO ₄ 60 : 40	3.9	5.8	238	Beckman Ultrasphere ODS
Casas López 2003 (modificado para este estudio)	ACN:H ₃ PO ₄ 60 : 40	2.2	3.8	238	Novapack C-18

Se determinaron los tiempos de retención para la lovastatina en su forma β -hidroxiácida y lactona para ambos métodos, el reportado por Szakács y col. (1998) y el de Casas-López y col. (2003) con una columna diferente a la utilizada en ese estudio. Se encontró que, para el método de Casas-López (modificado para este estudio), el tiempo de retención de la lovastatina en su forma β -hidroxiácida (forma activa de la lovastatina), fue de casi la mitad del tiempo (4.6 vs 2.2 minutos), con respecto al reportado por Szakács (1998), utilizando la misma columna, pero diferente composición en la fase móvil (tabla 6.2).

Se elaboró una curva de calibración para la cuantificación de lovastatina, partiendo de un estándar de 20 mg de lovastatina (Mevacor tabletas). Se utilizaron concentraciones de 1, 3, 5, 7, y 10 μ g de lovastatina por mililitro y se obtuvo una recta con un $r^2 = 0.9978$.

6.3. Estableciendo condiciones de inicio para la FS sobre espuma de poliuretano.

Basándonos en la experiencia sobre la producción de metabolitos secundarios en FS sobre bagazo de caña, se fijaron condiciones de inicio de parámetros importantes para la fermentación sobre poliuretano: concentración del medio 2X (Domínguez y col., 2000), contenido de humedad inicial de 80%, tasa de aireación de $0.08 \text{ l g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tomasini y col, 1997) y tamaño de inóculo de 1×10^8 esporas/ml (Casas-López y col, 2003).

Bajo estas condiciones de estudio, las cinéticas de producción mostraron un comportamiento muy similar para ambos sistemas (columna y matraz sin recambio de aire), una trofofase muy corta (de 24 a 48 horas) y la idiofase o el inicio de la producción de lovastatina a partir de las 48 horas; obteniendo una producción máxima de $5,348 \mu\text{g/gss}$ para las columnas y de $5,500 \mu\text{g/gss}$ para los matraces con recambio de aire, después de 5 días de incubación para ambos sistemas.

Este nivel de producción es alto, ya que representa 3.57 veces más que el obtenido por Szakács y col. (1998), $1540 \mu\text{g/gss}$, utilizando la misma cepa.

6.4. Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina en espuma de poliuretano.

Para estudiar el efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina, se utilizaron diferentes tasas de aireación, se probaron tres niveles decrecientes de aireación (0.16 , 0.08 y $0.04 \text{ l g}^{-1}\text{h}^{-1}$), para las fermentaciones realizadas en columnas. Para niveles menores de aireación se realizaron fermentaciones en matraces: un grupo con recambio de aire (MA) (aireación diaria de un minuto en campana de flujo laminar) y otro grupo sin recambio de aire (MC) durante la fermentación.

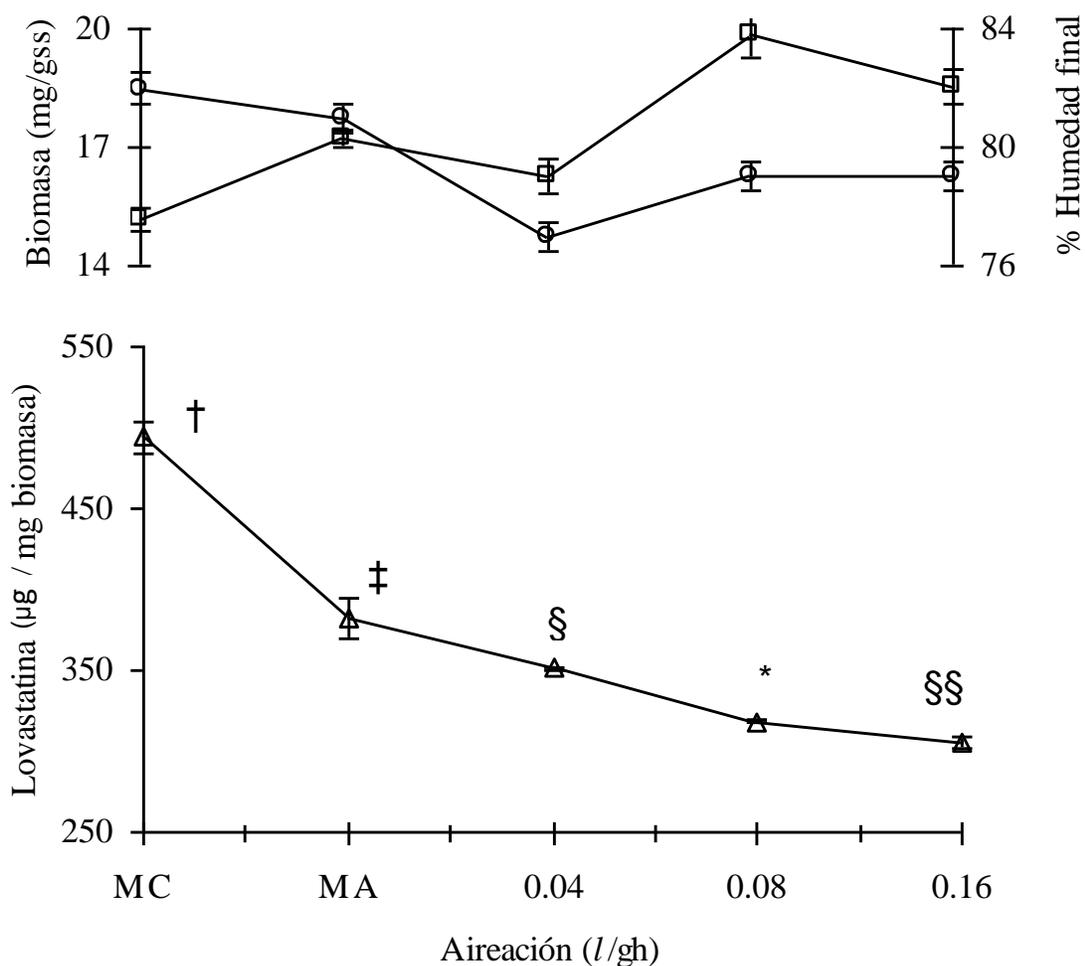


Figura 6.1. Producción específica de lovastatina después de cinco días de fermentación sobre espuma de poliuretano (Δ), utilizando diferentes niveles de aireación. Concentración final de biomasa (\square), contenido de humedad final (\circ). La producción específica de los matraces sin recambio de aire (\dagger), es significativamente diferente ($p < 0.001$), de las demás producciones específicas ($\ddagger, \S, *, \S\S$), de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. MA: Matraz con recambio de aire; MC: Matraz sin recambio de aire.

Las mejores producciones se obtuvieron para las fermentaciones con los niveles más bajos de aireación, 7,500 $\mu\text{g/gss}$ para los matraces sin recambio de aire, que corresponde a una producción específica de 493 μg de lovastatina por mg de micelio (figura 6.1); y 6,570 $\mu\text{g/gss}$ para los matraces con recambio de aire, con una producción específica de 381 μg de lovastatina por mg de micelio (figura 6.1), mientras que para las fermentaciones realizadas en columnas, la mejor producción fue de 6,317 $\mu\text{g/gss}$, con una producción específica de 351 μg de lovastatina por mg de micelio (figura 6.1), para la aireación de $0.04 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Por otro lado, la concentración de biomasa presentó el efecto inverso a la producción de lovastatina, en los matraces, la biomasa fue menor (15.19 y 17.21 mg/gss) que la observada para la fermentación en columnas, excepto para la aireación más baja (16.25, 19.86 y 18.53 mg/gss). Por consiguiente, las producciones específicas fueron mayores para las fermentaciones realizadas sin aireación forzada (figura 6.1).

Mientras que la humedad final de los cultivos (H_f), mostró incrementos de 1 y 2% en las fermentaciones realizadas en matraces, la fermentación en columnas, mostró pérdidas de entre 1 y 3%.

Así el reto fue, incrementar la concentración de biomasa final, pero bajo condiciones que permitieran una alta producción específica, es decir que el micelio tuviera las condiciones necesarias para aumentar la producción de lovastatina.

6.5. Efecto del contenido de humedad inicial y la concentración del medio sobre la producción de lovastatina.

Se estudió el efecto conjunto de la concentración del medio y del contenido de humedad inicial, sobre la producción de lovastatina; se desarrolló un diseño factorial al azar con 3 niveles de humedad inicial (75, 80 y 85%) y dos niveles de concentración de medio de producción (2X y 2.5X) (tabla 6.3); es importante mencionar que, no se probaron humedades mayores por que se superaba la capacidad de retención de medio de producción del soporte (tabla 5.10).

Tabla 6.3. Diseño factorial al azar de tratamientos. Tres niveles de humedad inicial x dos niveles de concentración del medio, con dos repeticiones para cada factor probado.

Contenido de humedad inicial	Concentración del medio	Soporte (g)
75%	2X	1.06
	2.5X	0.95
80%	2X	0.72
	2.5X	0.61
85%	2X	0.5
	2.5X	0.5

En la figura 6.2 se observa que, el perfil de producción de lovastatina está relacionado de manera directa con el contenido de humedad inicial, ya que, un aumento en el contenido de humedad inicial, de 75% a 85% con medio 2X, se reflejó en una mayor producción, 4,671 $\mu\text{g/gss}$ (75%) y 9,748 $\mu\text{g/gss}$ (85%). Además, un incremento en la concentración del medio de producción, de 2X a 2.5X, afectó de manera positiva la producción de lovastatina, es decir, un aumento en la concentración del medio de producción, se tradujo en una mayor producción de lovastatina.

En cuanto a la concentración de biomasa, presentó el mismo efecto que para la producción de lovastatina, es decir, un aumento en el contenido de humedad inicial o en la concentración del medio de producción, se vio reflejado en un aumento en la concentración de la biomasa.

Un dato muy interesante observado en los cultivos con alta concentración de medio y humedad, es que, bajo estas condiciones el micelio siguió creciendo y produciendo por más tiempo, en consecuencia, el tiempo de fermentación se alargó de 5 a 7 días, observándose una situación intermedia para 80% de humedad y 2.5X, que alcanzó una producción máxima de 8,869 $\mu\text{g/gss}$ en seis días de fermentación.

En contraste con lo observado, para el mayor contenido de humedad inicial (85%) y la mayor concentración de medio (2.5%), en donde se alcanzaron niveles de producción de 12,958 $\mu\text{g/gss}$, en 7 días de fermentación; para el cultivo con menor contenido de humedad

inicial (75%) y menor concentración del medio de producción (2X), se obtuvo la menor producción 4,671 $\mu\text{g/gss}$ en cinco días de fermentación (figura 6.2).

Otra manera de observar el efecto de la concentración del medio y el contenido de humedad inicial, sobre el crecimiento de *Aspergillus terreus*, fue por observaciones microscópicas al soporte cultivado (poliuretano de alta densidad (17 kg/m^3), figuras 6.3, 6.4, y 6.5.

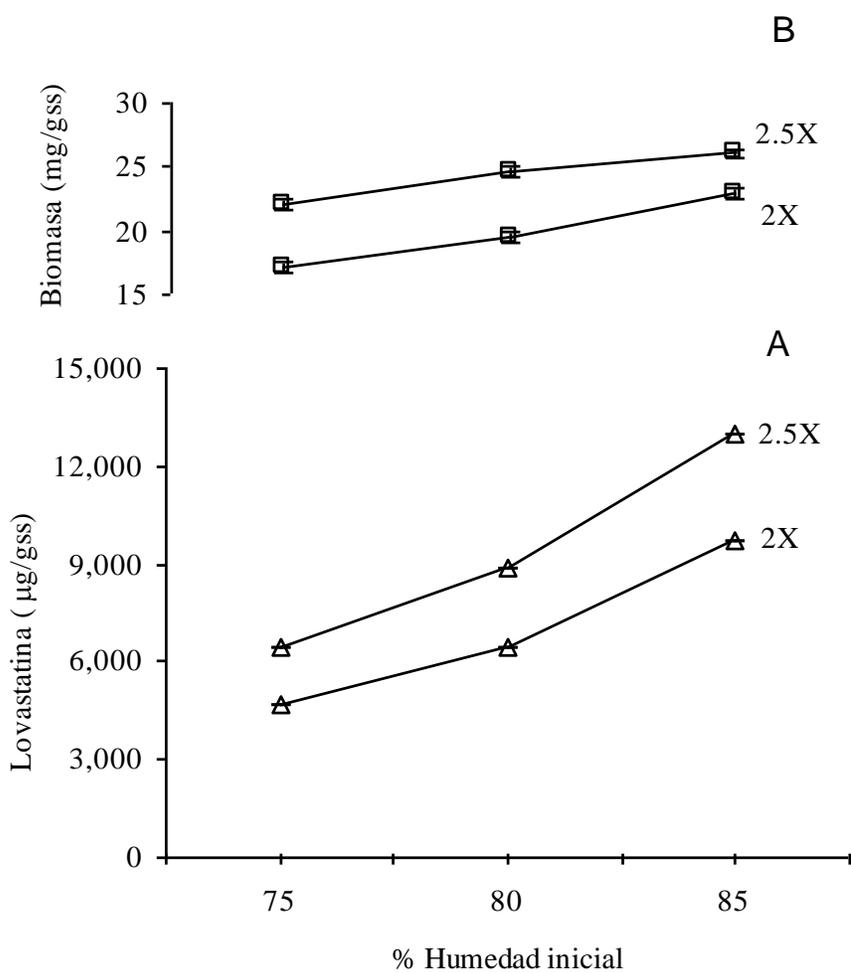


Figura 6.2. Perfil de producción de lovastatina en matraces con recambio de aire (A) y biomasa (B), bajo diferentes condiciones de humedad inicial (75, 80 y 85%) y concentraciones de medio de producción (2X y 2.5X).

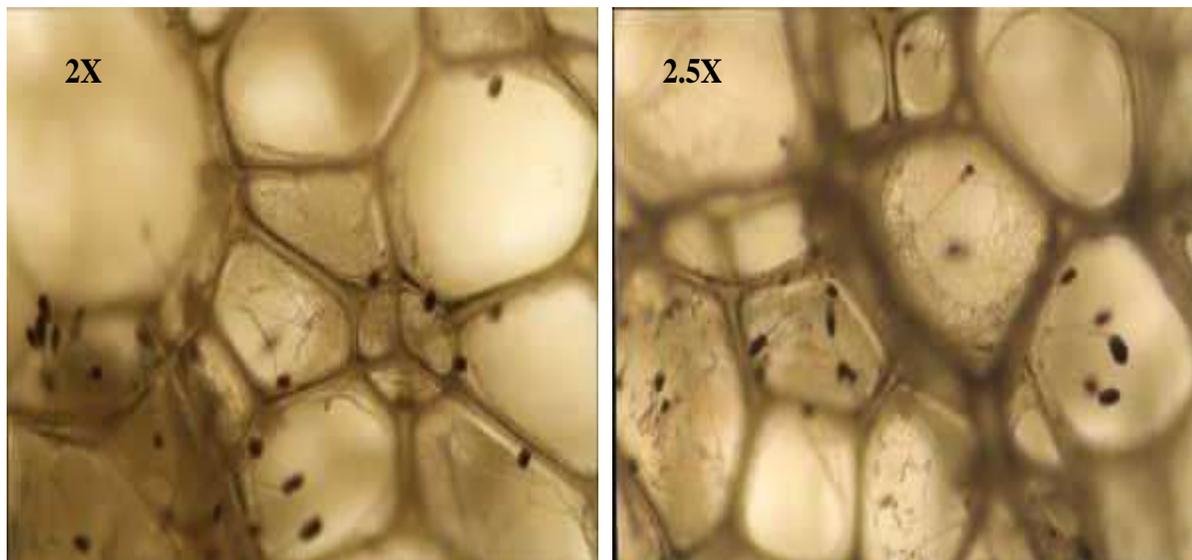


Figura 6.3. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad (17 kg/m^3), después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 75% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

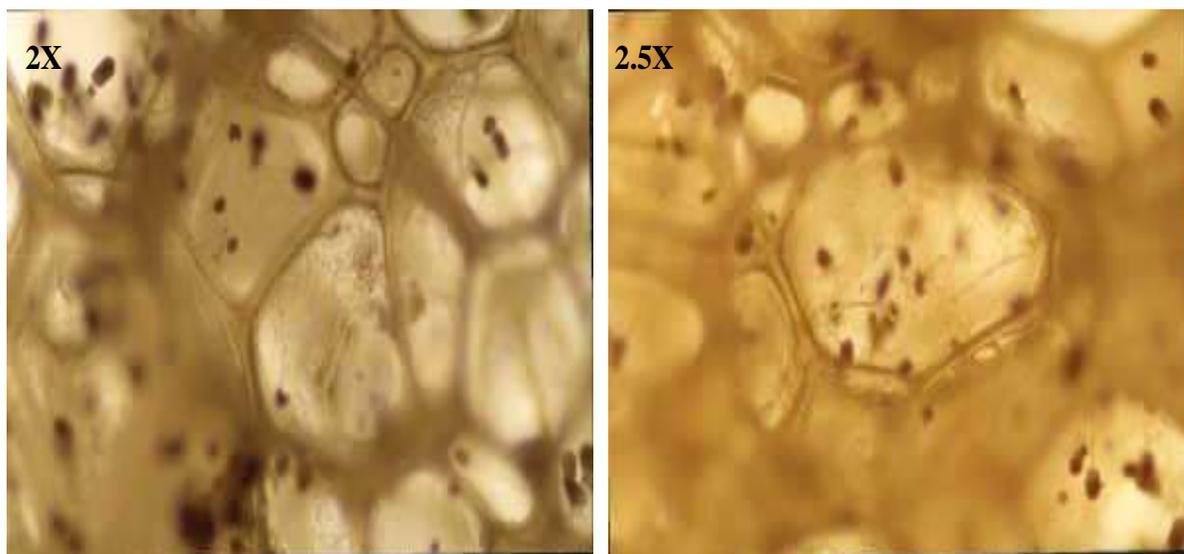


Figura 6.4. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad (17 kg/m^3), después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 80% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

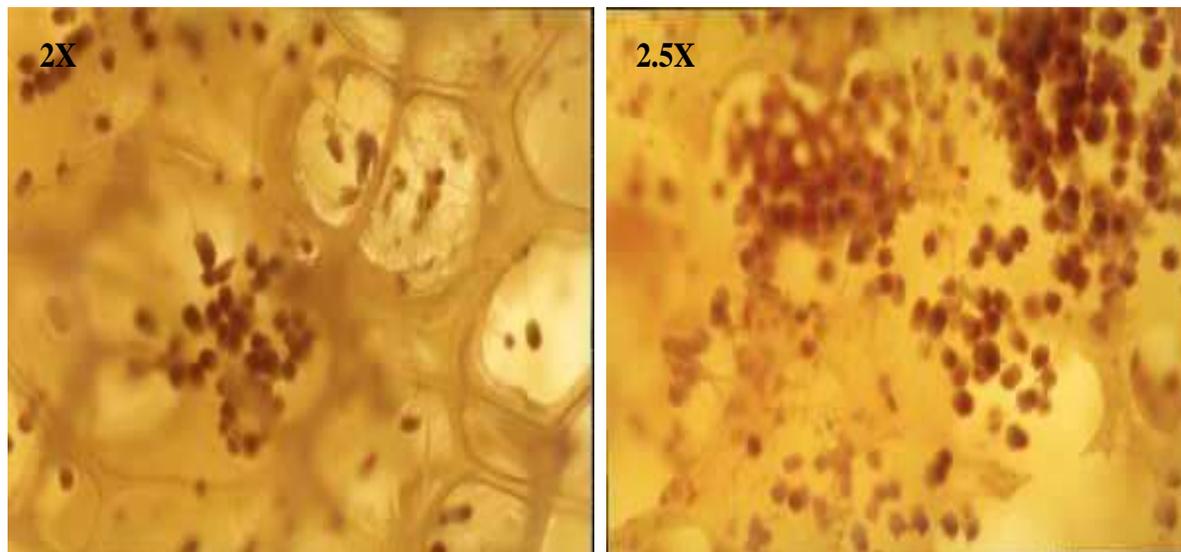


Figura 6.5. Vista microscópica (40X) del crecimiento de *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de alta densidad, después de 144 horas de cultivo. Contenido de humedad inicial de 85% y concentración de medio 2X (izquierda) y 2.5X (derecha).

Antes de estudiar el efecto del contenido de humedad inicial y la concentración del medio, partimos de la premisa de aumentar la concentración de biomasa (17.21 mg/gss), sin que se afectara la capacidad de alta producción (381.8 μg de lovastatina /mg de biomasa); esto se logró, ya que, al modificar la concentración del medio y el contenido de humedad inicial, se obtuvo una concentración de biomasa de 26.04 mg/gss, sin que ésta perdiera la alta producción (497 μg de lovastatina/mg de biomasa). Por lo tanto, para los estudios posteriores se eligió trabajar con una concentración de medio de producción de 2.5X y un contenido de humedad inicial de 85%.

6.6. Efecto de la adición de glucosa al medio de producción.

Aunque si bien, el medio de producción utilizado había sido optimizado para la producción de lovastatina en medio líquido, con un diseño estadístico denominado cuadrado Greco-Latino, se pensó en modificar la composición adicionando glucosa, una fuente de carbono de fácil asimilación, con la que se pretendía generar una fase de crecimiento

(trofofase) más fuerte y definida, que precediera a la fase de producción o idiofase, en donde se consume la lactosa, que es utilizada para la producción de lovastatina.

Se probaron dos concentraciones de glucosa, 1 y 1.5%, en cultivos en matraces abiertos y se cuantificó la producción de lovastatina durante los días 6,7 y 8; utilizando como control el medio de producción sin glucosa (2.5X), para no afectar el contenido de sólidos totales del medio, se disminuyó la cantidad de lactosa en la misma proporción que se adicionó glucosa, los resultados se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Producción de lovastatina y contenido de humedad final (Hf) en matraz con recambio de aire, 85% de humedad inicial y concentración del medio de producción 2.5X, suplementado con 1% de glucosa y 1.5% de glucosa, después de siete días de fermentación. La adición de glucosa se compensó con una disminución en lactosa.

Medio de producción	Lovastatina $\mu\text{g/gss}$	% Hf
2.5X	12,847 \pm 227.7	88
2.5X + 1% glucosa	14,087 \pm 179.1	89
2.5X + 1.5% de glucosa	14,144 \pm 145.2	89

Aunque las producciones obtenidas para los medios de producción a los que se le adicionó glucosa no muestran una diferencia significativa, estos sí son diferentes significativamente a la producción obtenida en el medio sin glucosa (Fisher's LSD (least significant difference) Multiple-Comparison Test ($p < 0.08$)). Además con el análisis de varianza se pudo observar que, aunque las medias de producción son muy similares, el efecto fue mayor para el medio que contiene 1.5% de glucosa. Siendo así cómo se eligió el medio 2.5X + 1.5% de glucosa para los demás estudios.

6.7. Efecto de la densidad del poliuretano sobre la producción de lovastatina.

Otro factor estudiado, fue la densidad del soporte (espuma de poliuretano). Se probaron cuatro densidades (13, 17, 20 y 24 kg/m^3), una de ellas de baja densidad (13 kg/m^3), utilizada por Tomasini y colaboradores (1997), para la producción de ácido giberélico,

y las otras tres de alta densidad. Debido a que cada densidad de soporte presenta diferente capacidad de retención de medio de cultivo (tabla 5.10), fue necesario iniciar las fermentaciones con la máxima capacidad de retención de cada densidad.

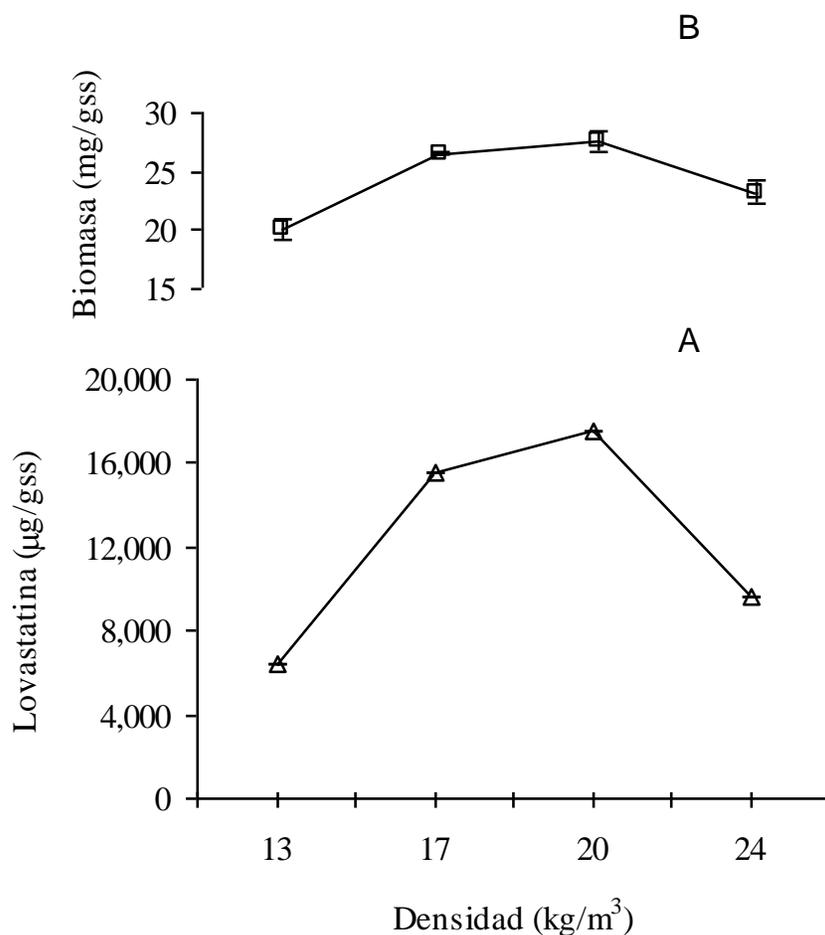


Figura 6.6. Producciones máximas de lovastatina (A) y biomasa (B). Por *Aspergillus terreus* sobre espuma de poliuretano de diferentes densidades (13, 17, 20 y 24 kg/m³), en matraces con recambio de aire.

Como se ve en la figura 6.6, la densidad, es un factor que influyó de manera importante en la producción de lovastatina, ya que, en el cultivo con una densidad de 20 kg/m³, se alcanzó una producción máxima de 17,530 µg/gss, siendo esta mayor a la observada por la densidad de 17 kg/m³ (15,560 µg/gss), aunque si bien, las concentraciones

de biomasa en ambas densidades no fueron muy diferentes (26.56 mg/gss para 17 kg/m³ y 27.61 mg/gss para 20 kg/m³), las producciones de lovastatina, si lo fueron. Mientras que, la más baja densidad (13 kg/m³), presentó la más baja producción de lovastatina (6,430 µg/gss) y la densidad más alta (24 kg/m³), presentó una producción de 9,620 µg/gss. Otra diferencia importante es que, para las densidades de 17 y 20 kg/m³, se observó que la ganancia de humedad final fue de 4 y 5%, mientras que para las densidades de 13 y 24 kg/m³, fue de sólo 3% (tabla 6.5).

