



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

“Unidad Iztapalapa”

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

**“EFECTO DEL CONTACTO CON EL AIRE, EL ESTRÉS OSMÓTICO Y EL  
ESTÍMULO DE EXPLORACIÓN DEL MICELIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
LOVASTATINA EN *Aspergillus terreus*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

IBI. Nayeli Ávila Cisneros

Director de Tesis: Dr. Javier Barrios González

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez

Dra. Adriana Garay Arroyo

México, D.F.

Octubre 2009

**El presente trabajo fue realizado 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.**

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001465.**

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

**“Efecto del contacto con el aire, el estrés osmótico y el estímulo de exploración del micelio sobre la producción de lovastatina en *Aspergillus terreus*”**

Que presentó

IBI. Nayeli Ávila Cisneros

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez

Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino.

Vocal: Dra. Carolina Campos Muñiz

Vocal: Dr. Armando Mejía Álvarez

A Dios

A mi familia principalmente a mis padres, porque han sido mi más grande inspiración para lograr este proyecto.

A ti Javier por tu apoyo incondicional en todo momento, muestras de cariño y amor.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Javier Barrios González: Gracias por permitirme trabajar con usted en este gran proyecto, aprendí mucho y en gran parte se lo debo a usted.

Un agradecimiento especial a CONACYT, por el otorgamiento de la beca para realizar este trabajo de investigación en la Universidad Autónoma Metropolitana UAM-I, y también en especial a ésta institución.

A mis asesores y sinodales por su dedicación y valioso tiempo para revisar este proyecto. Gracias por todos sus consejos y recomendaciones.

A mis compañeros del laboratorio, por ese ambiente armonioso ambiente en el que trabajamos. Maura, Rox, Tere, Tania, Jess por su apoyo en todo momento y sus innumerables muestras de cariño. Jaime y Jesús por todas sus recomendaciones y consejos para poder realizar este proyecto.

Gaby, Ana, Paty, Pao por esas platicas tan amenas que tuvimos.

A mi gran amiga, Olivia por estar conmigo en todo momento, por su apoyo incondicional y lealtad. Gracias por todos tus consejos y por estar ahí cuando te necesito.

## **Resumen**

La lovastatina es un metabolito secundario producido industrialmente por el hongo *Aspergillus terreus*. Durante años se ha usado en el tratamiento de enfermedades coronarias, debido a la ayuda que representa al reducir los niveles de colesterol en sangre humana. Esto ha intensificado la producción de lovastatina en los diferentes sistemas, particularmente el cultivo líquido o Fermentación Líquida (FL). Sin embargo, en años recientes la investigación realizada por muchos grupos de trabajo ha demostrado que un cultivo alternativo para la producción de éste y otros metabolitos secundarios puede ser el representado por la Fermentación Sólida (FS).

Nuestro grupo de trabajo demostró que la producción de lovastatina en FS utilizando un soporte inerte como el poliuretano (PUF), se eleva considerablemente, mostrando claramente que existe una fisiología especial del medio sólido, en comparación con la fisiología del medio líquido, siendo esta la principal razón en el aumento de producción del metabolito de interés.

Sin embargo a pesar de la importancia del cultivo sólido en la producción de metabolitos secundarios (particularmente lovastatina), la comprensión acerca de los mecanismos que regulan esta fisiología son aun limitados y poco conocidos. Por esta razón, en este trabajo se consideró importante estudiar los factores o señales ambientales que inducen esta fisiología, planteando hipotéticamente 3 estímulos ambientales que potencialmente dispararían este comportamiento en FS. Estos son: 1) estímulo de exploración (inmovilización) del micelio, que lo induce a explorar, colonizar y superar barreras; 2) efecto producido por la concentración de nutrientes-estrés osmótico, y 3) efecto producido por la interfase con el aire, estudiado en muchos experimentos variando la frecuencia de contacto con un ambiente líquido ( frecuencia de mojado FM).

Todos los estímulos fueron evaluados tanto en ambientes líquidos o sistemas de FL y en ambientes sólidos en contacto con el aire. Incluso, se diseñaron algunos sistemas de cultivo novedosos para estudiar estas combinaciones de estímulos y evaluar su efecto en: producción de lovastatina, crecimiento y producción específica (PE).

Se encontró un efecto importante al estudiar el efecto del estímulo de exploración en un ambiente líquido, encontrándose un fuerte incremento de la producción específica de lovastatina en micelio con este estímulo (inmovilizado), incrementándose este parámetro en  $\Delta = 157$  g/mg.

En el modelo desarrollado para estudiar el estímulo de exploración en contacto con el aire (cajas de Petri) se confirmó el efecto del estímulo de exploración sobre la producción de lovastatina, aunque las PEs obtenidas en este sistema fueron menores, cercanas a las obtenidas en FL. Sin embargo, si se observó un incremento en la PE al poner barreras al crecimiento (uso de una membrana) que estimularan la necesidad de explorar del micelio. También se observó que en este sistema que contenía la membrana y denominado CM y así como SM medio desarrollado sobre solo agar, la producción subió al usar medio concentrado 2.5X, siendo mayor el incremento en el medio CM, lo cual representa el estímulo del incremento en la concentración de nutrientes en una combinación con estímulo de exploración y contacto con el aire.

Profundizando en este experimento, se encontró que este incremento se debe a la acción combinada de dos fenómenos. Se demostró que el estrés osmótico es responsable de parte del incremento y que la mayor disponibilidad de nutrientes representa la otra parte del incremento para este ambiente de contacto con el aire.

El efecto más importante, sobre la producción y la PE se encontró en los experimentos realizados en un ambiente sólido (al estudiar el efecto de contacto con el aire), con medio concentrado (2.5X) al que se le varió el contacto con el líquido. Evidentemente, en estos experimentos se conjuntaron los estímulos de exploración del micelio y el del medio concentrado, y se varió el contacto con el líquido. Aquí el rango de PEs encontrados varió entre 21.6 a 515  $\mu\text{g/gss}$  ( $\Delta = 494$ ) respecto a los resultados obtenidos en cultivo a concentración de nutrientes 1x.

Un contacto con el líquido con frecuencias de mojado altas (cada 5 minutos) disminuyó la producción al nivel de FL. Al espaciar los baños desde cada 2 h hasta cada 10 h, se llegó a niveles similares al los la FS normal. Niveles mayores fueron obtenidos en los cultivos con baños más espaciados: es decir cada 12 h hasta cada 24 h. La producción de lovastatina fue sobresaliente en la FM 12 h, con una producción 63.1% mayor a la de la FS normal en PUF.

Inesperadamente, también la producción obtenida en el Control 2 fue alta, produciendo 18 mg lov/g MS; siendo esta 27.6% mayor que la FS normal. Es importante destacar que, este proceso no requiere ninguna operación como baños periódicos, sólo tener el medio líquido junto, lo cual puede ser manifestado como una atmósfera de humedad.

Así, la FS híbrida con baños cada 12 h y el tipo de FS utilizado como Control 2 mostraron resultados interesantes desde un punto de vista tecnológico, ya que prometen ser la base de sistemas de cultivo novedosos para una mayor producción de lovastatina. Desde un punto de vista básico, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el estímulo de exploración, el estrés osmótico y la mayor disponibilidad de nutrientes, junto con el contacto con el aire, son señales ambientales importantes que contribuyen a disparar y establecer la “fisiología particular del medio sólido” en el hongo.



## Índice General

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>5</b>
2.1 Metabolismo Secundario	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Clasificación de antibióticos: Familias Biosintéticas	6
2.2 Estatinas	6
2.2.1 Estructura Química de las Estatinas	8
2.2.2 Lovastatina	9
2.2.2.1 Biosíntesis de Lovastatina	10
2.2.2.2 Producción de Lovastatina	12
2.3 Fermentación Sólida (FS)	14
2.3.1 Definición	14
2.3.2 Tipos de Fermentación Sólida	14
2.3.2.1 FS sobre Sustratos Naturales	15
2.3.2.2 FS sobre Soportes Inertes	15
2.3.2.3 Desarrollo de Procesos de FS sobre soportes inertes para producción de Metabolitos Secundarios	16
2.4 Estímulos Ambientales	18
2.4.1 Inmovilización del Micelio	18
2.4.2 Aw	18
2.4.3 Interfase con el aire	18
<b>3. Justificación</b>	<b>21</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>23</b>
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Específicos	23
<b>6. Materiales y Métodos</b>	<b>24</b>
6.1 Cepas de Microorganismos utilizados	24
6.1.1 Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUB-F514	24
6.1.2 Cepa fúngica <i>Neurospora Crassa</i>	24
6.2 Condiciones de crecimiento	24
6.3 Medios de Cultivo	25
6.3.1 Medios de Cultivos para <i>Aspergillus terreus</i>	25
6.3.1.1 Medio CZAPEK: Medio de Esporulación y Mantenimiento	25
6.3.1.2 Medio PML: Medio de Esporulación y Mantenimiento	25
6.3.1.3 Medio POWER: Medio de Esporulación y Mantenimiento	25
6.3.1.4 Medio de Producción 1X: Cultivo para FL	26
6.3.1.5 Medio de Producción 2.5X: Cultivo para FS	26
6.4 Producción de Lovastatina	26
6.4.1 Fermentación Líquida (FL)	27
6.4.2 Fermentación Sólida (FS)	27
6.4.3 Fermentación Líquida Inmovilizada (FLI)	27
6.4.4 Fermentación Sólida Híbrida (FSH)	27

6.4.5	Cultivo de Agar en Placa (CAP).....	28
6.5	Técnicas Analíticas.....	28
6.5.1	Lovastatina.....	28
6.5.1.1	Extracción FL.....	29
6.5.1.2	Extracción FS.....	29
6.5.1.3	Extracción FLI.....	29
6.5.1.4	Extracción FSH.....	29
6.5.1.5	Extracción CAP.....	29
6.5.2	Biomasa y Humedad.....	30
6.5.3	pH.....	30
6.5.4	Azúcares.....	30
<b>7.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
7.1	Efecto de Inmovilización del Micelio.....	31
7.1.1	Sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada.....	31
7.1.1.1	Producción de Lovastatina en FLI.....	32
7.1.1.2	Crecimiento observado en FLI.....	33
7.1.1.3	P.E. FLI.....	34
7.1.2	Sistema de Fermentación en CAP.....	35
7.1.2.1	Diseño de Sistema de Fermentación Sólido.....	35
7.1.2.2	Producción de Lovastatina.....	37
7.1.2.3	Crecimiento observado en el sistema CAP.....	38
7.1.2.4	P.E. CAP.....	39
7.2	Efecto de [N] en la Producción de Lovastatina.....	40
7.2.1	Sistema FLI.....	40
7.2.1.1	Producción de Lovastatina [N]1x y [N] 2.5x.....	41
7.2.1.2	Crecimiento observado a [N] 1x y 2.5x.....	42
7.2.1.3	P.E. a [N] 1x y 2.5x.....	43
7.2.2	Sistema de FS.....	44
7.2.2.1	Producción de Lovastatina [N] 1x y 2.5x.....	45
7.2.2.2	Crecimiento obtenido [N] 1x y 2.5x.....	46
7.2.2.3	P.E. [N] 1x y 2.5x.....	47
7.3	Efecto de Interfase con el aire.....	48
7.3.1	Sistema de FLI.....	48
7.3.1.1	Producción de Lovastatina.....	49
7.3.1.2	Crecimiento.....	50
7.3.1.3	Producción Específica (P.E.).....	51
7.3.2	Sistema de FSH.....	52
7.3.2.1	Producción de Lovastatina en FSH.....	54
7.3.2.2	Crecimiento en FSH.....	56
7.3.2.3	Producción Específica (FSH).....	57
<b>8.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>59</b>
8.1	Efecto producido por la Inmovilización del micelio en FLI.....	60
8.1.1	Comparación entre la producción de lovastatina, crecimiento y P.E. en FL convencional y FLI.....	60
8.2	Efecto de la inmovilización del micelio en FS.....	62

8.2.1	Comparación de la producción de lovastatina, crecimiento y P.E en CAP.....	62
8.3	Efecto de la [N] en FL .....	64
8.3.1	Comparación del efecto producido en FLI en medios 1x y 2.5x.....	64
8.4	Efecto de la[N] en CAP.....	66
8.5	Efecto de la Interfase con el aire FLI .....	67
8.5.1	Comparación de la producción de lovastatina obtenida en las distintas zonas de FLI: LS, CNL y CIL.....	67
8.6	Efecto de la Interfase con el aire en FSH.....	69
8.6.1	Comparación de la producción de lovastatina a distintas F.M...	69
<b>9.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>72</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## A. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2-1</b> Ruta biosintética de la producción del colesterol.....	6
<b>Figura 2-2</b> Estructura Química del Colesterol.....	6
<b>Figura 2-3</b> Principales tipos de estatinas.....	8
<b>Figura 2-4</b> Base estructural de las estatinas : anillo de naftaleno y $\beta$ -hidrolactona.....	8
<b>Figura 2-5</b> Estructura química de la lovastatina.....	9
<b>Figura 2-6</b> Cluster de genes biosintéticos de la lovastatina ( <i>lovB</i> y <i>lovF</i> biosíntesis de policétidos; <i>lovC</i> enoil reductasa; <i>lovD</i> transesterasa; <i>lovE</i> y <i>lovH</i> genes reguladores; <i>ORF2</i> y <i>ORF17</i> genes del citocromo P-450; <i>ORF1</i> y <i>ORF10</i> genes potenciales de resistencia; <i>ORF12</i> y <i>ORF16</i> genes de transporte; <i>lovG</i> y <i>ORF2,ORF12, ORF15</i> y <i>ORF18</i> función desconocida)(Manzoni <i>et al.</i> , 2002).....	10
<b>Figura 2-7</b> Ruta de biosíntesis lovastatina.....	11
<b>Figura 7-1</b> Producción total de lovastatina mg/Matriz en sistemas de FL y FLI.....	32
<b>Figura 7.2</b> Producción total/Matriz de micelio seco por <i>A .terreus</i> en FL vs FLI.....	33
<b>Figura 7-3</b> Efecto producido en el crecimiento por efecto de la inmovilización del micelio...33	
<b>Figura 7-4</b> Producción específica de lovastatina obtenida en los sistemas de fermentación de FL .....	34
<b>Figura 7-5</b> Fotografía de los experimentos previamente realizados en el sistema de cilindro de agar.....	3
<b>Figura 7-6</b> Fotografía de cultivo de agar en placa CAP, sobre membrana de poliéster sulfonato.....	36
<b>Figura 7-7</b> Fotografía de cultivo de agar en placa CAP sobre superficie de agar.....	36

<b>Figura 7-8</b> Comparación de la producción de lovastatina en cultivos de caja Petri con membrana y sin membrana ( CM y SM).....	37
<b>Figura 7.9</b> Comparación entre el crecimiento observado durante el día 5 y 7 en caja Petri con membrana y sin membrana .....	38
<b>Figura 7-10</b> Comparación de la P.E. obtenida durante la cinética de cultivo en agar CM y SM.....	39
<b>Figura 7-11</b> Diseño del sistema de FLI. ....	40
<b>Figura 7-12</b> Diseño del sistema de FLI utilizada para conocer el efecto de [N] 2.5X.....	40
<b>Figura 7-13</b> Comparación de la producción de lovastatina obtenida en el sistema de FLI al día 7 a [N] 1X Y 2.5X.....	41
<b>Figura 7-14</b> Comparación de la producción de biomasa obtenida en cultivo líquido inmovilizado a diferentes [N].....	42
<b>Figura 7-15</b> Producción específica de lovastatina obtenida a distintas [N] 1x y 2.5x.....	43
<b>Figura 7-16</b> Comparación de la producción total de lovastatina obtenida en cultivo en caja Petri a [N] 1X, 2.5X y 1x+[1M]NaCl.....	45
<b>Figura 7-17</b> Comparación entre la producción de biomasa obtenida en cultivo de caja Petri con diferente [N] [N] 1X, 2.5X y 1x+[1M]NaCl.....	46
<b>Figura 7-18</b> P.E. de lovastatina en cultivo en caja Petri a distinta [N] [N] 1X, 2.5X y 1x+[1M]NaCl.....	47
<b>Figura 7-19</b> Fotografía de la descripción de zonas formadas en la banda de PUF utilizada en el diseño de FLI, para observar el efecto de la frecuencia de mojado.....	48
<b>Figura 7-20</b> Comparación de la producción de lovastatina total obtenida en las diferentes zonas de la FLI, CNL, CIL y LS.....	49

<b>Figura 7-21</b> Producción de biomasa obtenida en las diferentes zonas de cultivo inmovilizada para las distintas zonas CNL, CIL y LS.....	50
<b>Figura 7-22</b> P.E obtenida en las distintas zonas de cultivo líquido inmovilizado: CNL, CIL y LS.....	5
<b>Figura 7-23</b> Diseño de FSH utilizando variables de tiempo de inmovilización y F.M.....	53
<b>Figura 7-24</b> Producción de lovastatina total obtenida en el cultivo de FSH sometida a diferentes frecuencias de mojado (0.1- 24 horas).....	54
<b>Figura 7-25</b> Comparación del crecimiento obtenido durante el cultivo de FSH sometida a diferentes frecuencias de mojado (o.1-24 horas).....	56
<b>Figura 7-26</b> P.E. registrada en el sistema de FSH sometida a diferentes F.M (0.1- 24 hrs), y producción de los controles utilizados en el sistema .....	57

## **B. INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1-1</b> Principales hongos utilizados en la producción industrial de metabolitos secundarios.....	
<b>Tabla 7-1</b> Valores de Aw presentes en los medios de producción 2.5x, 1x+1.5 M Na Cl....	44
<b>Tabla 7-2</b> Frecuencias de mojado estudiadas en el sistema de FSH sobre la producción de lovastatina .....	58

### C. ABREVIATURAS

FS	Fermentación Sólida
FL	Fermentación Líquida
FLC	Fermentación Líquida Inmovilizada
FLI	Fermentación Líquida control
FSH	Fermentación Sólida Híbrida
CAP	Cultivo de Agar en Placa
FM	Frecuencia de Mojado
TI	Tiempo de Inmovilización
SM	Sin membrana
CM	Con membrana
LS	Líquido sumergido
CNL	Contacto nulo con el líquido
CIL	Contracto intermitente con el líquido
h	Hora
min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramo
gss	Gramo de soporte seco
MS	Micelio seco
mg	Miligramo
ug	Microgramo
L	Litros
mL	Mililitros
uL	Microlitros
g/L	Gramo por litro
mg/mL	Miligramo/mililitro
ug/mL	Microgramo/mililitro
ug/g MS	Microgramo/ gramo micelio seco
PE	Producción Específica

## **1.-Introducción**

Los hongos son un extenso grupo de microorganismos bien diversificados, que incluyen aproximadamente 1.5 millones de especies, (Hawksworth, 2001; Hyde, 2001). La manipulación de las condiciones de crecimiento, así como la diversidad química existente, hacen de ellos un recurso altamente importante para la producción de metabolitos secundarios de importancia industrial, así como la posibilidad de abrir una brecha para el conocimiento de compuestos terapéuticos de nuevo origen, importantes también en la salud humana, ( Demain 1981; Demain *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de tal diversidad fúngica muchos de estos hongos aun no se han estudiado, por lo tanto el desarrollo y papel ecológico de los hongos en la producción de metabolitos secundarios es aun complejo y poco entendido.

La producción de metabolitos secundarios, se lleva a cabo durante la etapa posterior al crecimiento del hongo, denominada idiofase. Durante esta etapa, el estrés al cual es sometido el microorganismo es capaz de inducir señales que ayudan a la producción de enzimas y otros requerimientos nutricionales capaces de modificar su metabolismo (Barrios-González *et al.*, 2003).

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 en plantas y animales y pueden destruir alimentos y materiales de los que depende el hombre. Asimismo, los hongos degradan gran parte de la materia orgánica de la tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite la reutilización de la materia viva (Bigelis *et al.*, 2006).

La tabla 1-1 presenta algunos ejemplos de hongos de uso industrial. Los hongos son la base de muchas fermentaciones como la combinación de soya, habichuelas, arroz y cebada que dan lugar a los alimentos orientales miso, shoyu y tempeh. Los hongos son también la fuente de muchos enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas, peroxidasas, etc.), ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico), alcoholes, antibióticos (penicilina, cefalosporina, etc.) y otros muchos metabolitos usados en medicina.



PROCESO O PRODUCTO	ORGANISMO
<b>ANTIBIÓTICOS Y OTROS FARMACOS</b>	
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>
<b>ENZIMAS</b>	
$\alpha$ - Amilasas	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Celulasas	<i>Penicillium funicolosum, Humicola insolens</i>
Glucoamilasas	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar</i>
Glucosa oxidasas	<i>Aspergillus niger</i>
Lacasas	<i>Coriolus versicolor</i>
Pectinasas	<i>Aspergillus terreus, Aspergillus oryzae</i>
Proteasas	<i>Aspergillus oryzae, Aspergillus melleus</i>
Peroxidasas	<i>Trametes versicolor</i>
Lipasas	<i>Aspergillus terreus</i>

**Tabla.1-1** Principales hongos utilizados en la producción industrial de metabolitos secundarios

El estudio de los hongos como fuente de metabolitos secundarios para su uso en el campo de la medicina comenzó hace más de 70 años. El descubrimiento de la penicilina por Fleming en el año 1929 a partir de *Penicillium notatum* es sin lugar a dudas el hito más importante dentro de la biotecnología moderna de hongos filamentosos y supuso un giro en el desarrollo de la microbiología industrial moderna.

Este hecho dio lugar a la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana e impulsó el estudio de la fisiología de los hongos, la tecnología de la fermentación y el desarrollo de cepas industriales, dando lugar a la llamada Edad de Oro de los antibióticos entre los años cuarenta y cincuenta.