Tabla 6.5. Efecto de la densidad de la espuma de poliuretano sobre la producción de lovastatina, biomasa, producción específica y contenido de humedad final (Hf) en matraces con recambio de aire.

Densidad Kg/m ³	% Hi	Lovastatina µg/gss	Biomasa mg/gss	Producción específica µg lov/mg biom	% Hf
13	75	6,430	20.08	320.24	78
17	85	15,560	26.56	585.82	90
20	85	17,530	27.61	634.84	89
24	80	9,620	23.22	414.37	83

*Hi contenido de humedad inicial.

Un punto importante fue que, aunque las condiciones iniciales fueron iguales (85% de humedad inicial), para las densidades de 17 y 20 kg/m³; la biomasa de la densidad de 20 kg/m³, se comportó de manera diferente, siendo esta un 8% más productiva que la de 17 kg/m³. Por otro lado al comparar la producción específica de la densidad de 20 kg/m³, con la de 13 kg/m³, fue casi del doble (634.84 vs 320.24 µg lovastatina/mg de biomasa) (Tabla 6.5).

6.8. Efecto de la concentración del medio de producción en cultivos con matraces con recambio (MA) y sin recambio de aire (MC).

Para tener una visión más amplia del efecto de la concentración del medio sobre la producción de lovastatina, pero ahora bajo las nuevas condiciones (humedad, composición del medio y densidad de PUF), se probaron diferentes concentraciones de medio y dos tasas

de aireación: matraces con recambio de aire (MA) (1.5, 2.5, 3.5 y 4.5X) y matraces sin recambio de aire (MC) (2.0, 2.5, 3.0 y 3.5X).

La producción máxima se encontró para los MC, 19,950 $\mu\text{g/gss}$, mientras que, para MA, la producción máxima de lovastatina fue de 17,450 mg/gss , ambos con una concentración de medio 2.5X. Ambos sistemas presentaron Hf de 91%. La concentración de biomasa fue menor en MC, comparada con la biomasa observada para los MA (24.5 vs 27.6 mg/gss) (tabla 6.6). Para los medios de producción con concentraciones mayores a 2.5X la producción de lovastatina disminuyó de manera considerable (tabla 6.6).

Tabla 6.6. Producción máxima de lovastatina sobre espuma de poliuretano, con diferentes concentraciones de medio, en matraces con recambio de aire y matraces sin recambio de aire. Además concentración de biomasa y contenido final de humedad (Hf).

Aireación y concentración del medio	Lovastatina $\mu\text{g/gss}$	Biomasa mg/gss	Producción específica $\mu\text{g lov/mg biom}$	% Hf	
MA	1.5X	11,850 \pm 210	25.5 \pm 0.70	464.70	90
	2.5X	17,450 \pm 480 †	27.6 \pm 0.15	632.24	91
	3.5X	14,150 \pm 300	30.9 \pm 0.60	457.92	90
	4.5X	15,160 \pm 280	32.3 \pm 0.30	469.34	89
MC	2.0X	15,260 \pm 200	23.57 \pm 0.25	647.43	89
	2.5X	19,950 \pm 690 ‡	24.5 \pm 0.15	814.28	91
	3.0X	16,740 \pm 250	25.1 \pm 0.20	666.93	90
	3.5X	17,290 \pm 320	23.7 \pm 0.30	729.53	90
	4.0X	17,380 \pm 60	24.0 \pm 0.10	724.16	90

† La producción máxima es diferente de las demás producciones de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer ($p < 0.001$).

‡ La producción máxima es diferente de las demás producciones de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer ($p < 0.005$).

Como se vio antes al estudiar el efecto de la Hi y concentración de medio (MA), la concentración del medio también repercutió de manera positiva sobre la concentración de

biomasa y se encontró el mismo comportamiento para los MA (tabla 6.6). Una baja concentración de medio (1.5X), produjo poca biomasa (25.5 mg/gss), mayor concentración de medio (3.5X a 4.5X), incrementó la concentración de biomasa (30.9 y 32.3 mg/gss respectivamente). Mientras que, para los MC, las concentraciones de biomasa fueron de 23.5 mg/gss para 2.0X hasta 25.1 mg/gss para 3.0X.

6.9. Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina creciendo *Aspergillus terreus* sobre bagazo de caña.

Una vez establecidas las condiciones para la producción de lovastatina por fermentación sólida, utilizando como soporte la espuma de poliuretano de alta densidad, se probaron éstas condiciones en el sistema de fermentación sólida mejor conocido: FS en columnas con bagazo de caña (Barrios-Gonzalez y Mejía (2007). En bagazo de caña se ha obtenido una alta producción de metabolitos secundarios, como por ejemplo: penicilina (Domínguez y col, 2000), cefalosporina C (Cuadra y col, 2008) e incluso en la degradación de compuestos tóxicos como el pentaclorofenol (Marcial y col, 2006), entre otros.

Al establecer las condiciones de producción de lovastatina utilizando como soporte el PUF, se encontró que el contenido de Hi, juega un papel muy importante en la producción de lovastatina, por lo que se fijó éste parámetro en la máxima capacidad de retención para éste soporte, 78%, con una concentración de medio de producción 2.5X. Se determinó el efecto de la aireación, de la misma forma que para la espuma de poliuretano.

En la tabla 6.7, observamos que la mayor producción de lovastatina (9,447 $\mu\text{g/gss}$) encontrada fue para el MC. Un resultado interesante fue que, la menor producción se encontró para el MA, alcanzando tan sólo 8,199 $\mu\text{g/gss}$, que comparado con lo observado para el PUF, la menor producción se observó para las columnas con aireación forzada.

Con respecto a la biomasa, al igual que en el PUF, la tasa de aireación es importante para lograr altas concentraciones de biomasa, de manera que al aumentar la aireación en las columnas la concentración de biomasa aumentó. En el mismo sentido para los MA, se encontró una mayor biomasa que en los MC.

Tabla 6.7. Producción de lovastatina en bagazo de caña utilizando diferentes niveles de aireación. Además biomasa, producción específica y el porcentaje de humedad final (Hf). En columnas (150 mm de largo x 21 mm de DI) y matraces con recambio de aire (MA) (1 minuto una vez al día) y matraces sin recambio de aire (MC), después de 8 días de fermentación.

Aireación	Lovastatina μg/gss	Biomasa mg/gss	Producción específica	% Hf
MC	9,447	20.90	452.00	84
MA	8,199	25.79	317.91	84
0.04 l g ⁻¹ h ⁻¹	8,913	21.64	411.87	80
0.08 l g ⁻¹ h ⁻¹	8,353	23.44	356.35	80
0.16 l g ⁻¹ h ⁻¹	8,759	28.50	307.33	79

Aunque el %Hf, presentó ganancia del 6% para los matraces y de 2% para las columnas; la mejor producción específica se observó para los MC, con 452 μg de lovastatina/mg de biomasa, mientras que para las columnas (0.04 l g⁻¹h⁻¹) fue de 411 μg de lovastatina /mg de biomasa.

6.10. Comparación de los sistemas de producción de lovastatina: FL vs FS.

Se realizó una cinética de crecimiento y producción de lovastatina en ambos sistemas de producción: FS-PUF (MC), FS-Bagazo (columnas con tasa de aireación de 0.04 l g⁻¹h⁻¹) y FL. La fermentación líquida se realizó utilizando el medio de producción Szakács 1X (modificado para este estudio).

En la figura 6.7, se muestran las cinéticas de producción de lovastatina: FS-PUF y FS-Bagazo y FL. Se puede ver que el mejor sistema de producción de lovastatina fue, el sistema propuesto como alternativa para la producción de lovastatina, FS-PUF, alcanzando la más alta producción, 19,950 μg/gss, que corresponde a más del doble (2.11 veces) del observado para la FS-Bagazo, 9,447 μg/gss y de 35 veces más, que la encontrada para la FL, 570 μg/ml.

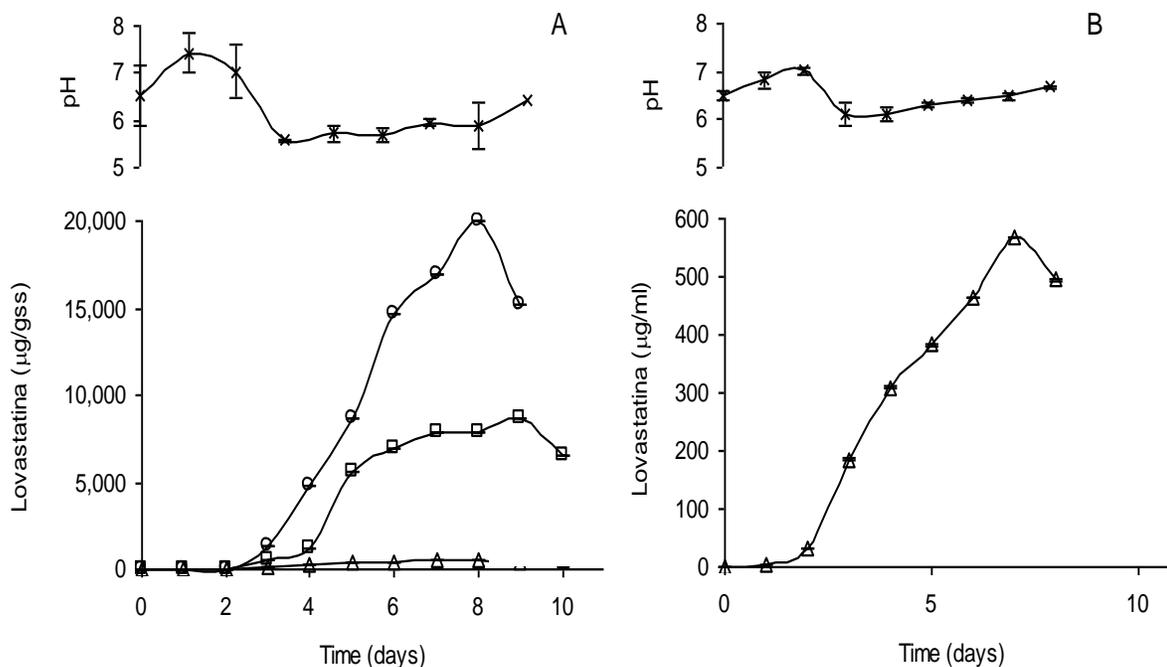


Figura 6.7. Cinéticas de producción de lovastatina y pH. (A) Producción por fermentación sólida en matraces sin recambio de aire utilizando como soporte espuma de poliuretano (\circ), fermentación sólida en matraces sin recambio de aire utilizando como soporte bagazo de caña (\square), fermentación líquida medio 1X (Δ) y perfil de pH para la fermentación sólida usando como soporte la espuma de poliuretano (x). (B) fermentación líquida (Δ), notar que la escala fue modificada.

Además se observó (figura 6.7), que el comportamiento de producción y del pH, son muy similares para la FL (figura 6.7 B) y FS-PUF (figura 6.7 A), pero con producciones completamente diferentes ($570 \mu\text{g/ml}$ y $19,950 \mu\text{g/gss}$). Otra característica similar entre estos sistemas de fermentación fue el tiempo, ya que la máxima producción de lovastatina, se da a los 7 días para la FS-PUF y FL, a diferencia de la FS-Bagazo que fue de 9 días (figura 6.7 A).

Tabla 6.8. Producción de lovastatina en fermentación sólida: poliuretano de alta densidad (PUF) y bagazo de caña, y en fermentación líquida. Además de biomasa y producción específica para cada sistema. Se muestran las producciones máximas de lovastatina para cada sistema de fermentación.

Tipo de fermentación	Lovastatina $\mu\text{g/gss}$	Biomasa mg/gss	Producción específica $\mu\text{g lov/mg biomasa}$
PUF	$19,950 \pm 0.69$	24.47 ± 0.15	815.32 ± 22
Bagazo de caña	$9,447 \pm 1.18$	20.9 ± 0.8	452 ± 0.93
Líquida	$570 \pm 30 \mu\text{g/ml}$	$10.4 \pm 0.15 \text{ mg/ml}$	54.80 ± 2.07

El micelio con mayor producción de lovastatina, fue para la FS-PUF, $815.32 \mu\text{g}$ de lovastatina/mg de biomasa y de $452 \mu\text{g}$ de lovastatina/mg de biomasa para la FS-Bagazo. Mientras que, para la FL la producción específica fue de $54.71 \mu\text{g}$ de lovastatina/mg de biomasa. La producción específica para la FS-PUF fue 14.90 veces más que en FL, mientras que la FS-Bagazo fue 8.24 veces mayor, con respecto a la FL. Además, la producción específica de la FS-PUF fue 1.80 veces mayor que la producción específica para la FS-Bagazo.

Estos resultados, indican que existen diferencias muy importantes entre los sistemas de producción, entre los que probablemente se encuentren cambios fisiológicos y moleculares, De donde surge un cuestionamiento muy importante, ¿La FS confiere condiciones especiales de estrés que estimulan la producción de lovastatina?

Barrios-Gonzalez y Mejía (1996) explican que, existen condiciones especiales de estrés osmótico y oxidativo; aunque las características que permiten al hongo adaptarse mejor al medio sólido no se conocen, hay diferencias muy claras entre ambos cultivos (FS y FL); entonces, si generamos mutantes resistentes a estrés osmótico y oxidativo ¿aumentará la producción de lovastatina? Entonces el reto fue, el desarrollo de una metodología que nos permitió generar mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo y osmótico, para seleccionar las mejores mutantes, y poder determinar si la resistencia o la sensibilidad estimula la producción de lovastatina por FS y/o FL.

6.11. Estrés osmótico. Determinación de la dosis mínima inhibitoria.

Para seleccionar con qué compuesto se generaría el estrés, se probaron diferentes compuestos como: glucosa, manitol, sorbitol, polietileno glicol (PEG) 8000 y NaCl, a diferentes concentraciones.

La glucosa, PEG 8000, manitol y sorbitol, no causaron inhibición del crecimiento de la cepa parental de *Aspergillus terreus* TUB F-514, en diferentes concentraciones, hasta llegar a la no disolución del compuesto.

Por otro lado, se probó NaCl como agente estresante utilizando concentraciones crecientes desde 0.5 M hasta 5 M, para las tres fases de crecimiento propuestas (esporas, micelio en trofofase (36 horas), micelio en idiofase (48 horas)).

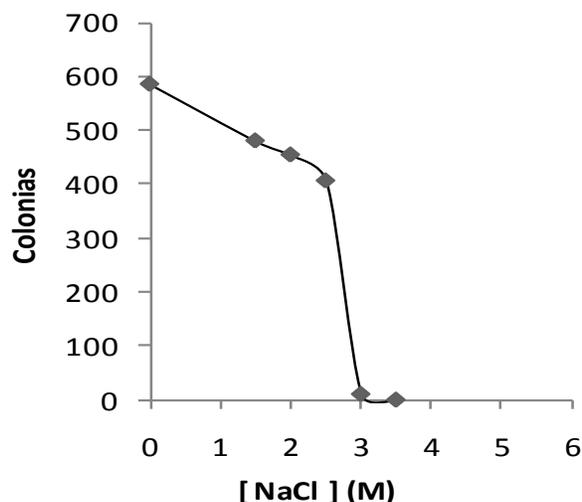


Figura 6.8. Determinación de la dosis mínima inhibitoria para el micelio en idiofase (48 horas de crecimiento) de *Aspergillus terreus*, utilizando NaCl como agente estresante.

En la figura 6.8 se observa el efecto de la concentración de NaCl, sobre el crecimiento de *Aspergillus terreus* y como disminuyó el número de colonias a mayor

concentración. Con 3M de NaCl ya no se observó crecimiento después de 48 horas, la dosis mínima inhibitoria.

Al determinar la DMI para la fase de micelio (micelio en trofofase y micelio en idiofase), se encontró el mismo comportamiento para las tres fases de crecimiento: esporas, micelio en trofofase y micelio en idiofase (figura 6.8).

6.12. Estrés oxidativo. Determinación de la dosis mínima inhibitoria.

6.12.1. Estrés inducido por Paraquat.

El paraquat es un compuesto generador de súper óxidos. Se utilizaron concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM, se contó el número de colonias sobrevivientes a cada concentración y se realizó una curva para determinar la DMI (figura 6.9).

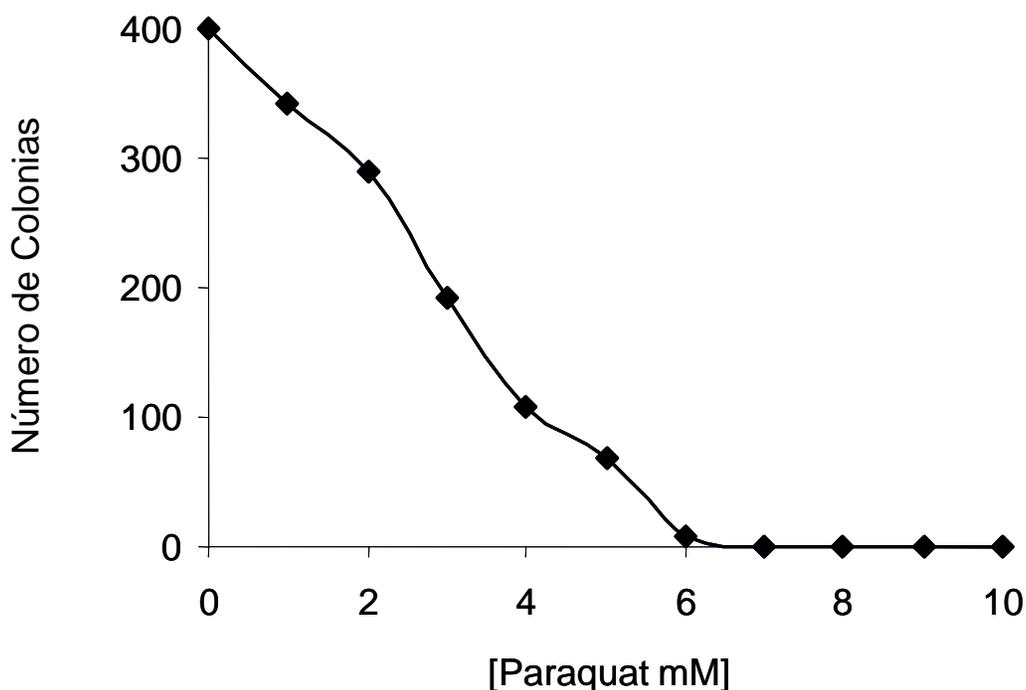


Figura 6.9. Determinación de la dosis mínima inhibitoria de las esporas de *Aspergillus terreus*.

Al igual que en la determinación de la DMI del NaCl, se encontró que la misma concentración de paraquat que causó la inhibición del crecimiento para las esporas, también causó la inhibición del crecimiento para las dos fases de crecimiento del micelio (trofofase e idiofase). Por lo tanto, la concentración que inhibió el crecimiento para las tres fases, fue de 7 mM.

6.12.2. Estrés inducido por peróxido de hidrógeno.

6.12.2.1. Estrés aplicado a esporas.

En experimentos preliminares, encontramos que después de 20 minutos el peróxido perdía intensidad, por lo tanto, se utilizaron dos tiempos para la aplicación del estrés, 20 y 15 minutos, para el tratamiento de las esporas de *Aspergillus terreus*.

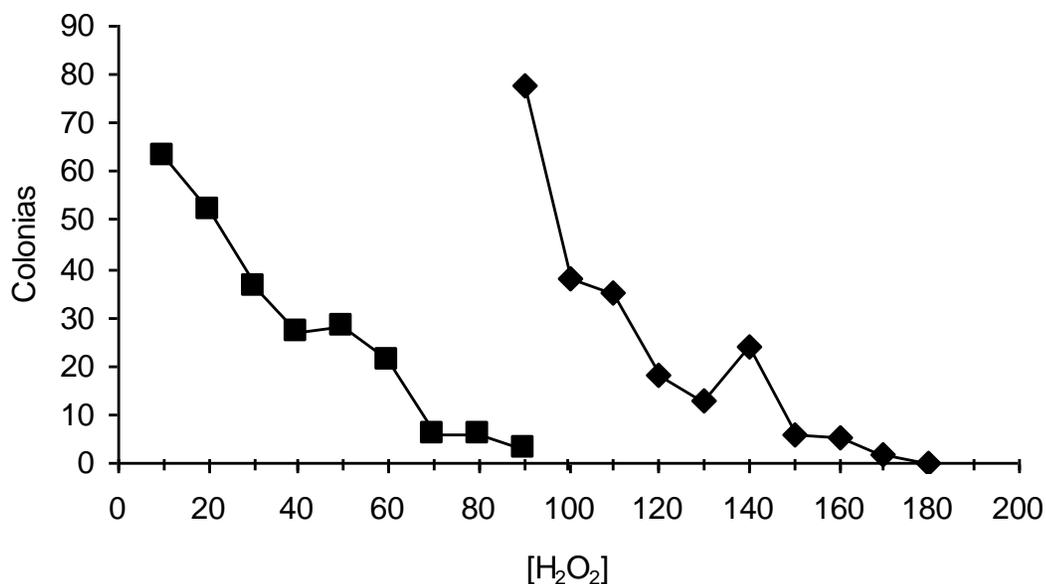


Figura 6.10. Determinación de la dosis mínima inhibitoria para las esporas de *Aspergillus terreus*, utilizando peróxido de hidrógeno a 15 minutos (◆) y 20 minutos (■) de exposición.

Las modificaciones en los tiempos de exposición, nos permitió determinar la DMI para las esporas a los 15 minutos, el tiempo de exposición al H₂O₂ mostró una relación inversa

con respecto a la concentración, es decir, para un tiempo de exposición de 20 minutos se necesitó una concentración de 100 mM de H₂O₂, mientras que para un tiempo de exposición de 15 minutos se necesitaron 180 mM de H₂O₂ (figura 6.10).

6.12.2.2. Estrés aplicado al micelio en trofofase (36 horas).

En un primer intento por encontrar la DMI para esta fase de crecimiento (micelio en trofofase, 36 horas), las soluciones de H₂O₂ se vertieron directamente sobre el micelio que había crecido en las cajas de petri y se dejaba actuar durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se desechaba la solución y las cajas se incubaron nuevamente, para determinar así el número de colonias que resistieron el estrés.

Esta técnica de adicionar la solución de H₂O₂ directamente a la caja petri presentó algunos inconvenientes, entre ellos, un fuerte burbujeo que partía el agar, provocando que el agar se desprendiera de las cajas, ocasionando que la solución de H₂O₂ no se distribuyera de manera uniforme; por lo que las colonias que se encontraban dentro de la burbuja (agar levantado), presentarían crecimiento después de la incubación.

Se planteó una alternativa, que consistió en rasurar el micelio de la caja y este se expuso a la solución de H₂O₂; evitando con esto la distribución no homogénea del peróxido, además se minimizó el efecto protector que pudo haber tenido el tamaño y forma de la colonia.

Las concentraciones probadas fueron de 0 hasta 1900 mM de H₂O₂, observándose un abundante crecimiento en las concentraciones de 0 a 300 mM, para las concentraciones de 400 a 700 mM, el crecimiento no fue tan abundante, por lo que no fue posible cuantificar el número de colonias. A partir de 800 mM, se observó una disminución del crecimiento y la formación de colonias aisladas. A concentraciones mayores a 1000 mM, la formación de colonias casi se inhibió, determinando la DMI en 1200 mM de H₂O₂ (Tabla 6.9).

Tabla 6.9. Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria para H₂O₂. Micelio en trofofase (36 hrs) y micelio en idiofase (48 hrs), utilizando la técnica del rasurado de micelio.

[H ₂ O ₂] (mM)	Colonias			
	Micelio 36 hrs.		Micelio 48 hrs	
800	138	146		
900	86	74		
1000	25	32		
1100	3	0		
1200	0	0	63	74
1300	0	0	48	54
1400	0	0	30	26
1500			16	10
1600			9	7
1700			3	1
1800			1	0
1900			0	0
2000			0	0
2100			0	0

6.12.2.3. Estrés aplicado al micelio en idiofase (48 horas).

Se utilizaron concentraciones de 0 hasta 2000 mM de H₂O₂, y al igual que para el micelio en trofofase, se encontró que las concentraciones por debajo de los 300 mM, el crecimiento fue abundante. El número de colonias se cuantificó hasta la concentración de 1200 mM (cuando se obtuvieron colonias aisladas), con 63 y 74 colonias para ambas réplicas. La DMI se determinó para la concentración de 1900 mM (tabla 6.9).

La resistencia al peróxido para el micelio en idiofase (48 horas), fue 10.5 veces más con respecto a las esporas (180 mM vs 1900 mM), y 1.5 veces más con respecto al micelio en trofofase.

6.12.3. Estrés mixto.

Se estudió el efecto combinado del estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (Paraquat), es decir se mezclaron ambos agentes estresantes con el medio PDA, partiendo de la DMI determinada para ambos tipos de estrés (figura 6.8 y figura 6.9). Se determinó la DMI a una concentración de 7 mM de paraquat + 2.5 M de NaCl, para las tres fases de crecimiento.

6.13. Generación de mutantes.

Se realizó mutagénesis al azar, utilizando radiación con luz UV de onda corta (250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Se determinó la viabilidad como el porcentaje de sobrevivientes de cada dosis de radiación (tiempo de exposición), mediante la técnica de siembra en placa. Se cuantificó el número de colonias crecidas después de 48 horas y se elaboró una curva de sobrevivencia (figura 6.11).

Se eligió el tiempo de exposición que presentó un 10% de sobrevivientes (6 minutos), para la selección de mutantes resistentes y sensibles. Se suele utilizar una dosis de radiación UV que produce un 90-95% de muerte en la población, para después buscar mutantes entre los sobrevivientes. Si se usan dosis más fuertes de radiación, aumenta mucho la probabilidad de obtener mutaciones múltiples, las que no son deseadas.

El tiempo de exposición (6 min) que indujo el 10% de sobrevivientes en *Aspergillus terreus*, fue mayor al reportado para *Penicillium chrysogenum* P-232, mostrando el mismo efecto (10% de sobrevivientes), 4 minutos de exposición a la luz UV (250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) (Manzano, 1994).

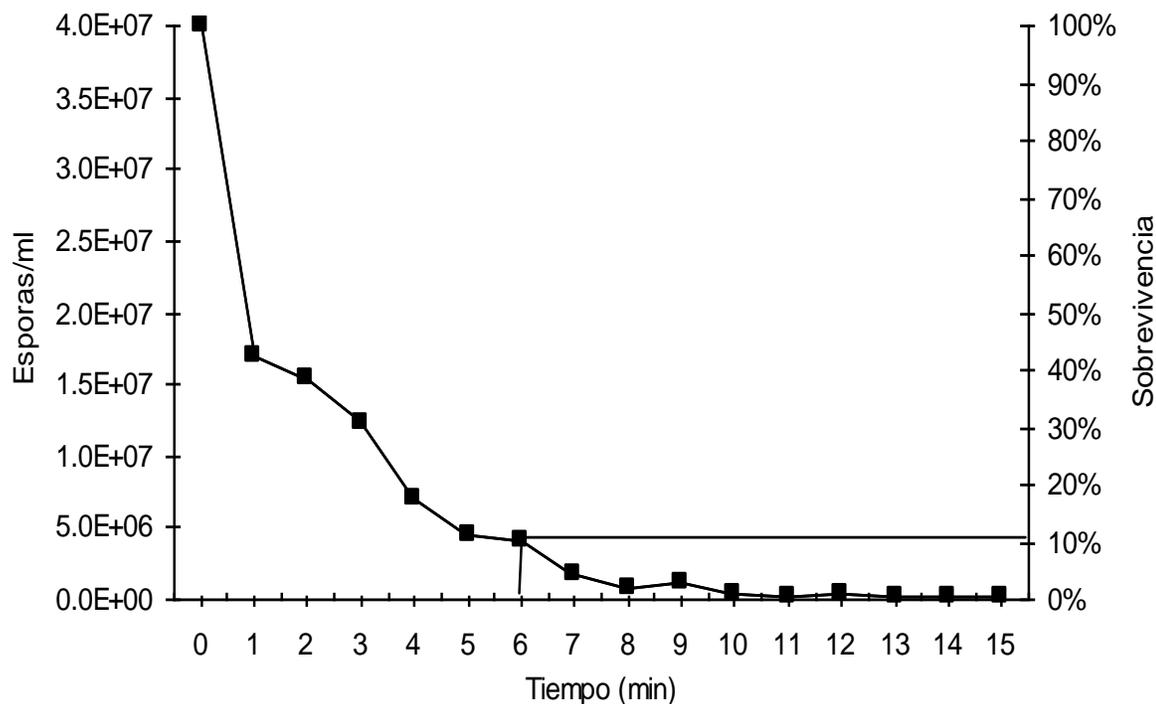


Figura 6.11. Curva de sobrevivencia. Esporas viables y porcentaje de sobrevivencia para cada tiempo de exposición. Se consideró el tiempo cero como el 100%.

6.14. Selección de Mutantes resistentes.

La FCA es una técnica de selección racional propuesta por Kumar y col. (2000), y fue adaptada para éste estudio. El método de cilindro de agar está basado en la propiedad antifúngica de la forma β -hidroxiácida de lovastatina, que produce inhibición del crecimiento de *N. crasa*, el cual se relaciona con la concentración de lovastatina.

Mediante la técnica del bioensayo, pudimos realizar un rastreo o screening, de todas las poblaciones de mutantes resistentes y sensibles generadas, para los diferentes tipos de estrés: osmótico, oxidativo y mixto; en sus diferentes etapas: espora y micelio en trofofase.

Un control utilizado en el estudio de las mutantes (resistentes y sensibles), fue obtener colonias aisladas de la cepa progenitora. Se determinó su producción en FCA y se caracterizó el comportamiento de estas colonias. Se encontró que las 60 colonias presentaron una distribución normal y una media de producción poblacional de 0.4143 μg de lovastatina, esta producción se utilizó como un parámetro para determinar si las mutantes obtenidas fueron sobre productoras.

Como un control adicional, se analizaron 120 colonias de mutantes sin selección oxidativa y/o osmótica, es decir, se estudiaron estas mutantes para determinar el efecto de la selección al estrés vs selección sin estrés. Esta población mostró una distribución normal, con una media de producción poblacional de 0.203 μg y un máximo de producción de 0.42 μg de lovastatina. De esta población, se seleccionaron dos mutantes, para estudiar el comportamiento de producción de lovastatina en FL y en FS. Una de las mutantes seleccionadas presentó la máxima producción en cilindro de agar, 0.42 μg de lovastatina, que se nombró Mt7. La otra mutante seleccionada fue la que presentó una producción similar a la media poblacional (0.24 μg de lovastatina), nombrada Mt8.

6.14.1. Estrés osmótico (NaCl).

Se obtuvieron 150 mutantes resistentes a estrés osmótico, que presentaron una distribución normal en la producción de lovastatina, con una media poblacional de 0.4824 μg de lovastatina; con un máximo de producción de 1.21 μg de lovastatina. Para este tratamiento, 69 colonias presentaron una mayor producción que la cepa parental (0.4143 μg), lo que representó un 46% de mutantes sobre productoras (figura 6.12).

Se seleccionaron 3 mutantes, las mejores producciones en FCA, mutantes que por su producción se encuentran en el extremo derecho de la gráfica de producción (figura 6.12), se nombraron OSR1, OSR23 y OSR25, (OSmótico (tipo de selección) Resistentes (capacidad)). Las mutantes seleccionadas, presentaron incrementos en la producción de lovastatina de entre el 12 y el 95 %, con respecto a la cepa parental (tabla 6.10).

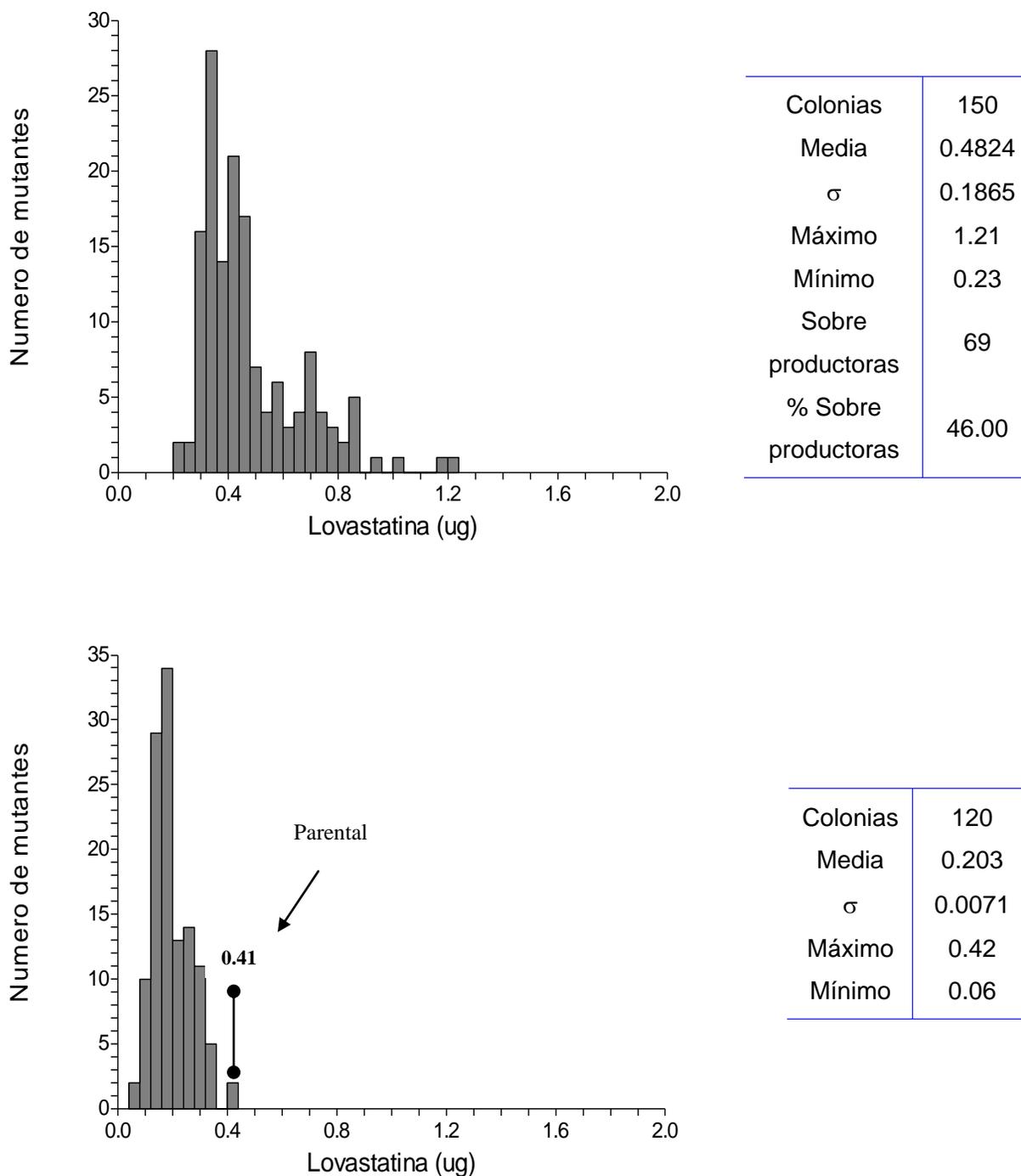


Figura 6.12. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes resistentes a estrés osmótico, NaCl 2.5 M (arriba) y mutantes sin selección a estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

Tabla 6.10. Mutantes resistentes a estrés osmótico (NaCl), seleccionadas con base en el incremento de la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA), con respecto a la cepa parental.

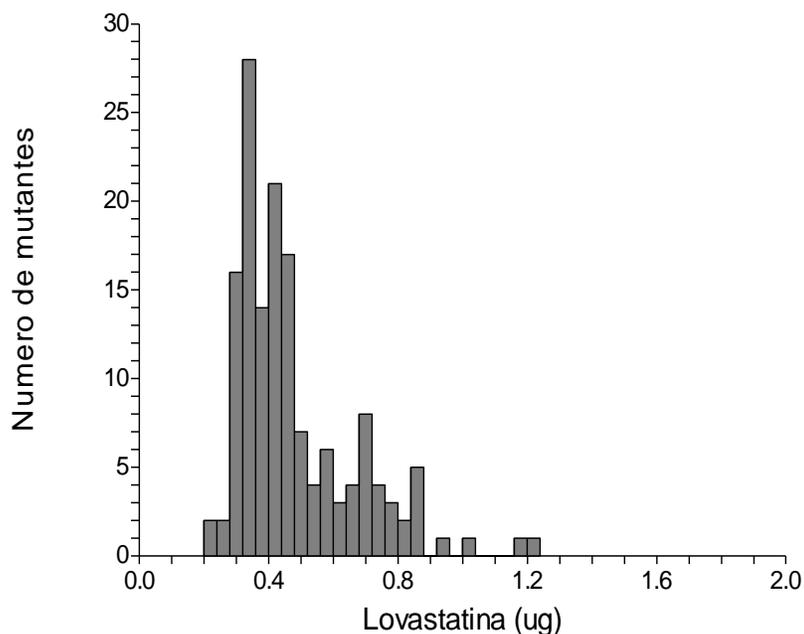
Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OSR1	0.87	112.19
OSR23	0.94	129.26
OSR25	1.21	195.12

6.14.1.1. Selección de mutantes sensibles a estrés osmótico.

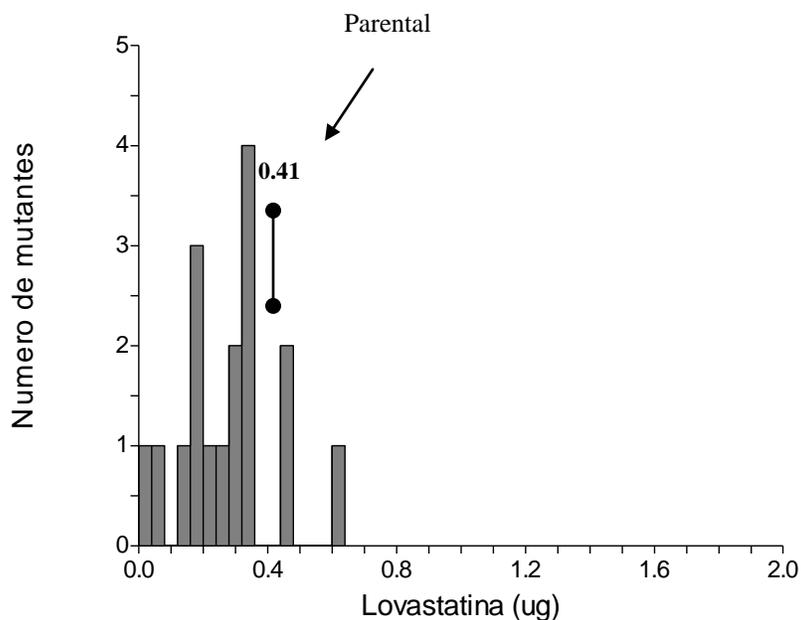
Para obtener mutantes sensibles, se comenzó por un cultivo de enriquecimiento de esporas sensibles en MML con estrés (ver anexo 3). Las esporas del cultivo de enriquecimiento, se crecieron en cajas con MMS. Las colonias que crecieron se sembraron por picadura en MMS + NaCl (a concentraciones de 1.5, 2.0 y 2.5 M).

Las mutantes sensibles obtenidas por enriquecimiento en MML + NaCl, se sembraron en cajas con MMS sin estrés y resembradas en cajas con MMS + NaCl en dos concentraciones (2.0 y 2.5M). Las colonias que crecieron en las cajas sin estrés y que crecieron en una concentración de NaCl, pero no crecieron en la concentración mayor, se consideraron como mutantes sensibles a estrés osmótico (selección negativa).

Bajo ésta técnica, se obtuvieron 17 colonias que presentaron una distribución normal, con una media de 0.2847 μg de lovastatina, un máximo de producción de 0.63 μg de lovastatina y un mínimo de 0.04 μg de lovastatina en FCA (figura 6.13). La media poblacional de las mutantes sensibles, presentó un decremento del 41% en la producción de lovastatina con respecto a la media poblacional de las mutantes resistentes a este estrés osmótico (0.4824 μg) y la máxima producción de lovastatina de las mutantes sensibles disminuyó en un 48%, con respecto a las mutantes resistentes.



Colonias	150
Media	0.4824
σ	0.1865
Máximo	1.21
Mínimo	0.23
Sobre productoras	69
% Sobre productoras	46.00



Colonias	17
Media	0.2847
σ	0.1496
Máximo	0.63
Mínimo	0.04

Figura 6.13. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes resistentes a estrés osmótico NaCl 2.5M (arriba) y mutantes sensibles al mismo estrés, NaCl, 2.0M (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

Se encontraron dos mutantes sensibles (OSS13 y OSS14), que presentaron producciones muy bajas de lovastatina (0.07 y 0.04 μg), incluso por debajo de la producción más baja de las mutantes sin selección a estrés (0.06 μg), lo que representó una disminución en la producción del 82.92 al 90.24%. Estas mutantes se seleccionaron con base a esa peculiar falta de producción de lovastatina en este sistema. También se seleccionó la mutante que presentó la mayor producción, 0.63 μg (OSS 8), con un incremento de 53.65%, con respecto a la cepa parental. Se seleccionó otra mutante que presentó una producción cercana a la media poblacional (0.28 μg) la OSS 3 (tabla 6.11).

Tabla 6.11. Mutantes sensibles a estrés osmótico (NaCl), seleccionadas con base en el incremento en la producción observada en fermentación en cilindro de agar (FCA), con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OSS8	0.63	53.65
OSS3	0.28	-31.70
OSS13	0.07	-82.92
OSS14	0.04	-90.24

6.14.2. Estrés oxidativo.

6.14.2.1. Selección de mutantes resistentes a estrés inducido por Paraquat.

Se obtuvieron 76 mutantes resistentes al estrés causado por el paraquat (generador de súper óxidos). Presentaron una media de producción poblacional de 0.5494 μg de lovastatina, un máximo de producción de 1.87 μg de lovastatina, y un mínimo de 0.13 μg de lovastatina. Siendo esta la mayor producción obtenida para la FCA (1.87 μg de lovastatina),

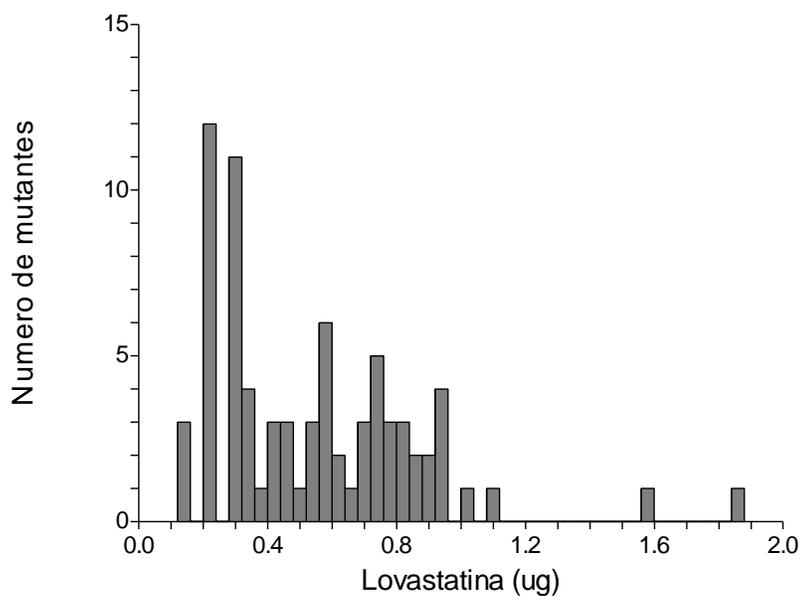
4.56 veces la producción de la cepa parental. Además, se encontraron 43 mutantes con sobreproducción (por encima de 0.41 μg de lovastatina, que es la producción de la cepa parental en FCA), lo que corresponde a un 56.57% (figura 6.14).

De las 43 mutantes sobre productoras, se seleccionaron las tres mejores, presentaron incrementos en la producción de lovastatina por FCA de hasta 356%, con respecto a la cepa parental (tabla 6.12). Las mutantes seleccionadas para este tratamiento fueron nombradas OXRA, OX, como mutantes provenientes de estrés oxidativo; R, por ser resistentes y A por ser el primer método de selección de mutantes resistentes a estrés oxidativo.

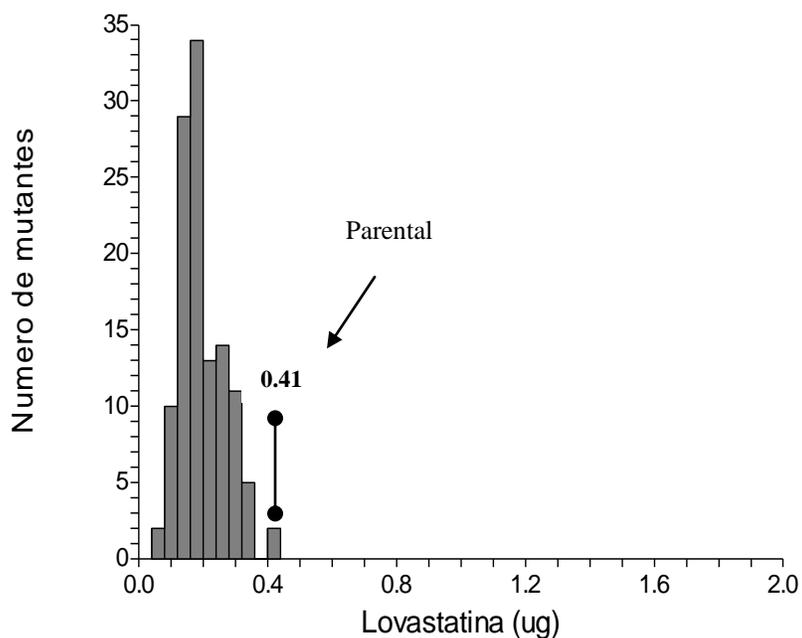
Tabla 6.12. Selección de mutantes resistentes a estrés oxidativo (paraquat), con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA).

Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OXRA 10	1.87	356.09
OXRA 8	1.09	165.85
OXRA 14	1.04	153.65

En este tipo de selección de mutantes (resistentes a estrés oxidativo), fue en el que se obtuvo el mayor número de mutantes sobre productoras, más del 56% de las mutantes. Este es un primer indicio que, para obtener altas producciones de lovastatina por FCA, es importante una resistencia al estrés oxidativo.



Colonias	76
Media	0.5494
σ	0.3252
Máximo	1.87
Mínimo	0.13
Sobre productoras	43
% Sobre productoras	56.57



Colonias	120
Media	0.203
σ	0.0071
Máximo	0.42
Mínimo	0.06

Figura 6.14. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo (Paraquat 7mM, arriba) y mutantes sin selección por estrés (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

6.14.2.2. Selección de mutantes sensibles a estrés inducido por Paraquat.

Se desarrolló una metodología que nos permitiera identificar mutantes sensibles, utilizando la técnica de siembra por picadura. Las esporas se sembraron en un medio sin estrés, medio PDA, y en medio PDA más el paraquat (5mM) (con estrés), las mutantes que crecieron en el medio control, pero no en la caja con paraquat, se consideraron mutantes sensibles.

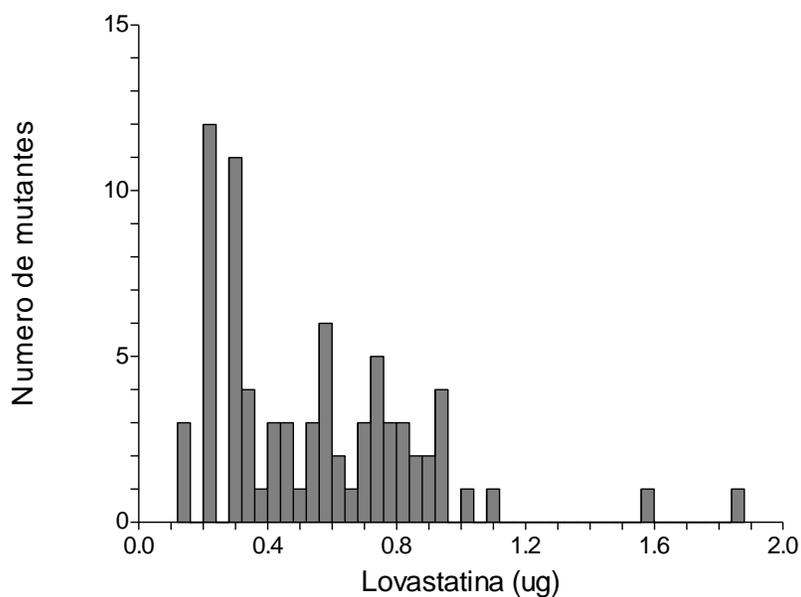
Se obtuvieron 40 colonias con sensibilidad al paraquat y una media poblacional de 0.413 μg de lovastatina en FCA, lo que representa una disminución del 25% con respecto a la media de las mutantes resistentes a estrés oxidativo por paraquat (figura 6.15).

En cuanto a la producción de lovastatina, las mutantes sensibles a estrés osmótico y las sensibles a estrés oxidativo, fueron muy similares, ya que, para ambos casos se observó un decremento en las medias de producción poblacionales. Este es un resultado esperado, puesto que la idea era que la resistencia resultara en un incremento en la producción de lovastatina en FCA, por lo tanto, una sensibilidad resultaría en una disminución en la producción de lovastatina en FCA.

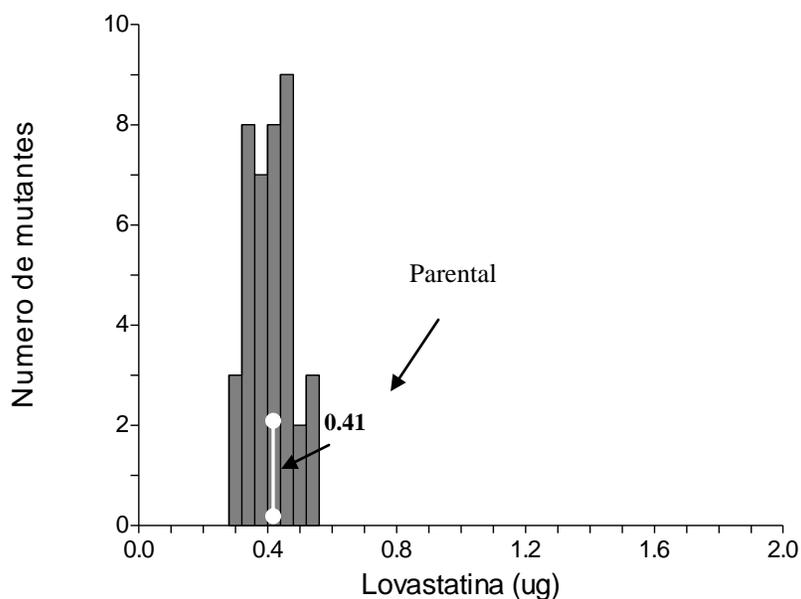
Tabla 6.13. Mutantes sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Selección de mutantes sensibles en base a la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar (FCA).

Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OXSA 19	0.55	34.14
OXSA 36	0.53	29.26
OXSA 9	0.41	0.0

Se seleccionaron tres mutantes sensibles a estrés oxidativo. La que presentó la mayor producción de lovastatina (0.55 μg) que se nombró OXSA 19, otra que presentó una producción similar (0.53 μg) la OXSA 36 y otra mutante que presentó una producción similar a la media poblacional (0.41 μg), la OXSA 9 (tabla 6.13).



Colonias	76
Media	0.5494
σ	0.3252
Máximo	1.87
Mínimo	0.13
Sobre productoras	43
% Sobre productoras	56.57



Colonias	40
Media	0.413
σ	0.062
Máximo	0.55
Mínimo	0.31

Figura 6.15. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo por paraquat, 7mM, (arriba) y mutantes sensibles, 5 mM, al paraquat (abajo), así como sus datos estadísticos (derecha).

La selección de las mutantes sensibles que presentaron altas producciones (OXSA 19 y OXSA 36), fue para estudiar el comportamiento de estas mutantes en FS y FL. Estas mutantes sensibles con altos niveles de producción en FCA, ¿presentaran altos niveles de producción de lovastatina en FS y/o en FL?

6.14.2.3. Selección de Mutantes Resistentes a estrés oxidativo (H₂O₂). Estrés aplicado a esporas.

Se obtuvieron 177 mutantes que presentaron resistencia al H₂O₂ (180 mM), con una media de producción poblacional de 0.5144 µg de lovastatina. Se encontró un máximo de producción de lovastatina en FCA de 1.49 µg, lo que equivale a 3.63 veces la media de producción de la cepa parental. Se encontraron 78 mutantes sobre productoras, lo que corresponde a un 44.06% de sobre productoras de lovastatina para este tipo de selección (figura 6.16).

Tabla 6.14. Mutantes resistentes a estrés oxidativo. Selección de mutantes resistentes, con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, a partir de esporas.