Otro importante metabolito en la industria es la lovastatina, la demanda y uso de lovastatina se halla íntimamente ligada con un problema de salud que aqueja a más del 10% de la población mexicana: la hipercolesterolemia, que ha sido asociada como uno de los factores más importantes en el desarrollo de enfermedades coronarias y una de las principales causas de muerte (Alberts, 1980). Esta enfermedad se caracteriza por el aumento del nivel de colesterol por encima de los normales en sangre, se sabe que del colesterol total del cuerpo, una tercera parte es obtenida de la dieta mientras que las 2 restantes son sintetizadas en el cuerpo (Valera *et al.*, 2005). Dicha enfermedad puede ser controlada debido a la administración de múltiples medicamentos de origen sintético o natural como la lovastatina, medicamento descubierto en los años 70's e introducido al mercado en 1980 durante el siglo XX (Manzoni y Rollini, 2002; Endo, 2004).

La lovastatina es un inhibidor de la 3 hidroxil-3 metil-glutaril-coenzima A reductasa, enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol del ser humano (Alberts, 1988). La lovastatina fue el primer medicamento hipocolesterolémico aprobado por la FDA, USA (Manzoni y Rollini, 2002), en años recientes ha sido reportada como agente terapéutico para tratamientos de varios tipos de tumores, inhibiendo la síntesis de compuestos isoprenoides no-esteroles (Jones *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 1994). Este metabolito es producido por microorganismos como: *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* (Bennett *et al.*, 1989) y algunas especies de *Penicillium* (Kuroda *et al.*, 1976) y *Trichoderma* (Endo *et al.*, 1986).

La producción convencional de dicho metabolito es típicamente desarrollada en procesos de fermentación líquida (FL) o cultivo sumergido, por el hongo filamentoso *A.terreus* (Negishi *et al.*, 1986 ; Kumar *et al.*, 2000; Suryanarayan, 2003). Sin embargo en años recientes otra alternativa de producción ha sido el cultivo en medio sólido (FS) que se basa en la utilización de sustratos como cereales y semillas (Szakács *et al.*, 1998; Valera *et al.*, 2005), y donde dichos sustratos muestran evidencia de resultados interesantes.

Un proceso novedoso para la producción de lovastatina a gran escala, es presentado en este trabajo. En años recientes, varios investigadores han mostrado gran interés en la fermentación en medio sólido (FS) como un proceso alternativo a la fermentación sumergida (FL), debido a las grandes ventajas que ofrece. Además, la FS tiene mayores rendimientos y ofrece mejor estabilidad del producto. Anteriormente la FS era empleada principalmente para la producción de enzimas industriales (Bigelis *et al.*, 2006), pero hoy en día es también utilizada para la producción de etabolitos secundarios.

En años recientes, nuestro grupo de investigación desarrolló un proceso de alta producción de lovastatina por un sistema novedoso de FS en espuma de poliuretano, donde la producción es 30 veces más alta de manera que además de tener potencial industrial, es un ejemplo claro de la fisiología en medio sólido (Baños *et al.*, 2008).

Es importante entender este fenómeno no sólo a nivel molecular, sino desde el punto de vista bioquímico y fisiológico pues aunque es aplicado por múltiples grupos de investigación no se sabe con certeza cuál es la causa que origina la “fisiología del medio sólido”, sin embargo se tiene conocimiento de que deben existir de señales que le indiquen al hongo encender mecanismos adecuados para explorar su hábitat y por tanto incrementar los rendimientos del metabolito secundario de interés.

Nuestro grupo de investigación está interesado en identificar los estímulos ambientales que conducen a la “fisiología del medio sólido”, relacionada principalmente con la alta producción de lovastatina. En el presente trabajo se plantea que uno de los factores involucrados es el estímulo que lo conduce a explorar, colonizar y superar barreras físicas (inmovilización del micelio), así como el efecto producido en el micelio al estar en contacto con el aire, así como

la baja disponibilidad de agua- estrés osmótico presentes en el ambiente en el que se desarrolla el hongo. En su conjunto estos estímulos, son la base para la comprensión de la fisiología del medio sólido, no solo eso sino que con dicha información se permitirá diseñar mejores sistemas de producción de lovastatina y de otros metabolitos secundarios.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Metabolismo Secundario**

#### **2.1.1 Generalidades**

Los metabolitos secundarios microbianos (MS's), son compuestos producidos principalmente por hongos y actinomicetos, usualmente en la fase tardía del crecimiento (idiofase), son compuestos con una variedad de sofisticadas estructuras químicas, producidos por cepas de ciertas especies microbianas y por algunas plantas (Pandey *et al.*, 2001; Barrios-Gonzalez *et al.*, 2007).

A este grupo pertenecen los antibióticos quienes son los MS's mejor conocidos. Existen otros metabolitos con un enorme rango de actividades biológicas, y que por lo tanto, tienen una importancia actual o potencial para la industria. Estos compuestos no juegan un rol fisiológico durante la fase exponencial del crecimiento. Además, se han descrito como opuestos a los metabolitos primarios como: aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos, que son esenciales para el crecimiento (Barrios-Gonzalez *et al.*, 2003).

Una característica del metabolismo secundario es que los metabolitos usualmente no se producen durante la fase rápida del crecimiento (trofofase). La producción de metabolitos inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de un nutriente clave: carbono, nitrógeno o fosfato. Por ejemplo, la biosíntesis de penicilina por *Penicillium chrysogenum* inicia el consumo de lactosa, que es un azúcar menos utilizado. (Barrios-Gonzalez *et al.*, 2003).

### **2.1.2 Clasificación de los Metabolitos Secundarios (MS's) de acuerdo a la Familia**

#### **Biosintética.**

Los metabolitos microbianos, muestran una enorme diversidad de estructuras químicas. Sin embargo, sus rutas biosintéticas están unidas a una red más uniforme del metabolismo primario. Se ha demostrado que estos son formados por rutas alternas al metabolismo primario y que son un número pequeño de puntos de ramificación los cuales definen una amplia categoría de familias biosintéticas (Barrios-González *et al.*, 2003.)

**1.- Metabolitos derivados del ácido Shikímico** (aminoácidos aromáticos). Ejemplos son los alcaloides ergot y los antibióticos candicidina y cloranfenicol.

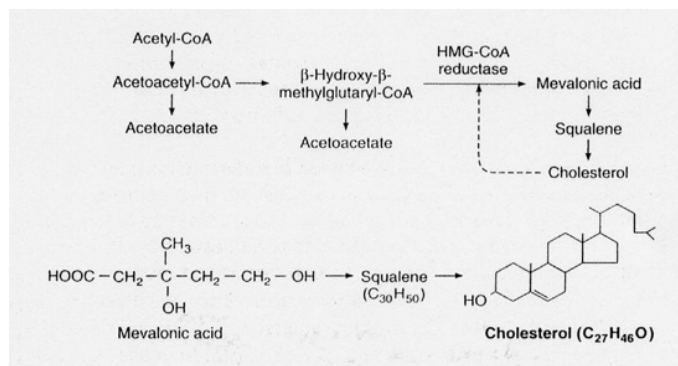
**2.- Metabolitos derivados de aminoácidos.** Esta familia incluye los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como penicilina, cefalosporinas y cefamicinas, así como antibióticos ciclicopéptidicos tales como la gramicidina o la ciclosporina como agente inmunosupresivo.

**3.- Metabolitos derivados de Acetil-Co A.** Incluye todos los intermediarios del ciclo de Krebs. Esta familia puede subdividirse dentro de policétidos y terpenos. Ejemplos de este grupo, incluye al antibiótico eritromicina, el compuesto insecticida-anti parasítico avermectina, y el agente antitumoral doxorubicina. Un ejemplo del segundo grupo es el agente antitumoral no toxigénico taxol.

**4.- Metabolitos derivados de azúcares.** Ejemplos de este grupo, son la estreptomina y la kanamicina.

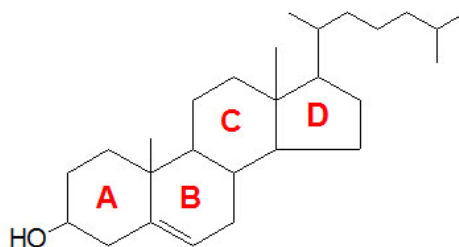
### **2.2 Estatinas**

La hipercolesterolemia es la acumulación de colesterol (Fig. 2-1) en el plasma sanguíneo, que causa aterosclerosis (bloqueo de la arteria), conduciendo a enfermedades coronarias de corazón y ataques cardíacos (Valera *et al.*, 2005). Por lo tanto la posibilidad de controlar la síntesis de novo del colesterol endógeno, que representa aproximadamente dos tercios del colesterol total del cuerpo, representa una forma efectiva de bajar los niveles de colesterol en plasma (Manzoni *et al.*, 2002).



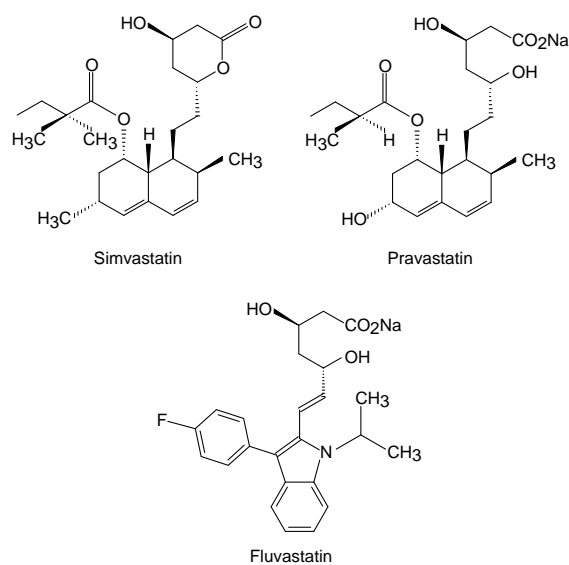
**Figura. 2-1** Ruta de biosíntesis del colesterol (Hajjaj *et al.*, 2001)

Existen varios metabolitos secundarios de estructura química compleja que son sintetizados mediante la ruta de los policétidos en hongos filamentosos y se utilizan para disminuir e inhibir la acumulación de colesterol (Fig. 2-1). Ejemplo de éstos son las estatinas de manera particular, la monacolina L, la mevastatina y la lovastatina, que son producidos por *Monascus ruber*, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus terreus* (Hajjaj *et al.*, 2001).



**Figura 2-2** Estructura química del colesterol (Manzoni *et al.*, 2002).

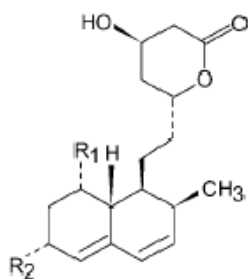
Actualmente son 5 las estatinas utilizadas en el ámbito clínico: la lovastatina y pravastatina (derivada de la mevastatina) son estatinas naturales de origen fúngico, mientras que la simvastatina es un derivado semisintético de la lovastatina, la atorvastatina y fluvastatina son estatinas completamente sintéticas, derivadas del mevalonato y la piridina, respectivamente (Manzoni *et al.*, 2002).



**Figura 2-3** Principales tipos de estatinas presentes en el mercado (Hajjaj *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Estructura de las estatinas

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

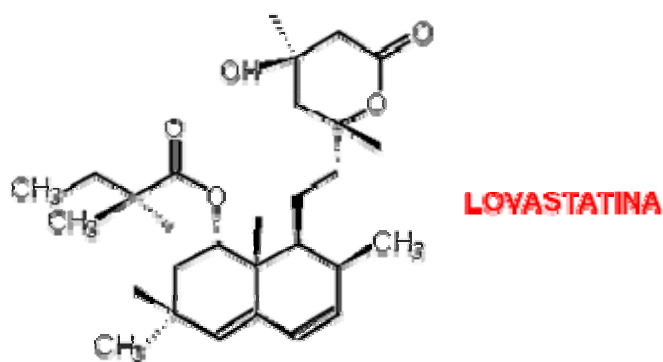


**Figura 2-4** Base estructural de las estatinas, anillo de naftaleno y  $\beta$ -hidrolactona.

(Manzoni *et al.*, 2002).

### 2.2.2 Lovastatina

La lovastatina (Fig. 2-5) es un inhibidor de la enzima 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG.Co A reductasa) mevalonato: NADP1 oxidoreductasa [EC 1.1.1.34] la cual cataliza la reducción de HMG.CoA a mevalonato durante la síntesis del colesterol (Hajjaj *et al.*, 2001).

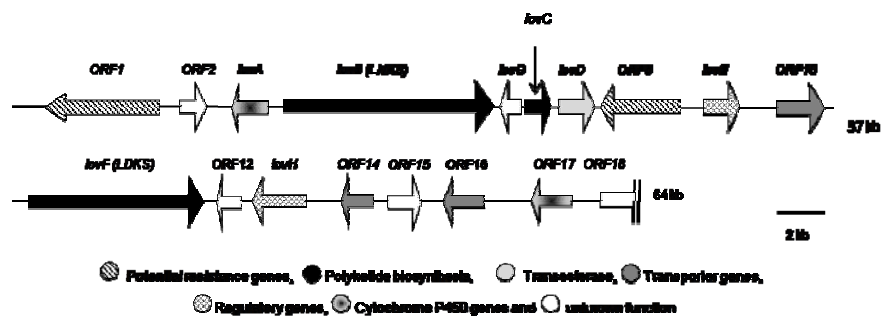


**Figura 2-5** Estructura química de la lovastatina (Manzoni *et al.*, 2002).

La ruta biosintética de la lovastatina se ha investigado por resonancia magnética y espectroscopia de masas (Yoshizawa *et al.*, 1994; Hendrickson *et al.*, 1999). Estos estudios concluyeron que la lovastatina está compuesta de dos cadenas de policétidos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas parcialmente por la Policétido sintasa, resultados que provienen de la clonación y caracterización del *cluster* de genes biosintéticos de lovastatina de *A. terreus* (Hajjaj *et al.*, 2001).



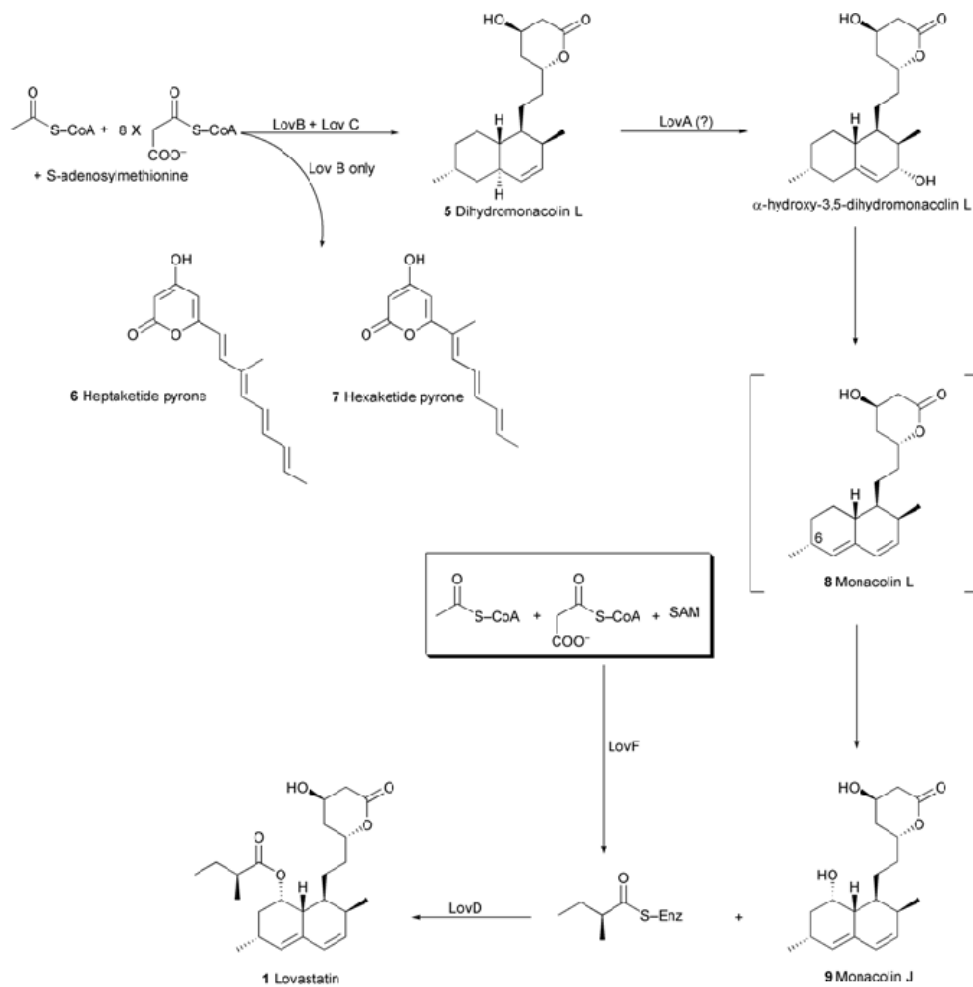
El *cluster* de genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos abiertos de lectura (open Reading frames u ORF'S), 2 de los cuales codifican para proteínas reguladoras, *lovE* y *lovH* (Fig.2-4) (Manzoni *et al.*, 2002).



**Figura 2-6** Cluster de genes biosintéticos de la lovastatina (*lov B* y *lov F* biosíntesis de policétidos; *lov C* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lov E* y *lov H* genes reguladores; ORF12 Y ORF16 genes de transporte; *lovG*, ORF2, ORF12, ORF15 y ORF18 función desconocida. (Barrios-González *et al.*,2007).

### 2.2.2.1 Biosíntesis

Investigaciones anteriores llevadas a cabo en una cepa de *Monascus ruber* sobre las estatinas monacolina J y L y que fueron marcados con  $^{14}\text{C}$ , sugieren que estos compuestos son precursores de la lovastatina y que por lo tanto pueden clasificarse como metabolitos intermediarios de la ruta de biosíntesis de lovastatina Fig. 2-7 (Manzoni *et al.*, 2002).



**Figura 2-7** Ruta biosintética de la lovastatina (Hajjaj *et al.*, 2001).

Estudios en *Monascus ruber*, *Palcilomyces viridis* y *Aspergillus terreus* (Hajjaj *et al.*, 2001), sobre la ruta que involucra la síntesis de lovastatina han demostrado que es iniciada a partir de unidades de acetato. La monacolina L, que es sintetizada a partir de 9 moléculas de acetato, y es convertido luego a monacolina J mediante una hidroxilación, para posteriormente convertirse en lovastatina, (Manzoni *et al.*, 2002).

Recientemente se ha estudiado, a nivel genético el mecanismo enzimático involucrado en la biosíntesis de lovastatina. Los resultados mostraron que hay un Sistema Multifuncional de Policétidos Sintasa (PKSs) el cual comprende una Nonáctido Sintasa (LNKS) involucrada en la ciclación de la cadena principal de policétidos, para formar el sistema de anillos de

hexahidronaftaleno, y una dicétido sintasa (LDKS) involucrada en la transferencia del metilbutiril al costado de la cadena del monacolin J (Manzoni *et al.*, 2002).

Han sido dilucidados los genes que codifican estas enzimas y los factores regulatorios en la producción de lovastatina en *A.terreus* que son clave en el entendimiento de la biosíntesis. En general, los recientes avances en la clonación de genes han permitido la identificación de enzimas involucradas en la biosíntesis de la lovastatina y han confirmado la ruta de biosíntesis hipotética en investigaciones anteriores (Manzoni *et al.*, 2002).

### **2.2.2.2 Producción de lovastatina**

Las investigaciones llevadas a cabo desde 1970 han indicado la posibilidad de obtener un amplio rango de estatinas, tanto de los productos finales como de intermediarios del metabolismo secundario microbiano. Se han desarrollado procesos a gran escala solamente para algunas de las estatinas descritas en la literatura. Para otras moléculas, la investigación todavía está en curso y por lo tanto son susceptibles de desarrollo. Estos estudios han resultado en un profundo entendimiento de los diferentes aspectos relativos a los mecanismos involucrados en la producción de las estatinas, lo cual provee las bases necesarias para el desarrollo de proceso a gran escala.

La lovastatina conocida comúnmente como mevinolina fue la primer estatina en ser aprobada por la FDA de EU (1987) y puesta a disposición para el mercado farmacéutico como un medicamento anticolesterolémico. Esta estatina fue obtenida de una cepa aislada del suelo, clasificada como *Aspergillus terreus* en los laboratorios CIBE en Madrid (España) y de *Monascus ruber* (llamada monacolina K) por (Ende, 1979). Pocos años después la lovastatina también fue obtenida de 17 cepas de diferentes especies, de 124 probadas, de *Monascus*, en particular *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus* y *M. pubigerus*. (Hajjaj *et al.*, 2001; Manzoni *et al.*, 2002).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante cultivo sumergido, es decir; mediante la comúnmente conocida fermentación líquida (FL). Recientemente, la productividad de la cepa de *A. terreus* ATCC 20542, cepa productora original de lovastatina, fue incrementada por el grupo de Metkinen, hasta alcanzar 7-8 g/L, utilizando procedimientos de mutagénesis y la experiencia adquirida en el desarrollo de programas de mejoramiento de procesos. (Manzoni *et al.*, 2002). Por otro lado, la fermentación sólida (FS) es un método de cultivo antiguo que se ha modernizado en los últimos 20 años, de manera que se considera una tecnología emergente con gran potencial para la producción de enzimas y metabolitos microbianos (Robinson *et al.*, 2001).

Existen varios estudios sobre la tecnología de producción para la obtención de lovastatina mediante FS. En años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés en este tipo de fermentación, como una alternativa potencial a la fermentación líquida sumergida, dado que se pueden utilizar sustratos económicos (como residuos agrícolas), que requieren poco procesamiento y en las etapas de transmisión continua, utiliza menos potencia y genera menos efluentes. Además, la FS tiene una alta productividad y ofrece mejor estabilidad del producto. Previamente, la fermentación en estado sólido era utilizada principalmente para la producción de enzimas industriales, pero en la actualidad, esta tecnología es aplicada para la producción de metabolitos secundarios (Manzoni *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2001).

Se ha producido lovastatina por *Aspergillus flavipes* en fermentación en medio sólido, empleando diferentes sustratos sólidos, tales como salvado de trigo, harina de soya, salvado de grano, desechos frutales y sus combinaciones. Valera y col., (2005) encontraron que empleando salvado de trigo se llegaba a producir hasta 13.49 mg/g(sólido seco) de lovastatina en camas estancadas y 16.65 mg/g de lovastatina en camas agitadas aireadas, después de 6 días de fermentación.

Biocon (Biocon, Bangalore, India) es una de las compañías que ha obtenido la aprobación para la producción de lovastatina por la FDA de EU (Enero 2001). Ésta fue la primer compañía hindú, en obtener esta aprobación para moléculas derivadas de fermentación para uso farmacéutico.

El proceso de lovastatina, está basada sobre una tecnología propia de fermentación, el Plafraactor, un biorreactor a gran escala de matriz sólida (Mazumdar y Suryanarayan, 2003). Este nuevo biorreactor, tiene las ventajas de un sustrato sólido y por lo tanto la fermentación permite la reducción de problemas debido a procesos posteriores durante la extracción del producto.

Investigaciones recientes en nuestro laboratorio han encontrado que al producir lovastatina por *Aspergillus terreus* en FS, empleando poliuretano como soporte inerte, hay una producción 30 veces mayor que en FL. Cabe destacar que al emplear un soporte inerte se permitió conocer la producción específica, obteniendo un parámetro comparable con respecto al obtenido en FL, y se encontró que ésta era 13 veces mayor en FS con respecto a FL ( Baños *et al.*, 2005).

## **2.3 Fermentación en Medio Sólido (FS)**

### **2.3.1 Definición**

Cultivo microbiano que se desarrolla sobre la superficie y en el interior de una matriz sólida, en ausencia de agua libre (Hasseltine *et al.*, 1977; Canel *et al.*, 1980; Pandey *et al.*, 2001;).

La fermentación en estado sólido (FS), es un sistema de cultivo microbiano que ha sido usado en muchos países orientales desde la antigüedad, para preparar una diversidad de alimentos fermentados derivados de granos y semillas de arroz (Lonsane *et al.*, 1985). En los últimos 20 años diferentes sistemas de FS a han sido desarrollados, estos trabajan en el diseño del desarrollo del cultivo microbiano, en los soportes utilizados y en la ausencia de agua libre presente en el sistema.

### **2.3.2. Tipos de Fermentación Sólida**

Se distinguen principalmente 2 tipos de sistemas de FS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada; el más comúnmente utilizado involucra un sistema de cultivo sobre material natural, y el menos frecuentemente utilizado, un cultivo involucra un soporte inerte impregnado con medio líquido ( Aidoo *et al.*, 1982; Barrios-González y Mejía, 1996).

### **2.3.2.1 Fermentación Sólida en Sustratos Sólidos Naturales.**

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

### **2.3.2.2. Fermentación Sólida en Soportes Inertes**

Estos sistemas involucran el cultivo de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con medio líquido. En esta FS, el soporte inerte sirve solamente como un reservorio de nutrientes (en una fase líquida), pero también como un punto de anclaje para los microorganismos (Oojikaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005). Estas características pueden convertirse en desventajas para el sistema de producción, y pueden superarse empleando soportes inertes, permitiendo mejorar el control de la transferencia de calor y masa. Una ventaja de este tipo de sistema, es que hace menos complicado la recuperación del producto.

Los productos extra o hasta intracelulares, pueden ser extraídos más fácilmente del soporte inerte, ya que estos pueden ser obtenidos con menos impurezas. Quizás la ventaja más importante de este sistema, es que facilita los estudios básicos, ya que la composición del medio puede ser diseñada con precisión. En esta forma, puede probarse un medio definido y el efecto de diferentes compuestos. Además, el medio líquido puede extraerse del soporte inerte en cualquier tiempo del cultivo y analizar sus componentes.

El sistema permite el diseño de un medio de producción adecuado, y es más fácil de desarrollar los balances de masa para modelar procesos más avanzados y controlarlos, ya que se conocen las concentraciones de todos los nutrientes en el medio de producción. Por otra parte, se han empleado dos variantes en este tipo de sistema: a) FS sobre soportes inertes naturales, tales como bagazo de caña de azúcar; b) FS sobre soportes inertes artificiales, tales como espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, agrolita, vermiculita, perlita, partículas de pozolano (material volcánico) y gránulos de arcilla (Oojkaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2006).

### **2.3.2.3 Desarrollo de procesos de FS sobre soportes inertes para la producción de metabolitos secundarios.**

El uso de soportes inertes impregnados con medio líquido, ofrece flexibilidad adicional cuando se diseña el medio para la producción óptima de metabolitos. Para el estudio de la producción de MS' sobre soportes inertes, se han empleado medios recomendados para la FL y también se ha optimizado el grado de concentración, el cual usualmente se encuentra entre 2 y 2.5 veces la concentración empleada en FL (Barrios-González *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 2000; Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005). Una vez que el nivel de concentración es establecido, la concentración óptima de los nutrientes individuales puede ser determinada, como por ejemplo por un diseño centrado en la composición y la metodología de análisis de la superficie de respuesta. De este modo, se pueden encontrar valores óptimos con menor número de experimentos, como se ha hecho en FS sobre sustratos sólidos. (Barrios-González *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 2000; Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005)

Aunque la FS sobre soportes inertes es muy conveniente para estudios básicos, otros trabajos indican que la fermentación sobre bagazo impregnado (soporte inerte natural) puede ser muy productivo, como en el caso de penicilina (13 mg/g)(Barrios-González y Mejía 1996; Barrios-González *et al.*, 1993). Resultados muy recientes muestran que los soportes inertes naturales pueden ser excelentes para la producción de MS's.

Baños y col.,(2005) diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial donde obtuvieron 19.95 mg/g en 7 días. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakács *et al.*, 1998). La producción de esta cepa, en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue de 0.62 mg/mL. Esta cepa también fue probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.615 mg/g. Estos estudios muestran que la producción de lovastatina obtenida en el sistema en FS fue más alta que en cualquier sistema de FS o FL reportado. La “ fisiología especial” del medio *sólido* se manifiesta con claridad aquí, ya que cada mg de micelio en FS, muestra una producción específica de 816 µg de lovastatina mientras que el proveniente de FL produce sólo 25 µg de lovastatina (con la misma cepa y composición del medio de cultivo).

Existen reportes donde se manifiesta con claridad esta fisiología especial del medio sólido, ya que en algunos casos se ha encontrado que enzimas que se producen en forma intracelular en FL, son de tipo extracelular en FS, y que ambas muestran diferente peso molecular y características cinéticas. Se ha encontrado que los hongos contienen distintos genes que codifican para una misma clase de enzima y que estos genes equivalentes son regulados diferencialmente dependiendo del medio donde se encuentren (Ishida *et al*, 2005).

Estos hechos sugieren que el hongo recibe señales provenientes del medio ambiente que le indican que está en uno u otro sistema de cultivo (FL o FS), y es esto lo que hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología distinta, ocasionando la presencia de estímulos ambientales que originan probablemente las altas producciones de “fisiología del medio sólido”. (Ishida *et al*, 2005).



## 2.4 Presencia de Estímulos Ambientales en fermentación sólida

No se conoce aun a ciencia cierta el por que se da un aumento en la producción en el sistema de fermentación sólida en comparación con FL durante la producción de metabolitos. Sin embargo Ishida y col., 1998 trataron de comprender la “fisiología del medio sólido” a través de su microorganismo de estudio; (*Aspergillus oryzae*, productor de diferentes tipos de glucoamilasas: especialmente de los genes codificadores de amilasas *gla A* y *gla B*).

Su investigación les permitió obtener observaciones importantes, diseñando un novedoso sistema de fermentación que se trató de un cultivo diseñado sobre agar en placa, este cultivo involucraba el uso de una membrana y dicho sistema fue denominado CM. Los resultados encontrados sugieren una relación entre la producción de glucoamilasa (*gla B*) y el tamaño de poro de la membrana utilizada, sobre todo si en Ésta se disminuía el tamaño de poro, por lo que esta evidencia asegura la existencia de un estímulo presente a la hora de colocar la membrana que puede ser el de ramificación y exploración, involucrado en la fisiología del medio sólido.

Otras de sus observaciones interesantes es que: aunado a este estímulo de superación de barreras físicas que provoca la alta producción de su enzima, encontraron que la región del promotor de *glaB* es mediada por la transcripción del gen debida a una alta temperatura y baja actividad de agua. Otro grupo de investigadores (Beisebeke *et al.*, 2005) llegaron a conclusiones muy similares en la que la alta inducción del gen *gla B* y producción de glucoamilasa B en fermentaciones sobre sustratos sólidos es debida a que el hongo debe ser capaz de vencer barreras físicas para poder desarrollar hifa y aumentar su crecimiento. La alta temperatura el efecto de la  $A_w$  no son realmente significativas, sino que todo el efecto producido es debido a la concentración de maltosa presente en el medio de fermentación.

Estudios recientes enfocados a este mismo aspecto, realizados por Kobayashi *et al.*, (2007), con la finalidad de encontrar evidencias acerca de las altas producciones obtenidas en el cultivo en fermentación sólida, señalan que una variable importante que desencadena esta reacción de la denominada “fisiología del medio sólido” es el contenido de agua del cultivo, que se halla relacionado con una alta expresión del gen. Por lo tanto mayores producciones en

sistema de fermentación sólido, son debidas al agua disponible, por lo que este es uno de los factores más importantes que afectan la expresión de los genes durante el cultivo en estado sólido.

Este grupo de investigadores realizó un estudio, probando diferentes cantidades de agua: 2, 3,46 y 8 mL a 30°C durante un tiempo de cultivo de 48 horas. Extrajeron RNA total y utilizando herramientas de biología molecular llegaron a una conclusión importante de que el aumento en el contenido de agua, disminuía la expresión del gen, por lo tanto a menor cantidad de agua mayor expresión del gen y entonces mayor producción de la enzima de interés. En forma inversa sucede para la enzima producida por el gen *gla A*, la cual a mayores valores de contenido de agua, aumenta la expresión del gen es decir; la relación es directamente proporcional.

Otra aportación interesante es la realizada por (Nakanishi *et al.*, 2004), quienes realizando estudios en diferentes tipos de cultivo observaron de manera directa el estímulo de barreras físicas a las que se enfrenta el hongo cuando está presente alguna membrana o soporte en el medio de cultivo. Los diseños utilizados se denominaron MSLC (Membrane Surface Liquid Culture), APC (Agar Plate Culture), USC (Culture on urethane sponge supports), LSC (Liquid Surface Culture) utilizando en algunos de ellos membranas de nylon y poliéter sulfonato.

Hallaron evidencias de que las membranas constituidas por material de nylon con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ micras presentaban una mayor producción del metabolito de interés en comparación con aquellas membranas compuestas de poliéter sulfonato. Además otras de las conclusiones importantes fueron las siguientes:

- La cantidad de  $\alpha$ -glucosidasa producida durante el día 5, fue 5 veces mayor en el cultivo MSLC en comparación con LSC.
- El sistema APC (Cultivo de agar en placa) obtuvo una producción de enzima muy similar a la obtenida en el cultivo MSLC
- La producción obtenida en USC fue la mitad de lo obtenido en MSLC y APC.

- Cabe destacar que los resultados obtenidos también fueron analizados observando el efecto de la fuente de N: extracto de levadura y  $\text{NaNO}_3$  siendo esta última la que mejores resultados obtuvo.

Así, MSLC podría ser utilizado como un método de cultivo alternativo a la fermentación en medio sólido para la producción de  $\alpha$ -glucosidasa (una enzima utilizada ampliamente a nivel industrial). Incluso MSLC podría sustituir al cultivo en Fermentación Sólida si logran optimizarse los componentes del medio y pH debido a que al realizar un análisis de la producción específica ésta resulto ser 10 veces mayor que la reportada en Fermentación Sólida utilizando como soporte salvado de trigo.

De esta manera ha sido demostrado la producción en soportes de tipo sólido ofrece altas producciones de cada metabolito en cuestión, esto como consecuencia del desarrollo de una fisiología distinta, “fisiología de medio sólido” que puede desencadenar múltiples señales de aviso para el hongo y por tanto que se presenten altos niveles de producción durante el uso de soportes de tipo sólido.

Dichas señales han sido poco estudiadas y no se sabe a ciencia cierta que ocurre, probablemente esto pueda deberse a causa de un estrés (un ejemplo es la levadura *S. cerevisiae* que cuando se encuentra en condiciones desfavorables, sintetiza moléculas llamadas proteínas de estrés que atenúan o reparan el daño causado por estrés). Su estudio ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta, por lo tanto estos estudios pueden ser determinantes para ver lo que sucedería en hongos, particularmente en *A. terreus*.

### 3.- Justificación

La lovastatina es un metabolito secundario de origen fúngico producido por *Aspergillus terreus*, la forma convencional de obtención de dicho metabolito es por un proceso de fermentación líquida (FL). Sin embargo los estudios de los últimos 10 ó 15 años han permitido que la fermentación sólida (FS) surja como un proceso alternativo de producción industrial.

La demanda de producción de lovastatina se halla íntimamente ligada con un problema de salud que aqueja a más del 10% de la población mexicana, la denominada hipercolesterolemia, que ha sido asociada como uno de los factores más importantes en el desarrollo de enfermedades coronarias y una de las principales causas de muerte. Dicha enfermedad puede ser controlada debido a la administración de múltiples medicamentos de origen sintético o natural, como la lovastatina, medicamento descubierto en los años 70 e introducida al mercado en 1980.

Tomando en cuenta esto, la producción de lovastatina para su uso como medicamento es de interés económico en el área de salud y en el sector farmacéutico. Nuestro grupo de trabajo desarrolló un sistema novedoso de alta producción de lovastatina por FS en poliuretano. Se ha demostrado que la producción de lovastatina es mucho mayor en este sistema de FS que en FL, y en un trabajo anterior se demostró que esto se debe a que, en FS, el factor transcripcional (*Lov E*) y los genes de biosíntesis se expresan más intensamente. (Barrios-González *et al.*, 2008) Esto indica que en FS el hongo está percibiendo señales ambientales que inducen a estos y otros genes, cuya expresión da como resultado la fisiología del medio sólido.

Es por tanto muy importante, desde el punto de vista básico, identificar y estudiar los estímulos ambientales relacionados con esta fisiología (inmovilización del micelio, actividad de agua-estrés osmótico e interfase con el aire). Este conocimiento se podrá aplicar al diseño de métodos de mejoramiento genético específico para FS o FL. También al diseño de procesos de FS más eficientes.

#### **4.-Hipótesis**

- A.** Existen estímulos ambientales que inducen en hongos, y en particular en *A. terreus* la “fisiología del medio sólido” y por lo tanto la alta producción de lovastatina obtenida en FS.
  
- B.** Estos estímulos incluyen: 1) estímulo que induce al hongo a formar un micelio que explora y coloniza; 2) baja disponibilidad de agua-alta concentración de nutrientes y 3) interfase con el aire. Por lo que la presencia de ellos, solos y sobre todo en combinaciones, se verá reflejada en un incremento de la producción y producción específica de lovastatina.

## 5.- Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de: estímulo de exploración, baja disponibilidad de agua-concentración de nutrientes y efecto de interfase con el aire, sobre la producción de lovastatina en *A. terreus*.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Observar el efecto de la inmovilización del micelio (exploración) en Sistemas de Fermentación líquida (FL) y Fermentación Sólida (FS).
  - Diseñar un sistema de Fermentación Líquida con micelio inmovilizado.
  - Comparar la producción de los sistemas: FL micelio suelto vs FL micelio inmovilizado (FLI).
  - Diseñar un Sistema de FS: micelio suelto vs micelio inmovilizado y evaluar el parámetro de producción.
- 2) Efecto de la concentración de nutrientes en Sistemas de FL y FS
  - Comparación entre los sistemas de FLI y Cultivo en membrana sobre agar desarrollados a concentraciones de medio: 1x y 2.5x
- 3) Efecto del grado de contacto del micelio con el aire (interfase con el aire) en FL y FS.
  - Diseño de un Sistema de FL con diferentes grados de contacto del micelio con el aire (FLI).
  - Diseño del Sistema de FS con diferentes grados de contacto del micelio con medio líquido (FSH).

## **6.-Materiales y Métodos**

### **6.1 Cepas fúngicas utilizadas**

#### **6.1.1.Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUBF-514**

Con la finalidad de obtener un inóculo adecuado para llevar a cabo la fermentación en medio sólido se utilizó la cepa de *Aspergillus terreus* con número de colección TUB F-514 (Szakács *et al*, 1998) aislada del suelo de Asia y, proporcionada por el Departamento de Tecnología Química de Agricultura de la Technical University of Budapest. Es un hongo filamentoso que produce metabolitos secundarios clínicamente relevantes como, la estatina.

Linaje: *Eucaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae; Aspergillus; Aspergillus terreus.*

#### **6.1.2 Cepa fúngica: *Neurospora crassa***

*Reino: Hongos; Phylum: Ascomycota; Clase: Ascomyceto; Orden: Sordariales; Familia: Sordariaceae; Género: Neurospora; Especie: Crassa*

Esta cepa fue utilizada, para realizar los bioensayos necesarios en el sistema de fermentación sólida, al estudiar el estímulo de exploración y colonización (inmovilización del micelio) de *A. terreus*. La cepa fue proporcionada por el laboratorio de Biología molecular y metabolitos secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana.

### **6.2 Condiciones de Crecimiento**

La proliferación de la cepa se llevó a cabo sobre Medio Power (Medio PMI y Medio CZAPEK proporción 1:1), repartiendo 50 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL e inoculando con 200 µL de la suspensión de esporas en glicerol. Posteriormente se incubó a 30 °C, durante 6 días, para la cosecha de esporas fue necesario utilizar como solución de cosecha Tween 80 al 0.05% estéril, se adicionaron 10 mL a cada uno de los matraces y finalmente las esporas fueron contadas con ayuda de cámara de Neubauer mediante un microscopio de contraste de fases.

## 6.3 Medios de Cultivo

### 6.3.1 Medios de Cultivo para *Aspergillus terreus*

6.3.1.1 Medio Czapek: Medio utilizado para esporulación y mantenimiento de la cepa.

<b>Nutriente</b>	<b>Composición (g/L)</b>
Sacarosa	30.0
NaNO <sub>3</sub>	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01

6.3.1.2 Medio PML: Medio utilizado para esporulación y mantenimiento de la cepa.

<b>Nutriente</b>	<b>Composición (g/L)</b>
Baltopeptona	5.0
Lactosa	5.0
NaCl	4.0
Sólidos de Maceración de maíz	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.060
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.050
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.003
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.001

6.3.1.3 Medio Power: Medio utilizado para esporulación y mantenimiento para la cepa.

<b>Nutriente</b>	<b>Composición (g/L)</b>
Medio PML	50%
Medio Czapek	50%
Agar	2%
pH	6.5



6.3.1.4 Medio de Producción 1x: Medio utilizado para cultivo en Fermentación Líquida (FL).

<b>Nutriente</b>	<b>Composición (g/L)</b>
Glucosa	6
Lactosa	34
Harina de soya	3
KNO <sub>3</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.5
pH	6.5

6.3.1.5 Medio de producción 2.5x: Medio utilizado para cultivo en Fermentación Sólida (FS).

<b>Nutriente</b>	<b>Composición (g/L)</b>
Glucosa	15
Lactosa	85
Harina de Soya	7.5
KNO <sub>3</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.5
NaCl	1.25
MgSO <sub>4</sub>	1.25
pH	6.5

## **6.4 Producción de lovastatina**

### 6.4.1 Cultivo en Medio Líquido (FL)

Para realizar la FL, se preparó medio de producción 1x (Baños *et al.*, 2005), posteriormente se repartieron 50 mL de medio en matraces Erlenmeyer. Cada cultivo fue inoculado con una suspensión de esporas donde estaban contenidas  $2 \times 10^6$  esporas/mL e incubados a 30 °C con una agitación de 200 rpm durante 7 días.

#### 6.4.2 Fermentación Líquida Inmovilizada (FLI)

El diseño de este sistema de fermentación consistió en utilizar una banda de soporte inerte sólido (PUF 20 Kg/m<sup>3</sup>) de 16 cm X 5 cm, posteriormente se colocó en matraces Erlenmeyer de 250mL la forma de inóculo fue distinta pues se realizó el cálculo estimado para impregnar el soporte a un contenido de humedad del 85%, lo cual se logró adicionando medio de cultivo y una concentración de esporas de 2X10<sup>6</sup> esporas/mL, a estas condiciones se dejó inmovilizar el cultivo durante 4 horas y posteriormente se adicionó el volumen necesario para completar 150 mL de medio concentración 1x y 2.5x según el caso. Se incubó a 30 °C con una agitación de 150 rpm durante 7 días.

#### 6.4.3 Cultivo en Medio Sólido (FS)

Para realizar FS, se preparó medio de producción cuya concentración de nutrientes fue 2.5x veces. Se inóculó con una concentración de esporas de 2X10<sup>6</sup> esporas/ mL, y éste medio ya inóculado fue empleado para impregnar el soporte sólido inerte (PUF 20 Kg/m<sup>3</sup>) a un contenido de humedad del 85%. Se empleo espuma de poliuretano como soporte, el cual fue pretratado (Tomasini *et al.*, 1997). Los cubos de 1cm<sup>3</sup> fueron impregnados con el medio previamente inóculado, y 6 g de este medio sólido fue colocado en cada matraz Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente fueron cubiertos con papel aluminio y parafilm (Pechiney Plastic Pacaging, Menasha, Wi USA) como ha sido descrito por Baños y col., (2005).