Mutante	Lovastatina (µg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OXRB 24	1.49	263.41
OXRB 26	1.45	253.65
OXRB 28	1.30	217.07
OXRB 31	1.23	200.00
OXRB 27	1.16	182.92
OXRB 29	1.04	153.65
OXRB 25	1.00	143.90

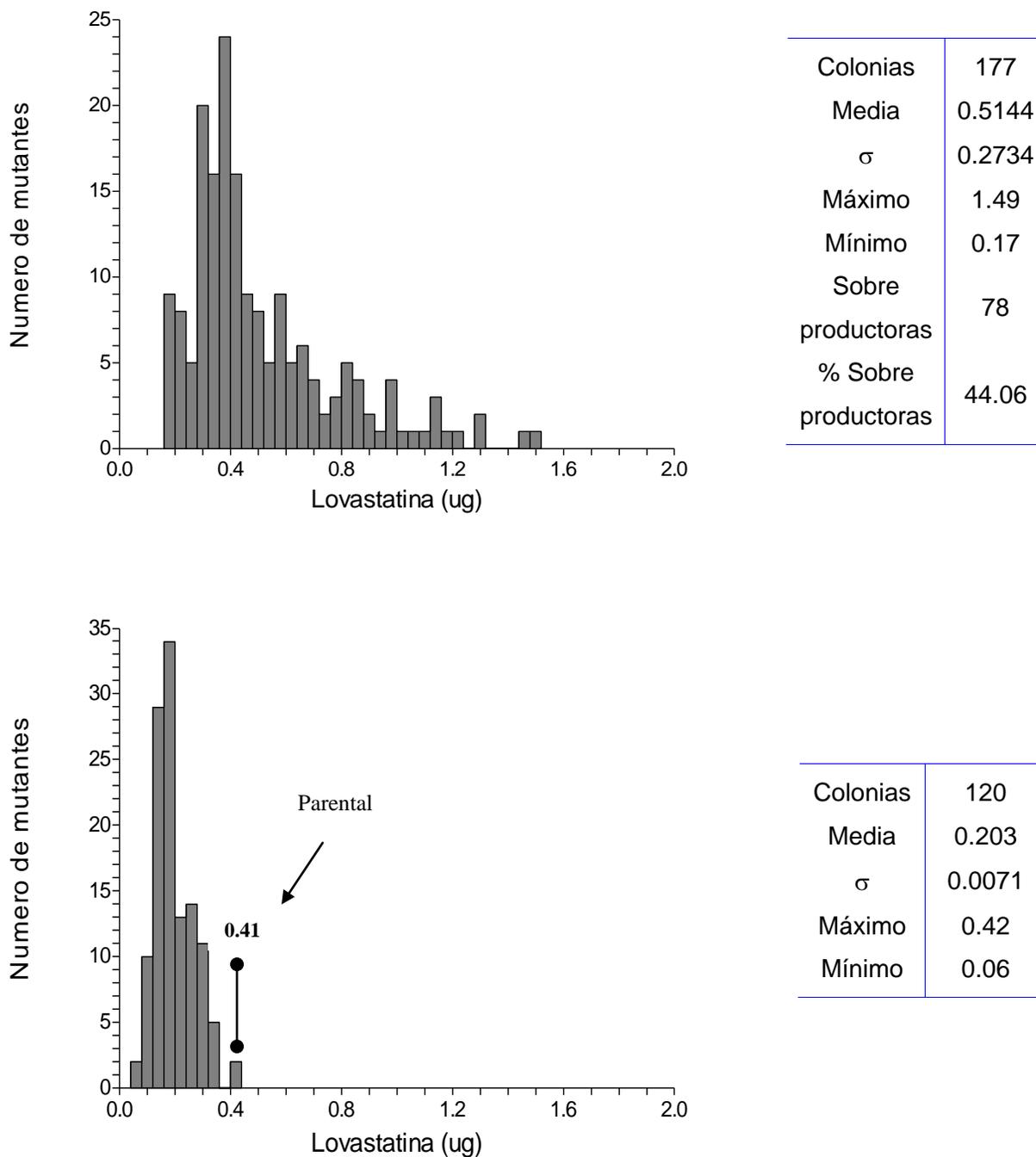


Figura 6.16. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo, seleccionadas para la fase de esporas (H_2O_2 180mM) (arriba) y mutantes sin estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

De las 177 mutantes resistentes a estrés oxidativo seleccionadas por la producción de lovastatina en FCA, se seleccionaron 7 mutantes. En este caso se seleccionaron un número mayor de mutantes debido a la proporción de mutantes sobre productoras encontradas para este tipo de selección.

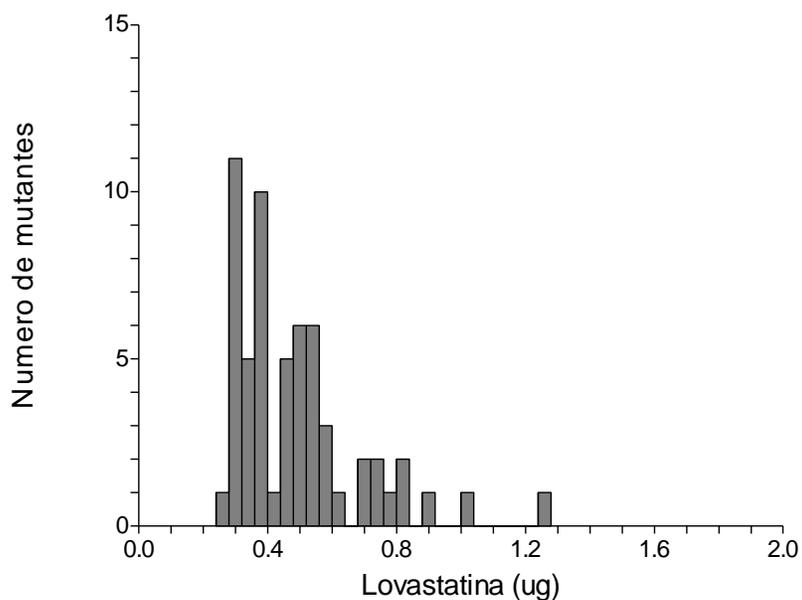
Las mutantes resistentes seleccionadas fueron nombradas como OXRB, OX por el tipo de selección (oxidativo), R por ser resistentes y B por el método de selección (A fue para las mutantes resistentes a estrés oxidativo utilizando paraquat). Estas mutantes presentaron incrementos en la producción de lovastatina en FCA desde 143% (OXRB 25) hasta un 263% para la mutante seleccionada OXRB 24 (tabla 6.14).

Las mutantes OXRB 24, 26 y 28 presentaron los mayores incrementos en la FCA (tabla 6.14), solo por debajo de la mutante OXRA 10 (tabla 6.12), que presentó el mayor incremento en la producción (356%) para la FCA. Siendo este otro indicio que para la producción de lovastatina por FCA, es necesaria una resistencia al estrés oxidativo.

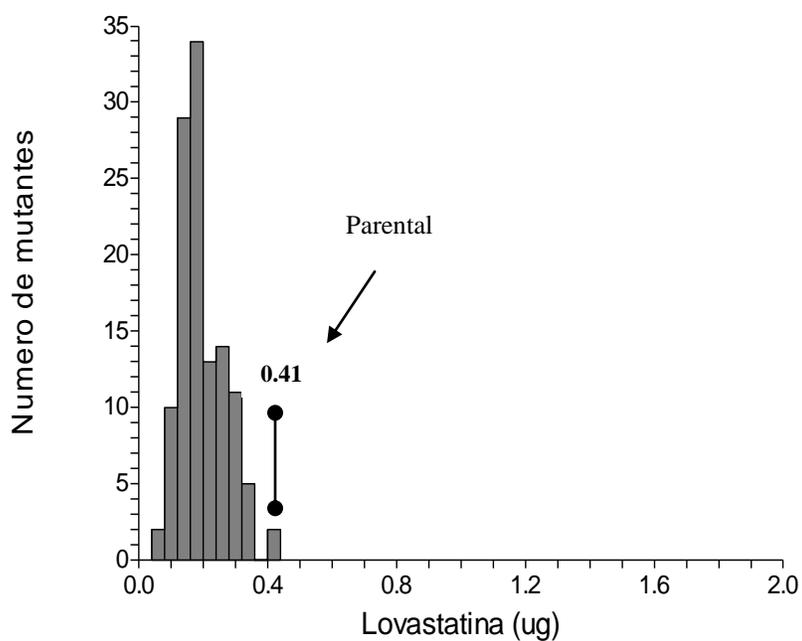
6.14.2.4. Selección de Mutantes Resistentes a estrés Oxidativo (H₂O₂). Estrés aplicado a micelio en trofofase (36 horas).

Se obtuvieron 59 mutantes con resistencia al H₂O₂ (1200 mM) con una media poblacional de 0.493 µg de lovastatina y una producción máxima de lovastatina de 1.28 µg. De las 59 mutantes seleccionadas, 31 fueron sobre productoras en FCA, con respecto a la cepa parental, lo que corresponde a un 52.54% (figura 6.17).

Esta selección presentó el segundo lugar de sobre productoras, solo por debajo de las mutantes resistentes a paraquat (56.57%), es decir, los dos mejores métodos de selección de mutantes sobre productoras (por el porcentaje de sobre productoras obtenidas), corresponden a los métodos de selección por estrés oxidativo.



Colonias	59
Media	0.493
σ	0.2027
Máximo	1.28
Mínimo	0.27
Sobre productora s	31
% Sobre productora s	52.54



Colonias	120
Media	0.203
σ	0.0071
Máximo	0.42
Mínimo	0.06

Figura 6.17. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés oxidativo (arriba), para el micelio en trofofase (H_2O_2 1200mM). Mutantes sin estrés (abajo) y sus datos estadísticos (derecha).

Tabla 6.15. Selección de mutantes resistentes a estrés oxidativo para el micelio en trofofase, con base en el incremento en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, con respecto a la cepa parental.

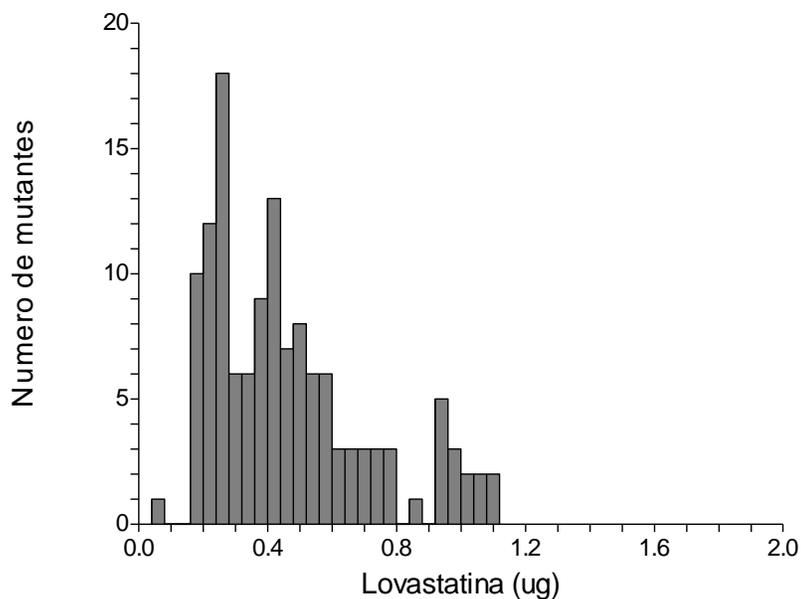
Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
OXRC 2	1.28	212.19
OXRC 4	1.02	148.78
OXRC 9	0.81	97.56

Se seleccionaron las 3 mejores mutantes productoras de lovastatina en FCA, estas se nombraron OXRC (OX, por oxidativo; R por ser resistentes y C por el tipo de selección, micelio en trofofase). Presentaron incrementos en la producción de lovastatina de 97% para la mutante OXRC 9 hasta un 212% para la mutante OXRC 2 (tabla 6.15).

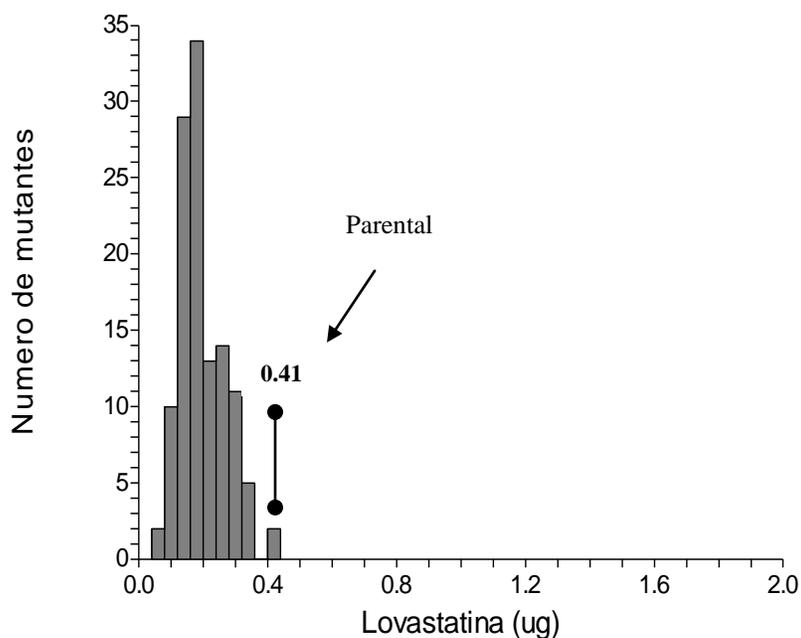
6.14.3. Estrés mixto.

6.14.3.1. Selección de Mutantes Resistentes a estrés Mixto.

Se obtuvieron 132 mutantes resistentes (NaCl – Paraquat), las cuales mostraron en FCA una media de producción poblacional de 0.4664 μg de lovastatina. La mejor producción de lovastatina para las mutantes resistentes a estrés mixto fue de 1.09 μg . Se obtuvieron 58 mutantes sobre productoras (con respecto a la cepa parental), lo que corresponde a un 43.93% (figura 6.18).



Colonias	132
Media	0.4664
σ	0.2464
Máximo	1.09
Mínimo	0.05
Sobre productoras	58
% Sobre productoras	43.93



Colonias	120
Media	0.203
σ	0.0071
Máximo	0.42
Mínimo	0.06

Figura 6.18. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), por las mutantes resistentes a estrés mixto (NaCl 2.5M – Paraquat 7mM) (arriba), mutantes sin estrés (abajo) y los datos estadísticos de las poblaciones (derecha).

Tabla 6.16. Mutantes resistentes a estrés Mixto (MR). Selección de mutantes resistentes con base en la producción de lovastatina por fermentación en cilindro de agar, utilizando NaCl y Paraquat.

Mutante	Lovastatina (μg)	Incremento (%)
Parental	0.41	
MR 11	1.09	165.85
MR 12	1.09	165.85
MR 6	1.07	160.97

Se seleccionaron las tres mejores productoras y se nombraron MR, por provenir de un estrés mixto y ser resistentes. Estas mutantes resistentes presentaron producciones de lovastatina en FCA, muy similares 1.09 μg y 1.07 μg , (tabla 6.16).

6.15. Crecimiento radial y su relación con el método de selección de mutantes.

La cepa parental presentó un crecimiento radial muy uniforme sobre las cajas de medio PDA, con una buena esporulación, un tamaño promedio de la colonia de 3.55 ± 0.071 centímetros de diámetro a las 72 horas de incubación a 30°C. Con base a este crecimiento, el 56% (trece de ellas) de las 23 colonias seleccionadas, presentaron un crecimiento radial superior al de la cepa parental, mientras que las otras 10 mutantes, presentaron un crecimiento menor al de la cepa parental (44%).

Las mutantes resistentes seleccionadas por Paraquat, presentaron un patrón bien definido, es decir, mayor crecimiento radial. Mientras que las mutantes sensibles al mismo estrés, presentaron menor crecimiento, que el de la cepa parental. Estos datos nos sugieren que la selección por Paraquat, es decir la capacidad para contender con éste tipo de estrés, está relacionado con el crecimiento, puesto que las mutantes resistentes son más grandes que las mutantes sensibles (tabla 6.17).

Las mutantes que presentaron un crecimiento algodonoso, también presentaron una mala esporulación, excepto las mutantes resistentes a estrés oxidativo, producido por paraquat (OXRA). Al parecer la mutación en estas mutantes, además de resistencia al paraquat afectó el crecimiento y la capacidad de esporular. Las tres mutantes resistentes a paraquat seleccionadas, presentaron textura algodonosa, pero esporularon bien (tabla 6.17).

En la figura 6.20, se observan los cambios en la morfología de algunas de las mutantes, en algunos casos las mutaciones afectaron el tamaño, formando colonias más grandes (OXRA 8), mientras que en otros casos, se afectó la textura de la colonia, presentando una textura algodonosa, así como también se vio afectada la esporulación.

Tabla 6.17. Relación entre la morfología y los métodos de selección de mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo, osmótico y mixto.

Colonia	Crecimiento radial	Esporulación	Morfología
PARENTAL	3.55 ± 0.071	+++++	Normal
Selección por estrés Oxidativo			
OXRA 8	4.52 ± 0.028	+++++	Normal/Algodonoso
OXRA 10	3.77 ± 0.021	+++++	Normal/Algodonoso
OXRA 14	3.55 ± 0.042	+++++	Normal/Algodonoso
OXSA 9	3.37 ± 0.021	+	Muy Algodonoso
OXSA 36	3.48 ± 0.028	+++++	Normal
OXR B 24	3.59 ± 0.028	+++++	Normal
OXR B 25	3.35 ± 0.113	+++++	Normal
OXR B 26	3.63 ± 0.014	++++	Normal
OXR B 27	3.56 ± 0.134	++++	Normal
OXR B 28	3.14 ± 0.134	++++	Normal
OXR B 29	3.11 ± 0.007	++	Algodonoso
OXR B 31	3.59 ± 0.071	+++++	Normal
OXRC 2	3.77 ± 0.028	+++++	Normal
OXRC 4	3.73 ± 0.099	+++++	Normal
OXRC 9	3.75 ± 0.226	+++++	Normal
Selección por estrés Osmótico			
OSR 1	3.75 ± 0.071	+++++	Normal
OSR 23	3.48 ± 0.396	+++++	Normal
OSR 25	3.70 ± 0.240	+++	Normal/Algodonoso
OSS 8	3.55 ± 0.127	++++	Normal
OSS 13	3.61 ± 0.207	++++	Normal
Selección por estrés Mixto			
MR 6	3.58 ± 0.072	+++++	Normal
MR 11	3.55 ± 0.064	+	Algodonoso
MR 12	3.32 ± 0.028	+++++	Normal

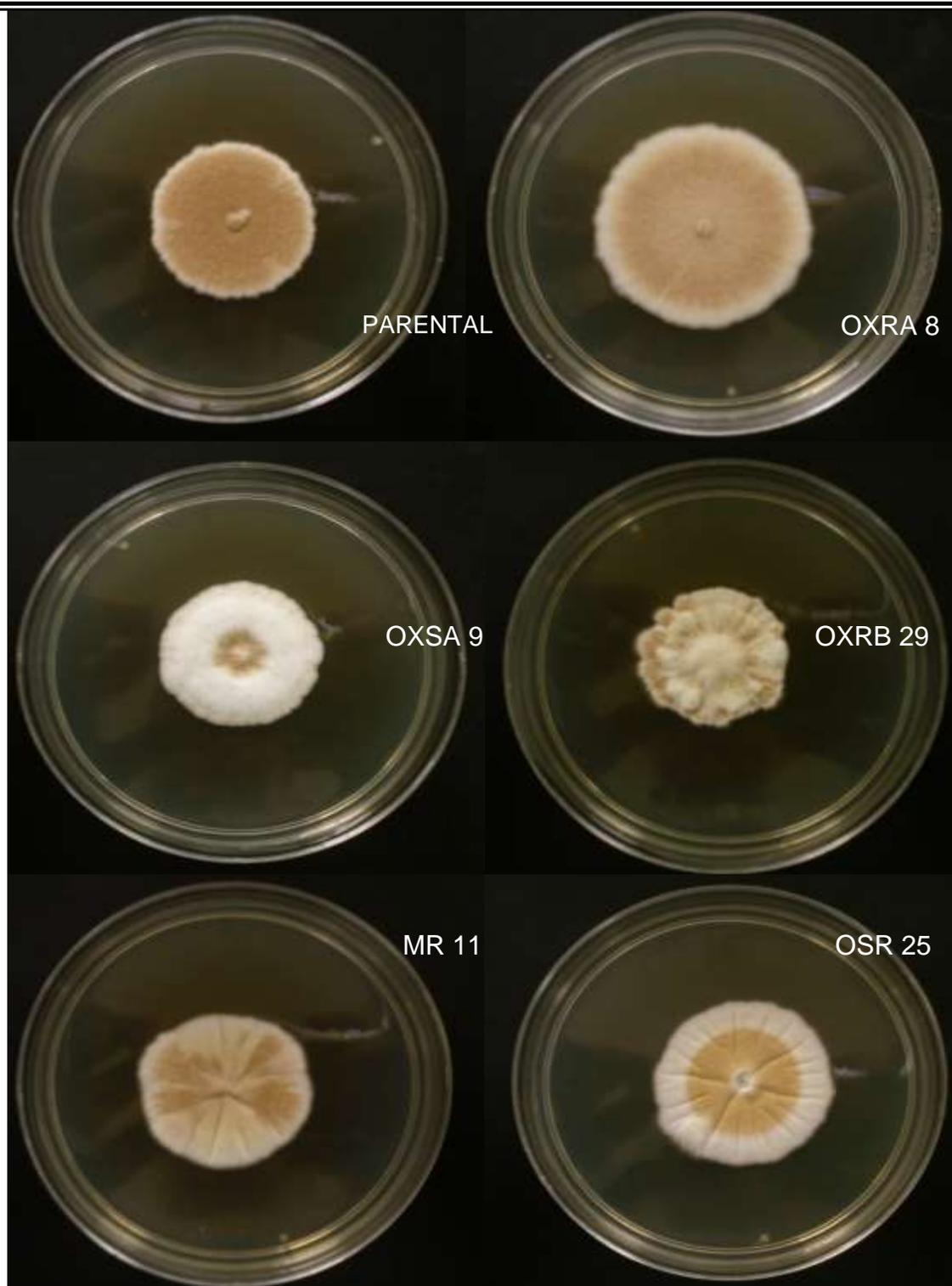


Figura 6.19. Crecimiento radial (morfología) de la cepa parental y de mutantes resistentes (OXR, OSR y MR) y sensibles (OXS y OSS) seleccionadas, que presentaron un crecimiento diferente al de la cepa parental.

6.16. Producción de lovastatina en FL, por mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl).

Se determinó la producción de lovastatina de las tres mutantes preseleccionadas en FCA, mismas que presentaron incrementos sorprendentes en la producción de lovastatina por FL, incrementos que fueron del 46% al 80.9%, con respecto a la cepa parental. (tabla 6.18).

Tabla 6.18. Producción de lovastatina en FL por las mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl). Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Incremento (%)
Parental	462.6	
Mutantes resistentes		
OSR 23	836.8	80.9
OSR 1	778.3	68.2
OSR 25	675.6	46.0
Mutantes sensibles		
OSS 8	464.9	0.5
OSS 14	449.2	- 2.9
OSS 13	439.2	- 5.1
OSS 3	429.7	- 7.1

La producción de lovastatina de las mutantes sensibles, presentó una ligera disminución (2.9% - 7.1%), indicando que la sensibilidad al estrés osmótico afecta de manera negativa la producción de lovastatina, pero el efecto no es tan fuerte como lo es el efecto positivo en la producción (46%, 68.2% y 80.9%), que le confiere la resistencia al estrés osmótico en FL (tabla 6.18).

6.17. Producción de lovastatina en FL por las mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo: paraquat.

Las producciones de lovastatina en FL de las mutantes resistentes a paraquat, fueron inesperadas. En lugar de presentar incrementos, todas las mutantes presentaron fuertes decrementos en la producción de lovastatina, de 45% para la mutante OXRA 10, (la mutante mejor productora de lovastatina en FCA), hasta un 58.8% para la mutante OXRA 8, con una producción de 190 $\mu\text{g/ml}$; comparada con la producción de la cepa parental que fue de 462.6 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 6.19).

Tabla 6.19. Producción de lovastatina en FL por las mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Incremento (%)
Parental	462.6	
Mutantes resistentes		
OXRA 10	254.6	- 45.0
OXRA 14	215.7	- 53.4
OXRA 8	190.7	- 58.8
Mutantes sensibles		
OXSA 19	488.0	5.5
OXSA 9	467.8	1.1
OXSA 36	463.7	0.2

6.18. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo: H₂O₂.

6.18.1. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de esporas.

De las siete mutantes seleccionadas, dos de ellas presentaron incrementos en la producción de lovastatina por FL. La mutante OXRB 29, presentó un incremento del 63.6% (el segundo incremento más importante en FL, tabla 6.30) y la mutante OXRB 28 un incremento del 8.5%, con respecto a la cepa parental (Tabla 6.20).

La disminución en la producción de lovastatina, para las demás mutantes seleccionadas, fue desde un 1.5% hasta un 54.7%, siendo importante destacar que tres de estas mutantes, presentaron decrementos cercanos al 50% (tabla 6.20).

Tabla 6.20. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo, utilizando la fase de esporas como método de selección. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina (µg/ml)	Incremento (%)
Parental	462.6	
OXRB 29	756.9	63.6
OXRB 28	501.7	8.5
OXRB 25	455.9	- 1.5
OXRB 26	389.0	- 15.9
OXRB 31	228.8	- 50.6
OXRB 27	227.3	- 50.9
OXRB 24	209.8	- 54.7

6.18.2. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de micelio en trofofase.

Para este tipo de selección, ninguna de las tres mutantes presentó incrementos en la producción de lovastatina por FL, por el contrario, presentaron altos decrementos en la producción de lovastatina, que fueron de un 43% a un 55%, probablemente este es otro indicio de que la producción de lovastatina por FL, no es favorecida por este tipo de selección, o lo que es lo mismo, la resistencia al estrés oxidativo no es favorable para producir lovastatina en FL. (tabla 6.21).

Tabla 6.21. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés oxidativo, utilizando micelio en trofofase como método de selección. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Incremento (%)
Parental	462.6	
OXRC 2	262.3	- 43.3
OXRC 4	241.4	- 47.8
OXRC 9	206.5	- 55.4

6.19. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés mixto.

Las tres mutantes seleccionadas por su alta producción en FCA, con resistencia a estrés mixto, presentaron incrementos importantes en la producción de lovastatina por FL. Estos incrementos fueron de un 42.9% para la mutante MR 12, 52% para la MR 11 y de 65.7% para la mutante MR 6 (tabla 6.22). Siendo esta última, la tercer mejor producción de lovastatina para FL de todas las mutantes estudiadas (tabla 6.30). Este comportamiento en la producción de lovastatina en FL, estuvo más en concordancia con las mutantes resistentes a estrés osmótico que con las mutantes resistentes a estrés oxidativo, que presentaron bajas producciones de lovastatina (OXRC 206.5 $\mu\text{g/ml}$ vs 766.8 $\mu\text{g/ml}$ MR 6).