#### 6.4.4 Fermentación Sólida Híbrida (FSH)

Para FSH, de igual manera que en FS, se utilizaron cubos de 1 cm<sup>3</sup> de soporte inerte sólido. Se impregnaron con medio de producción 2.5x previamente inóculado a una concentración de esporas de 2X10<sup>6</sup> esporas/mL, se inmovilizó durante 8 horas, y se incubó a 30°C. Posteriormente, al término de este tiempo, fueron adicionados 8 mL de medio limpio, los matraces fueron colocados en un aparato Rocker (Modelo 35 Lab Net), con cierta frecuencia de mojado la cual consistió en mojar los cubos de poliuretano a distintos tiempos, cabe destacar que se controló el tiempo con un cronómetro (Modelo Lab Controller).

#### 6.4.5 Cultivo de Agar en Placa (CAP)

Se preparó medio de producción 2.5x y 1x, se agregó 2% agar, ajustándose a pH 6.5. Se esterilizó en autoclave para posteriormente vaciar en cajas de Petri 12 mL, dejándose solidificar. De acuerdo a cada uno de los tratamientos se colocó una membrana estéril de poliétersulfonato en la mitad de las unidades experimentales. Se inoculó con una suspensión de esporas previamente cosechada, haciendo las diluciones necesarias para inocular con 100  $\mu\text{L}$  que contenían  $1 \times 10^4$  esporas. La inoculación se desarrolló de manera uniforme con ayuda de un asa de vidrio. Se incubaron en cámara de humedad a 30 °C hasta observar esporulación. Se realizó el análisis de biomasa y cuantificación del metabolito, por HPLC.

### 6.5 Técnicas Analíticas

#### 6.5.1 Lovastatina

6.5.1.1 Extracción en FL. Para la extracción de lovastatina en este sistema, se tomaron 2 tipos de muestra, la primera proveniente del caldo obtenido durante la fermentación de la cual se tomaron 2 mL de caldo, se adicionaron 2 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua 50% depositando en un vial; la segunda proveniente del micelio, en este caso se pesó 1 g de micelio húmedo el cual se paso a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo-agua 50%, seguida de una agitación en el vórtex durante 2 min. Los tubos obtenidos de cada muestra se colocaron en el sonicador (Branson 120) durante 30 min, la muestra se pasó a través de un filtro Nyltal y posteriormente por una membrana millipore de 0.40  $\mu\text{m}$  de poro. Todas las muestras fueron guardadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL a 4 °C hasta su posterior análisis en HPLC.

6.5.1.2. Extracción en FS. Se pesó 1 g de soporte húmedo fermentado, al cual se le adicionaron 10 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua 50%, seguida de una agitación de 250 rpm a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se llevó al sonicador por un tiempo de 30 min (Branson 120), y finalmente la muestra se pasó a través de una membrana (Millipore) de 0.40  $\mu\text{m}$  de poro. Las muestras fueron guardadas en Eppendorf de 1.5 mL, hasta su posterior análisis por inyección en HPLC.

6.5.1.3 Extracción en FLI. Para la extracción en este sistema, la banda de poliuretano fermentada que se obtuvo (12 x 5 cm), fue cortada en 3 trozos y posteriormente cada uno de ellos fue tratado en forma individual, obteniéndose así cuadros de poliuretano de aproximadamente 1 cm, como en FS, considerando cada una de las zonas obtenidas en este sistema de fermentación. A cada gramo de soporte fermentado se adicionaron 10 mL de una mezcla de acetonitrilo: agua 50%, seguida de una agitación de 250 rpm y 37 °C, posteriormente se sonicó durante 30 min. Finalmente cada una de las muestras obtenidas fueron filtradas a través de una membrana de 0.40  $\mu\text{m}$ , las muestras fueron guardadas hasta su posterior análisis por inyección en HPLC.

6.5.1.4 Extracción en FSH. Se tomaron 2 muestras para este sistema, la primera del soporte fermentado y la segunda del caldo obtenido en la fermentación. Se pesó 1 g de soporte húmedo fermentado, al cual se adicionaron 10 ml de la mezcla acetonitrilo: agua 50%, se agitó y sonicó durante 30 minutos en las condiciones explicadas anteriormente. Para la muestra obtenida de caldo se adicionaron 2 mL de la mezcla acetonitrilo: agua, se agitó y los viales obtenidos para ambos casos fueron guardadas hasta su posterior análisis por inyección en HPLC.

6.5.1.5 Extracción en CAP. El muestreo empleado en este caso se realizó de la siguiente forma: del cultivo en caja de Petri, se tomó una cuarta parte la cual fue macerada de forma homogénea y depositada en un tubo de vidrio, a éste se le adicionaron 10 mL de la mezcla acetonitrilo: agua, se agitó a una velocidad de 250 rpm incubando a 37 °C, y posteriormente se llevó a sonicador durante 30 min. Las muestras obtenidas de cada tubo fueron filtradas con ayuda de una membrana de 0.40  $\mu\text{m}$  y guardadas para su posterior uso.

6.5.1.6 Cuantificación: Se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150X 3.9 mm, 4  $\mu\text{m}$ ), con una fase móvil de acetonitrilo; ácido fosfórico 0.1% (50% v/v), la velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min, y la forma  $\beta$ -hidroxiácida se determinó a 238 nm con un detector de arreglo de diodos.

### **6.5.2 Biomasa y Humedad**

**Humedad en FS, FLI y FSH.** Para la medición de este parámetro, se tomaron los cubos de soporte fermentado finales del matraz de fermentación, se secaron en un horno a 60 °C durante 48 horas; por diferencia de peso se pudo determinar el contenido de humedad inicial y final.

**Biomasa en FS, FLI y FSH.** La biomasa fue determinada por el método de glucosamina (Tomaselli *et al.*, 2001; Marcial *et al.*, 2005) empleando el soporte seco utilizado para conocer la humedad.

**Biomasa en FL.** Se empleó el método de peso seco, donde el micelio filtrado, se secó en un horno a 60 °C durante 48 horas.

**Biomasa en CAP.** Para determinar la producción de biomasa en este sistema, se utilizó una cuarta parte del cultivo, se solubilizo el agar con un volumen de 20 mL de buffer de acetato pH 3.5, y se llevó a calentamiento a 100°C durante 15 minutos. Posteriormente el micelio fue recuperado mediante la filtración del mismo utilizando filtros Nyltal, para finalmente secar en horno a 60 °C, durante 48 horas.

### **6.5.3 pH**

Medición de pH en FL. Del caldo obtenido durante la fermentación y la posterior filtración del micelio, se midió el pH directamente.

Medición de pH en FS, FLI y FSH. Se tomó 1 g del soporte húmedo, se adicionaron 10 mL de agua. La mezcla fue sometida a agitación en vortéx durante 2 minutos, posteriormente el pH fue medido directamente.

### **6.5.4 Azúcares**

Se realizó la medición por HPLC, empleando una columna YMC-Pack NH2 S-5 de 120 (4.6 X 250 mm, 12 nm), con una fase móvil de acetonitrilo: agua (75:25), la velocidad del flujo fue de 1mL/min. La lactosa y la glucosa fueron detectadas a los 8 y 5 minutos respectivamente a 190 nm, con un detector de arreglo de diodos.

## **7. Resultados**

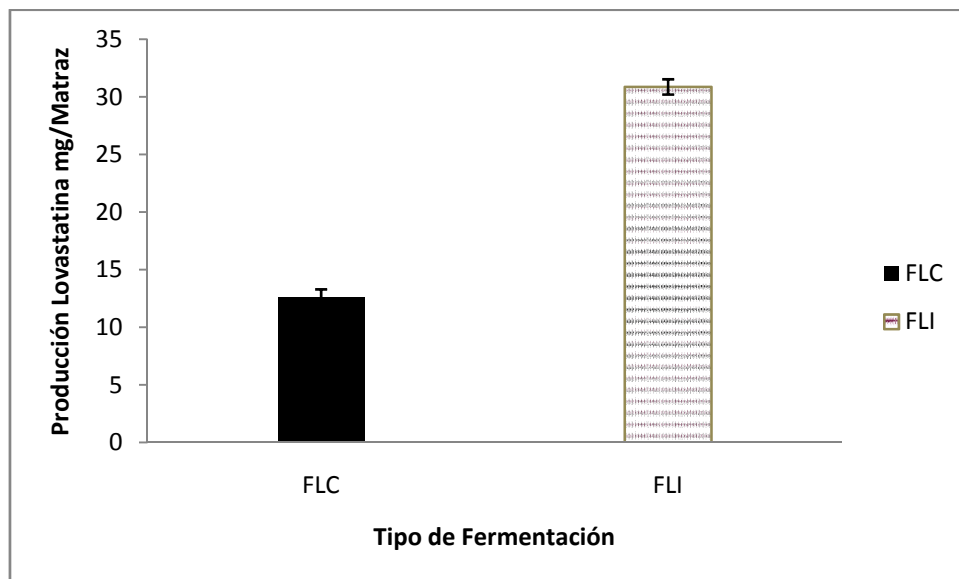
### **7.1 Efecto de Inmovilización del Micelio**

#### 7.1.1 Sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada

Los estímulos ambientales planteados en esta tesis requirieron del diseño de sistemas de fermentación novedosos para conocer la influencia de cada uno de ellos en la producción de lovastatina. Cabe destacar que todos los estímulos ambientales involucrados fueron probados tanto en un ambiente líquido como en cultivo en estado sólido (FS) o en contacto con el aire, en *A. terreus*.

El primero de los estímulos ambientales planteados fue el de exploración y colonización (inmovilización del micelio) en FL y FS. Para el cultivo en líquido, se montó un sistema diseñado a partir de poliuretano de alta densidad, (PUF 20 kg/m<sup>3</sup>) que se denominó Fermentación Líquida Inmovilizada (FLI). En este sistema se utilizó una banda de PUF colocada en un matraz de 250 mL y medio de Producción 2.5x. Asimismo, el proceso de inmovilización consistió en inocular con el número de esporas correspondientes al medio utilizado para impregnar el soporte con ( $1 \times 10^8$  esporas/mL), posterior a esto se incubó por 4 horas a 30°C, después se agregó el resto del medio para completar a un volumen de 150 mL. Se realizó también una FL control, utilizando un volumen de 150 mL e inoculación con el mismo número de esporas.

### 7.1.1.1 Producción de lovastatina



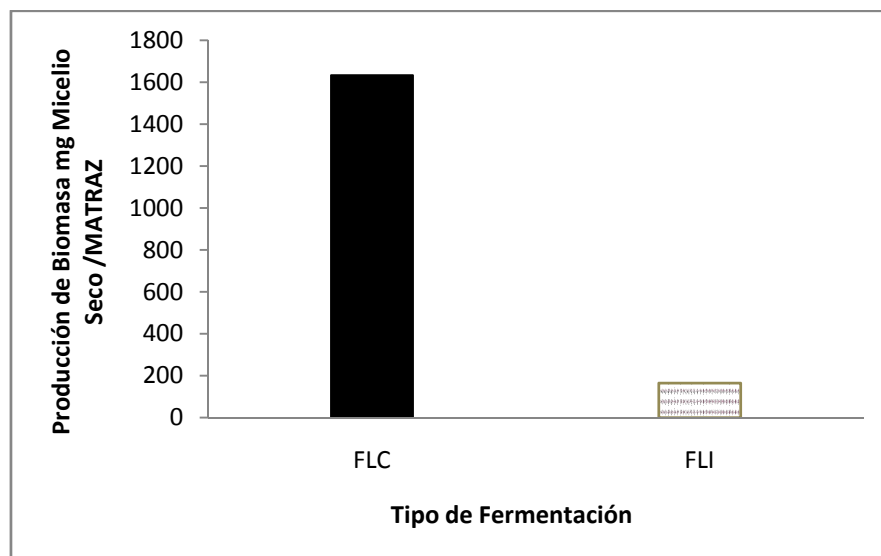
**Figura 7-1** Producción total (mg/matraz) de lovastatina producida por *A. terreus* en el Sistema de FLC convencional (■) y Fermentación líquida inmovilizada FLI (▨), 6 repeticiones

La idea de inmovilizar el micelio, fue con la finalidad de observar si el estímulo de exploración, estaba relacionado con la alta producción de lovastatina, FS. Los resultados (Fig. 7-1) mostraron un nivel mayor de producción en FLI en comparación con FL convencional, (31 vs 13 mg Lov/Matriz) lo que demostró que hay influencia importante del estímulo planteado.

### 7.1.1.2 Producción de biomasa

De la misma forma fue estudiado el efecto producido en el crecimiento. La producción de biomasa fue determinada en FLI por el método de glucosamina, con algunas modificaciones durante el muestreo. Debido a que la banda de PUF fermentada era poco manipulable, se cortó en 3 fragmentos, hasta así obtenerse cuadros de PUF de 1 cm.

Como se observa en la (Fig.7-2), la mayor producción de biomasa fue en el cultivo de FL, cultivo convencional. En contraparte no sucede así para la FLI; como se aprecia en la figura, el valor registrado es 10 veces menor en comparación con el sistema convencional ( $164 \pm 0.016$  mg MS vs  $1,600 \pm 0.016$  mg MS), lo que sugiere que la inmovilización en PUF, limita el crecimiento en ciertos espacios (Fig.7-3).



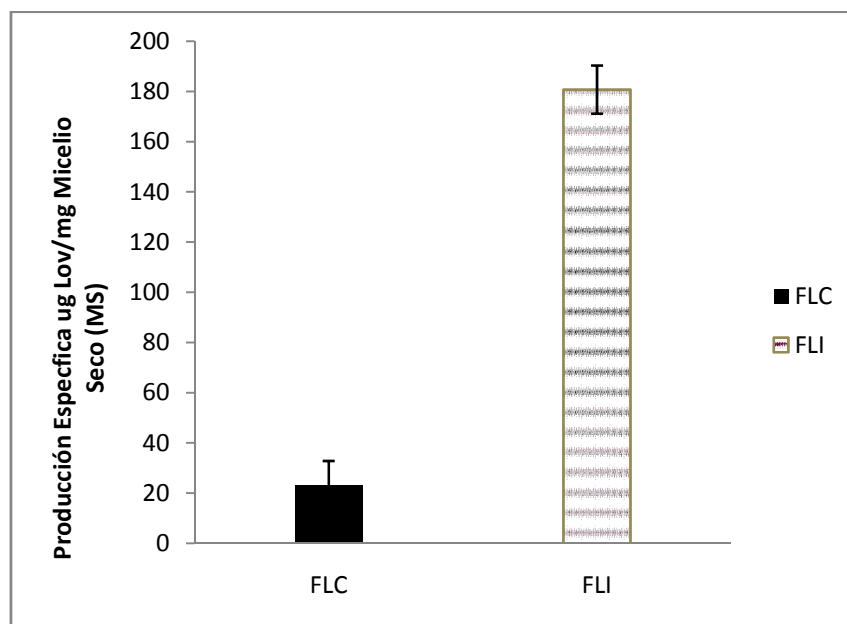
**Figura 7-2** Producción de micelio seco (mg/matraz) generada por *A. terreus* en (■) FL y (□)FLI.



**Figura 7-3.** Crecimiento presentado en los cubos de poliuretano durante la FLI.



### 7.1.1.3 Producción específica



**Figura 7-4** Producción específica de lovastatina por *A. terreus* obtenida al día 7 en los sistemas de FL (■) y FLI (▣)

La producción específica (PE) nos permitió realizar una comparación más precisa de cómo está funcionando el micelio en ambos tipos de fermentación, fermentación líquida convencional (FLC) y fermentación líquida micelio inmovilizado (FLI).

Así se encontró que en FLI, la producción específica fue casi 10 veces mayor que en FL ( $180.76 \pm 13.61 \mu\text{g}/\text{mg MS}$  vs  $23.2 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ), apoyando la hipótesis de que los estímulos que obligan al hongo a explorar y colonizar están relacionados con una alta producción de lovastatina. Estos resultados parecen coincidir con lo obtenido en el perfil de producción de lovastatina donde la inmovilización tiene un efecto positivo, que incide en la producción de lovastatina y más aún que este estímulo pertenece al grupo de señales ambientales involucradas en la “fisiología del medio sólido”.

## 7.1.2 Sistema de Fermentación Sólida

### 7.1.2.1 Diseño de Sistema de Fermentación Sólida.

Para estudiar el efecto del estímulo de exploración en un ambiente sólido o de contacto con el aire, se diseñó un sistema de cultivo en caja Petri con medio en agar (donde no hay un estímulo de exploración claro) y lo mismo con una membrana que permite el paso de nutrientes pero no del micelio, por lo que se estimula la exploración y la superación de barreras.

El diseño de este sistema se denominó, Cultivo de Agar en Placa (CAP), cabe destacar que antes de trabajar en el diseño, previamente se trabajó con la metodología de cilindros de agar (Figura 7-5). Sin embargo al no obtenerse resultados satisfactorios sobre todo en el parámetro de biomasa; es decir que no se tenía precisión para cuantificar biomasa debido a que la producción de ésta era muy pequeña, por lo que fue necesario escalar el procedimiento a cajas de Petri completas con el uso de membranas.

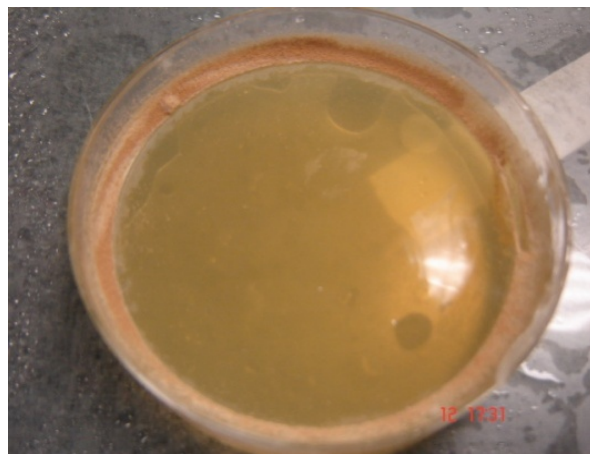


**Figura 7-5** Experimento previo realizado en el sistema de Cilindro de Agar

Con la finalidad de observar este estímulo en cultivo sólido, se realizaron experimentos previos en el sistema de cajas de Petri, se seleccionó sólo un tipo de membrana de entre tres que se trabajaron: nitrocelulosa, nylon y poli éter sulfonato; obteniéndose así que la mejor membrana fue aquella compuesta de poli éter sulfonato. Esto debido a la alta producción de lovastatina en comparación con nylon y nitrocelulosa.



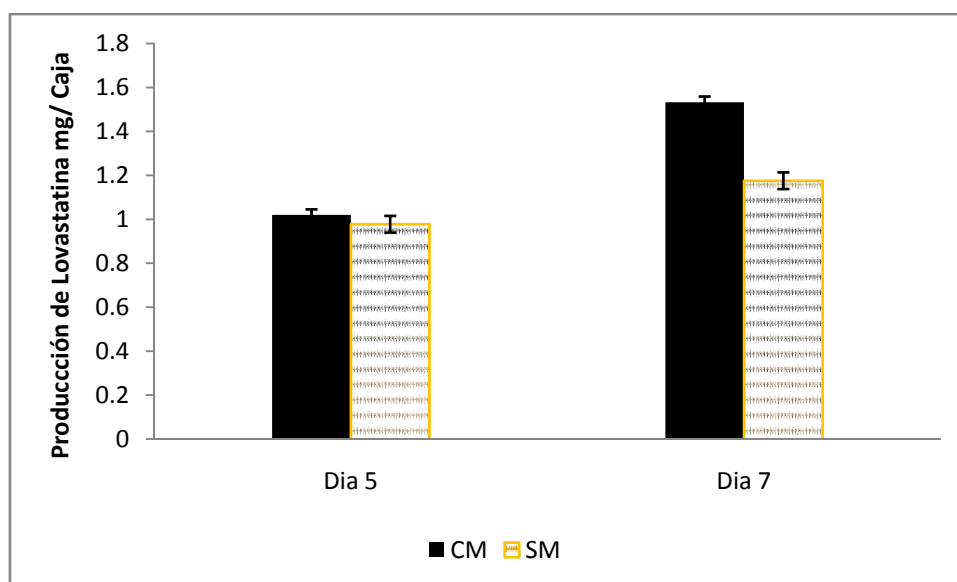
**Figura 7-6.** Cultivo de Agar en Placa Membrana



**Figura 7-7** Cultivo de Agar en Placa (SM Poliéter Sulfonato. (CM)

### 7.1.2.2 Producción de Lovastatina

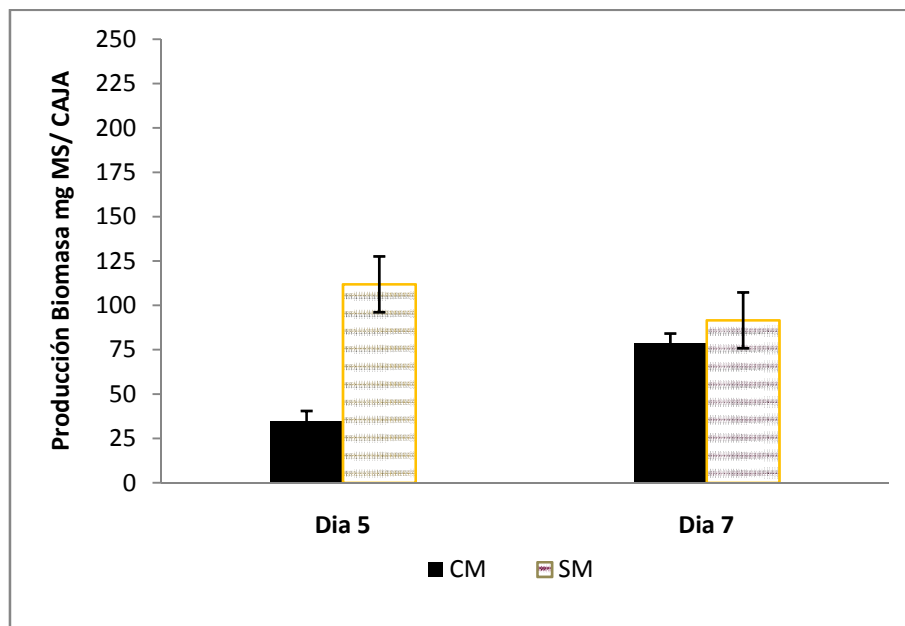
Como se observa en la Fig. 7-8, la mayor producción en caja se obtuvo al día 7. En estas figuras se demuestra que la producción de lovastatina es mayor en caja con membrana (CM) en comparación con aquellas cajas que no contenían membrana (SM) alcanzando valores de  $1,533 \pm 30.98 \mu\text{g}$  vs  $1,176 \pm 119.31 \mu\text{g}$  Lov/Caja al día 7.



**Figura 7-8** Comparación de la producción de lovastatina en caja de Petri (mg totales/caja) con membrana (■ CM) y sin membrana (□ SM), la mayor producción se registró durante el día 7.

Esto significa que cuando *A. terreus* crece sobre una superficie como la membrana está expuesto a superar barreras físicas y explorar el medio donde se desarrolla con la finalidad de obtener o hacer más disponibles los nutrientes presentes. En caso contrario, al crecer sobre la superficie de agar, el micelio parece funcionar un poco como en un sistema de cultivo líquido por lo que el crecimiento sobre agar simula la fisiología de líquido, y la adición de una membrana en el sistema simula bien la fisiología de sólido determinando así que el efecto de inmovilización está relacionado con la alta producción del metabolito de lovastatina.

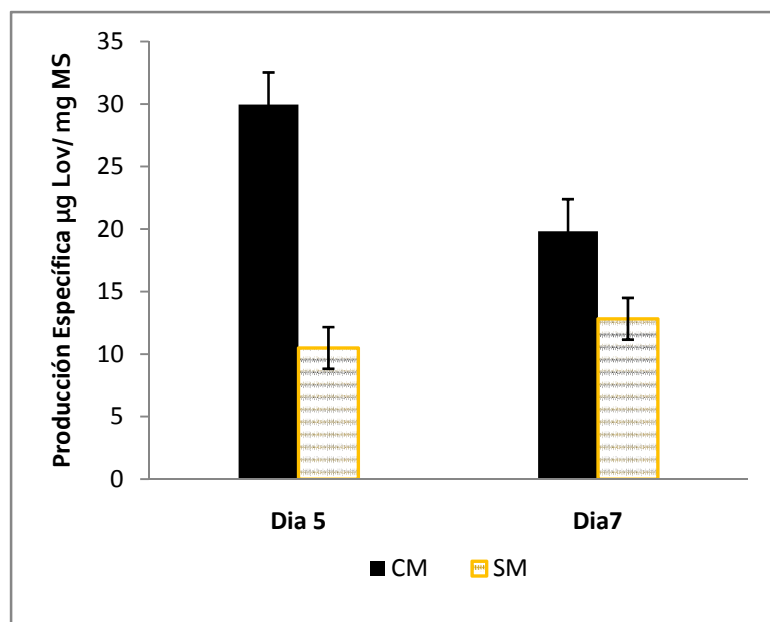
### 7.1.2.3 Producción de biomasa



**Figura 7-9** Comparación entre el crecimiento observado durante el día 5 y 7 en caja de Petri con membrana ( ■CM) y sin membrana ( ■SM). Crecimiento reportado en mg micelio seco /CAJA.

De la misma forma se determinó qué sucedía con el crecimiento (Fig. 7-9), y se encontró que en el cultivo desarrollado sobre la membrana, el crecimiento fue menor en comparación con el cultivo en agar registrándose concentraciones de  $78.37 \pm 11.37$  mg MS vs  $91.6 \pm 45.57$  mg MS, respectivamente durante el día 7. Por lo que puede apreciarse que el estímulo de inmovilización también tiene una influencia ligeramente negativa en el crecimiento de *A. terreus*.

#### 7.1.2.4 Producción Específica



**Figura 7-10** Comparación de la producción específica obtenida durante el cultivo de agar en placa ( ■ ) CM y cultivo en agar ( □ ) SM

En el caso de la producción específica PE (Fig. 7-10) se observó un comportamiento similar al obtenido en la producción; excepto que fue un poco más acentuado ( $20 \pm 2.5$  mg MS vs  $13 \pm 6.6$  mg MS). Confirmando que el estímulo de exploración también es detectable en este sistema que permite el contacto con el aire.

Un dato interesante es que el experimento se llevó a cabo a una concentración de nutrientes 1x, con la finalidad de determinar cómo actuaba en general el sistema. Es decir; si existía un efecto producido por la concentración de nutrientes como sucede un líquido. En experimentos posteriores se estudió el efecto de concentración de nutrientes en ambos sistemas (FLI y CAP), donde de igual forma se determinó como actuaba la concentración de nutrientes, dichos resultados se muestran en la siguiente sección.

## 7.2 Efecto de concentración de nutrientes

### 7.2.1 Sistema de fermentación líquida inmovilizada

Otra característica de la FS es la baja disponibilidad de agua y estrés osmótico. Estudios previos acerca del efecto de concentración de nutrientes en sistemas de fermentación líquida (Barrios- González *et al.*, 2008), demostraron que una elevada concentración de nutrientes (2.5x) en el medio de cultivo afectaba negativamente a la producción de lovastatina. Por esta razón fue de gran interés saber que ocurría con este factor en los nuevos sistemas planteados.

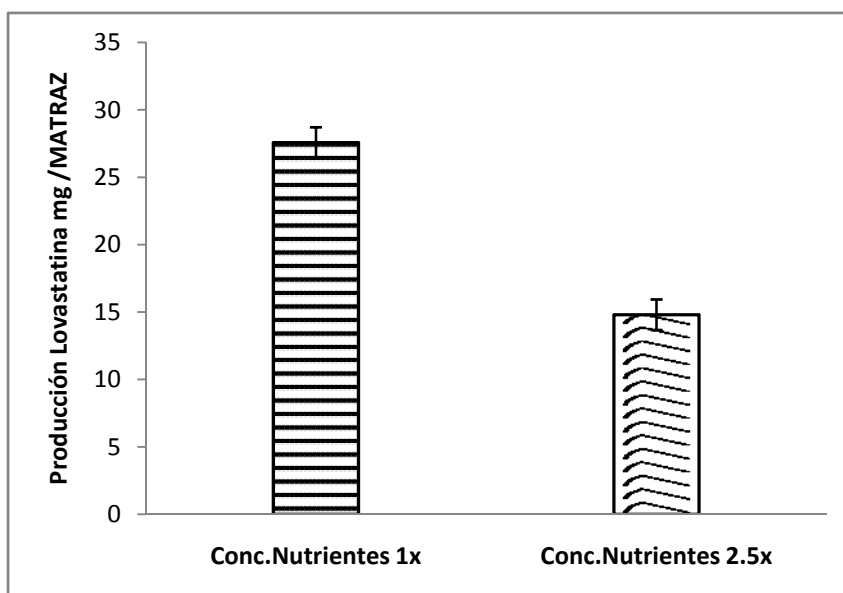


**Figura 7-11** Diseño del Sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada (FLI) utilizada para observar el efecto de concentración de nutrientes 1x en el medio sobre la producción de lovastatina.



**Figura 7-12** Diseño del Sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada (FLI) para observar el efecto de concentración de nutrientes 2.5X sobre la producción de lovastatina.

### 7.2.1.1 Producción de lovastatina



**Figura 7-13** Comparación de la producción de Lovastatina obtenida en el sistema de fermentación líquida inmovilizada (FLI) durante el día 7 a concentración de nutrientes 1x (■) y 2.5x (▣) reportada en mg/MATRAZ.

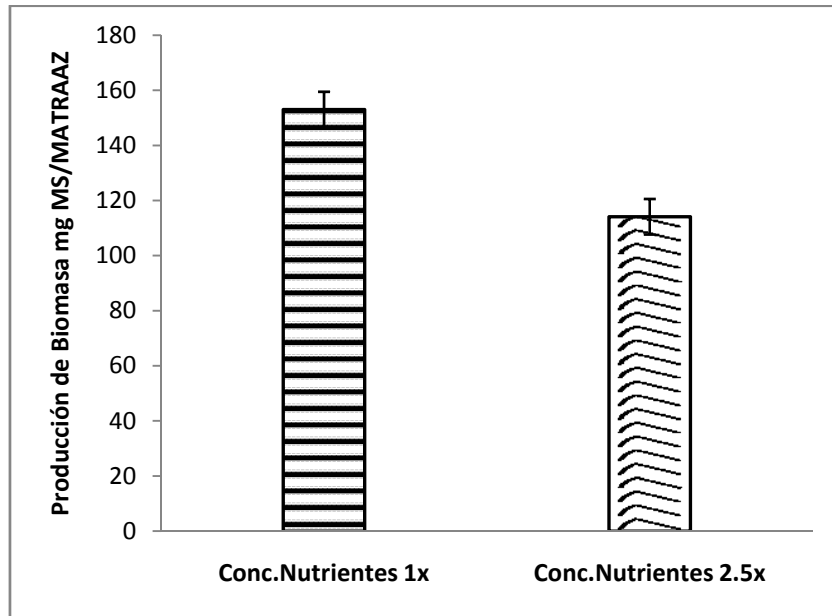
Para conocer la influencia del efecto de la concentración de nutrientes, sobre la producción de lovastatina, se realizaron fermentaciones a concentraciones de medio 1x y 2.5x para la producción de lovastatina.

Los resultados (Fig. 7-13) muestran un decremento en la producción de lovastatina en medio 2.5x (27.57 ± 1.15 mg Lov/Matraz y 14.80 ± 1.33 mg Lov/Matraz). Como se puede apreciar al aumentar la concentración de nutrientes a 2.5x, disminuye la producción de lovastatina a casi la mitad, indicando que la producción se ve afectada por la concentración a pesar de estar el micelio inmovilizado.

En este sentido la FLI, tiene un comportamiento similar a la FL convencional sin embargo variables como la inmovilización y baja concentraciones de nutrientes la hacen más eficiente y productiva lo cual coincide con los estudios realizados en FL por Barrios-Gonzalez *et al.*, (1996).



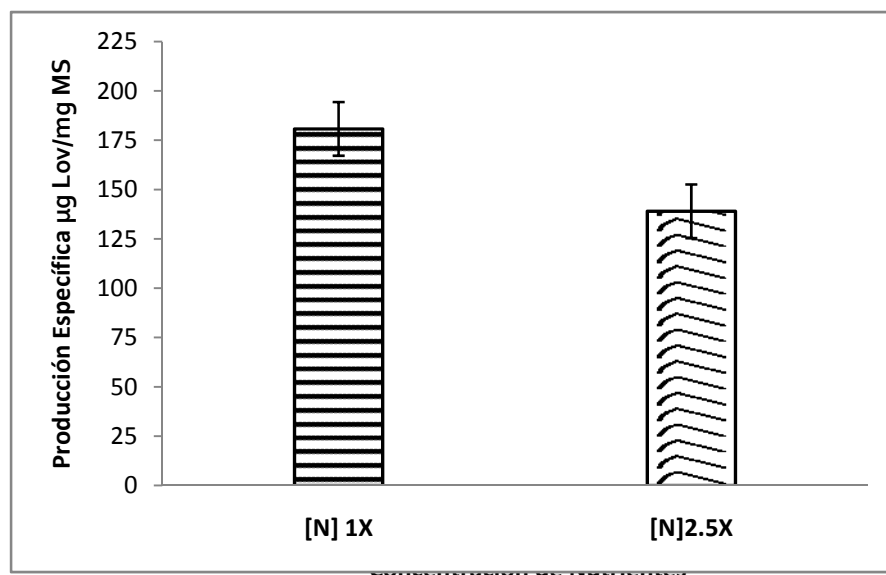
### 7.2.1.2 Producción de biomasa



**Figura 7-14** Comparación de la producción de biomasa obtenida en cultivo líquido (mg/MATRAZ) inmovilizado a diferente concentración de nutrientes (■) 1x y (▨) 2.5x.

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento, indican que este parámetro también se ve afectado por la alta concentración de nutrientes, en comparación con aquel tratamiento de menor concentración 1x, alcanzando valores (153 mg MS vs 114 mg MS).

### 7.2.1.3 Producción específica



**Figura 7-15** PE de lovastatina obtenida a distintas concentraciones de nutrientes, en cultivo líquido inmovilizado 1x (■) y 2.5x (□)

El cálculo de la PE (Fig. 7-15) confirmó el efecto negativo de la alta concentración de nutrientes sobre la producción específica de lovastatina. Sin embargo hay un punto importante que debe rescatarse de este sistema, aun cuando la PE haya sido afectada por la concentración de nutrientes, en ambos casos (1x y 2.5x), tanto los valores de la producción del metabolito como el parámetro de PE son por mucho superiores a los valores registrados en fermentación líquida convencional (FL), hasta casi 10 veces. Lo que significa que aun cuando ésta variable afecta la producción (concentración de nutrientes), el sistema de FLI resulta ser más factible que la producción en el sistema de fermentación líquida (FL).

### 7.2.2 Sistema de fermentación sólida

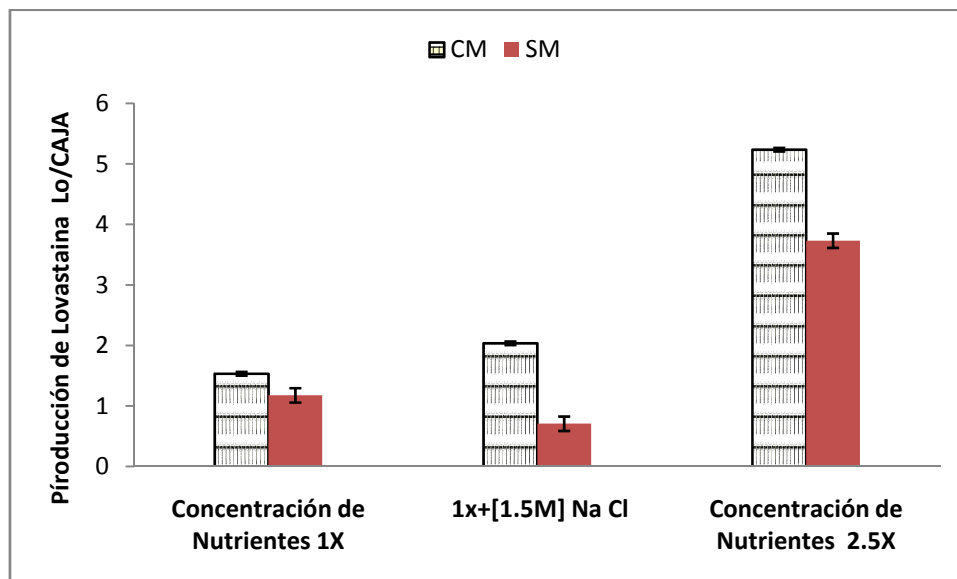
Para completar el estudio del efecto de concentración de nutrientes y el estímulo de exploración sobre la producción de lovastatina, se estudiaron las concentraciones utilizadas en FLI en el sistema de cajas de Petri con y sin membrana. Al igual que en FLI el objetivo fue conocer el efecto de concentración de nutrientes sobre un sistema en contacto con el aire. En un inicio al trabajar a concentraciones 1x y 2.5x, se observó un comportamiento sorprendente. Es decir, un aumento en la concentración de nutrientes (2.5x) favoreció la producción de lovastatina para CAP y por el contrario, a bajas concentraciones la producción de lovastatina también era baja.

Al observarse estos resultados, se trabajó sobre este mismo sistema pero ahora introduciendo el parámetro de  $A_w$ . La razón de introducir este parámetro fue conocer si las altas producciones registradas en ambos sistemas eran debidas a una alta concentración de nutrientes o bien a estrés osmótico. Por lo tanto el diseño para este nuevo experimento consistió en adecuar un medio de producción que coincidiera con el mismo valor de  $A_w$  que aquel donde se observó alta producción de lovastatina (2.5x) usando medio 1x y ajustando el  $A_w$  con ayuda de un osmolito el [Na Cl]. Los valores de dicha variable presente en los medios de cultivo se muestran a continuación en la Tabla 7-1. Una vez obtenidos los valores de actividad de agua, se determinó que el medio adecuado sería 1x+1.5 [M] Na Cl ya que dicha concentración contenía una  $A_w$  casi igual a la presentada en 2.5x.

[ ] Medio de Producción	$A_w$
2.5x	<b>0.9775</b> ±0.0026
1x+1 [M] NaCl	0.9382±0.0144
1x+1.5[M] NaCl	<b>0.9722</b> ±0.0052

**Tabla 7-1** Valores de  $A_w$ , obtenida en los medios utilizados durante la fermentación cabe destacar que la mayor producción de lovastatina se presentó en el medio 2.5x

### 7.2.2.1 Producción de lovastatina

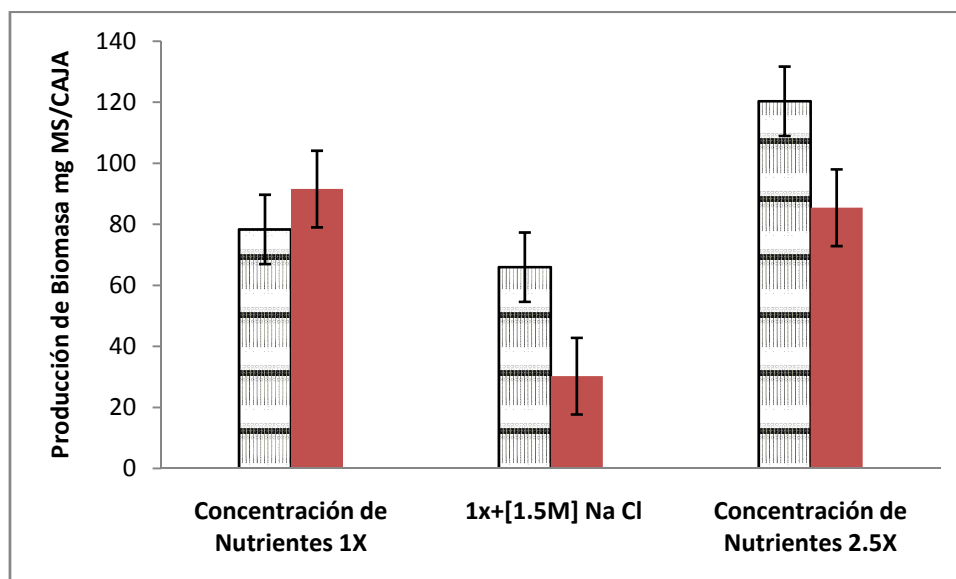


**Figura 7-16** Comparación de la producción total de Lovastatina obtenida en cultivo en caja de Petri al día 7, a concentraciones de nutrientes 1x, 2.5X y 1X+[1.5 M] Na Cl, CM (▨) y SM(■)

Al estudiar el efecto producido de la concentración de nutrientes (Fig. 7-16), se encontró que la producción de lovastatina se incrementó en el medio 1x Aw; y que aumenta todavía más en 2.5x, sobre todo en los cultivos con membrana y en los cultivos sin membrana, sin embargo la producción en 1x+Aw baja, al compararlo con 2.5x.

Estos comportamientos confirman que los 2 sistemas diseñados respondieron de acuerdo a las hipótesis planteadas obteniendo un comportamiento de fisiología en medio líquido para la FLI y en medio sólido CAP. También se logró separar el efecto del estrés osmótico sobre la producción y el efecto de mayor cantidad de nutrientes. En cuanto al estrés osmótico, este estimula la producción en cultivos CM, mientras que la baja en los cultivos SM.

### 7.2.2.2 Producción de biomasa

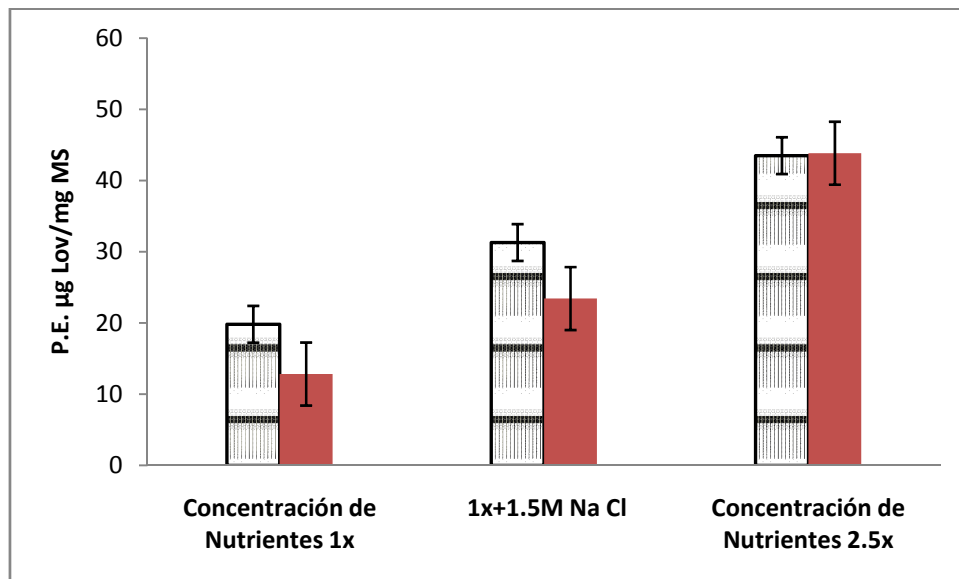


**Figura 7-17** Comparación entre la Producción de biomasa obtenida (mg/CAJA ) al día 7 en cultivos con diferente concentración de nutrientes, [ ] 1x , 1x+[1M]Na Cl y [ ] 2.5X .CM (▨) y SM (■)

Para determinar la producción de biomasa en este sistema de fermentación, cabe destacar que se implementó una técnica de cuantificación de micelio (Nakanishi *et al.*, 2004) para los cultivos en caja Petri con solo agar, esta metodología consistió en solubilizar el agar con ayuda de un buffer de acetatos (0.1 M, pH 3.5) y calentando a 100°C durante 15 minutos, posteriormente el micelio fue colectado con ayuda de filtros nytal, se secó a 60°C durante 2 días y se peso posteriormente. En el caso de los cultivos que se desarrollaron sobre una membrana, la biomasa fue cuantificada por peso seco.