Tabla 6.22. Producción de lovastatina en FL por mutantes resistentes a estrés Mixto. Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental, utilizando NaCl y paraquat como agentes estresantes.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Incremento (%)
Parental	462.6	
MR 6	766.8	65.7
MR 11	703.4	52.0
MR 12	661.2	42.9

6.20. Producción de lovastatina en FS, por mutantes resistentes y sensibles a estrés Osmótico (NaCl).

Se caracterizó la producción de lovastatina en FS, de las mutantes seleccionadas resistentes a estrés osmótico, por su alta producción en FCA. Las tres mutantes resistentes a estrés osmótico, presentaron sobreproducción de lovastatina en FS, mostrando incrementos moderados en la producción, de 10% y 15%, con respecto a la producción de la cepa parental. Dos de ellas (OSR 25 y OSR 23) con producciones muy cercanas a los 20,000 $\mu\text{g/gss}$ (tabla 6.23).

En contraste con lo observado en FL, las producciones de las mutantes sensibles, mostraron decrementos muy importantes en la producción en FS, decrementos del 20% hasta un 63% (tabla 6.23). Recordando que, las mutantes OSS 13 y OSS 14, se seleccionaron por presentar muy mala producción en FCA; para la FS, estas resultaron ser también muy malas productoras de lovastatina. Incluso la disminución en la producción (62.7% y 63.6%), fue la más alta encontrada para todas las mutantes seleccionadas (tanto para estrés osmótico como para estrés oxidativo).

Tabla 6.23. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes y sensibles a estrés osmótico (NaCl). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)
Parental	17,212	
Mutantes resistentes		
OSR 25	19,891	15.6
OSR 23	19,847	15.3
OSR 1	18,942	10.0
Mutantes sensibles		
OSS 8	13,748	- 20.1
OSS 3	12,128	-29.5
OSS 13	6,419	-62.7
OSS 14	6,268	-63.6

6.21. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo causado por paraquat.

Al caracterizar las mutantes resistentes a paraquat por su producción de lovastatina en FS, encontramos que sólo una de las tres mutantes seleccionadas, presentó incremento en la producción de lovastatina, la mutante OXRA 14, con 23,660 $\mu\text{g/gss}$ (tabla 6.24). Siendo esta la tercer mejor producción en FS, para todas las mutantes seleccionadas (tabla 6.32).

Tabla 6.24. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes y sensibles a estrés oxidativo (paraquat). Incremento en la producción, con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)
Parental	17,212	
Mutantes resistentes		
OXRA 14	23,660	37.5
OXRA 10	14,831	- 13.8
OXRA 8	14,103	-18.1
Mutantes sensibles		
OXSA 19	13,368	- 22.3
OXSA 36	12,183	- 29.2
OXSA 9	11,737	- 31.8

Como era de esperarse, las mutantes sensibles a estrés oxidativo, presentaron decrementos en la producción de lovastatina en FS, decrementos de un 22.3% hasta un 31.8%. Lo inesperado fue, que mutantes resistentes con éste tipo de selección, presentaron decrementos en la producción de hasta 18%, con respecto a la cepa parental (tabla 6.24).

6.22. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés oxidativo causado por H_2O_2 .

6.22.1. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de esporas.

De las siete mutantes seleccionadas, sólo cuatro de ellas resultaron ser sobre productoras en FS. Una de ellas la OXRB 28, presentó la segunda mejor producción (25,028 $\mu\text{g/gss}$) de lovastatina por FS, de todas las mutantes seleccionadas por estrés osmótico u oxidativo (tabla 6.32). Las otras tres mutantes, resultaron sobre productoras, OXRB 25,

OXRB 31 y OXRB 24, con incrementos en la producción de 16.1%, 9.7% y 4.2%, respectivamente (tabla 6.25).

Tabla 6.25. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés oxidativo (H^2O_2), utilizando esporas como medio de selección. Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)
Parental	17,212	
OXRB 28	25,028	45.4
OXRB 25	19,986	16.1
OXRB 31	18,881	9.7
OXRB 24	17,941	4.2
OXRB 29	17,085	- 0.7
OXRB 26	16,153	- 6.2
OXRB 27	16,088	- 6.5

Aunque la producción de lovastatina de las mutantes resistentes disminuyó, (0.7% - 6%), la producción de lovastatina fue mayor que la producción observada para las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo (tabla 6.25).

6.22.2. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés oxidativo provenientes de micelio en trofofase.

La mutante OXRC 9, presentó la producción de lovastatina más alta para la FS obtenida para este estudio de investigación, alcanzando una producción de 27,890 $\mu\text{g/gss}$, lo que representa un incremento en la producción del 62%, es decir, 10, 678 $\mu\text{g/gss}$, con respecto a la cepa parental (tabla 6.26).

Sin embargo, fue contradictorio encontrar que las otras dos mutantes, resultaron ser malas productoras de lovastatina en FS. Incluso la mutante OXRC 2, presentó producciones

por debajo de las observadas para las mutantes sensibles, OSS 8 y OXSA 19, con un decremento en la producción del 26.3% (tabla 6.26).

Tabla 6.26. Producción de lovastatina en fermentación sólida (FS) por mutantes resistentes a estrés oxidativo (H_2O_2), utilizando micelio en trofofase como medio de selección. Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)
Parental	17,212	
OXRC 9	27,890	62.0
OXRC 4	14,364	- 16.5
OXRC 2	12,679	- 26.3

6.23. Producción de lovastatina en FS por mutantes resistentes a estrés mixto.

Dos de las tres mutantes seleccionadas, presentaron incrementos moderados en la producción de lovastatina en FS. La mutante MR 6, presentó una producción de 21,706 $\mu\text{g/gss}$, lo que corresponde a un incremento del 26.1%. Mientras que la mutante MR 12 presentó una producción de 19,362 $\mu\text{g/gss}$, que corresponde a un incremento del 12.5%, con respecto a la cepa parental. La mutante MR 11, presentó un decremento en la producción del 9.7% (tabla 6.27).

Tabla 6.27. Producción de lovastatina en fermentación sólida (FS) por mutantes resistentes a estrés Mixto (NaCl + paraquat). Incremento en la producción con respecto a la cepa parental.

Mutante	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)
Parental	17,212	
MR 6	21,706	26.1
MR 12	19,362	12.5
MR 11	15,540	- 9.7

6.24. Evaluación de los sistemas de selección de mutantes (FCA) con respecto a la producción de lovastatina en FL y FS.

La FCA fue una herramienta muy útil como parte del método de selección de mutantes. Se seleccionaron 26 mutantes, de las cuales 19 fueron mutantes resistentes y las otras 7 mutantes sensibles. De estas 26 mutantes, 22 se seleccionaron por ser sobre productoras y las otras 4 por presentar baja producción de lovastatina en FCA.

De las 19 mutantes resistentes, 13 fueron mutantes resistentes a estrés oxidativo, 3 OXRA, 7 OXRB y 3 OXRC (OXRA = paraquat; OXRB = H₂O₂ esporas; OXRC = H₂O₂ micelio en trofofase); 3 mutantes con resistencia a estrés osmótico (OSR) y las otras 3 mutantes con resistencia mixta (NaCl + paraquat). De las mutantes sensibles, 3 fueron sensibles a paraquat (OXSA) y las otras 4 sensibles a NaCl (OSS).

De las diez mejores mutantes productoras de lovastatina en FCA, ocho son resistentes a estrés oxidativo, lo que nos indica una relación de la alta producción con la resistencia a estrés oxidativo. Las otras dos fueron resistentes a estrés osmótico. De las ocho mutantes resistentes a estrés oxidativo, cinco corresponden a la selección realizada por H₂O₂ en la fase de esporas y una por selección en micelio en trofofase; las otras dos presentaron resistencia al paraquat (figura 6.20).

Las mutantes seleccionadas por su resistencia al estrés oxidativo, presentaron las mejores producciones en FCA, 1.87 µg (OXRA), 1.49 µg (OXRB) y 1.28 µg (OXRC) de lovastatina (tabla 6.28). Por otro lado, se observó que una sensibilidad al estrés osmótico se reflejó en una mala producción de lovastatina en FCA.

El estudiar la producción de las 120 mutantes sin estrés, nos permitió visualizar y contrastar el efecto de la selección por estrés. Es decir, las mutantes sin estrés presentan una media poblacional de producción muy baja, 0.203 µg; casi de la mitad de la obtenida para la cepa parental (0.413 µg), lo que significa que la mutación al azar afectó la producción

de lovastatina. Esto ilustra la dificultad de aislar mutantes sobre productoras con un método de generación de mutantes al azar.

Tabla 6.28. Comparación de los métodos de selección de mutantes sobre productoras de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA).

Mutantes aisladas	Método de selección	Media	Máximo	% sobre productoras	Mutantes seleccionadas
76	OXRA	0.549	1.87	56.57	3
177	OXRB	0.514	1.49	44.06	7
59	OXRC	0.493	1.28	52.54	3
150	OSR	0.482	1.21	46.00	3
132	MR	0.466	1.09	43.96	3
40	OXSA	0.413	0.55	0	3
17	OSS	0.284	0.63	0	4
120	Sin estrés	0.203	0.42	0	0

* OXRA, mutantes resistentes a estrés oxidativo (paraquat). OXRB, mutantes resistentes a estrés oxidativo (H_2O_2 , esporas). OXRC, mutantes resistentes a estrés oxidativo (H_2O_2 , micelio en trofofase). OSR, mutantes resistentes a estrés osmótico. MR, mutantes resistentes a estrés mixto (NaCl + Paraquat). OXSA mutantes sensibles a estrés oxidativo (paraquat). OSS, mutantes sensibles a estrés osmótico.

De los cinco tratamientos utilizados (OXR, OXS, OSR, OSS y MR) como métodos de selección, los tres mejores, de acuerdo a las medias poblacionales de producción, corresponden a la selección por estrés oxidativo. Siendo este, otro indicio de que para la producción de lovastatina por FCA, es necesaria la resistencia al estrés oxidativo (tabla 6.28).

Los resultados encontrados para la FCA, nos indicaron que para obtener altas producciones de lovastatina en este sistema, una resistencia al estrés oxidativo y/u osmótico, es más compatible, por el contrario la sensibilidad osmótica, afectó de manera negativa la producción y esto se reflejó en una mala producción de lovastatina en FCA. Sin embargo, no es claro el efecto de la sensibilidad oxidativa sobre la producción de lovastatina en FCA (figura 6.20).

De la tabla 6.28 podemos observar que, la población de de mutantes seleccionadas sin estrés no presentaron sobre producción de lovastatina en FCA, mientras que en los métodos de selección por estrés, se observó desde un 44% hasta un 57% de mutantes sobre productoras. Este es un dato muy importante que nos dice que, si queremos obtener mutantes sobre productoras de lovastatina, no basta con generar mutantes al azar, sino que debe ser necesaria una selección por resistencia a estrés oxidativo y osmótico.

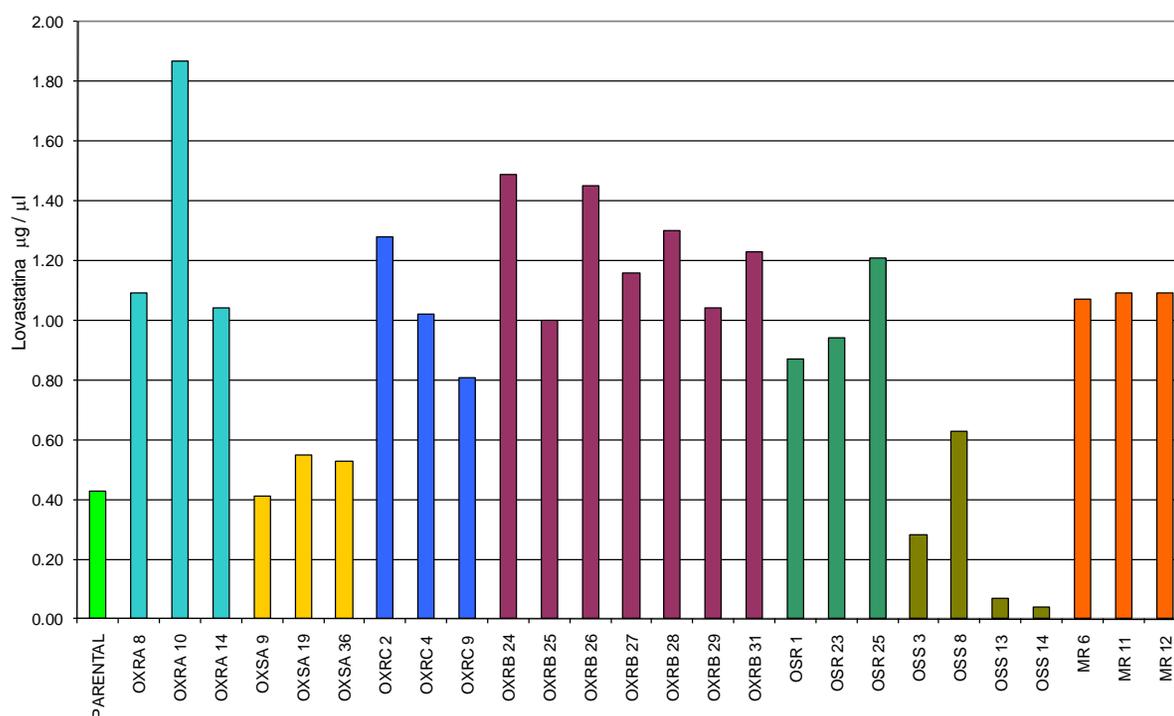


Figura 6.20. Producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA) por las mutantes seleccionadas; resistentes a estrés oxidativo (OXRA, OXRB y OXRC), osmótico (OSR) y mixto (MR) y sensibles (OSS y OXSA).

Ahora bien, en lo que respecta al desempeño que tuvieron las mutantes seleccionadas (por su alta producción de lovastatina en FCA), en la tabla 6.29 se observa que, la selección por estrés osmótico y mixto tuvo una excelente eficiencia para seleccionar mutantes hiperproductoras de lovastatina en FL.

Esto se confirma con el hecho de que las dos mejores productoras en FL son mutantes resistentes a estrés osmótico. De hecho, de las 7 mejores productoras en FL, 3 son resistentes a estrés osmótico, 3 resistentes a estrés mixto. Es decir que, para este sistema de producción, la resistencia a estrés osmótico parece importante para lograr altas producciones de lovastatina (tabla 6.30).

Tabla 6.29 Proporción de las mutantes seleccionadas por el método de selección racional (resistencia y producción en FCA) que fueron sobre productoras en FL.

Resistentes a Estrés	Número de Mutantes	Sobre productoras en FL	%
Oxidativo	13	2	15.38
Osmótico	3	3	100
Mixto	3	3	100

En contraste, la selección por resistencia a estrés oxidativo no fue efectiva para seleccionar mutantes sobre productoras para FL. Sólo una de las trece mutantes seleccionadas por resistencia a estrés oxidativo presentó un incremento significativo en la producción de lovastatina en FL. Además, las diez peores productoras en FL corresponden a las mutantes resistentes a estrés oxidativo.

Por otro lado, la sensibilidad a estos estreses no afectó en forma importante la producción de lovastatina en FL, ya que la producción de las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo presentaron producciones muy cercanas a la observada para la cepa parental, es decir, ninguna presentó una diferencia mayor a 8% (tablas 6.18 y 6.19).

Tabla 6.30. Las mejores mutantes productoras de lovastatina en FL, su origen y su desempeño en FS. Incremento en la producción de lovastatina, con respecto a la cepa parental (FL y FS).

Mutante	FL	FL	FS
	Lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Incremento (%)	Incremento (%)
Parental	462.6		
OSR 23	836.8	80.9	15.3
OSR 1	778.3	68.2	10.0
MR 6	766.8	65.7	26.1
OXRB 29	756.9	63.6	-0.7
MR 11	703.4	52.0	-9.7
OSR 25	675.6	46.0	15.6
MR 12	661.2	42.9	12.5

En cuanto a la FS, los resultados indicaron que todos los métodos (resistencia a estrés osmótico, Oxidativo o Mixto) fueron bastante efectivos para seleccionar sobre productoras para FS. Todas las mutantes resistentes a estrés osmótico seleccionadas en FCA, resultaron se sobre productoras en FS y en FL (tabla 6.31).

Tabla 6.31. Proporción de las mutantes seleccionadas por el método de selección racional (resistencia y producción en FCA) que resultaron sobre productoras en FS.

Resistentes a Estrés	Número de Mutantes	Sobre productoras en FS	Proporción (%)
Oxidativo	13	6	46.15
Osmótico	3	3	100
Mixto	3	2	66.7

Los incrementos en la producción de lovastatina en FS de las mutantes resistentes a estrés osmótico y mixto fueron moderados, es decir entre 10 y 15.6%. Fue más conveniente aislar mutantes resistentes a estrés oxidativo, ya que presentaron mayores incrementos en la producción de lovastatina por FS, 37.5, 45.4 y 62% (tabla 6.32).

Lo anterior se confirma con el hecho de que las cinco más altas productoras de lovastatina obtenidas en esta tesis son resistentes a estrés oxidativo. Esto indica, una relación del estrés oxidativo con la producción de lovastatina en FS (Tabla 6.32).

Dos de las mutantes sensibles a estrés osmótico, (que presentaron las más bajas producciones en FCA), presentaron también las más bajas producciones en FS, con decrementos en la producción de más del 60%. Estos datos indican que la resistencia a estrés oxidativo es favorable para la producción de lovastatina en FS; mientras que la sensibilidad se refleja en una mala producción de lovastatina en FS. Las demás mutantes sensibles presentaron decrementos de entre el 20% y el 32%, con respecto a la cepa parental (tabla 6.23 y 6.24).

Tabla 6.32. Las mejores mutantes productoras de lovastatina en FS, su origen y su desempeño en FL. Incremento en la producción de lovastatina, con respecto a la cepa parental (FS y FL).

Mutante	FS	FS	FL
	Lovastatina ($\mu\text{g/gss}$)	Incremento (%)	Incremento (%)
Parental	17,212		
OXRC 9	27,890	62.0	-55.4
OXRB 28	25,028	45.4	8.5
OXRA 14	23,660	37.5	-53.4
MR 6	21,706	26.1	65.7
OXRB 25	19,986	16.1	-1.5

Un indicio más de que para la FS, es indispensable la resistencia al estrés oxidativo y osmótico, para alcanzar altos niveles de producción de lovastatina. Mientras que, para la FL es más importante la resistencia al estrés osmótico. Esta fue una diferencia muy clara entre la FS y FL, para la producción de lovastatina bajo las condiciones de este estudio.

La resistencia a estrés osmótico, está involucrada en la producción de lovastatina en FL, mientras que la sensibilidad a estrés osmótico, es un factor que afecta la producción de

lovastatina. La resistencia al estrés oxidativo no fue favorable para obtener mutantes sobre productoras en FL, ya que las peores productoras de lovastatina en FL, fueron las mutantes resistentes a estrés oxidativo (tabla 6.30 y 6.32).

En lo que respecta a la FS, encontramos que existe una relación del estrés oxidativo con la producción de lovastatina. De las 11 mutantes sobre productoras 8 son resistentes a estrés oxidativo. Las mutantes sensibles a estrés oxidativo, resultaron ser malas productoras de lovastatina en FS. La sensibilidad al estrés osmótico también es un factor importante para seleccionar mutantes sobre productoras de lovastatina, debido a que este factor es el que afectó de manera más fuerte la producción de lovastatina en FS (tabla 6.32).

Otra diferencia entre la FL y FS, seis de las siete mejores productoras de lovastatina en FL, también lo son en FS (tabla 6.29); a diferencia de que sólo dos de las mejores cinco productoras de lovastatina en FS, también lo son en FL (tabla 6.32).

Tabla 6.33. Efecto del tipo de selección de mutantes, sobre la producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA), fermentación sólida (FS) y fermentación líquida (FL). Incrementos en la producción con respecto a la cepa parental.

Tipo Mutante	FCA Sobre productoras (%)	FS Sobre productoras (%)	FL Sobre productoras (%)
Parental			
OxRA	56.57	33.3	0
OxRB	44.06	57.1	28.57
OxRC	52.54	33.3	0
OsR	46	100	100
MR	43.96	66.6	100

* OXRA, mutantes resistentes a estrés oxidativo (paraquat). OXRB, mutantes resistentes a estrés oxidativo (H₂O₂, esporas). OXRC, mutantes resistentes a estrés oxidativo (H₂O₂, micelio en trofofase). OSR, mutantes resistentes a estrés osmótico. MR, mutantes resistentes a estrés mixto (NaCl + Paraquat).

Las mutantes resistentes a estrés oxidativo, presentaron las más altas producciones de lovastatina en FS y FCA, pero no presentaron un buen desempeño en FL. Las mutantes OXRB, presentan sobre producción en los tres tipos de fermentación. Mientras que, para la

selección de mutantes sobre productoras de lovastatina por resistencia osmótica, se observó que el 100% de estas mutantes resultaron ser sobre productoras en ambos sistemas y las mutantes con resistencia mixta, sólo lo fueron para la FL (tabla 6.33).

6.24.1. Actividad enzimática para catalasa y súper óxido dismutasa en FS y FL..

El cuanto al comportamiento de las actividades enzimáticas, se encontró que existen comportamientos diferentes de las enzimas CAT y SOD para la FS y FL. Se observó mayor actividad CAT y menor actividad SOD en FL que en FS, con algunas excepciones, las mutantes sensibles OXSA 9 y OXSA 36 y OSS 13; además de las mutantes resistentes OXRB 26, OXRC 9 y la MR 11 (figura 6.21 y 6.22).

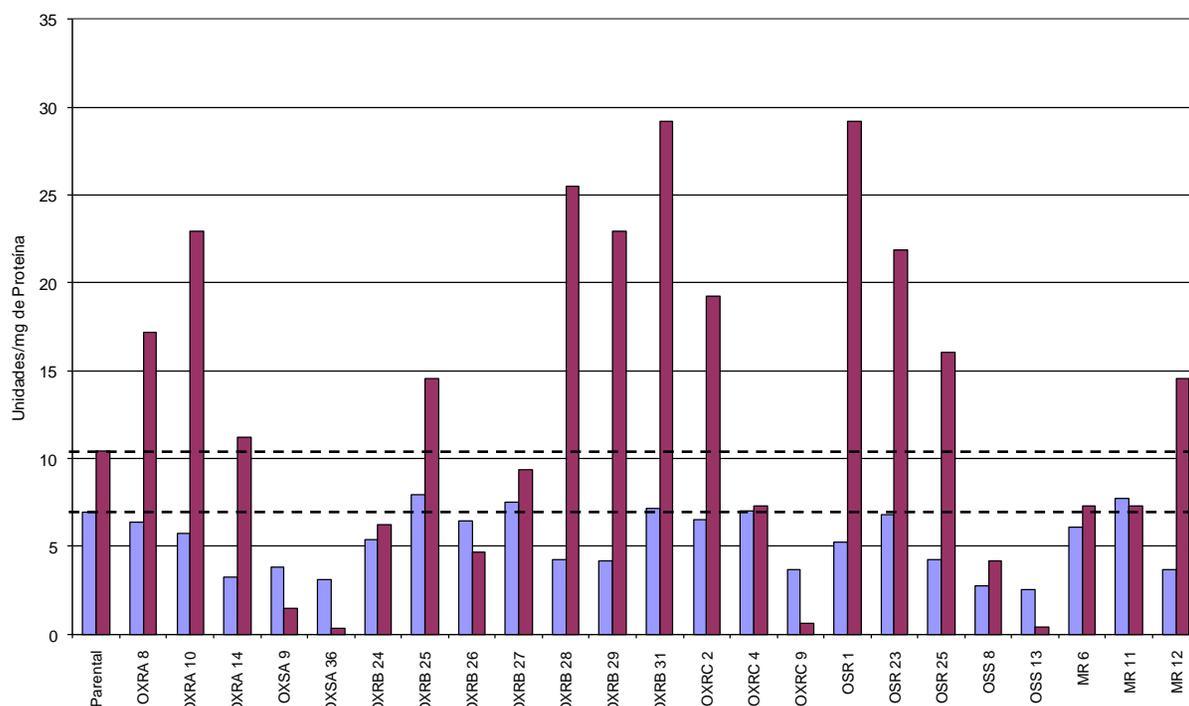


Figura 6.21. Actividad de catalasa en fermentación sólida ■ y fermentación líquida ■, para las mutantes resistentes a estrés osmótico, oxidativo, mixto y de las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo.

Por otro lado, con respecto a la actividad SOD, esta fue mayor que la actividad CAT en FS que en FL, a diferencia de lo observado para la actividad CAT en FS y FL (figura 6.21 y 6.22) Siendo esta otra diferencia entre la FS y la FL, para producir lovastatina bajo las condiciones de éste estudio.

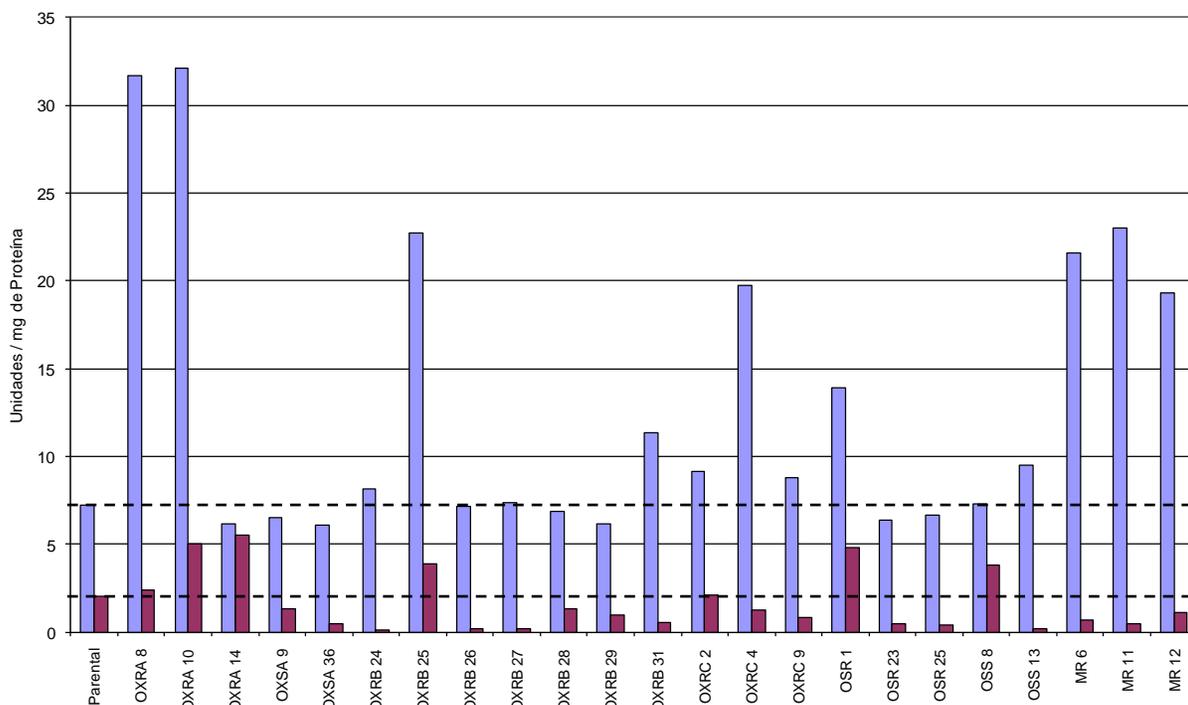


Figura 6.22. Actividad de la súper óxido dismutasa en fermentación sólida ■ y fermentación líquida ■, para las mutantes resistentes a estrés osmótico, oxidativo, mixto y para las mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo.

Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio, no se encontró una relación entre la alta producción de lovastatina y el comportamiento de las enzimas CAT y SOD, lo que nos hace suponer que están involucrados otros factores en la producción de lovastatina, probablemente a nivel de transcripción de genes.

7. Discusión

7.1. Extracción de lovastatina de la espuma de poliuretano y del bagazo de caña.

La extracción de los metabolitos secundarios es una de las etapas más importantes dentro de la producción de estos metabolitos, debido a que de esta etapa se desprende la cuantificación, un mal proceso de extracción nos puede conducir a una subestimación de la producción de cualquier metabolito, bajo las condiciones de producción que sean.

Para poder seleccionar un método de extracción, probamos tres niveles de lovastatina (10,000, 1,000 y 10 $\mu\text{g/ml}$), un nivel alto, intermedio y uno que se considero bajo. Estas concentraciones de lovastatina se adicionaron al medio de producción y se impregnó a los soportes (PUF y bagazo de caña).

Xu y colaboradores (2002), proponen que la adición de un solvente orgánico al agua, modifica la solubilidad de ambas formas de lovastatina. Casas-López y colaboradores (2002), proponen una mezcla de acetonitrilo:agua 1:1 v:v para realizar las diluciones de las muestras provenientes del caldo de cultivo de la fermentación líquida. Basándonos en lo anterior, propusimos modificar el solvente de extracción propuesto por Szakács (acetonitrilo), al adicionarle agua al acetonitrilo (1:1 v:v) y lo que obtuvimos fue un aumento en los porcentajes de recuperación de la forma β -hidroxiácida de la lovastatina.

Se seleccionó el solvente de extracción (ACN:agua 1:1 v:v) que fue el que presentó los más altos porcentajes de recuperación (96, 95% y 60%), para los tres niveles de lovastatina adicionados. Las medias de ambos métodos de extracción, resultaron ser significativamente diferentes entre sí ($\alpha= 0.001$), seleccionando así el método de extracción de lovastatina de las fermentaciones (FS y FL).

Por otro lado, en cuanto al bagazo de caña, el método modificado (ACN:agua 1:1 v:v) sólo resultó ser significativamente diferente de los dos superiores (alto y medio), mientras

que para el nivel bajo de lovastatina (10 μg / ml) la diferencia no fue significativa ($\alpha = 0.1$), en cuanto a las concentraciones de lovastatina utilizadas para evaluar el proceso de extracción.

Con base en las diferencias observadas en los niveles de recuperación de lovastatina, se decidió utilizar el método de extracción que utiliza como solvente acetonitrilo: agua 1:1 v/v.

7.2. Cuantificación de lovastatina por HPLC.

Para establecer un método de cuantificación de lovastatina, se montaron dos métodos cromatográficos, uno propuesto por Szakács (1998) y el otro por Casas-López y col. (2003), modificado para este estudio. Ambos métodos nos permitieron detectar las dos formas (β -hidroxiácida y lactona) de la lovastatina proveniente de las fermentaciones (FS y FL).

Las diferencias en los tiempos de retención, de 4.6 minutos para el método propuesto por Szakács y col. y de 2.2 minutos para el Casas-López y col. modificado, atribuible a la diferencia en la composición de la fase móvil, 50:50 y 60:40 acetonitrilo : agua, respectivamente, permitió disminuir el tiempo de cuantificación en menos de la mitad. Si bien Morovján y col. (1997), encontraron que la lovastatina eluye en un tiempo de 4.6 minutos para la forma β -hidroxiácida y de 9.2 minutos para la forma lactona, Xu y col (2002) encontraron que la forma β -hidroxiácida eluye en un tiempo de 8.94 minutos y la forma lactona en 17.22 minutos. Long-Shant y col. (2002), utilizando una fase móvil de metanol : agua 4:1, detectan la forma β -hidroxiácida con un tiempo de retención de 13.5 minutos.

Con base en las diferencias mostradas de los tiempos de retención de la forma β -hidroxiácida (forma en la que *Aspergillus terreus* excreta la lovastatina), se seleccionó el método cromatográfico propuesto por Casas-López y col. (modificado para este estudio, cambio en la composición (60:40 ACN:agua) y velocidad del flujo en el flujo del solvente (1.5 ml/min), para realizar las cuantificaciones de los productos de las fermentaciones, FS-PUF (FS sobre espuma de poliuretano) y FS-BAG (FS sobre bagazo de caña); así como también para las muestras provenientes de FL.

7.3. Estableciendo condiciones de inicio para la FS sobre espuma de poliuretano.

Las condiciones iniciales para la producción de lovastatina en FS-PUF, se basaron en nuestra experiencia previa en FS en bagazo: concentración del medio 2X (Domínguez y col., 2000), contenido de humedad inicial de 80% y la tasa de aireación de $0.08 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tomasini y col., 1997), con un tamaño de inóculo de 1×10^8 esporas/ml (Casas-López y col., 2003), dicha experiencia nos permitió encontrar y comparar el perfil de producción de éste metabolito utilizando como soporte inerte artificial la espuma de poliuretano.

Bajo éstas condiciones obtuvimos una producción de $5,500 \text{ } \mu\text{g/gss}$ en cinco días, que fue 3.57 veces superior a la reportada por Szakács y col. (1998) utilizando la misma cepa.

Por otro lado el comportamiento de la cinética nos indica que, para la producción de lovastatina en los dos sistemas de producción probados (columnas y matraces aireados), las producciones son muy similares ($5,348 \text{ } \mu\text{g/gss}$ para la columna y de $5,500 \text{ } \mu\text{g/gss}$ para el matraz con recambio de aire), durante los 5 días que dura el cultivo, sin embargo los niveles de aireación son diferentes.

Fue muy importante encontrar que para ambos sistemas de producción (columnas y matraces), los niveles de producción de lovastatina fueran muy similares, siendo este el primer indicio de los bajos niveles de aireación requeridos por *Aspergillus terreus* para la producción de éste metabolito sobre espuma de poliuretano.

7.4. Efecto de la aireación sobre la producción de lovastatina.

Para determinar si la aireación tenía un efecto sobre la producción, se probaron 5 niveles de aireación. Tres niveles fueron probados en columnas, un nivel por debajo ($0.04 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y otro por encima ($0.16 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), del nivel probado en las condiciones iniciales ($0.08 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Se probaron dos niveles en matraces, uno con recambio de aire, 1 minuto una vez al día y el otro sin recambio de aire.

Valera y colaboradores (2005), utilizando una cepa de *Aspergillus flavipes*, produjeron lovastatina en FS, utilizando diferentes sustratos (bagazo, salvado de trigo, cebada y harina de soya, entre otros), así como mezclas de los mismos sustratos; además de dos tipos de reactores (uno de aireación forzada (2 l) y otro de aireación por difusión (5 l)). Los resultados indicaron que una aireación de 1-2 vvm era la mejor para producir lovastatina para el reactor de 2 l, pero que estas condiciones no eran escalables para mayores volúmenes de operación, además de que los reactores eran agitados intermitentemente. Mientras que para los reactores con sistema de difusión de oxígeno (5 l), mostraron un límite de 4 cm de espesor del sustrato dentro del reactor, y que, una cama de 10 cm de espesor era considerado el límite para la producción de lovastatina.

A diferencia de lo observado para *Aspergillus flavipes*, nuestros resultados indican que para *Aspergillus terreus*, los niveles necesarios de aireación para la producción de lovastatina, en FS-PUF son muy bajos, ya que una alta aireación forzada ($0.16 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), no permitía una buena producción de lovastatina. Por el contrario una aireación forzada moderada ($0.08 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue conveniente para la producción de lovastatina utilizando columnas. Mientras que para el estudio realizado en matraces la mejor producción se encontró en los matraces sin recambio de aire.

En lo que respecta a la FS-BAG, el efecto de la aireación se determinó bajo las mejores condiciones encontradas para la FS-PUF, y el resultado no fue muy diferente. La mayor producción de lovastatina se encontró en el nivel más bajo de aireación probado (MC), con producciones inferiores a las encontradas en la FS-PUF. Estos resultados nos indican que una baja aireación es más compatible con la producción de lovastatina, sin importar el soporte en el que se cultive a *Aspergillus terreus* (bagazo de caña o PUF).

Una diferencia observada entre nuestros resultados (FS-BAG) y lo observado por Valera y colaboradores (2005), es que la producción de lovastatina que encontraron en bagazo de caña fue de 2,730 y 2,930 $\mu\text{g/gss}$, mientras que la obtenida en este estudio utilizando también bagazo de caña, fue de 9,447 $\mu\text{g/gss}$.

Por otro lado, Novak y colaboradores (1997), encontraron que para un sistema de producción fed-batch (cultivo líquido), niveles altos de oxígeno (80%) mostraban bajos niveles de producción comparado con el reactor (15 l) que contenía niveles medios de oxígeno disuelto (70%). Long-Shant y colaboradores (2002), encontraron que niveles de aireación por encima del 60% del oxígeno disuelto inhiben la síntesis de lovastatina en reactores de 5 l, alcanzando sólo concentraciones de lovastatina de 66 µg/ml. Casas-López y colaboradores (2005), encontraron que con agitaciones bajas (300 y 600 rpm) se obtenían mayores concentraciones de lovastatina (80 µg/ml y de 30 µg/ml, respectivamente) en comparación con las obtenidas a agitaciones altas (800 rpm, 25 µg/ml), lo que representa menos del 30% de los 230 µg/ml obtenidos en 2003. Lo que es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, una baja aireación es más compatible con la producción de lovastatina para ambos sistemas de fermentación (FS y FL).

Otro punto importante fue el contenido de humedad final, para la FS-PUF en columnas se observó un decremento de entre 1 y 3%, comparada con la ganancia que se observó en los matraces de entre 2 y 4%. Esto puede ser la explicación de haber encontrado una menor producción de lovastatina utilizando columnas (6,300 µg/gss), comparada con la mejor producción obtenida en matraces (7,500 µg/gss).

7.5. Efecto del contenido de humedad inicial y la concentración del medio sobre la producción de lovastatina.

El primer indicio del papel que juega el contenido de humedad sobre la producción de lovastatina, lo observamos al probar el efecto de la aireación. En los matraces en los que mejor se conservó la humedad se alcanzaron niveles más altos en la producción de lovastatina.

Xu y colaboradores (2002), probaron 5 contenidos de humedad inicial (53.78, 61.11, 64.35, 71.56 y 77.59) sobre la producción de Monacolin K (lovastatina) utilizando *Monascus sp.* 9901, y encontraron que para la humedad más baja, utilizando como sustrato arroz, presentó un crecimiento muy pobre y que el sustrato se observaba muy seco, además no

hubo producción. Para la humedad de 64.35, presentó un excelente crecimiento y la mejor producción de lovastatina (9,108 $\mu\text{g/gss}$). Para los contenidos mayores de humedad, el crecimiento fue muy pobre así como también lo fue la producción (1,958 $\mu\text{g/gss}$).

Por otro lado Domínguez y colaboradores (2000) encontraron que, para la producción de penicilina, los contenidos de humedad inicial para alcanzar la producción más alta, se encontraban alrededor de 80%, que es la máxima capacidad de retención (78%, este estudio), que presentó el bagazo de caña.

En esta tesis, se probó el efecto conjunto del contenido inicial de humedad y la concentración del medio (matraces con recambio de aire), así como el efecto de la concentración del medio (matraces con recambio y sin recambio de aire). Se encontró que el contenido de humedad inicial juega un papel muy importante en la producción de lovastatina, ya que a medida que se incrementa el contenido de humedad inicial (hasta alcanzar la máxima capacidad de retención para el soporte), también lo hace la producción de lovastatina en FS-PUF. Así se encontró que para el contenido de humedad inicial de 75% y concentración de medio 2X, la producción fue de 4,671 $\mu\text{g/gss}$, mientras que para el mayor contenido de humedad inicial (85%) y una concentración de medio 2.5X, la producción alcanzó un máximo en la producción de 12,958 $\mu\text{g/gss}$.

El efecto del contenido de humedad inicial se reflejó claramente sobre la producción de lovastatina en FS-PUF, ya que la producción aumentó de 4,671 $\mu\text{g/gss}$ para la humedad de 75%, hasta 9,748 $\mu\text{g/gss}$ para la humedad inicial de 85%. El efecto de la concentración del medio de cultivo no repercutió de manera directa sobre la producción, sino sobre la generación de la concentración de biomasa que pasó de 17 mg/gss a 26 mg/gss.

Al estudiar la concentración del medio en las fermentaciones sobre matraces con y sin recambio de aire en FS-PUF, se observó como la concentración del medio y el recambio de aire en los matraces, afectó de manera directa la producción de la biomasa, pero no así la producción de lovastatina.

Al aumentar la concentración del medio para los MA (matraces con recambio de aire) de 1.5 a 4.5X, se incrementó la concentración de biomasa, de 25 a 32 mg/gss, pero no fue así con la producción de lovastatina. Sin embargo se encontró una máxima producción de lovastatina (17,450 μ g/gss) en la concentración de 2.5X.

Para los matraces sin recambio de aire (MC), se encontró que la biomasa no presentó un incremento significativo ($\alpha=0.1$), ya que para las concentraciones de medio probadas (2X a 4X) la menor concentración de biomasa fue de 23.57 mg/gss y la mayor de 25.1 mg/gss. Mientras que para la producción de lovastatina se observó un incremento significativo para las concentraciones mayores a 2X, encontrándose la máxima producción (19,950 μ g/gss) a una concentración de 2.5X en FS-PUF.

7.6. Efecto de la adición de glucosa al medio de producción.

Para la producción de lovastatina se ha utilizado como fuente principal de carbono lactosa (Szakács y col. 1998, Casas-López y col, 2003, 2004, 2005), glicerol (Manzoni y col 1998, 1999) y glucosa (Xu y col., 2002, Hajjaj y col., 2001, Novak y col, 1997), entre otras fuentes de carbono. Sin embargo, se ha visto (Ruijter y col., 2005), que existe represión catabólica para la producción de este metabolito por glucosa. Hassan y colaboradores (2001), encontraron que, para concentraciones de glucosa de 20 g/l se obtenían 37 μ g/ml de lovastatina y para una concentración de 45 g/l de glucosa, la producción de lovastatina disminuyó a 35 μ g/ml y para una concentración de 70 g/l de glucosa la producción de lovastatina se encontró por debajo de los 2 μ g/ml en un medio químicamente definido en FL. En nuestro caso, la adición de 10 g/l y 15 g/l de glucosa, se reflejó en un incremento de la producción de lovastatina de entre 9 % y 10 %, con respecto al medio que no contenía glucosa, pero en FS.

7.7. Efecto de la densidad del poliuretano sobre la producción de lovastatina.

La espuma de poliuretano ha sido utilizada para estudiar la producción de diferentes enzimas (Fujishima y col., 1972; Kobayashi y col., 1991; Zhu y col., 1994, 1996; Romero-

Gómez y col., 2000), con buenos rendimientos en la producción. Tomasini y colaboradores (1997) utilizaron espuma de poliuretano de baja densidad para la producción de metabolitos secundarios (ácido giberélico) y encontraron que solo una muy pequeña cantidad de medio líquido se encontraba en los ángulos que forman los poros del PUF, mientras que la mayoría de los poros estaban completamente vacíos.

En este trabajo se observó que la densidad del PUF estimula la producción de lovastatina relacionada con la capacidad de retención de medio líquido que muestra el PUF a las diferentes densidades. La menor producción de lovastatina (6,430 $\mu\text{g/gss}$), se encontró con el PUF de menor densidad (13 kg/m^3), que presentó la menor capacidad de retención, y por lo tanto, el menor contenido de humedad inicial (75%). El PUF de mayor densidad (24 kg/m^3), presentó una producción de 9,620 $\mu\text{g/gss}$, con un contenido de humedad inicial de 80%.

Las mejores producciones se encontraron para el PUF de 17 y 20 kg/m^3 de densidad, con una diferencia de 2,000 $\mu\text{g/gss}$ de lovastatina más para el PUF de 20 kg/m^3 . Para estas densidades se observó una capacidad de retención muy similar y por lo tanto, se probaron con el mismo contenido de humedad inicial (85%). Si comparamos las producciones específicas observamos que, para el PUF de 20 kg/m^3 se obtuvo el doble de la producción específica (634 vs 320 μg de lovastatina/mg de biomasa), observada para el PUF de menor densidad (13 kg/m^3). Al parecer, el estímulo causado por el tamaño de poro atribuido a la densidad del PUF fue mayor que el que propició la capacidad de retención sobre la producción de lovastatina.

7.8. Comparación de los sistemas de producción: FL vs FS (FS-BAG y FS-PUF).

En este estudio, la producción de lovastatina en FS-PUF (19,950 $\mu\text{g/gss}$), es la más alta reportada para *Aspergillus terreus* por FS, además que es el primer estudio realizado sobre PUF de alta densidad para la producción de metabolitos secundarios, en particular de lovastatina. Si bien la producción de lovastatina por *Aspergillus flavipes* (Valera y col., 2005), presenta una alta producción (16,650 $\mu\text{g/gss}$), es tan sólo del 83% de la obtenida en este estudio.

En lo que respecta a la producción de lovastatina en FS-BAG, 9,447 $\mu\text{g/gss}$, obtenida en este estudio es de 3.22 veces más que la reportada (2,930 $\mu\text{g/gss}$), por Valera y colaboradores (2005) utilizando *Aspergillus flavipes*.

Para la FL, Manzoni y colaboradores (1999) en 21 días de cultivo, obtuvieron 256 $\mu\text{g/ml}$ y 235 $\mu\text{g/ml}$ de lovastatina, utilizando *Aspergillus terreus*. Casas-López y colaboradores (2003), reportaron que *Aspergillus terreus* produce 326 $\mu\text{g/ml}$ al modificar la relación C:N del medio de cultivo; también reportaron una producción de 230 $\mu\text{g/ml}$ optimizando los componentes del medio de cultivo (Casas-López y col., 2004) y de 80 $\mu\text{g/ml}$ al estudiar la morfología de *Aspergillus terreus* en fermentación líquida en 2005.

Hajjaj y colaboradores (2001) utilizando un medio de producción químicamente definido, produjeron 220 $\mu\text{g/ml}$ en 13 días de cultivo. Bizukocjc y colaboradores (2006), reportaron que, adicionando vitaminas del grupo B al medio de cultivo, produjeron 55 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo de 7 días.

En este estudio, utilizando el medio de cultivo propuesto por Szakács y colaboradores (1998) modificado, se obtuvo una producción de 570 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo de 7 días en FL, producción que se encuentra por encima de las reportadas para *Aspergillus terreus*.

Por otro lado, se mostró en este estudio que en FS, la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus* utilizando PUF fue de 2.11 veces más que la observada para la FS-BAG y de 35 veces más que la obtenida por FL. Mientras que para el bagazo de caña la producción es de 16.5 veces más que la observada en FL.

Barrios- González y colaboradores (2008) encontraron que la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de lovastatina, en particular *lovE* y *lovF* se expresan de manera diferencial al realizar el cultivo en FL y en FS-PUF. El gen *LovE* presenta niveles de expresión de 4.6 veces más en FS que los observados para la FL. Mientras que para el gen *lovF*, la transcripción es 2 veces más alta en FS-PUF que la expresión observada en FL.

Esta pudiera ser una explicación del por qué se presentan diferencias tan importantes en ambos sistemas de producción.

Barrios-González & Mejía (1996) proponen que, las características que permiten a un hongo adaptarse mejor al medio sólido no se conocen, pero hay diferencias muy claras entre la FL y FS. En FS, generalmente se requiere mayor concentración de nutrientes en el medio, generando mayor presión osmótica. Otra diferencia es que en FL, una pequeña porción de oxígeno, puede solubilizarse en el medio acuoso, y es así como llega al microorganismo; mientras que en FS hay una corriente constante de aire húmedo, que está en contacto directo con el micelio, lo que hace pensar que, en FS, se presentan condiciones especialmente difíciles de estrés oxidativo. Con base en esto se decidió estudiar si estas condiciones de estrés osmótico y/u oxidativo, son imperativas para la producción de lovastatina en FL y en FS-PUF, por lo que se generaron mutantes resistentes y sensibles a estos tipos de estrés.

7.9. Generación de mutantes: Dosis mínima inhibitoria.

Este es el primer trabajo en *Aspergillus terreus*, en el que se estudió la resistencia a diferentes tipos de agentes que causan estrés osmótico, estrés oxidativo y la combinación de estos (estrés mixto). Además se estudió esta resistencia en diferentes fases de crecimiento (esporas, micelio en trofofase y micelio en idiofase), así como también la selección de mutantes sensibles a estrés osmótico y oxidativo.

En un primer intento, por determinar el compuesto a utilizar para generar el estrés osmótico, encontramos que *Aspergillus terreus* presenta una buena capacidad para contender con altas concentraciones de glucosa, manitol, sorbitol, PEG y NaCl. Una condición de estrés hiperosmótico, se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo (Folch-Mallol y col, 2004). Estudios en *Aspergillus oryzae* (Ishida y col, 2000), *Aspergillus nidulans* (Beever y col, 1986) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ölz y col, 1993 y Norberck y col, 1996); encontraron que las respuestas de estos hongos al estrés osmótico, era a través de la generación de compuestos denominados solutos compatibles (manitol, glicerol, eritritol, entre otros) al interior de la

célula. Probablemente éste fue el principal problema para poder determinar la DMI (dosis mínima inhibitoria), ya que la mayoría de los compuestos probados como agentes estresantes, son utilizados por el hongo como solutos compatibles, excepto la glucosa, que es utilizada como precursor para la formación de solutos compatibles.

La alta resistencia mostrada por *A. terreus* al NaCl, resultó interesante, ya que para *A. nidulans*, se ha reportado una resistencia de 0.6M (Vargas-Pérez y col, 2007). Para *S. cerevisiae*, la mayor concentración reportada es de 1.4M (Ölz y col, 1993); mientras que la resistencia observada para *A. terreus* (este estudio), fue de 3M de NaCl. Este fue el primer indicio de la alta capacidad de *A. terreus* para contender con el estrés osmótico.

En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que la biosíntesis del glicerol (solute compatible), está regulada a nivel transcripcional principalmente por la vía de HOG (High Osmolarity Glicerol) (Albertyn y col, 1994 y Larsson y col, 1993). Esta vía se activa principalmente bajo condiciones de estrés hiperosmótico y regula la transcripción de genes de respuesta a estrés, muchos de los cuales a su vez se inducen por la vía general de respuesta a estrés (Causton y col, 2001 y Gasch y col, 2000).

Las células aerobias han desarrollado estrategias para la defensa en contra del daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ERO's), estas defensas incluyen enzimas, tales como catalasa, peroxidada y súper óxido dismutasa; también se encuentran involucradas moléculas no enzimáticas como los antioxidantes, ejemplos de ellos el ascorbato y el tocoferol (Sigler y col, 1999).

En cuanto a la resistencia al H₂O₂ mostrada por *A. terreus* en las tres fases de crecimiento, se encontraron diferencias muy marcadas entre estas. Para las esporas, la DMI fue de 180 mM, mientras que para el micelio en trofofase fue 6.6 veces más que la resistencia encontrada para las esporas (1200 mM). Para el micelio en idiofase la resistencia al estrés oxidativo fue todavía mucho mayor (1800 mM), comparado con las otras dos fases, esto es, la resistencia fue de 10 veces más a la encontrada para las esporas y de 1.5 veces más que la encontrada para el micelio en trofofase. Siendo estas concentraciones las más altas reportadas, para las que un hongo pueda contrarrestar el efecto nocivo causado por el H₂O₂.

Probablemente, una explicación a esta alta resistencia, es la fase de crecimiento en la que se encuentran, es decir, para el micelio en trofofase (36 horas) la maquinaria enzimática no está desarrollada completamente, y esto, de alguna manera pudo disminuir la capacidad de contender con el estrés, mientras que para el micelio en idiofase (48 horas), que es una fase de estrés nutricional, estos complejos enzimáticos que ayudan a contrarrestar los efectos nocivos del H₂O₂, se encuentran en mayor cantidad que los presentes en la fase de esporas, además que en esta etapa (esporas), la mayor actividad de catalasa esta predominantemente realizada por CAT 1. Además que, se ha visto en *A. nidulans*, la existencia de hasta cuatro grupos de catalasas (Kawasaki y col, 1997, 2001) y la presencia de peroxidasas (Valenciano y col, 1998), para ayudar a contrarrestar el efecto tóxico de las ERO's.

En lo que respecta al paraquat, la resistencia encontrada fue de 7mM, para alcanzar la inhibición del crecimiento en placas de PDA. Angelova y colaboradores (2005), encontraron una disminución de entre el 40% y un 60% del número de esporas formadoras de colonias, al ser tratadas con 5 mM de paraquat, esto para algunos hongos filamentosos tales como: *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum* y *P. roquefortii*, entre otros. Esta resistencia al paraquat reportada para estos hongos filamentosos es muy cercana a la encontrada para *Aspergillus terreus* en este estudio.

7.10. Morfología de las mutantes seleccionadas.

Se ha visto que, los cambios en la morfología de los cultivos de los hongos filamentosos, puede influenciar de manera determinante la formación del producto, además que muchos procesos fúngicos requieren un tipo particular de morfología para obtener altos rendimientos del metabolito (Casas-López y col, 2005; Amanullah y col, 2002; Pazouki y col, 2000; Schügerl y col, 1998). No solo la macro morfología es de importancia con respecto a la formación de productos en los hongos filamentosos, la formación del metabolito es también dependiente de la diferenciación de las hifas, las que generalmente están asociadas con la producción de metabolitos secundarios (Casas-López y col, 2005; Paul y col, 1996).

Otros estudios indicaron que las mutaciones en los genes relacionados en la respuesta al estrés osmótico y oxidativo, resultan en cambios en la morfología de las colonias y sensibilidad o resistencia al estrés (Kawasaki y col, 2002, 2007; Furukawa y col, 2005; Siderius y col, 2000). Los cambios en la morfología es un método que los hongos pueden utilizar para disminuir el estrés oxidativo (Hansberg y col, 1990; Toledo y col, 1994). Al realizar una mutagénesis al azar, como fue nuestro caso, se presentaron una gran variedad de mutaciones, que pudieron ser simples o múltiples, estas afectaron el crecimiento de las mutantes, en algunos casos en el tamaño de la colonia y en otros en la forma, con respecto a la cepa progenitora.