Los experimentos demuestran que el estrés osmótico tiene un efecto negativo (no significativo) sobre el crecimiento en cultivo CM (66± 9.0 mg MS); mientras que este mismo efecto es muy grande en SM (30.27± 1.97). También es importante destacar que se observó un mayor crecimiento en SM en 1x, mientras que el crecimiento a concentración 2.5x disminuyó para este mismo tratamiento.

### 7.2.2.3 Producción específica



**Figura 7-18** Producción específica de lovastatina total ( $\mu\text{g Lov/mg MS}$ ) obtenidas Al día 7 a diferentes [ ] de nutrientes: [ ] 1x, 1x+[1.5M] Na Cl y [ ] 2.5X . CM (▨) y SM (■).

Al analizar los resultados obtenidos en PE, se observó que los valores mayores se registraron en concentraciones 1x+1.5M Na Cl y 2.5x ( $31 \pm 4.83 \mu\text{g Lov/mg MS}$  VS  $43.5 \pm 5.86 \mu\text{g Lov/mg MS}$ ) sobre todo para aquellas cajas de Petri que contenían la membrana, siendo la concentración 1x la que menor valor de PE obtuvo ( $19.82 \mu\text{g Lov/mg MS}$ ).

Cabe destacar que esto se manifestó en aquellas cajas que contenían la membrana. Esto completa el estudio realizado para observar el efecto de concentración de nutrientes, tanto en sistemas de FL y FS, confirmando que un aumento en la concentración de nutrientes favorece no solo la producción de lovastatina y crecimiento sino también la PE sobre todo para el sistema de FS, además es importante señalar que existe un efecto negativo ocasionado posiblemente por el estrés osmótico en ambos sistemas.

### 7.3 Efecto de Interfase con el aire

#### 7.3.1 Sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada.

Para estudiar el efecto de interfase con el aire en este sistema de fermentación, se utilizó nuevamente el cultivo líquido inmovilizado (FLI) descrito en secciones anteriores. Cabe destacar que en este caso el estudio se centró en las diferentes zonas de crecimiento generadas en la banda de PUF. Las 3 zonas de crecimiento diferentes surgieron debido a que experimentaban distintas frecuencias de mojado; relacionadas con la agitación ejercida en cada uno de los matraces. Dicha agitación hizo posible la detección de 3 zonas con diferente comportamiento en cuanto a producción de lovastatina se refiere.

Las zonas presentes en la banda de PUF se denominaron de la siguiente manera: zona contacto nulo con el líquido *CNL* nombrada así ya que el medio de cultivo nunca estuvo en contacto con la parte superior de la banda de poliuretano, otra de las zonas fue la de contacto intermitente con el líquido *CIL* y finalmente la zona en contacto con el líquido *LS* expuesta todo el tiempo al medio de cultivo. Es importante notar que la frecuencia de mojado en la zona *CIL* fue de 3 baños/ seg. Al observar esta determinante formación de zonas, se realizaron los estudios pertinentes para saber cómo se comportaban los parámetros de producción, crecimiento y producción específica considerando que cada una de las zonas actuaba de forma distinta debido a las diferentes condiciones a las que estaban expuestas.

*Contacto nulo con el líquido CNL*

*Intermitente Líquido CIL*

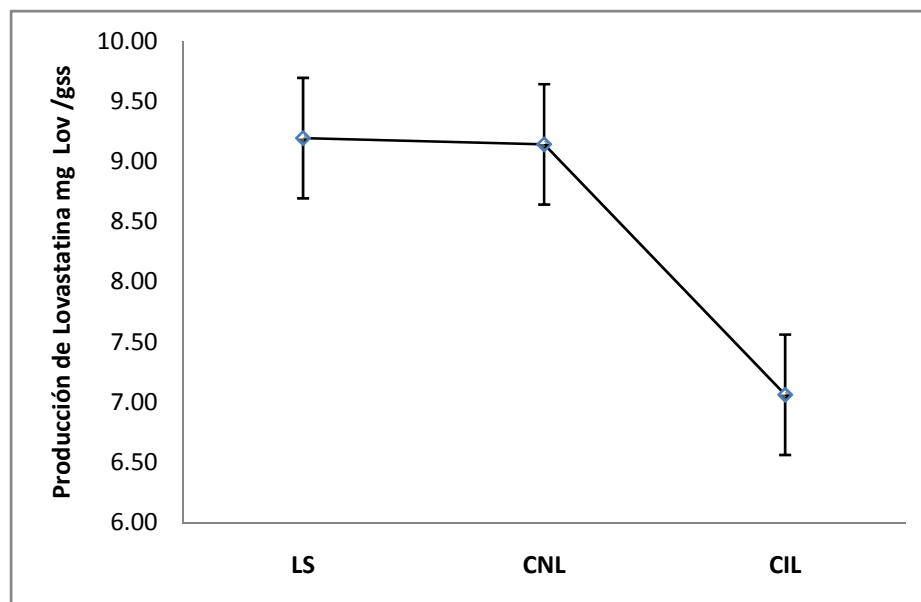
*Líquido Sumergido LS*



**Figura. 7-19** Fotografía de la descripción de las zonas formadas en la banda de PUF utilizada en el cultivo líquido inmovilizado (FLI); Zona Contacto Nulo con el líquido (CNL), Contacto Intermitente con el líquido (CIL), Líquido Sumergido (LS).

### 7.3.1.1 Producción de lovastatina

Como se describió anteriormente, la formación de zonas durante el cultivo fue evidente, y el efecto producido por la interfase con el aire, se reflejó en la producción obtenida en cada zona.



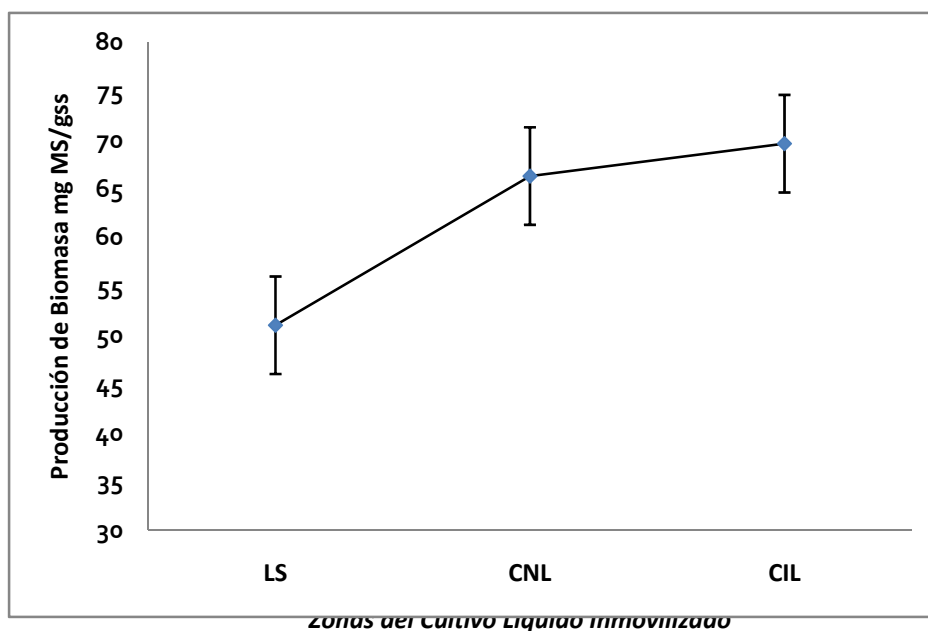
**Figura 7-20** Comparación de la producción de lovastatina total (mg Lov/gss) obtenida en las diferentes zonas presentadas en cultivo líquido inmovilizado LS, CNL y CIL.

Como se observa en la (Fig. 7-20), el efecto de la frecuencia de mojado estimuló y afectó en cierto grado la producción de lovastatina. En primer lugar cabe destacar que se observó un comportamiento sorprendente pues la mayor producción fue registrada para la zona LS  $9.192 \text{ mg/gss}$  fermentado *seco* la cual estuvo en contacto con el líquido todo el tiempo, seguido de la zona CNL  $9.14 \text{ mg/gss}$ , cuya frecuencia de mojado fue nula, en ambos casos fue evidente que existe un comportamiento general en cada zona, es decir una fisiología bien definida que puede ser líquida o bien sólida.

La zona que menos producción registró fue la de CIL con un valor de  $7 \text{ mg/gss}$ , esto confirma que el hongo es incapaz de producir bien si se encuentra en una zona inestable es decir; donde la fisiología no está bien definida, probablemente porque la frecuencia de mojado o el cambio de ambiente es demasiado rápido.



### 7.3.1.2 Producción de biomasa

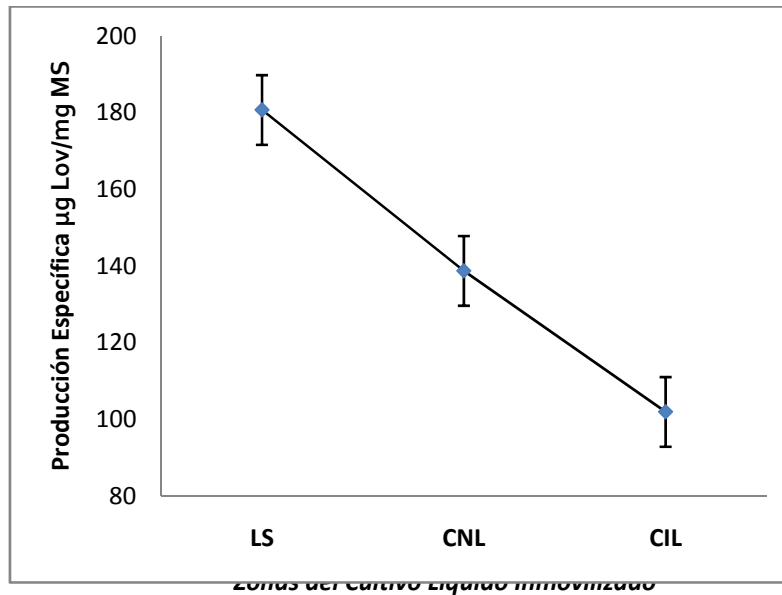


**Figura 7-21** Producción de biomasa obtenida (mg/gss) en las diferentes zonas de cultivo inmovilizado (FLI), por efecto de la frecuencia de mojado (FM), LS, CNL y CIL.

De forma inversa a lo observado en la producción de lovastatina, el crecimiento tuvo su máximo en la zona CIL (69.6 mg MS) es decir; aquella zona que manifestaba frecuencias de mojado intermitentes.

Esto significa que en un ambiente inestable favoreció el crecimiento del hongo, mientras que en aquellas zonas donde se manifestaba una fisiología, en particular CNL y LS, (66.31 y 51.02 mg MS/gss) el crecimiento se vio desfavorecido. Lo que indica que el crecimiento es un proceso menos delicado que el metabolismo secundario.

### 7.3.1.3 Producción específica



**Figura 7-22** PE obtenida ( $\mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) en las diferentes zonas de cultivo inmovilizado por efecto de la FM en las zonas LS, CNL y CIL.

Si el crecimiento se había encontrado asociado de forma inversa a lo reportado en producción, el comportamiento en la PE tendría que ser positivo manifestándose como un incremento. Esto puede ser observado en la Fig. 7-22, donde el perfil corresponde al presentado en la Fig. 7-20 donde se reportó la producción del metabolito.

Estos resultados señalan la frecuencia de mojado o bien la interfase con el aire es un estímulo que influye en la producción de lovastatina. Otro punto que es necesario resaltar es que el hongo es capaz de establecer fisiologías bien definidas, llámese fisiología de sólido o fisiología de medio líquido, debido a que es capaz de sentir estímulos ambientales provenientes del medio en el que se está desarrollando.

### **7.3.2. Sistema de Fermentación Sólida Híbrida**

La baja producción mostrada por el cultivo de la zona contacto intermitente con el aire (o con el líquido), sugiere que ese contacto era demasiado frecuente (3 veces/ segundo), y no le permitía al hongo establecer una fisiología definida. Así el diseño de un nuevo sistema fue resultado de las observaciones obtenidas al estudiar el efecto de interfase con el aire en el sistema de FLI.

Este aspecto sirvió para trabajar en el diseño de un sistema de FS, donde se incluyera el mismo parámetro que en líquido para observar de igual manera el efecto en producción, crecimiento y PE. Para ello se tomó en cuenta que este estímulo podría estar bien adaptado si se variaba el período de exposición aire durante la fermentación: es decir durante cierto tiempo el medio de cultivo estaría en contacto con el soporte de la fermentación, lo que significa que este baño interrumpe el período de exposición con el aire. Este sistema se logró utilizando un cronómetro y Rocker descritos en la sección de materiales (Pág. 28). Para montar el sistema de FS con humidificación o mojado periódico se estudió el tiempo de inmovilización (T.I.), variable que se consideró debido a que al estar en contacto el medio de cultivo con los cubos de poliuretano fermentado, no deseábamos que existieran esporas o micelio suelto que complicará la cuantificación de los parámetros.

Cabe destacar que para este sistema, fueron implementados 2 controles distintos con la finalidad de observar la eficiencia del mismo; el primero una FS normal mencionada con anterioridad en este trabajo y FS control, la cual funcionaba como una FS con atmosfera de humedad debido a que contenía cierta cantidad de medio de producción, el cual a lo largo de la fermentación nunca tocaba el soporte de poliuretano, debido a que permanecía inclinado.



**Fig.7-23** Diseño de Fermentación Sólida Híbrida (FSH) utilizando variables de tiempo de inmovilización (T.I.) y frecuencia de mojado (FM)

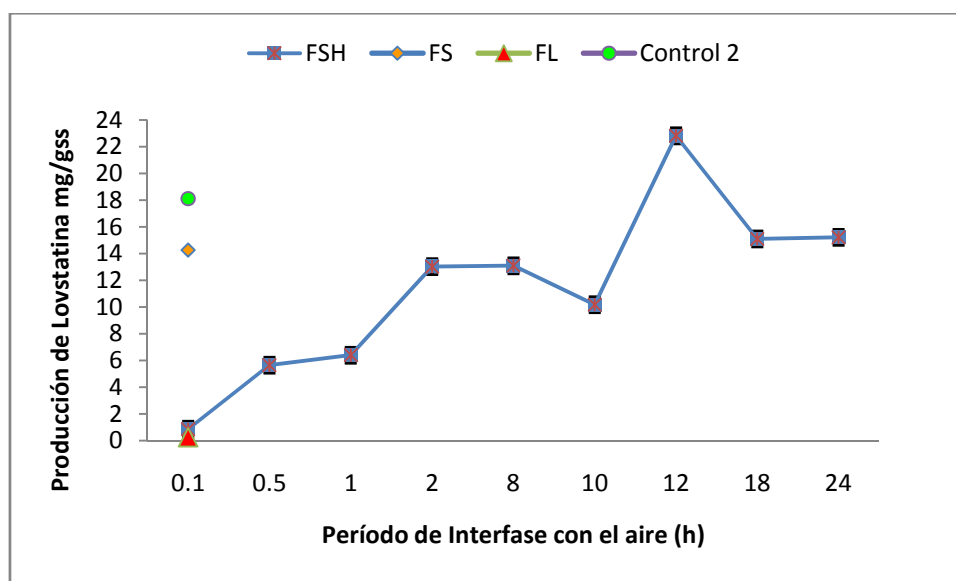
En experimentos iniciales se determinó el tiempo de inmovilización (es decir sin iniciar los baños) adecuado, que permitiera la geminación de esporas y la inmovilización del micelio, de manera que no hubiera desprendimiento de biomasa al iniciar los baños de la FS. Así, se probaron 4, 8 y 12 h se evaluaron parámetros de producción y seleccionó 8 h como el período de inmovilización, debido a las altas producciones registradas, además otra variable que se consideró fue la biomasa residual observada con los diferentes tiempos de inmovilización, siendo 8 h la que menor desprendimiento de biomasa obtuvo.

Una vez que se determinaron las variables involucradas y en el sistema se llevaron a cabo los experimentos que determinaron cual era el comportamiento producido por influencia de la interfase con el aire en este sistema de fermentación, así como la planeación de los controles para medir la eficiencia del nuevo sistema. Se planteó un primer control que funcionó como FS y un segundo control 2, el cual nunca recibió baños como los del sistema de FSH.

### 7.3.2.1 Producción de lovastatina

Se llevó a cabo la FSH, las condiciones iniciales fueron PUF de alta densidad  $20 \text{ kg/m}^3$ , medio de producción 2.5x, inoculo con *A. terreus*  $2 \times 10^6$  esporas/mL utilizando el rocker y cronómetro. Los resultados obtenidos señalaron en un principio que el mejor tiempo de inmovilización correspondió a las 8 horas. Cabe destacar que una vez fijado el tiempo de inmovilización, la única variable de estudio fue el período de exposición al aire, que correspondió a valores de 5 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 8 hrs, 10 hrs, 12 hrs, 18 hrs y 24 hrs, obteniéndose comportamientos distintos en cada uno de los parámetros de estudio.

En la Fig. 7-24. Puede observarse que la producción de lovastatina se encuentra en función del periodo de exposición al aire. La figura muestra que al aumentando el tiempo de exposición al aire, se llega a un máximo en la producción a justo cuando interrumpimos esta interfase con un baño de medio de cultivo líquido a las 12 h.



**Figura 7-24** Producción de lovastatina (mg Lov /gss) al día 7 obtenida en cultivos de FSH con diferentes t de exposición al aire (—) (0.1- 24hrs). Producción de controles: FL (—), FS (—) y Control 2 (—).

De acuerdo al desarrollo de los experimentos es importante señalar que se inició con tres distintos períodos de exposición al aire, durante la fermentación. Se manejaron períodos de exposición al aire de 2 h, 12 h y 24 h, obteniendo el máximo en un principio a las 12 horas con un valor de 23 mg/gss. A partir de este comportamiento, se diseñaron nuevas períodos de exposición al aire como que originaron información acerca de lo que sucedía en aquellos puntos intermedios que aun no estaban del todo claros es decir; menos de 2 h, entre 2 y 12 h y entre 12 y 24 h, para lo cual se propusieron los siguientes frecuencias de tiempos de exposición: 10 h y 18 h citadas en las figura 7-24.

Los resultados de estos experimentos indicaron nuevamente que el período de exposición influye fuertemente en la producción de lovastatina, pues existe un aumento en la producción al hacer más largo el tiempo de exposición al aire, esto puede ser observado en la Fig.7-24.

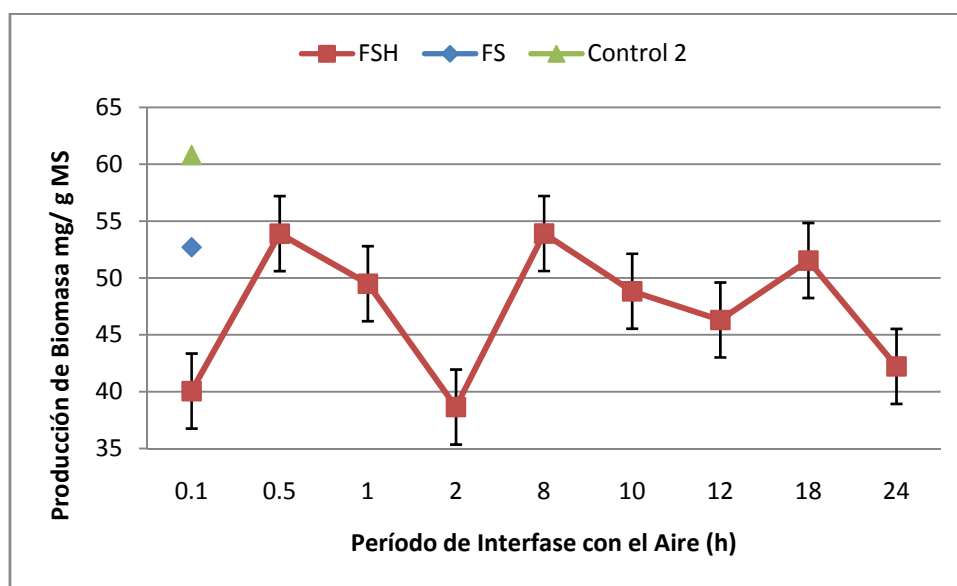
Dado que el objetivo de este sistema era mostrar en qué momento el hongo percibía que el cultivo dejaba de ser líquido para convertirse en sólido y viceversa, se plantearon tiempos de exposición al aire que fueron < 2 horas. Con esto se pudo observar que la producción de lovastatina se vio disminuida de 13 mg Lov/gss (t de exposición 2hrs) a 0.8 mg Lov /gss (t exposición 5 min), y es justo este punto el que coincide con la producción registrada en el sistema de fermentación líquida FL por lo que para éste tiempo el sistema deja de representar para el hongo una FS, para presentar fisiología de líquido. Otro dato importante que complementa este resultado es que los valores presentados los tiempo de exposición <2 h, son incluso menos que el control de FS normal, también señalado en la figura, cuyo valor corresponde a 14 mg Lov/gss, con estos resultados sugerimos que valores menores a éste corresponde a una etapa de transición. Otro de los puntos más importante y quizás al cual le hemos dado menor relevancia lo representa el segundo control, pues a pesar de ser un sistema que sólo contaba con una atmósfera de humedad es decir que a un lado tenía medio de cultivo de baño que nunca lo tocaba, también presentó valores interesantes en cuanto a producción de lovastatina, superando a la FS control y llegando a producir hasta 18 mg Lov/gss valor que no se encuentra alejado del máximo de producción, y es por esta razón que lo señalamos como un sistema bastante eficiente.

### 7.3.2.2 Producción de Biomasa

Otro parámetro que se determinó en este sistema de fermentación, fue la producción de biomasa por el método de glucosamina. Dicho método presenta en un principio altos márgenes de error, es decir las desviaciones de los datos estadísticos fueron elevadas sobre todo en el caso de la del período de exposición al aire de 8 h, cuyo valor de producción fue de 55 mg MS $\pm$  22.19, desviación que corresponde casi a la mitad del valor obtenido en producción.

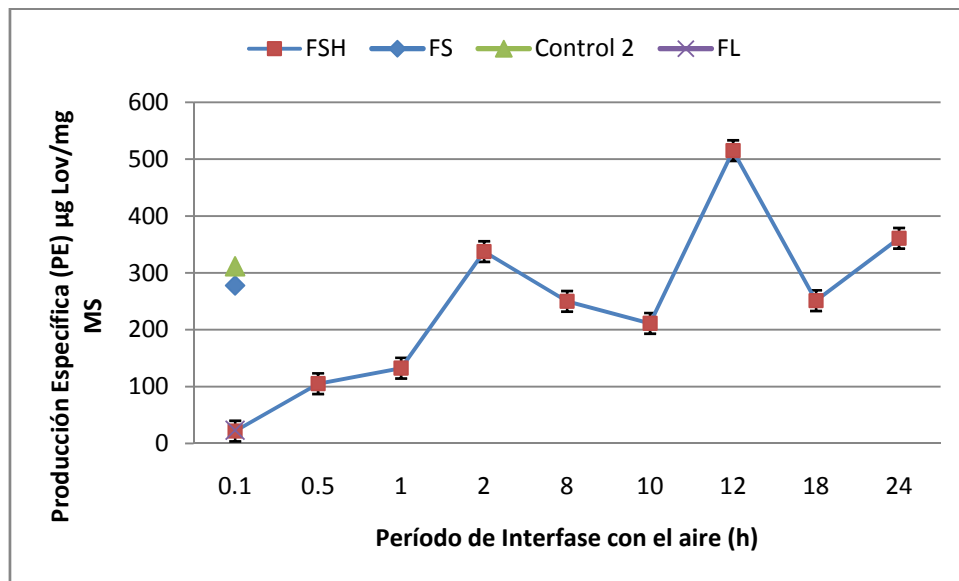
Este fenómeno se presentó como consecuencia de que en el sistema se veía heterogeneidad en el crecimiento, observando mayor biomasa en la superficie del soporte y menos en las partes internas o centrales, esto se debía a que el líquido de los baños drenaba con cierta lentitud, probablemente esto ocasionaba sitios con menor oxígeno en el interior del cubo por cierto tiempo. Esto aunado a que el micelio que se formaba en el medio líquido a veces se adhería a la superficie del soporte sólido.

Estos problemas fueron parcialmente solucionados, probando soportes menos densos (17 kg/m<sup>3</sup> y 15 Kg/m<sup>3</sup>). Sin embargo aunque estos nuevos cultivos a vista fueron más homogéneos (la variabilidad disminuyó de 3.14 a 1.19), la producción de lovastatina también disminuyó, de 23 mg/gss a 18 y 16.5 mg/gss utilizando densidades de 15 y 17 kg/m<sup>3</sup>, respectivamente.



**Figura 7-25** Comparación del crecimiento presentado a diferentes F.M. (0.1 hr- 24 hr) para el sistema de cultivo de FSH.

### 7.3.2.3 Producción específica



**Figura 7-26** PE registradas en el sistema de FSH, sometida a diferentes F.M. (—) 0.1 hr-24 hr. También se reportan los controles de FS (—), FL (—) y C20(—) con atmósfera humidificada.

A pesar de que los valores de PE arrastran el problema de la variabilidad en la medición de la biomasa, la Fig. 7-26 muestra un perfil muy parecido al mostrado por la producción en la Fig. 7.24, es decir coincide con el perfil obtenido en la producción del metabolito. Es interesante notar que el control 2 presentó un crecimiento mayor en comparación con el presentado en FS ( $60 \pm 2.99$  mg vs  $52 \pm 6.54$ ), lo cual indica que en un ambiente muy húmedo (90%) le ayudo a crecer y aumentar la PE ( $311 \pm 8.69$  vs  $277 \pm 7.44$ ).

Estos resultados ponen en evidencia que efectivamente el período de exposición al aire influye en la PE de lovastatina y además muestra puntos clave donde la fisiología de este sistema de fermentación se torna líquida o sólida, lo que puede ser producto de una señal de tipo molecular que le indica al hongo que empiece a encender fisiología para medio sólido o líquido.



Tomando en cuenta esto y para tratar de entender las diferencias entre los cultivos arriba donde manejamos tiempos de exposición al aire de 2h, se estructuró la Tabla 7-1, donde se calculó el número de baños antes del inicio de la idiofase a las 24 h (encendido del gen *lov E*) y el tiempo del baño siguiente a ese tiempo, considerando la hipótesis que el tiempo o período de exposición se encuentra relacionada con el encendido del gen *lov E*. Y por tanto con la alta producción de lovastatina, considerando que actúa a un nivel de señalización.

<b>Período de Interfase con el aire.</b> (h)	<b>Baños Antes Encendido <i>lov E</i></b> <b>(24 h)</b>	<b>Tiempo baño más cercano</b> <i>lov E</i> (h)	<b>Tiempo Baño Siguiete</b> (h)	<b>Lovastatina</b> (mg/g MS)	<b>Prod. Esp.</b> (µg/mg)	<b>Humedad Final</b> (%)
0.1	72	24	24.1	0.86±0.12	21.6±2.20	89±0.007
0.5	24	24	24.5	5.65±0.18	105.1±5.83	89±0.003
1	12	24	25	6.4±1.90	132.4±7.44	89±0.006
2	6	24	26	13.03±0.60	337.5±7.7	88±0.009
8	2	20	28	13.03±0.20	250±8-69	89±0.003
10	2	22	32	10.18±0.42	211.2±13.23	90±0.005
12	1	24	36	23±1.73	515.2±11.37	91±0.014
18	1	30	48	15.1±1.07	25.1±10.65	88±0.012
24	1	36	60	15.2±2.07	360.9±14.09	89±0.007

**Tabla 7-1** Frecuencias de mojado en el sistema de Fermentación Sólida Híbrida (FSH). Producción FS Control = 14.1 mg/g MS, Control 2 = 18.2 mg/g MS

## 8- Discusión

En un trabajo anterior del grupo, se desarrolló un nuevo proceso de producción de lovastatina sobre FS, empleando poliuretano como soporte inerte (Baños *et al.*, 2009), en el cual se obtuvo una producción al día 8, 30 veces mayor que en FL (Baños *et al.*, 2005). Al emplear PUF, se pudo calcular la producción específica en FS ( $\mu\text{g}$  lovastatina/mg micelio seco), con lo cual es posible realizar una comparación más precisa entre los dos tipos de fermentación. Así se encontró que en FS, la producción específica fue 14 veces mayor que en FL ( $816 \mu\text{g}/\text{mg}$  vs  $45.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Evidentemente, este es un ejemplo de la denominada “fisiología particular del medio sólido”, dado que en FS el micelio funciona de una forma muy diferente a la fisiología en medio líquido. Existen además otros estudios comparativos de FS vs fermentación líquida (FL), en donde se ha reportado una mayor producción y productividad de otros metabolitos secundarios en FS (Barrios-González *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2001; Mejía & Barrios-González, 2007).

Los estudios llevados a cabo para producir lovastatina utilizando *A. terreus*; en nuestro grupo de trabajo (Barrios-González *et al.*, 2008) revelaron que en FS los genes de la vía (relacionados con la biosíntesis) de lovastatina se expresan más intensamente en este sistema sólido en comparación con el cultivo líquido.

Esto sugiere que en FS, el hongo recibe señales que le indican que está en un medio sólido y que generan una expresión diferencial de grupos de genes que dan como resultado una fisiología diferente (de medio sólido); y que una de sus características es la alta capacidad de producción de lovastatina.

Sin embargo, a pesar de que existen evidencias importantes y novedosos estudios a nivel molecular que señalan la importancia del fenómeno del medio sólido, la fisiología no ha sido estudiada con tanto detalle y no se sabe cuáles son los estímulos que desencadenan las altas producciones del metabolito de interés.

En esta tesis se estudiaron los siguientes factores ambientales: estímulos que inducen al micelio a explorar y colonizar la superficie, creando así un micelio más especializado y en un estado fisiológico diferente; 2) la disponibilidad de agua-estrés osmótico; y 3) el contacto con oxígeno en fase gaseosa (período de interfase con el aire), para investigar si pertenecen al grupo de estímulos ambientales que inducen la fisiología del medio sólido.

## **8.1 Efecto de la Inmovilización del micelio en Sistema de Fermentación Líquida**

### *8.1.1 Comparación de la producción de lovastatina, crecimiento y P.E. obtenida en FL convencional y FL inmovilizada FLI.*

Si la existencia de ciertas señales que recibe el hongo desencadena la denominada fisiología del medio sólido, dichas señales deben estar particularmente presentes en la fermentación sólida y no en la FL. Por lo tanto inmovilizar el micelio fue una de las estrategias utilizadas para estudiar el efecto de la exploración y adhesión del micelio sobre la producción de lovastatina en FLI.

Los resultados obtenidos en FL, con respecto a la producción de lovastatina total, presentaron un comportamiento positivo, pues la producción se vio incrementada hasta en más del doble de su valor ( $30.86 \pm 0.664$  mg Lov/Matraz vs  $12.62 \pm 0.611$  mg Lov/Matraz), (Fig. 7-1); en FLI y FL convencional respectivamente. Esto indica que existe una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre uno y otro sistema de producción, y no solo eso, sino que el estímulo de inmovilización está presente y estimula la producción de lovastatina. Por lo tanto la FLI resultó ser un sistema eficiente de producción.

En cuanto al efecto producido en el crecimiento, en una primera parte hay que destacar el método de cuantificación, considerando que se procedió como en FS, en la banda de PUF presente en el sistema, algo que se observó es que el micelio fue creciendo en el interior de la banda y la formación de micelio en el caldo de cultivo fue nula, esto señala que las variables que en un principio representaron un problema fueron solucionadas.

Sorpresivamente, los valores registrados por el método de glucosamina determinaron que en el cultivo líquido inmovilizado (FLI), la producción de biomasa es mucho menor que la obtenida en FL convencional (1633.6 mg MS vs 164.8 mg MS, Fig. 7-2) esto podría significar que la inmovilización reduce el crecimiento del hongo haciendo que éste sea capaz de colonizar y explorar la superficie donde se está desarrollando formando así un micelio más diferenciado, lo cual es respaldado con una diferencia de casi 10 veces en el sistema FL.

Los resultados indican que al inmovilizar el micelio ocurren efectos importantes en la producción específica de lovastatina, obteniendo un diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) muy importante en ambos sistema de cultivo (180.76  $\mu\text{g Lov/mg MS}$  VS 23.2  $\mu\text{g Lov/mg MS}$ , Fig.7-4); para sistema de FLI y FL respectivamente es decir; hay una relación positiva entre el micelio que coloniza y la producción de lovastatina. Lo que señala que el estímulo de inmovilización del micelio, aún en un ambiente líquido, está ligado de alguna manera con la biosíntesis de lovastatina, por lo que se propone que el estímulo de exploración pertenece al grupo de factores ambientales que inducen la fisiología del medio sólido.

Estos resultados son congruentes con lo reportado por Bigelis *et al*, (2006), quienes diseñaron un sistema de producción para los antibióticos pirrocidinas y acremonidinas. El sistema fue denominado sistema de fermentación mixto (sólido-líquido), y utilizaron un soporte polimérico como poliéster-celulosa metido en un matraz agitado con medio líquido. Ellos encontraron diferencias importantes al utilizar el soporte, pues la producción de las pirrocidinas mostraron un incremento muy importante, obteniéndose 21.8 mg/L de pirrocidina tipo A, y 3.1 mg/L de pirrocidina tipo B. En el caso de la FL, la producción no sólo fue mucho menor, sin que la pirrocidina tipo A, no se detectó en ese cultivo. Los autores discuten que el polímero no sólo aumentó la superficie disponible para el crecimiento del hongo, sino que también habrá estimulado su capacidad biosintética al imitar en mucho su hábitat de crecimiento natural.

En cuanto al concepto de un micelio que explora, coloniza y se adhiere, y que proponemos que está de alguna manera diferenciado y tiene una fisiología diferente, es interesante mencionar que Rahardjo *et al* (2002) demostraron que las hifas aéreas son importantes en FS, ya que *A. oryzae*, creciendo en un sistema modelo, las hifas aéreas contribuyeron con un 75% del consumo de oxígeno total tomado del medio. Por esta razón no dudamos que pudiera existir alguna contribución similar en *A. terreus*, sin embargo es necesario realizar los estudios correspondientes.

## **8.2 Efecto de la Inmovilización del micelio en Sistema de Fermentación Sólida**

### **8.2.1 Comparación de la producción de lovastatina, crecimiento y P.E. obtenida en el Cultivo de Agar en Placa (CAP)**

En FLI, el estímulo de inmovilización de micelio tuvo un efecto importante en la producción de lovastatina, un caso similar deseaba ser observado en conjunto con el contacto con el aire (caja de Petri); lo cual implicaba ciertos problemas metodológicos para tener un micelio indiferenciado es decir; que no coloniza ni explora en medio sólido. En realidad lo que fue difícil de simular fue un micelio que no explora ni coloniza en medio sólido. Sin embargo, se consideró el cultivo en agar (caja de petri) como un sistema diferente al presentado en una FS, ya que aunque está en contacto con el aire y sí coloniza el medio, consideramos que el estímulo de exploración y de superar barreras no es muy importante, y que el sistema es en cierta forma parecido a la FL, ya que los nutrientes están en el medio circundante y no tiene que explorar para encontrarlos. Quizás la realidad es que este sistema de cultivo se encuentra a medio camino entre FL y FS. En este orden de ideas, el micelio que sí tiene que explorar, superar barreras y encontrar los nutrientes fue el que creció y se desarrollo sobre una membrana en agar, y que permitía el paso de nutrientes, pero no el del micelio.

Se realizaron los experimentos pertinentes, y se observó que para el diseño de cultivo de agar en placa el día máximo de producción del metabolito se presentó durante el día siete quedando así el diseño del sistema.

El hallazgo más importante fue que en aquellas cajas donde se colocó la membrana, hubo un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en la producción de lovastatina  $1.533 \pm 0.261$  mg Lov/Caja, Fig.7-8 en comparación con la producción obtenida en aquellas caja que contenían solo agar  $1.176 \pm 0.277$   $\mu$ g Lov/Caja, (Fig.7-8). Esto señaló, de forma muy similar a lo obtenido en cultivo líquido inmovilizado, que el estímulo de exploración está relacionado con la producción de lovastatina, aunque en este caso en contacto con el aire.

Con estos resultados podemos sugerir que el diseño del sistema fue adecuado, además las fisiologías actuaron como se esperaba, pues el cultivo en agar sin membrana mostró un fisiología intermedia sólido-líquida de FL mientras que colocar la membrana nos permitió observar la fisiología de medio sólido, comportamiento que realmente sorprendió, dado que se comporta de forma muy similar a lo presentado en cultivo líquido y sólido.

El parámetro de crecimiento también fue una variable que se estudió en este sistema, aunque los problemas metodológicos en esta parte fueron fuertes y se registró importante variabilidad; fue necesario extraer el micelio del agar y cuantificarlo por peso seco, mientras que el del filtro se cuantificó por su contenido de glucosamina. Sin embargo, los valores registrados se comportaron de forma similar a lo obtenido en FLI, es decir el menor crecimiento fue registrado en aquellas cajas donde se colocó la membrana con 78.37 mg MS, (Fig.7-9), al día 7 vs 91.6 mg MS obtenidos en el cultivo con sólo agar, sin embargo esta diferencia no fue relevante.

Finalmente, en cuanto a la producción específica registrada en ambos tipos de cultivo, encontrando evidencias de que el cultivo desarrollado sobre una membrana registró la más alta PE comparado con el cultivo en agar ( $20 \mu$ gLov/mg MS vs  $13 \mu$ gLov/mg MS) al día 7 con una ( $p < 0.01$ ), Fig.7-10. Lo que indica que el estímulo de exploración incide en la producción de lovastatina ya sea en un ambiente líquido o sólido.

Por esta razón se propone que el estímulo de inmovilización forma parte y contribuye a las señales ambientales que en su conjunto dan origen a las características de la fisiología del medio sólido, siendo esto lo que probablemente se halla relacionada con los altos niveles de producción de metabolitos secundarios y enzimas, particularmente lovastatina. Un hecho inesperado, y cuya causa no está clara, fue que las producciones específicas estuvieron en valores relativamente bajos comparados con FLI y sobre todo con FS.

Esto coincide con estudios previos llevados a cabo por Ishida *et al.*, (1998) quienes demostraron que al llevar a cabo la producción de glucoamilasa por *A. oryzae* en un sistema de fermentación denominado MTC (Membrane Transfer Culture), utilizando membranas de nitrocelulosa la producción aumentaba hasta 2 veces más en comparación con aquel cultivo que no contenía membrana.

### **8.3 Efecto del aumento de la concentración de nutrientes en sistema de FL**

*8.3.1 Comparación del efecto producido por el aumento de concentración de nutrientes [N] en la producción de lovastatina, para el sistema de Fermentación Líquida Inmovilizada FLI en medios 1x y 2.5x.*

En el presente estudio se consideró el incremento en la producción de lovastatina, al crecer *A. terreus* en FS impregnada con un medio más concentrado que el que se usa en FL (2.5x), como una característica de la fisiología en medio sólido. Esto es debido a que se ha visto este efecto en la producción de diferentes metabolitos secundarios (Barrios-González & Mejía 2007). Este efecto no se ha considerado así antes, ni se sabe si es debido al estrés osmótico que esto representa o a la mayor disponibilidad de nutrientes. Lo que sí se sabe es que en FL el efecto es inverso, es decir la producción baja al incrementar de esa manera la concentración de nutrientes (Barrios-González *et al.*, 1983; Barrios-González *et al.*, 2008).

Por lo tanto se estudió el aumento en la concentración de nutrientes, utilizando medios de cultivo 1x y 2.5x. Ambas concentraciones fueron probadas en los sistemas de FL y FS, es decir; cultivo líquido inmovilizado (FLI) y cultivo de agar en placa (CAP). Se encontró que la producción de lovastatina disminuyó hasta un valor de casi la mitad al trabajar con un medio

para la fermentación de concentración 2.5x en el sistema de FLI (Fig. 7-13). Esto señala que al igual que en FL convencional, el efecto por concentración de nutrientes resulta ser negativo en cuanto a producción de lovastatina se refiere, también es importante resaltar que a pesar de que este sistema de fermentación tiene la característica de micelio inmovilizado es incapaz de resistir el estrés osmótico por nutrientes, o simplemente en este cultivo no existe alguna señal a nivel genético capaz de encender genes del medio sólido que hacen posible resistir estrés por aumento en la concentración.

Del mismo modo, el crecimiento tuvo un comportamiento similar al obtenido en el parámetro de producción, es decir; al aumentar la concentración de nutrientes se desfavorecía la producción de biomasa observando así un efecto positivo y un comportamiento inverso al trabajar con medio 1x. Esto señala que el comportamiento de la FLI es equiparable con el observado en cultivo líquido convencional (FL). Sin embargo cabe destacar que las producciones y el crecimiento obtenido en FLI son muy superiores a las obtenidas en FL.

En cuanto al parámetro de PE obtenido en este tipo de cultivo, puede observarse una diferencia importante al trabajar a concentraciones 1x y 2.5x. En primer lugar los valores de PE registrados indicaron que un aumento en la concentración de nutrientes afectaba la PE de lovastatina (Fig.7-15). Esto coincide con lo reportado por Barrios-Gonzalez *et al.*, (2008), donde el cultivo líquido es afectado por una baja disponibilidad de agua, es decir estrés osmótico.

Lo más importante es señalar que aun cuando el sistema de cultivo inmovilizado (FLI), se vio afectado por el estímulo de alta concentración, disminuyendo la PE hasta en una tercera parte en comparación con aquellas que se desarrollaron a concentración 1x, el sistema demostró ser un patrón de comparación para la FL, donde la máxima PE alcanzada en este sistema convencional corresponde a un valor de 26  $\mu\text{g Lov/mg MS}$  es decir 7 y 9 veces menor que lo obtenido en el sistema de FLI a concentraciones 1x y 2.5x respectivamente, siendo esta diferencia significativa a ( $p < 0.01$ ).



La conclusión es que el micelio inmovilizado en FL, aunque tiene el estímulo de exploración y es diferente y más productivo, reacciona igual que el micelio suelto en FL al incremento en la concentración de nutrientes; es decir baja la producción, el crecimiento y la PE.