Kawasaki y col., (2007) y Hagiwara y col. 2007), trabajaron con *A. nidulans* y construyeron mutantes con deleciones simples y dobles en los genes reguladores de respuesta a estrés osmótico y estrés oxidativo (*sskA* y *rrkA*); estas mutantes al ser sometidas a estrés osmótico (0.8M KCl y 1M sorbitol) u oxidativo (H_2O_2 y menadiona) presentan cambios en la morfología, menor tamaño para el estrés osmótico y mayor tamaño para el estrés oxidativo, con respecto a la cepa parental. También mostraron retardos en el tiempo de esporulación para ambos tipos de estrés. Estos resultados son congruentes con algunos de los crecimientos observados para las mutantes de esta tesis, las mutantes sensibles a estrés oxidativo presentan un crecimiento similar a las mutantes generadas por Kawasaki y col y Hagiwara y col (2007).

Las mutantes seleccionadas con paraquat, presentaron un crecimiento de micelio algodonoso, el cual se hace más notable en las mutantes sensibles a este tipo de estrés, pero de menor tamaño que la cepa parental. Las mutantes resistentes seleccionadas para estrés oxidativo, pero con resistencia al peróxido de hidrógeno, presentaron mayor crecimiento radial que el observado para la cepa parental, pero conservaron el crecimiento algodonoso presente sólo en las mutantes seleccionadas por estrés oxidativo.

7.11. Fermentación en cilindro de agar (FCA).

Un primer indicio, de que la alta producción de lovastatina por *A. terreus*, está relacionada con el estrés oxidativo, es el comportamiento poblacional de la producción de lovastatina por FCA, de las nueve poblaciones estudiadas (mutantes resistentes, sensibles, mutantes sin selección y la cepa parental), las tres mejores medias poblacionales de producción de lovastatina (0.5494 μg , 0.5144 μg y 0.493 μg), están relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo (PQ, H_2O_2 (esporas), H_2O_2 (micelio en trofofase)).

Otro indicio, de que la resistencia al estrés oxidativo, está relacionada con la alta producción de lovastatina, es que de las 10 mejores mutantes resistentes, productoras de lovastatina en FCA, ocho de estas, corresponden a mutantes seleccionadas por resistencia a estrés oxidativo; una mutante con resistencia mixta (seleccionada también, por resistencia a estrés oxidativo) y una más con resistencia a estrés osmótico. Esto indica además que, la fisiología del hongo en FCA se parece más a la mostrada por *Aspergillus terreus* en FS.

Otro punto que es importante resaltar es que, los incrementos en la producción de lovastatina por FCA, para las mutantes resistentes a estrés oxidativo, osmótico y mixto, van desde 1.23 veces más, hasta 4.35 veces más con respecto a la producción observada para la mejor mutante sin selección productora de lovastatina en FCA. Lo que corresponde a una producción por cilindro de agar, para la mejor mutante resistente, (OXRA 10, resistente a paraquat), de 374 μg de lovastatina, comparados con los 84 μg de lovastatina para la mejor mutante sin selección y de 86 μg de lovastatina por cilindro de agar para la cepa parental.

7.12. Fermentación Líquida (FL).

Los resultados indicaron una clara relación entre la resistencia al estrés osmótico y la biosíntesis de lovastatina en FL. La selección por estrés osmótico y mixto (seguida por selección por FCA) tuvo una excelente eficiencia para seleccionar mutantes hiperproductoras de lovastatina en cultivo líquido. El 100 % de las mutantes seleccionadas fueron sobre

productoras en FL, con incrementos importantes del 43% hasta un 80.9%. Este último fue el mayor incremento en FL, mostrado por la mutante OSR 23, la cual produjo 837 μg de lovastatina/ml.

El hecho de que el sistema de selección racional desarrollado, en la variante de resistencia a estrés osmótico, es muy eficiente para desarrollar mutantes para FL, es también evidente cuando se considera que las dos mejores productoras en FL son mutantes resistentes a estrés osmótico. Además, de las 7 mejores productoras en FL, 3 son resistentes a estrés osmótico, 3 mutantes resistentes a estrés mixto (que incluye el estrés osmótico). En general, estos resultados indican que la resistencia a estrés osmótico le da al hongo alguna ventaja para lograr altas producciones de lovastatina en medio líquido.

Las mutantes sensibles a estrés osmótico presentaron ligeros decrementos en la producción en FL (no significativos) o prácticamente no mostraron diferencia con la parental (como la mutante OSS 8).

En contraste, se encontró una relación inversa entre el estrés oxidativo y la biosíntesis de lovastatina en FL. Los resultados mostraron que la selección por resistencia a estrés oxidativo no fue efectiva para seleccionar mutantes sobre productoras para medio líquido. Sólo una de las trece mutantes seleccionadas por resistencia a estrés oxidativo presentó un incremento significativo en la producción de lovastatina en FL. Asimismo, la mayoría (70%) de las mutantes resistentes a estrés oxidativo mostraron fuertes disminuciones, mayores a 43%, en la producción de lovastatina en FL. Por esto, las diez peores productoras en FL corresponden a las mutantes resistentes a estrés oxidativo.

Recientemente, Miranda y col (2007) encontraron en *A. terreus*, un período hiperoxidante que precede el inicio de la idiofase; y que este es más corto pero más intenso en FL, en relación al observado en FS. Es posible que estas diferencias en el período hiperoxidante estén relacionadas con la diferencia en producción. Esto porque sus resultados también sugieren que este estado oxidante tiene una función señalizadora para los genes de biosíntesis de lovastatina (Miranda et al. Manuscrito en preparación) Es posible que la resistencia al estrés oxidativo en las mutantes modifique (reduzca) en tiempo o en magnitud este estado.

Por otro lado, la sensibilidad a estos estreses (osmótico y oxidativo) no afectó en forma importante la producción de lovastatina en FL, lo cual contrasta con la situación en FS (ver más adelante).

En relación a la FS, Barrios-González y col (1993) demostraron que las cepas sobre productoras de metabolitos secundarios desarrolladas para FL generalmente no son buenas productoras en FS. Esto mostró la urgente necesidad de desarrollar métodos y estrategias de mejoramiento genético para generar cepas especiales para FS (Barrios-González & Mejía, 2007). Sin embargo, son muy pocos los métodos específicos que se han desarrollado. En ese sentido es importante que el método de selección racional propuesto en esta tesis puede generar cepas especiales para FS.

Los resultados indicaron que todos los métodos (resistencia a estrés Osmótico, Oxidativo o Mixto) fueron bastante efectivos para seleccionar sobre productoras para FS. Sin embargo, aunque pareciera más conveniente aislar mutantes resistentes a estrés osmótico o mixto, los incrementos en producción de lovastatina en FS de estas mutantes fueron moderados, es decir entre 10 y 15.6%. En contraste, los incrementos mostrados por las mutantes resistentes a estrés oxidativo fueron mayores, obteniéndose mutantes con incrementos de 37.5, 45.4 y 62%.

Las cinco mejores productoras de lovastatina (sobre productoras) en FS provinieron del grupo de mutantes resistentes al estrés oxidativo. De hecho, la mejor mutante (OXRC 9) presentó una producción de 27,890 $\mu\text{g/gss}$. Este representa el más alto nivel de producción para cualquier metabolito secundario obtenida en cualquier tipo de FS (Barrios-González & Mejía, 2007).

La importancia de la resistencia al estrés oxidativo en FS se confirmó con las mutantes sensibles a estrés oxidativo, las cuales mostraron fuertes disminuciones en producción en FS (de hasta 58%), pero no en FL.

La efectividad del método de selección racional (variante resistencia a estrés oxidativo) para la obtención de mutantes sobre productoras especiales para FS, resultó en

un 46% de mutantes sobre productoras de lovastatina en FS. En contraste, sólo el 15% resultaron ser sobre productoras en FL.

Estos datos demuestran una clara relación entre el estrés oxidativo y la producción de lovastatina en FS. Los resultados sugieren que en la FS los microorganismos enfrentan a un mayor estrés oxidativo (que en FL) y que éste está relacionado de alguna manera con la mayor producción de lovastatina en este sistema.

Se midió la actividad de de las enzimas defensivas de estrés oxidativo (catalasa y superóxido dismutasa) en la cepa parental y en las mutantes, tanto en FS como en FL. Aunque era previsible que las mutantes resistentes iban a tener mayor actividad de catalasa y superóxido dismutasa, y que iba a haber una relación directa entre estas actividades y la producción de lovastatina, al menos en FS, esto no fue así. Es posible que en parte se deba, a que la actividad de estas enzimas varía a lo largo del cultivo (Miranda y col., 2007) y que sólo se determinó la actividad de muestras de 24 h de cultivo.

8. Conclusiones.

- El contenido de humedad, es uno de los principales factores que estimulan la producción de lovastatina, puesto que, mientras el contenido de humedad sea alto (85% de humedad inicial), los niveles de producción de lovastatina serán altos.
- Una baja aireación es más compatible con la producción de lovastatina por fermentación en medio sólido, debido a que conserva mejor la humedad en el sistema de producción.
- La densidad del poliuretano, es otro factor importante para la producción de lovastatina por FS. La espuma de poliuretano de alta densidad (entre 17 y 20 kg/m³), estimula la producción de lovastatina, en niveles de cerca de tres veces más la producción, comparada con la observada para una espuma de poliuretano de baja densidad, y del doble de la producción presentada para un soporte natural, el bagazo de caña.
- La resistencia a estrés osmótico, es una característica necesaria, para obtener altas producciones de lovastatina por fermentación en medio líquido.

- Los altos niveles de producción de lovastatina en FS-PUF, observados para *Aspergillus terreus*, son consecuencia de la alta resistencia, que presenta el hongo al estrés oxidativo, puesto que las mejores producciones de lovastatina por fermentación en medio sólido, se da para las mutantes resistentes a estrés oxidativo.
- El método de selección racional propuesto fue muy efectivo para aislar mutantes sobre productoras de lovastatina.
- La variante de resistencia a estrés osmótico o mixto fue excelente para aislar mutantes sobre productoras de lovastatina en FL, ya que presenta un 100% de eficiencia en las mutantes seleccionadas. Además que se obtienen incrementos en las producciones de lovastatina de 40 – 80 %
- La variante de resistencia a estrés oxidativo fue mejor para aislar mutantes sobre productoras especiales para FS-PUF. Esto debido a la alta eficiencia (50%) y también por la magnitud de los incrementos en la producción obtenidos (37 – 62%).
- Existe una mayor actividad específica de la enzima catalasa, en fermentación líquida. Mientras que para la fermentación sólida, la mayor actividad es para la enzima, súper óxido dismutasa.

9. Perspectivas.

- Los resultados obtenidos en este trabajo, abren una amplia e interesante línea de investigación. Estudiar a fondo, el efecto del contenido de humedad sobre la producción de lovastatina por fermentación en medio sólido.
- Es importante, identificar de que manera la resistencia al estrés osmótico, se relaciona con una mejor producción de lovastatina en fermentación líquida.
- Estudiar la vías y/o rutas, con las que *Aspergillus terreus*, contrarresta los efectos tóxicos, de las especies reactivas de oxígeno, así como también, de que manera se relaciona la resistencia al estrés oxidativo, con la alta producción de lovastatina en fermentación sólida.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Adinarayana, K., Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Bhavani Devi, R., and Adinarayana, G., Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation, *Process Biochem.* 2003. 38: 1565-1572.
2. Angelova Maria B., Pashova Svetlana B., Spasova Boriana K., Vassilev Spassen V. y Slokoska Lyudmilla S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research.* 2005 109(2):150-158.
3. Alberts A. W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., López M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J. y Springer J. Mevinolin a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl CoA reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. 77: 3957-3961
4. Albertyn J. y Hohmann S., Prior B.A. Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr Genet.* 1994. 25: 12-18.
5. Alfred W. Alberts. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American Journal of Cardiology.* 1988. 62: 10J-15J.
6. Amanullah A., Christensen L.H., Hansen K., Nienow A.W. y Thomas C.R. *Biotechnol Bioeng.* 2002. 77:815-826.
7. Balakrishnan K. y Pandey A. Production of biologically active secondary metabolites in Solid-State Fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 1996. 55: 365-372.
8. Baños-Mejía J., Tomasini A., Szakács G. y Barrios-González J. Producción de lovastatina por fermentación sólida de dos fases con *Aspergillus terreus*. 34° Congreso Nacional de Microbiología. Agosto de 2004. Cancún, Quintana Roo, México.

-
9. Baños Mejía Jesús Gabriel., Tomasini Araceli, Szakács George. y Barrios-González Javier. Fisiología y producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida de dos fases. VI Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Octubre del 2005. Morelia Michoacán, México.
 10. Baños Mejía Jesus Gabriel, Mejía Álvarez Armando, Garay. Producción de lovastatina en fermentación solida por mutantes resistentes a estrés oxidativo. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio de 2007. Morelia, Michoacán, México.
 11. Baños Jesús G, Tomasini Araceli, Szakács George and Barrios-González Javier. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *JBB*. 2009. 108 (2): 105-110.
 12. Barrios-González, J., Baños J. G., Covarrubias A. A., and Garay-Arroyo A. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are differentially expressed in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008 79: 179-186.
 13. Barrios-González J., González H. y Mejía A. Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotech. Adv.* 1993. 11: 539-547.
 14. Barrios-González J. y Mejía A. Secondary metabolites production by solid state fermentation. *Biotechnol Annual Rev.* 1996. 2: 85-121.
 15. Barrios-González J. y Mejía A. Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites, in: A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, J.A. Rodríguez-León (eds), *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Chapter 14, springer, London/ Heidelberg. 2007. 262-296.
 16. Barrios-González J. y Miranda U. Roxana. Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. 85:869-883.
 17. Barrios-González J., Tomasini A., Viniestra-González G. y López L. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 1988. 10: 793-798.
 18. Beers R.F. y Sizer I.W: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol Chem.* 1952. 195:133-140.
 19. Beever R.E. y Laracy E.P. Osmotic Adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 1986. 168:1358-1365.
 20. Bennet J. W. *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology.* *Journal of Biotechnology.* 1998. 66: 101-107.
-

-
21. Bizukocjc M., Pawlowska B y Ledakowicz S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol.* 2007. 127: 258-268.
 22. Blomberg A. Metabolic Surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett.* 2000. 182: 1-8.
 23. Buckland B., Gbewonyo K., Hallada T., Kaplan L. y Masurekar P. Production of lovastatin, an inhibitor of cholesterol accumulation in humans. *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture elsevier.* 1989. 161-169.
 24. Casas-López J.L., Sánchez-Pérez J.A., Fernández-Sevilla J.M., Rodríguez Porcel E.M. y Chisti Y. Pellet morphology, culture reology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* 2005. 116: 61-77.
 25. Casas López J.L., Rodríguez Porcel E. M., Vilches Ferrón M. A., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J. M. y Chisti Y. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 2004a. 31 (1): 48-50.
 26. Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J. M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E. y Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb. Technol.* 2003. 33: 270-277.
 27. Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J. M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E. y Chisti Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of the response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2004b. 33: 170-177.
 28. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S. y Young R.A. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 2001. 12: 323-337.
 29. Comparación de la transcripción del gen de la IPN sintetasa de *P. chrysogenum* cultivado en fermentación líquida y en fermentación sólida. Herminio Fernández M. Maestría en Biotecnología, UAM. Concluida 1998.
 30. Chamilos G., Kontoyiannis D.P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat.* 2005 8: 344-358.
-

-
-
31. Chang Y. N., Huang J.C., Lee C.C., Shih I.L. y Tzeng Y.M. Use of surface response methodology to optimize culture medium for the production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme and Microbial Technol.* 2002. 30: 889-894.
 32. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987.162, 156-159.
 33. Couch R. D. y Gaucher G.M. Rational elimination of *Aspergillus terreus* sulochrin production. *Journal of Biotechnology.* 2004. 108: 171-178.
 34. Crueger W y Crueger A. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology.* Sinauer, Sunderland, MA. 1982.
 35. Cuadra T. Fernández F.J., Tomasini A. y Barrios-González J. Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Lett Appl Microbiol.* 2008. 46:216-220.
 36. de Vries R.P., Flitter S.J., van de Vondervoort P.J.I., Chaverroche M.K., Fontaine T., Fillinger S., Ruijter F.J.G., d'Enfert C., Visser J. Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 2003. 49: 131-141.
 37. Dominguez M., Mejía A y Barrios-González J. Respiration studies of penicillin solid-state fermentation. *J Biosci Bioeng.* 2000. 89: 409-413.
 38. Domínguez M., Mejía A., Revah S. y Barrios-González J. optimization of bagasse, nutrients and initial moisture ratios on the yiel of penicillin in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2001. 17: 751-756.
 39. Downs T. y Frankowski R. A cancer risk model with adaptative repair. *Hum Exp Toxicol.* 1998. 12:697-700.
 40. Endo A., Kuroda M. y Tanazawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase by ML-236 A and ML-236B fungal metabolite having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 1976a. 72: 323-326.
 41. Endo A., Kuroda M. y Tsujita Y. ML-236-A, ML-236 B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 1976b. 29: 1346-1348.
 42. Fernández J., Hernandez M., Rios G. y Gutierrez C. Cholesterol biosynthetic pathway *J. Antibiot.* 2003. 16:234-246.
-
-

-
-
43. Fredrickson D.S. y Steinberg D. Failure of alpha-phenylbutyrate and beta-phenylvalerate in treatment of hypercholesterolemia. *Circulation*. 1957. 15: 391-398.
 44. Friedrich J., Zuzek M., Bencina M., Cinerman A., Strancar A., Radez I. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. *J. Chromatogra A*. 1995. 704: 363-367.
 45. Folch-Mallol J.L., Garay-Arroyo A., Lledías F. y Covarrubias-Robles A.A. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2004. 46: 24-46.
 46. Fujishima T., Uchida K y Yoshino H. Enzyme production by molds in sponge culture. *J Ferment Technol*. 1972. 50: 724-730.
 47. Furberg C.D. Natural statins and stroke risk. *Circulation*. 1999. 99: 185-188.
 48. Furukawa K., Hoshi Y., Maeda T., Nakajima T y Abe K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signaling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol*. 2005. 56: 1246-1261.
 49. Gasch A., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D. y Brown P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2000. 11:4241-4257.
 50. Grahek R., Milivojevic D., Bastarda A. y Kracun M., Chromatographic purification of some 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Journal of Chromatography A*. 2001. 918: 319-324.
 51. Gutierrez-Correa Marcel, Portal Leticia, Moreno Patricia, Tengerdy Robert, Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane waste. *Bioresource Technology*. 1999. 68:173-178.
 52. Gutierrez Santiago, Casqueiro Javier, Martín Francisco. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*. 2000. 17:S54-S60.
 53. Hagiwara D., Asano Y., Marui J., Furukawa K., Kanamaru K., Kato M., Abe K., Kobayashi T., Yamashino T. y Mizuno T. The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2007. 71:1003-1014.
-
-

-
-
54. Hajjaj Hassan, Neiderberger Peter y Duboc Philippe. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology. 2001. 67:2596-2602.
 55. Hansberg W., y Aguirre J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. J. Theor. Biol. 1990. 142: 201-221.
 56. Hohmann S. Osmotic Stress signaling and osmoadaptation in yeast. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. 66:300-372.
 57. Hölker U. y Lenz J. Solid-State Fermentation – are there any biotechnological advantages?. Curr. Opin. Microbiol. 2005. 8: 301-306.
 58. Ishida H., Hata Y., Ichikawa E., Kawato A., Abe Y., Suginami K., and Imayasu S. Regulation of the glucoamylase encoding gene (*gluB*), expressed in solid state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment. Bioeng. 1998. 86: 301-307.
 59. Javernik Sandra, Kreft Samo, Comparisson of CE and HPLC methods for determining lovastatin and its oxidation products after exposure to an oxidative atmosphere. Croatica Chemica Acta. 2003. 76(3): 263-268.
 60. Jones K.D., Couldwell W.T., Hinton D.R., Su Y.H., He D.K., Anker L., Law R.E. Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. Biochem Biophys Res Commun. 1994. 205: 1681-1687.
 61. Kallen J., Welzenbach K., Ramage P., Geyl D., Kriwacki R., Legge G., Cottens S., Weitz-Schmidt G. y Hommel U. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. J Mol Biol. 1999 292:1-9.
 62. Kannel W.B., Dawber T.R., Kaban A., Revotskie S.J.L. Factors of risk in the development of coronary heart disease – six year follow up experience; the Farmingham study. Ann Intern Med. 1961. 40: 602-609.
 63. Kawasaki L., Vargas-perez I., Sánchez O., Georgellis D. y Aguirre J. Response regulators SrrA and SskA are central components of phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cell. 2007. 6:1570-1583.
 64. Kawasaki L., Wysong D., Diamond R. y Aguirre J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. J. Bacteriol. 1997. 179:3284-3292.
 65. Kawasaki L. y Aguirre J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 2001. 183:1434-1440.
-
-

-
66. Kennedy J., Auclair K., Kendrew S.G., Park C., Vederas J.C. y Hutchinson C.R. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*. 1999. 284: 1368-1372.
 67. Kobayashi N. y McEntee K. Evidence for heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 87: 6550-6554.
 68. Kreiner Michaela, Harvey Linda M., McNeil Brian. (2002). Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition. *Enzyme and Microbial Technology*; 30:346-353.
 69. Kumar M.S., Jana S.K., Senthil V., Shashanka V., Kumar S.V. y Sadhukhan A.K. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochem*. 2000. 36: 363-368.
 70. Kumar M.S., Pallapothu M.K., Hemant M.S. y Sadhukhan A.K. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *J. Microbiological Methods*. 1999. 40: 99-104
 71. Lai L.S.T., Kuo C.M. y Tsai S.Y. Influence of increased dissolved oxygen tensions by agitation on secondary metabolite production by a mutant of *Aspergillus terreus* in a 5L fermentor. *J. Chinese Inst. Chem. Engrs*. 2001. 32: 135-142.
 72. Lai L.S.T. y Tsai T.H. Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation. *J. Biosci. Bioeng*. 2002. 94: 453-459.
 73. Larsson K., Ansell R., Eriksson P. y Adler L. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1993. 10:1101-1111.
 74. Marcel Gutiérrez-Correa, Leticia Portal, Patricia Moreno, Robert P. Tengerty. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource technology*. 1999. 68:173-178.
 75. Marcial J., Barrios-González J. y Tomasini A. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process. Biochem*. 2006. 41: 496-500.
 76. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology biotechnology*. 2002. 58: 555-564.
-

-
-
77. Manzoni Matilde, Bergomi Silvia, Rollini Manuela y Cavazzoni Valeria. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters*. 1999. 21: 253-257.
 78. Maurice Raimbault. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1998. Vol 1. No 3. 174-188.
 79. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 1959. 31: 426-428.
 80. Miranda-Labra R., Mejía A., Garay-Arroyo A. y Barrios-González J. Different expression of gene *sod1* (super oxide dismutase) in *A. terreus*, during solid-state and liquid fermentations. *International Workshop on Oxidative Stress*. Octubre. 2007. Cuautla Morelos, México.
 81. Miyake T., Uchitomi K., Zhang M.Y., Kono I., Nozaki N., Sammoto H., Inagaki K. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilous*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006. 70: 1154-1159.
 82. Morovján G., Szakács G. y Fekete J. Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1997. 763:165-172.
 83. Neghishi S., Huang Z.C., Hasumi K., Murakawa S., Endo A. Productivity of monacolin K (mevinolin) in the genus *Monascus*. *J. Ferment Eng*. 1986. 64: 509-511.
 84. Newman A., Clutterbuck R.D., Powles R.L., Millar J.L. Selective inhibition of primary acute myeloid leukemia cell growth by lovastatina. *Leukemia*. 1994. 8: 2022-2029.
 85. Norberck J y Blomberg A. Protein expression during exponential growth in 0.7M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1996. 137:1-8.
 86. Novak N., Gerdin S., y Berovic M. Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. *Biotechnology Letters*. 1997. 19: 947-948.
 87. Ölz R., Larsson K. Adler L y Gustafsson L. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J Bacteriol*. 1993. 175:2205-2213.
 88. Ooijkaas L.P., Weber F.J., Buitelaar R.M., Tramper J. y Rinzema A. Defined media and inert supports their potentials as solid state fermentation production systems. *Trends Biotechnol*. 2000. 18: 356-360.
 89. Raimbault M. y Alazard D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol*. 1980. 9: 199-209.
-
-

-
90. Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J.M. Hohmann S. Ammerer G. y Ruis H. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol.* 1999. 19:5474-5485.
 91. Robinsons T., Singh D. y Nigam P. Solid-State Fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. 55: 284-289.
 92. Romero-Gómez S.J., Augur C. y Viniegra-González G.. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters.* 2000. 22:1255-1258.
 93. Ruijter G.J., Visser J. y Rinzema A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology.* 2005. 150: 1095-1101.
 94. Sadhukhan AK, Murthy Ramana, Kumar Ajaya, Mohan EVS, Vandana G. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 199. 22:33-38.
 95. Schimmel Timothy, Borneman Scott and Conder Michael. Purification and characterization of a lovastatin esterase from *Clonostachys compactiuscula*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1997. 63:1307-1311.
 96. Schügerl K., Gerlach S.R., y Siedenberg D. Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of Aspergilli. *Adv. Biochem Eng Biotechnol.* 1998. 60: 185-266.
 97. Shary-Bagnon V., Lozano P., Saucedo-Castañeda G. y Roussos S. Production of 6-pentyl- α -pyrona by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process. Biochem.* 2000. 36: 103-109.
 98. Siderius M., Kolen C.P., Van Heerikhuizen H. y Mager W.H. Candidate osmosensors from *Candida utilis* and *Kluyveromyces lactis*: structural and functional homology to the Sho1p putative osmosensor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem biophys Acta.* 2000. 1517:143-147.
 99. Sigler K y Gille G. Stability and refractoriness of the hihg catalase activity in the oxidative-stress-resistant fission yeast *Scchizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiol.* 1999. 43:369-372.
 100. Shindia A. Mevinolin production by some fungi. *Folia Microbiol.* 1997. 42(5): 477-480.
-

-
101. Steinberg D., Avigan J. y Feigelson E. Effects of triparanol (MER-29) on cholesterol biosynthesis and on blood sterol levels in man. *Progr Cardiovasc Dis.* 1961. 5: 883-893.
 102. Storz G., Christman M.F., Sies H. y Ames B.N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceeding of the National Academic of Sciences.* 1987. 84: 8917-8921.
 103. Suryanarayan S. Current industrial practice in solid state fermentation for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem. Eng. J.* 2003. 13: 189-195.
 104. Szakács György, Morovján György y Tengerdy P. Robert. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters.* 1998. 20:411-415.
 105. te Biesebeke R., Levin A., Sagt C., Bartels J., Goosen T., Ram A., Punt P.J., Van den Hondel C., and Punt P. Identification of growth phenotype-related genes in *Aspergillus oryzae* by heterologous macroarray and suppression subtractive hybridization in Solid State and Submerged Cultivated *Aspergillus oryzae*, *Mol. Genet. Genomics.* 2005. 273: 33 – 42.
 106. Tobert J.A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2003. 2: 517-526.
 107. Toledo I., Aguirre J. y Hansberg W. Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology.* 1994. 140:2391-2397.
 108. Tomasini A., Fajardo C. y Barrios-González J. Gibberellic acid production using different solid state fermentation systems. *World J. of Microbiol Biotechnol.* 1997. 13: 203-206.
 109. Tomasselli S.C., Vergoignan C., Feron G. y Durand A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* growth in solid state cultivation conditions. *Biochem. Eng. J.* 2001. 7: 1-5.
 110. Trejo H.M.R., Lonsane B.K., Raimbault M. y Roussos S. Spectra of ergot alkaloids produced by *C. purpurea* 1029c in solid state fermentation system: influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar-cane pith bagasse. *Process Biochem.* 1993. 28: 23-27.
 111. Valenciano S., De Lucas J.R., Van der Klei L., Veenhuis M y Laborda F. Characterization of *Aspergillus nidulas* peroxisomes by immunoelectron microscopy. *Arch Microbiol.* 1998. 170: 370-376.
-

-
-
112. Valera H. R., Gomes J., Lakshmi S., Gururaja R., Suryanarayan S. and Kumar, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme Microb. Technol.* 2005, 37: 521-526.
 113. Vargas-Pérez I., Sánchez O., Kawasaki L., Georgellis D. y Aguirre J. Response regulators SsrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukariotic Cell.* 2007. 6:1570-1583.
 114. Vilchez Ferron M.A., Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J.M., Chisti Y. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005. 21:123-125.
 115. Vinci V.A., Hoemer T.D., Coffman A.D., Schimel T.G., Dabora R.L., Kirpeker A.C., Ruby C.L. y Stieber R.W. Mutants of a lovastatin hyper producing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. *J. Ind Microbiol.* 1991. 8: 113-120.
 116. Wei, P., Xu, S., and Cen, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* by solid state fermentation. *Journal of Zhejiang University - Science A.* 2007. 8: 1521-1526.
 117. Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M. y Carrel R.W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* 1975. 30: 259-264.
 118. Xu G., Chen Y., Chen Y. Ling X y Li X. Production of monacolin K in solid-state fermentation of *Monascus sp.* 9901 that does not produce citrinin. 2002.
 119. Yancey P., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. y Somero G.N: Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 1982. 217: 1214-1222.
 120. Zhu Y., Smits J.P. y Knol W. A novel solid state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Lett.* 1994. 16: 643-648.
 121. Zhu Yang, Knol Wieger, Smits Jan and Bol Jan. Medium optimization for nucleasa P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology.* 1996. 18:108-112.