#### **8.4 Efecto del aumento de la concentración de nutrientes en sistema de Cultivo de Agar en Placa (CAP)**

Como se mencionó en la sección 8.2, el modelo que se diseñó para estudiar el efecto del estímulo de exploración en FS resultó exitoso; y se demostró que el hongo produce más lovastatina en condiciones que estimulan las funciones de exploración. Es decir, consideramos el cultivo en agar (caja de petri) como diferente a una FS ya que, aunque está en contacto con el aire y sí coloniza el medio, no necesita explorar ni superar barreras ya que los nutrientes están relativamente asequibles en el medio circundante. En contraparte sí se estimula esta función de exploración del micelio por medio de la membrana (que permite el paso de nutrientes pero no del micelio).

En esta parte de la tesis se estudió si, además de incrementar la producción en el cultivo con membrana, también se presentaría otra característica de la FS: el incremento de la producción del metabolito al incrementar la concentración de nutrientes.

Se encontró que tanto en cultivo en agar como en agar con membrana, se obtuvo un incremento en la producción en medio 2.5 x; sugiriendo que el cultivo en agar también tiene ciertas características de medio sólido, como contacto directo con el aire y quizás un cierto estímulo de exploración (¿gradientes?). Este incremento fue mayor en medio CM (241% vs 217%). Sin embargo, el efecto fue diferente en 1X+1.5M [Na Cl] (cultivo donde se igualó el parámetro de actividad de agua), donde el CM subió 32.8%, mientras que el SM bajó 39.8%, indicando que el estrés osmótico está induciendo una mayor producción en ese cultivo (CM); mientras que en el tratamiento SM el efecto es inverso. Este es uno de los experimentos más interesantes del estudio, ya que se logró aislar o separar los efectos del estrés osmótico del de disponibilidad de nutrientes, en este ya conocido efecto de incremento de la producción de metabolitos secundarios con el incremento de concentración de nutrientes.

Otra observación interesante fue que en medio 1x, el crecimiento fue mayor en SM, lo cual es lógico, ya que los nutrientes llegan más directamente en ese caso. En contraste, en 2.5x se encontró más biomasa en CM; también en 1X+1.5 [Na Cl] Aw se encontró mucha más biomasa en CM. Esto sugiere que en estos medio hay un efecto de estrés osmótico sobrepuesto con el de mayor disponibilidad de nutrientes, así mismo el CM defiende de alguna manera del estrés osmótico, lo cual se refleja en mayor crecimiento. Esto podría ser algo mecánico como una cierta separación física de los osmolitos o un micelio diferenciado (por estímulo de exploración junto con el contacto con el aire) que contiene mucho mejor con este estrés. Estos conceptos fueron confirmados por la PE, excepto que en el caso del medio 2.5X la diferencia entre CM y SM no fue significativa.

## **8.5 Efecto de la interfase con el aire estudiado en el sistema de fermentación cultivo líquido inmovilizado FLI.**

*8.5.1 Comparación de la producción de lovastatina por efecto de la interfase con el aire, en las distintas zonas desarrolladas durante la fermentación el cultivo líquido inmovilizado (FLI). CNL (Contacto nulo con el líquido), CIL (Contacto Intermitente con el líquido) y LS (Líquido Sumergido).*

Otro de los estímulos planteados para conocer la causa de la alta producción de lovastatina en estado sólido, fue observar la influencia del efecto de la interfase con el aire en el sistema de FLI. Se presentó la formación de 3 zonas debido a la agitación o frecuencia de mojado (F.M) presente en el sistema, revelando que la alta producción es debida a que el hongo es capaz de sentir estímulos presentes en el ambiente.

Los comportamientos en las distintas zonas revelaron, que la mayor producción del metabolito se presentó en zonas con fisiologías bien definidas es decir; LS (líquido sumergido) y CNL (contacto nulo con el líquido) alcanzando producciones de 9.20 mg Lov/gss y 9.10 mg Lov/gss, Fig. 7-20 alcanzando un nivel significativo de  $p < 0.001$ . En contraparte, la zona que menor producción presente fue la definida como CIL (7 mg Lov/gss) una zona que se caracterizó por presentar cambios de ambiente (FS, FL) muy rápidos (varias veces por

segundo) que no permiten el establecimiento de ninguna de las 2 fisiologías y por lo tanto la producción es baja.

De esta forma, aparentemente no se estableció ningún tipo de fisiología y si una confusión regulatoria, siendo esto lo que determinó que en este sistema el hongo fuera incapaz de reconocer el medio en que se encontraba o hacer la señalización que respondiera con una fisiología específica.

El perfil obtenido en crecimiento mostró un comportamiento inverso en comparación con el perfil observado en la producción de lovastatina, es decir; la zona que presentó mayor producción de lovastatina LS (51.02 mg MS), resultó ser la que menos biomasa produjo y la que mostró menor producción del metabolito, CIL registró el valor más alto de biomasa (69.63 mg MS), al cuantificar la cantidad de micelio por la técnica de glucosamina.

Estos resultados indicaron que el crecimiento es un proceso menos delicado y fue favorecido por la presencia de un ambiente inestable mientras que en las zonas donde se manifestó una fisiología particular y bien definida el crecimiento se vio afectado y por tanto disminuido. Este comportamiento también fue observado en el parámetro de P.E. el cual permitió diferenciar cual zona resultó ser más productiva.

La principal conclusión con respecto a este tema fue que cambios tan rápidos de ambiente (FS/FL) varias veces por segundo, no permite señalar y establecer una fisiología, por lo que era necesario otro sistema de cultivo para realizar cambios de ambiente (sólido/líquido) mucho mas espaciados.

## **8.6 Efecto de la interfase con el aire estudiado en el sistema de fermentación sólida híbrida (FSH).**

### *8.6. Comparación de la producción de lovastatina obtenida en el sistema de FSH al variar frecuencias de mojas por efecto de Interfase con el aire.*

Al observar el efecto de interfase con el aire en FSH (la producción máxima de cada condición se muestra en la Fig. 7.24), se observa que con tiempos de exposición al aire menores a 2 h se incide negativamente en la producción de lovastatina obtenida, hasta llegar a un tiempo de exposición más frecuente (cada 5 minutos) en la que la producción llega incluso hasta un valor de FL.

A mayores valores de tiempo de exposición (>12h), la producción va subiendo, en lo que sería una fase fisiológica de transición, hasta llegar a una producción parecida a la FS normal cuando el tiempo de exposición es de cada 2 h, se obtiene una producción ( $13 \pm 0.6017$  mg/gMS) similar al control ( $14.1 \pm 0.7729$  mg/g MS: FS normal), demostrando que es hasta esa frecuencia que se establece una fisiología de medio sólido. Baños más frecuentes bajan la producción, lo cual interpretamos como una fisiología intermedia (líquido/sólido). Finalmente, con un tiempo de exposición relativamente bajo, de cada 0.1 h se obtiene una producción similar a la de FL, indicando que ahí *A. terreus* percibe el ambiente como un medio líquido.

Volviendo a la Fig. 7.24, después de estos tiempos de exposición donde se ve una fisiología intermedia (0.5 y 1 h) y después del ya mencionado de cada 2 h, la producción se mantiene aproximadamente en esos niveles de exposición (8 y 10 h). Sin embargo, con un tiempo de exposición de 12 h se obtuvo la producción más alta de lovastatina de 23 mg/g MS, la cual bajó a niveles de 15.1 y 15.22 mg/g MS con la interrupción de baños menos frecuentes, es decir 18 y 24 h (respectivamente).

En la Tabla 8.1 se ve que los cultivos con tiempos de exposición muy cortos o bajos muestran una producción muy baja. Los cultivos que dieron producciones medianamente altas (cercana o superior al Control 1) tuvieron uno o dos baños antes del inicio de la idiofase (encendido de *lovE*). Sin embargo, el de tiempo de exposición de 2 h tuvo 6 baños en este período

incluyendo los de las 20 y 22 h. De hecho, en esto se parece al período de exposición que tuvo un baño a las 20 h, y al tiempo 10 h con un baño a las 22 h. Es interesante notar que estos 3 cultivos tuvieron producciones similares. Al parecer ese rango de tiempo (20 a 22 h) es importante y sensible.

En contraste, tiempos de exposición al aire como 12, 18 y 24 que tuvieron sólo un baño a las 12 h y el siguiente fue después del encendido del gen *lovE*: en tiempo de exposición de 12 h, exactamente a las 24 h (recién encendido *lovE*). Esto parece haber sido muy importante pues este cultivo fue el que mostró la mejor producción de lovastatina con 23 mg/g MS.

Los cultivos con tiempo de exposición de 18 h tuvo el 2do baño a las 30 h y en el tiempo 18 h a las 36 h, mostrando ambas producciones altas, ligeramente superiores a 15 mg/g MS. Estos datos sugieren que un número de baños alto (superior a 6), antes de las 24 h baja la producción por ser interpretadas por los sistemas reguladores de *A. terreus* como un ambiente intermedio sólido/líquido; y que baños cada 5 minutos lo interpreta como medio líquido. Además, que la zona de tiempo entre 20 y 22 h puede ser sensible y se puede producir más si no se baña ahí. Esto concuerda con los resultados de Miranda *et al.* (2007) quien detectó, en esos tiempos, un estado hiperoxidante que contribuye a la señalización que lleva al encendido del gen *lovE* y al inicio de la idiofase. Los datos también indican que al no bañar en esa “zona de señalización” y dar el baño exactamente a las 24 h (recién encendido *lovE*) es muy positivo para la producción de lovastatina. El baño unas horas después (30 o 36 h) también genera producciones altas, aunque no tanto como el caso anterior.

Consideramos que después de esto, la humedad y nutrientes que proporcionan los baños deben estar contribuyendo a que la biosíntesis siga sin limitaciones. Aunque los valores de biomasa determinados no son tan confiables por la heterogeneidad del crecimiento presente en el soporte, cabe destacar que la PE (Fig. 7-26) mostró un comportamiento similar al perfil obtenido durante la producción.

La razón de la heterogeneidad fue debida a ciertos problemas presentados durante la cuantificación, pues la formación de una nata en el soporte fue una variable que no se pudo controlar, esto ocasionado por el número de baños presentes en cada tratamiento.

Para resolver este problema, se planteó que esta variación podía estar relacionada con la densidad del PUF empleado durante la fermentación, principalmente con el drenado del medio líquido utilizado para los baños. Así se planteó una serie de experimentos utilizando densidades de poliuretano de 15 y 17 kg/m<sup>3</sup>. Se desarrollaron las fermentaciones y los resultados encontrados indicaron que efectivamente la variación en todos los parámetros disminuyó, sin embargo de la misma forma la producción de lovastatina decayó, alcanzando incluso valores de 14 mg Lov/g MS- 16 mg Lov/g MS (en cuanto a producción se refiere), pero manifestando también el máximo a un tiempo de exposición de 12 horas.

De forma similar ocurrió en el parámetro de producción específica. Por esta razón se decidió seguir trabajando con la densidad inicial (20 kg/m<sup>3</sup>) y realizar la cuantificación de biomasa considerando ciertas precauciones.

Desde el punto de vista aplicado o tecnológico, es importante notar que el sistema de fermentación híbrida con un tiempo de exposición al aire de 12 h se produjeron 23 mg de lovastatina por g MS, lo cual representa una producción 63.72% mayor a la obtenida en el control de la FS normal en PUF. La producción obtenida en la fermentación híbrida es un valor muy importante ya que la producción de lovastatina en FS en PUF tiene el record de la segunda mayor producción reportada en la literatura científica para un metabolito secundario producido por FS. De hecho es la más alta usando una cepa silvestre (Baños *et al.*, 2009; Barrios-González y Mejía, 2007). Esto sugiere que este sistema de fermentación híbrida puede tener importancia tecnológica.

Un resultado sorprendente fue el nivel de producción de lovastatina del Control 2, en el cual se obtuvo una producción de  $18 \pm 0.634$  mg/g MS; muy superior a la obtenida en la FS normal (Control 1); la cual alcanzó 14.1 mg/g MS). De este modo, el poner medio de cultivo líquido en el mismo matraz que la FS (pero sin tocarse) debe haber generado una atmósfera muy húmeda que favoreció el crecimiento y la producción.

Llama la atención que este es un sistema más sencillo, fácil de manipular y fácil de escalar. Este es entonces un segundo sistema novedoso propuesto en esta tesis y que también tiene potencial para producción industrial.

## **9.- Perspectivas**

Este trabajo abre un área de investigación muy amplia e interesante para aplicaciones sobre todo de tipo biotecnológico. En un futuro, los diseños de estos sistemas de fermentación planteados en este trabajo, pueden representar métodos para elevar las producciones a nivel industrial de metabolitos de gran interés sobre todo en el sector salud y farmacéutico, aunque en uno de ellos es necesario resolver el problema de la heterogeneidad causada por biomasa que flota en el medio líquido.

Aunado a esto se abre una gran puerta para la realización de futuros trabajos que definan con más precisión estos y otros factores ambientales involucrados en las altas producciones de metabolitos secundarios y con ello el entendimiento de la fisiología del medio sólido.

La fisiología del medio sólido es compleja, sin embargo nos encontramos frente a un trabajo en el que realizando ciencia básica se identificó algunos de los estímulos presentes en la fisiología e involucrados en ese conjunto de señales ambientales. En un futuro será muy importante descubrir los receptores de cada estímulo y la cascada de transducción de señales que activa, y a qué factores transcripcionales inducen y finalmente los grupos de genes que se expresan.

## **10. Conclusiones**

- ❖ Tanto en FS (CAP) como en FL (FLI), el estímulo de exploración (inmovilización) favoreció la producción de lovastatina, por lo tanto proponemos que este estímulo contribuye al grupo de señales ambientales involucradas en la denominada fisiología del medio sólido.
  
- ❖ En FLI, aunque el micelio tiene el estímulo de exploración, en este cultivo se observó disminución de la producción y P.E. de lovastatina en un medio concentrado 2.5x. Aunque esto coincide con el comportamiento de FL, es contrario a lo observado en FS.

- ❖ En el modelo desarrollado para estudiar el estímulo de exploración en un ambiente en contacto con el aire (cajas de Petri) se confirmó el incremento de la producción (y la PE) al poner barreras al crecimiento (membrana) que estimulara la necesidad de explorar del micelio. En este mismo sistema modelo se demostró también que el incremento a la producción, al usar medio 2.5x, se debe al estrés osmótico y a una mayor disponibilidad de nutrientes.
  
- ❖ Se demostró que el efecto del contacto o Interfase con el aire (tanto en FLI como FSH) juega un papel importante en la alta producción de lovastatina y por lo tanto en la fisiología del medio sólido. Variando la FM en la FSH, se logró manipular la fisiología obteniendo producciones de lovastatina típicas de FL (0.86 mg/gms con baños cada 5'), otras intermedias (baños cada 0.5 y 1 h); unas típicas de FS (13.03 a 10.18 mg/gms) con baños con FM de 2 h a 10 h.
  
- ❖ Usando baños con FM de 12 a 24 h se obtuvieron producciones mayores a las del sistema de FS en PUF; alcanzando, con una FM de 12 h una producción de 23 mg/gms, 63.1% mayor al de la FS normal en PUF.
  
- ❖ Observar el efecto de Interfase con el aire llevó al diseño de 2 sistemas novedosos de fermentación: siendo uno el sistema utilizado como Control 20 y el otro la FSH con FM de 12 h.



## 11. Bibliografía

- Aidoo, K. E., Hendry, R., & J.B. Wood. 1982. Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. 28: 201–237.
- Baños, J.G., Tomasini, A., Szakács, G. & J. Barrios-González. (2005) Fisiología y producción de lovastatina de *A. terreus* en fermentación sólida de dos fases. VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos. 27 al 29 de octubre. Morelia, Michoacán, México.
- Baños, J.G., Mejía, A., Garay, A. & J. Barrios-González. (2007) Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidativo. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 25 a 29 de junio. Morelia, Michoacán, México.
- Barrios-González J., Tomasini, A., Viniegra-González, G.& L. López. 1988 Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*. 10:793-798.
- Barrios-Gonzalez, J., Castillo, TE., & A. Mejía. 1993. Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnology Advances*. 11:525-537.
- Barrios-González, J. & A. Mejía. 1996. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. 2:85-121.
- Barrios-González, J., Baños J.G., Tomasini, A. & A. Mejía. 2004. Patente: “Procedimiento para la producción de lovastatina por fermentación sólida en soporte inerte artificial. Depositada el 16 de diciembre de 2004, con el No. PA/a/2004/012778.
- Barrios-González, J. & A. Mejía. 2007. Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Larroche C, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA (eds) *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Chapter 14 Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, pp 262-296
- Barrios- González, J., Fernández, F.J. & A. Tomasini. 2003. Production of microbial secondary metabolites and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*. Special Issue: Microbial Biotechnology. 2(3):322-333.
- Barrios- González, J., Baños, J.G., Covarrubias, A.A., Garay-Arroyo, A. 2008 Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 79:179-186

- Barrios-González, J., Baños, J.G., Covarrubias, A.A. & A. Garay-Arroyo. 2008. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are differently expressed in solid-state and liquid submerged fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. En prensa.
- Barrios-González, J. & A. Mejía. 2007. Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Larroche C, Soccol CR, Rodriguez-León JA (eds) Current Developments in Solid-State Fermentation. Chapter 14 Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, pp 262-296
- Beisebeke, R., Van Biezen, N., de Vos, W.M., Van den Hondel, C.A.M.J., Punt, P.J. 2005 Different control mechanisms regulates glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. Biotechnologically Relevant Enzyme and Proteins. 67:75-82
- Bigelis, R., He, H., Hui, Y., Chang, Li- Ping., Greenstein, M. 2006. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. J Ind Microbiology Biotechnology. 10: 815-826
- Cannel, E., & M. Moo-Young. 1980. Solid-state fermentation systems. Process Biochemistry. 4: 2–7.
- Domínguez, M., Mejia, A., Barrios-González J. 2000 Respiration Studies of Penicillin Solid-State Fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 89:409-413
- Domínguez, M., Mejía,A., Revah, S., Barrios-González, J.2001 Optimization of bagasse, nutrients and initial moisture ratios on the yield of penicillin in solid-state fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 17.751-756
- Hajjaj, H., P. Niederberger & P. Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology. 67 (6): 2596-2602.
- Hasseltine, C. W. 1977. Substrate fermentations. Process Biochemistry. 12: 24–27.
- Hendrickson, L., C.R. Davis, C.Roach, D.K. Nguyen, T. Aldrich, P.C. Mcada & C.D. Reeves. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. Chemistry & Biology. 6:429-439.

- Hisada, H., Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe & O. Akita. 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience And Bioengineering*. 99(6):562-568.
- Hölker, U., & Hofer, M. 2002. Solid substrate fermentation of lignite by the coal-solubilizing mould *Trichoderma atroviride*, in a new type of bioreactor. *Biotechnology Letters*. 24: 1643-1645.
- Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., Imayasu, S. 1998 Regulation of the Glucoamylase- Encoding Gene (gla B), Expressed in Solid- State Culture (Koji) of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86: 301-307.
- Kobayashi, A., Sano, M., Oda, K., Hisada, H., Hata, Y., Ohashi, S. 2007 The Glucoamylase- Encoding Gene (gla B) Is Expressed in Solid-State Culture with A Low Water Content. *Bioscience .Biotechnol. Biochem*. 71:1797-1799
- Manzoni, M. & M. Rollini. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 555-564.
- Mazumdar-Shaw, K. & S. Suryanarayan. 2003. Commercialization of a novel fermentation concept. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. 85:29-42.
- Marcial J., Barrios-González J. & A. Tomasini. 2005. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry*. In press (2005)
- Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J. & A. Rinzema. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 18:356-360.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Rodríguez-León, J. A., & P. Nigam. 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology—Fundamentals and Applications*. Asia Tech Publishers, Inc. New Delhi, pp. 100–221.
- Porcel-Rodríguez, E.M., Casas-López J.L., Sánchez- Pérez, J.A. 2007. Enhanced production of lovastatin in a bubble columns by *Aspergillus terreus* using a two-stage feeding strategy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82:58-64

- Rahardjo S.P *et al.*,2002. Contribution of Aerial Hyphae of *Aspergillus oryzae* to Respiration in a Model Solid- State Fermentation System. *Biotechnology and Bioengineering*. 78: 539-544
- Robinson, T., Singh, D., & P. Nigam. 2001. Solid state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:284-289.
- Szakács, G., G. Morovján Y R.P. Tengerdy. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*. 20(4): 411-415.
- Tomasselli S.C., Vergoignan, C., Feron G., & A. Durand. 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* growth in solid state cultivation conditions. *Journal of Biochemical Engineering*. 7: 1-5.
- Valera, H.R., Gomes, J., Lakshmi, S., Gururaja,R., Suryanarayan, S., Kumar, D. 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:521-526
- Yoshizawa, Y., D. J. Witter, Y. Liu, & J. C. Vederas. 1994. Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinoлин (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus*.
- Yovita, S.P. Rahardjo., Weber, F., Le Comte, P., Tramper, J., Rinzema, A. 2002 Contribution of Aerial Hyphae of *Aspergillus oryzae* to Respiration in a Model Solid-State Fermentation System. *Biotechnology and Bioengineering*. 78: 540-544

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

**“Efecto del contacto con el aire, el estrés osmótico y el estímulo de exploración del micelio sobre la producción de lovastatina en *Aspergillus terreus*”**

Que presentó

IBI. Nayeli Ávila Cisneros

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

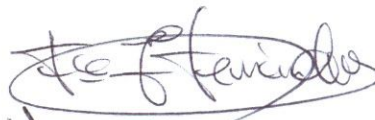
Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez

Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio



Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino.



Vocal: Dra. Carolina Campos Muñiz



Vocal: Dr. Armando Mejía Álvarez