11. Anexos.

Anexo 1. Cuantificación de biomasa por el método de la glucosamina

Esta metodología es propuesta por Elson y Morgan en 1993, modificada por Tomaselli *et al* en 2001 y adaptada para la fermentación sólida por Marcial *et al* 2005.

1.1. Curva patrón

Para la realización de la curva patrón se prepara una solución con una concentración de glucosamina de 1 mg/ml y se utilizan los siguientes volúmenes:

A.1. Curva patrón de glucosamina.

Tubo	Solución de glucosamina (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración de glucosamina ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	1	0
2	0.1	4.9	20
3	0.2	4.8	40
4	0.3	4.7	60
5	0.4	4.6	80
6	0.5	4.5	100

*Cada tubo se hace por duplicado.

Reactivos utilizados para realizar la prueba de la glucosamina:

1. Solución A:

- 1 ml de acetilacetona
- 50 ml de carbonato de sodio 0.5 N

2. Solución B:

- 0.8 g de PDBA
 - 30 ml de HCl 12 N
 - 30 ml de etanol
-
-

-
3. H₂SO₄ al 72%
 4. NaOH 10 M
 5. NaOH 0.5 M

1.2. Procedimiento:

Pesar 0.3 g de soporte cultivado seco. Agregar 5 ml de H₂SO₄ al 72%. Incubar a 25°C a 130 rpm por 30 minutos. Diluir con 54 ml de agua destilada. Autoclavar la mezcla 1 hora a 121°C. Neutralizar a pH 7 con NaOH 10 M y NaOH 0.5 M y anotar el volumen utilizado. Centrifugar. Tomar 2 ml de muestra hidrolizada (sobrenadante del centrifugado). Agregar 1 ml de la solución A. Agregar 1 ml de agua destilada. Llevar a baño maría durante 15 minutos. Enfriar los tubos. Adicionar 4 ml de etanol. Adicionar 1 ml de reactivo B. Adicionar 1 ml de etanol. Agitar y dejar reposar durante 1 hora en obscuridad. Determinar la DO a 530 nm.

Anexo 2. Fermentación en cilindro de agar

Esta es una técnica de selección racional propuesta por Kumar et al 2000, y, adaptada para éste estudio. El método de cilindro de agar esta basado en la propiedad antifúngica de la forma β-hidroxi ácida de la lovastatina, que al utilizar a *Neurospora crassa* como un hongo sensible, produce halos de inhibición en el crecimiento, relacionando así la cantidad de lovastatina con la inhibición del crecimiento de *N. crassa*.

2.1. Reactivos utilizados para la realización del bioensayo:

1. Medio de producción 2.5X
2. Medio SDA
3. Agua destilada estéril
4. Acetato de etilo

2.2. Preparación de los cilindros de agar

Preparar el medio de producción denominado 2.5X modificado. Vaciar 40 ml en cajas de petri estériles de 10 cm y dejar solidificar en campana de flujo laminar. Hacer los cilindros

de agar con un sacabocados de 6 mm de diámetro, para obtener tacos de 6 mm de diámetro x 5 mm de alto.

2.3. Inoculación e incubación de los cilindros de agar

Colocar en una caja petri de 10 cm de vidrio un papel Whatman #1, dos portaobjetos y esterilizar a 15 lb/in², durante 15 minutos. Pasar los cilindros de agar (10) a un portaobjetos. Los cilindros de agar se inoculan por picadura, con ayuda de palillos de madera, se toca ligeramente la superficie de la colonia y con éstas esporas se inocula el cilindro de agar. Agregar 2 ml de agua destilada estéril a la caja petri para que se absorba por el papel Whatman y evitar así que se sequen los cilindros de agar.

La caja petri es cerrada con papel parafilm y puestas en cajas para bioensayo de 30 cm x 30 cm, adicionándoles 30 ml de agua destilada, para evitar que los cilindros de agar se sequen. Estas cajas funcionan como cámaras de humedad. Las cajas para bioensayo se incuban a 28°C durante 5-7 días o hasta que estén bien esporuladas.

2.4. Extracción de lovastatina de los cilindros de agar

Colocar el cilindro de agar cultivado en un tubo de ensaye con rosca de 5 ml. Adicionar 2 ml de acetato de etilo. Con ayuda de una varilla de vidrio macerar el cilindro de agar. Dejar reposar durante 2 horas. La extracción tiene que hacerse en el momento que se va a realizar el bioensayo.

2.5. Preparación del bioensayo

Preparar 120 ml de medio SDA (2% agar p/v) y mantenerlo a 45°C. Cosechar las esporas de *N. crassa* con 10 ml de solución salina (0.85%) y tween 80 al 0.2%. Los matraces con *N. crassa* se deben inocular 10 días antes de realizar el bioensayo. Inocular con 1.6×10^6 esporas/ml el medio SDA. Vaciar el medio (inoculado) en las cajas para bioensayo 30 cm x 30 cm y dejarlas en la campana de flujo laminar hasta que solidifique.

2.6. Realización del bioensayo

Cortar discos de papel Whatman #1 de 6 mm de diámetro. Adicionar a los discos 10 µl del extracto de lovastatina, previamente realizado a los cilindros de agar. Como control

negativo se adiciona 10 ml de acetato de etilo a un disco de papel, que es considerado como el cero de la curva patrón. Como controles positivos o curva patrón se adicionan 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 μg de lovastatina en su forma activa, la β -hidroxi ácida.

Dejar secar los discos de papel durante 4 minutos o el tiempo necesario para que se seque el acetato de etilo. El acetato de etilo inhibe el crecimiento. Pasar los discos, con ayuda de unas pinzas, a las cajas donde se va a realizar el bioensayo. Previamente preparadas. Incubar a 28°C durante 16-18 horas. Medir los halos de inhibición.

Anexo 3. Obtención y selección de mutantes

3.1. Determinación de la dosis mínima inhibitoria (DMI)

La dosis mínima inhibitoria (DMI) se definió como la concentración del agente estresante, (H_2O_2 , Paraquat o NaCl), a la que *Aspergillus terreus* es incapaz de presentar crecimiento a simple vista. Para determinarla se eligieron tres estadios: esporas, micelio en trofofase (36 horas) y micelio en idiofase (48 horas).

Para todos los tratamientos se realiza el siguiente procedimiento: Preparar Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio PDA. Inocular con 0.2 ml de *A. terreus* los matraces. Incubar a 30°C durante 5-7 días. Cosechar las esporas con 10 ml de tween al 0.05% y perlas de vidrio. Determinar la concentración de esporas por cámara de Neubauer.

Para los tratamientos con esporas, ajustar la concentración a 1×10^4 esporas/ml. Para los tratamientos con micelio de ambas fases de crecimiento además de lo anterior: Ajustar la concentración a 1×10^7 esporas/ml. Preparar cajas petri con 25 ml de medio PDA. Inocular las cajas con 0.2 ml de la solución de esporas.

3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

3.2.1. Estrés aplicado a Esporas

Reactivos:

- Solución de H_2O_2 desde 10 mM hasta 200 mM

En una serie de tubos eppendorf adicionar lo siguiente: Tomar 0.1 ml de la solución de esporas ajustada a 1×10^4 esporas/ml. Adicionar 0.9 ml de H_2O_2 10 mM. Dejar reposar durante 15 minutos. Tomar 0.1 ml y sembrarlos en cajas de 10 cm conteniendo 25 ml de medio PDA. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias presentes. Repetir esta operación para todas las concentraciones (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200 mM de H_2O_2). Determinar la DMI.

3.2.2. Estrés aplicado a micelio en dos fases de crecimiento

3.2.2.1. Micelio en trofofase

Reactivos:

- Solución de H_2O_2 desde 100 mM hasta 1700 mM.
- Solución salina estéril (0.85% de NaCl).

Procedimiento: Incubar las cajas petri a 30°C durante 36 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Adicionar 0.1 ml de la suspensión de micelio en una serie de tubos eppendorf. Adicionar 0.9 ml de la solución 100 mM de H_2O_2 . Dejar reposar durante 15 minutos. Tomar 0.2 ml y sembrarlo en cajas petri con medio PDA. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir esta operación para todas las concentraciones (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 y 1700 mM de H_2O_2). Determinar la DMI.

3.2.2.2. Micelio en idiofase

Reactivos:

- Solución de H_2O_2 desde 100 mM hasta 2200 mM.
- Solución salina estéril (0.85% de NaCl).

Procedimiento: Incubar las cajas petri a 30°C durante 48 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Adicionar 0.1 ml de la suspensión de micelio en una serie de tubos eppendorf. Adicionar 0.9 ml de la solución 100 mM de H_2O_2 . Dejar reposar durante 15 minutos. Tomar 0.2 ml y sembrarlo en cajas petri con medio PDA. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir esta operación para todas las concentraciones

(200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 2100 y 2200 mM de H₂O₂). Determinar la DMI.

3.3. Estrés oxidativo: Paraquat

Preparación de las cajas con Paraquat: Preparar medio PDA (normal) y dejar enfriar. Preparar el Paraquat 1 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA (9 ml). Dejar solidificar en campana de flujo laminar.

3.3.1. Estrés aplicado a esporas

Inoculación de las cajas con Paraquat: Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir ésta operación para todas las concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 mM). Determinar la DMI.

3.3.2. Estrés aplicado a micelio en trofofase y micelio en idiofase

Inocular las cajas que contienen medio PDA. Incubar a 30°C durante 36 o 48 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Inoculación de las cajas con Paraquat: Inocular con 0.1 ml de la suspensión de micelio. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir ésta operación para todas las concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 mM). Determinar la DMI.

3.4. Estrés osmótico: NaCl

3.4.1. Estrés aplicado a esporas

Preparar medio PDA + NaCl 0.5 M (25 ml por caja). Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir ésta operación para todas las concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 M). Determinar la DMI.

3.4.3. Estrés aplicado a micelio en trofofase y micelio en idiofase

Inocular las cajas que contienen medio PDA. Incubar a 30°C durante 36 o 48 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Preparar medio PDA + NaCl 0.5 M (25 ml por caja). Inocular con 0.2 ml de la suspensión de micelio. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Repetir ésta operación para todas las concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 M). Determinar la DMI.

3.5. Estrés mixto NaCl – Paraquat

3.5.1. Estrés aplicado a esporas

Preparación de las cajas con Paraquat: Preparar medio PDA + NaCl 2.0 M (9 ml por caja) y dejar enfriar. Preparar el Paraquat 6 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA + NaCl 2.0 M (9 ml). Dejar solidificar en campana de flujo laminar. Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Determinar la DMI.

3.5.2. Estrés aplicado a micelio en trofofase y micelio en idiofase

Inocular las cajas que contienen medio PDA. Incubar a 30°C durante 36 o 48 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Preparar medio PDA + NaCl 2.5 M (9 ml por caja). Preparar el Paraquat 7 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA + NaCl 2.5 M (9 ml). Inocular con 0.2 ml de la suspensión de micelio. Incubar a 30°C durante 72 horas. Contar el número de colonias. Determinar la DMI.

3.6. Obtención de mutantes resistentes

Para la obtención de mutantes resistentes a los tratamientos, se ajusta el número de esporas a utilizar como sigue: Para las esporas, ajustar el número de esporas a 1×10^4 esporas/ml.

3.6.1. Mutantes resistentes a estrés oxidativo: Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)**3.6.1.1. Estrés aplicado a Esporas**

Tomar 0.1 ml de la solución de esporas ajustada a 1×10^4 esporas/ml. Adicionar 0.9 ml de H₂O₂ 180 mM. Dejar reposar durante 15 minutos. Tomar 0.1 ml y sembrarlos en cajas de 10 cm conteniendo 25 ml de medio PDA. Incubar a 30°C hasta la esporulación. Las colonias esporuladas son sembradas en cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.6.1.2. Micelio en trofofase

Incubar las cajas petri a 30°C durante 48 horas. Adicionar 0.5 ml de solución salina estéril. Rasurar el micelio con una navaja de bisturí del No. 20. Recolectar la suspensión de micelio. Adicionar 0.1 ml de la suspensión de micelio en un tubo eppendorf. Adicionar 0.9 ml de la solución 1200 mM de H₂O₂. Dejar reposar durante 15 minutos. Tomar 0.2 ml y sembrarlo en cajas petri con medio PDA. Incubar a 30°C hasta la esporulación. Las colonias esporuladas son sembradas en cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.6.2. Paraquat

Preparación de las cajas con Paraquat: Preparar medio PDA (normal) y dejar enfriar. Preparar el Paraquat 7 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA (9 ml). Dejar solidificar en campana de flujo laminar.

Inoculación de las cajas con Paraquat: Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C hasta la esporulación. Las colonias esporuladas son sembradas en cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.6.3. Mutantes resistentes a estrés osmótico: NaCl

Preparar medio PDA + NaCl 2.5 M (25 ml por caja). Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C hasta la esporulación. Las colonias

esporuladas son sembradas en cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.6.4. Mutantes resistentes a estrés mixto: NaCl – Paraquat

Preparación de las cajas con Paraquat: Preparar medio PDA + NaCl 2.5 M (9 ml por caja) y dejar enfriar. Preparar el Paraquat 7 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA + NaCl 2.5 M (9 ml). Dejar solidificar en campana de flujo laminar. Inocular con la suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/ml. Incubar las cajas petri a 30°C hasta esporulación. Las colonias esporuladas son sembradas en cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.7. Obtención de mutantes sensibles

3.7.1. Mutantes sensibles a estrés oxidativo: Paraquat

Preparación de las cajas con Paraquat: Preparar medio PDA (normal) y dejar enfriar. Preparar el Paraquat 5 mM (en 1 ml) con agua estéril, ajustar los cálculos para un volumen final de 10 ml de medio. Adicionar el Paraquat (1 ml) al medio PDA (9 ml). Dejar solidificar en campana de flujo laminar.

Inoculación de las cajas: Se hacen diluciones de la mutagénesis para obtener 100 colonias por caja de PDA con 25 ml de medio. Las colonias son sembradas por picadura en medio con Paraquat 5mM y en medio PDA. Incubar a 30°C hasta esporulación. Las colonias que crecen en medio PDA pero no en medio 5mM son las mutantes sensibles a Paraquat. Las mutantes sensibles son sembradas en los cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

3.7.2. Mutantes sensibles a estrés osmótico: NaCl.

Enriquecimiento de mutantes sensibles a estrés osmótico: Preparar medio mínimo líquido (MML) + 1.5 y 2.0 M de NaCl. Adicionar 50 ml de MML a matraces Erlenmeyer de 250 ml. Para evitar la agregación del micelio con las esporas se adicionan 5 g de perlas de vidrio. Inocular los matraces con 2×10^6 esp/ml. Incubar a 30°C durante 48 horas a 150 rpm. Filtrar dos veces con fibra de vidrio para remover el micelio. Centrifugar a 1500 rpm durante 20

minutos. Recuperar las esporas no germinadas por decantación, mutantes sensibles. Sembrar las esporas no germinadas en cajas petri con 30 ml de medio mínimo sólido. Incubar a 30°C hasta la esporulación. Para corroborar que las esporas obtenidas son sensibles a estrés osmótico, se preparó MMS (sin estrés) y MMS + NaCl (1.5 y 2.0 M).

De las colonias obtenidas por MMS: Sembrar por picadura en MMS, MMS + NaCl 1.5M y MMS 2.0 M. Incubar a 30°C hasta esporulación. Las colonias que crecen en medio MMS y no así en MMS + NaCl 1.5 M y MMS + 2.0 M son las mutantes sensibles a estrés osmótico. Las mutantes sensibles son sembradas en los cilindros de agar por duplicado. Una réplica es utilizada para realizar el bioensayo y la otra es almacenada en glicerol al 50% y a -20°C.

Anexo 4.

4.1. Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares componentes del medio de producción, lactosa y glucosa, son considerados como azúcares reductores, Miller (1956) propone un método para determinar éste tipo de compuestos en una muestra.

Curva patrón

Se elabora a partir de una solución estándar de glucosa (1 mg/ml) y se prepara como sigue:

A.4. Curva patrón de glucosa.

Tubo	Solución de glucosa (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración de glucosa (mg/ml)
0	0	1.0	0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6

4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0	1.0

*Cada tubo se elabora por duplicado.

Reactivos utilizados:

4.2. Reactivo DNS:

10 g NaOH

10 g Acido 3,5 dinitosalicílico

0.5 g Sulfito de sodio

2 g Fenol

Aforar a 1 l con agua destilada

4.3. Procedimiento:

Colocar 1 ml de la muestra. Adicionar 1 ml del reactivo DNS. Agitar con vortex. Colocar los tubos en baño María en ebullición durante 15 minutos. Enfriar los tubos con agua fría. Adicionar 8 ml de agua destilada. Homogeneizar con vortex. Leer la absorbancia a 575 nm

Anexo 5.

5.1. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La prueba se basa en el acoplamiento del colorante con la proteína y se determina colorimetricamente, existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteína. La principal ventaja de éste método es su simplicidad, ya que solamente se necesita un solo reactivo, y, la rapidez con la que ésta determinación se hace.

5.2. Reactivos utilizados:

1. Reactivo de Bradford
2. Solución de albúmina sérica bovina (0.1mg/ml)

5.3. Preparación de la curva patrón.

La curva patrón de albúmina sérica bovina, para determinar el contenido de proteína se prepara como se describe en la tabla A.5.

A.5. Curva patrón de proteína.

Tubo	Albúmina sérica bovina (μ l)	Agua destilada (μ l)	Reactivo de Bradford (μ l)	Concentración de proteína (μ g/ml)
0	0	800	200	0
1	20	780	200	2
2	40	760	200	4
3	60	740	200	6
4	80	720	200	8
5	100	700	200	10

*Cada tubo se elabora por duplicado.

5.4. Procedimiento:

1. Agregar 100 ml de muestra.
2. Agregar 700 ml de agua destilada.
3. Agregar 200 ml de agua destilada.
4. Homogeneizar con vortex.
5. Leer absorbancia a 595 nm.

Anexo 6.**Extracción de catalasa y súper óxido dismutasa****6.1. Soluciones:**

1. Buffer de extracción pH 7.2
 - a. Hepes 20 mM
 - b. Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM
-

-
- c. Dithiothreitol 1 mM
 - d. Deferrieroxamine 0.1 mM

Se prepara el buffer con hepes y DTT, se ajusta el pH y se guarda en alícuotas a -20°C, cuando se va a utilizar se descongela una alícuota y se añade el PMSF, que debe quedar a una concentración final de 1mM, pero puede prepararse un stock concentrado que puede guardarse a 4°C. El PMSF concentrado debe disolverse en etanol, no es soluble en agua.

6.2. Procedimiento:

1. Congelar el micelio con nitrógeno líquido (N₂) y guardarlo a -80 si no se va a proceder.
2. Limpiar un mortero con etanol y papel y preenfriarlo con N₂.
3. Moler el micelio usando N₂.
4. Desde aquí hacerlo todo en frío.
5. Resuspender en buffer de hepes (depende de que tan concentrado se quiere el extracto, lo recomendable es ½ del volumen del micelio).
6. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm en frío.
7. Recuperar el sobrenadante
8. Precipitar con 2 volúmenes de acetona (fría)
9. Dejar 20 minutos a -20°C
10. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm en frío
11. Recuperar el pellet y resuspender en 1/3 del volumen original del buffer de hepes
12. Tratar de resuspender lo más posible porque muchas proteínas no se resuspenden
13. Centrifugar a 14,000 por 10 minutos
14. Buscar actividad de la catalasa o SOD en el sobrenadante
15. Tomar 50 µl para determinar proteína.

Anexo 7.
Ensayo enzimático para catalasa (CAT)**7.1. Condiciones del ensayo:**

$$T = 25^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 7.0$$

Absorbancia = 240 nm

7.2. Soluciones:

1.- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.0.

Preparar 200 ml usando agua destilada y fosfato de potasio monobásico anhídrido, ajustar el pH a 7.0 usando hidróxido de potasio 1M.

2.- Solución de peróxido de hidrogeno al 0.036% (Solución sustrato).

Preparar utilizando la solución 1 y peróxido de hidrógeno al 30 %. Determinar la absorbancia a 240 nm utilizando el reactivo 1 como blanco, la absorbancia debe estar entre 0.550 y 0.520, para aumentar la absorbancia usar peróxido de hidrógeno y el reactivo 1 para disminuir la absorbancia.

3.- Solución de Catalasa.

Preparar inmediatamente antes de su uso una solución que contenga 50 -100 unidades por ml en la solución 1 (fría).

7.3. Procedimiento:

Pipetear los siguientes reactivos en las cuvetas para el espectrofotómetro.

A.7. Preparación de las muestras.

	Muestra	Blanco
Buffer fosfato de potasio pH 7	----	3.0
Solución de peróxido de Hidrógeno	2.9	
Solución de catalasa	0.1	

Inmediatamente después de adicionar la catalasa mezclar por inversión y anotar el tiempo requerido en que la lectura de la absorbancia a 240 nm disminuye de 0.45 a 0.40.

7.4. Cálculos.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}_{\text{ enzima}}} = \frac{(3.45)(FD)}{(\text{min})(0.1)}$$

3.45 = Corresponde a la descomposición de 3.45 micro moles de H₂O₂ en una mezcla de reacción de 3.0 ml, produciendo una disminución en la absorbancia (240 nm) de 0.45 a 0.40.

FD = Factor de dilución.

min. = Tiempo en minutos requerido para la disminución de la absorbancia a 240 nm de 0.45 a 0.40.

1.1 = Volumen de enzima usado, en mililitros.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}_{\text{ sólido}}} = \frac{(\text{unidades})/(\text{ml}_{\text{ enzima}})}{(\text{mg}_{\text{ sólido}})/(\text{ml}_{\text{ enzima}})}$$

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}_{\text{ proteína}}} = \frac{(\text{unidades})/(\text{ml}_{\text{ enzima}})}{(\text{mg}_{\text{ proteína}})/(\text{ml}_{\text{ enzima}})}$$

7.5. Definición de Unidad

Una unidad descompone 1.0 μmol de H₂O₂ por minuto a pH a 25°C, cuando la concentración final disminuye de 10.3 mM a 9.2 mM. La velocidad de desaparición de H₂O₂, es seguida por la observación de la disminución de la velocidad en la absorbancia a 240 nm.

Anexo 8.

Ensayo enzimático para súper óxido dismutasa (SOD)

8.1. Condiciones del ensayo:

$$T = 25^{\circ}\text{C}$$

Absorbancia = 560 nm

8.2. Soluciones:

1.- Buffer fosfato de potasio 67 mM pH 7.8 (KH₂PO₄).

Para 1L de solución, se pesan 9.11 gramos de fosfato de potasio monobásico anhídrido y se disuelven en agua destilada, ajustar el pH a 7.8 usando hidróxido de potasio 1M.

2.- EDTA 0.1 M.

Para 25 ml se pesan 0.950 gramos de EDTA y se disuelven en agua destilada.

3.- NBT 1.5 mM.

Para 10 ml se pesan 0.0122 gramos de NBT y se diluyen en agua destilada.

4.- Vitamina B₂ 0.12 mM.

Para 10 ml se pesan 0.0004 gramos, esta solución tiene que prepararse en el momento en que se vaya a utilizar.

8.3. Procedimiento:

Pipetear los siguientes reactivos en tubos de ensaye para leer en el espectrofotómetro.

A.8. Determinación de la actividad súper óxido dismutasa.

No.	Muestra (μ l)	PBS (ml)	EDTA (μ l)	NBT (μ l)		Vit B2 (μ l)		
0	0	2.7	200	100	I	50	I	
1	2.5	2.6975	200	100	N	50	N	
2	5	2.6950	200	100	C	50	C	L
3	10	2.6900	200	100	U	50	U	E
4	25	2.6750	200	100	B	50	B	E
5	50	2.6500	200	100	A	50	A	R
6	75	2.6250	200	100	R	50	R	
7	100	2.6000	200	100		50		560 nm
8	150	2.5500	200	100	10	50	10	
9	175	2.5250	200	100	MIN	50	MIN	
10	BLANCO	3.0000	0	0		0		

La actividad súper óxido dismutasa se calculó en base a que, una unidad de enzima es capaz de causar el 50% de la inhibición del NBT.

Los resultados se reportaron como U/ mg de proteína.