



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

UNIDAD IZTAPALAPA.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Biotecnología.

EFFECTO DE LA SOBREENPRESION DEL GEN *lovE* SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE *Aspergillus terreus*, EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

I.B.I. AGUSTIN DANIEL MARTINEZ VELASCO

Director de Tesis: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez

Dr. Francisco Fierro Fierro.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología y 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 está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F., a 25 de Enero del 2012.

El Jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM unidad Iztapalapa, aprobó la

Tesis

EFFECTO DE LA SOBREENPRESION DEL GEN *lovE* SOBRE LA PRODUCCION DE LOVASTATINA, POR *Aspergillus terreus*, EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA.

Qué presentó

Agustín Daniel Martínez Velasco

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando mejía Álvarez.

Dr. Francisco Fierro Fierro.

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino _____

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez _____

Vocal: Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos _____

Vocal: Dra. Roxana Uri Miranda Labra _____

RESUMEN:

El hipercolesterolemico lovastatina se produce en forma convencional por fermentación líquida por *Aspergillus terreus*, aunque últimamente se ha utilizado la fermentación sólida (FS), un nuevo sistema que involucra un material inerte como soporte y muestra una productividad sorprendente. Una desventaja de la fermentación sólida, sin embargo, es la falta de cepas especiales, eficientes en este sistema. Por lo anterior, en esta tesis se pretende desarrollar métodos para mejoramiento genético de cepas para FS. Una estrategia avanzada para generar cepas sobreproductoras de metabolitos es el incremento del número de copias y la sobreexpresión de un gen regulador positivo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la estrategia de incrementar el número de copias del gen *lovE* (gen regulador específico de los genes de biosíntesis lovastatina) y comprobar su efecto sobre la producción de lovastatina en FS y en FL.

Para ello, se transformó *A. terreus* con el gen *lovE*, bajo el control de un promotor constitutivo (*gpd* de *A. nidulans*). Sin embargo, como el vector usado, pAN52.1, carece de un marcador para hongos fue necesario utilizar un proceso de cotransformación con el vector pULC43.

Se obtuvieron 36 transformantes totales y como un paso de preselección, se evaluó la producción de lovastatina de las transformantes por Fermentación en Cilindro de Agar (FCA), obteniéndose que, solamente 10 incrementaban la producción con respecto a la parental, mientras que el control (transformada solamente con los vectores pULC43 y pAN52.1 pero sin el inserto *lovE*) mantuvo una producción ligeramente inferior a la de la parental. Así, se caracterizó a las 10 transformantes preseleccionadas en FCA, midiendo su producción en FS y FL al séptimo día.

En FS solamente dos transformantes, de las 10 evaluadas, fueron sobreproductoras. La T11 mostró un incremento de producción de lovastatina de 60.48 %, llegando a una producción de 23.27 mg de lovastatina/gms. Y siguió la T08, con incremento de 37.17% (19.89 mg/gms).

Desde el punto de vista de la eficiencia del método de mejoramiento genético, se observa que de treinta y seis transformantes aisladas originalmente solamente 2 fueron realmente sobreproductoras en fermentación sólida, dando una eficiencia de obtención relativamente

baja (11.11%). Probablemente, el sistema de cotransformación utilizado le quitó eficiencia a este método.

Sin embargo, también es evidente que la técnica de preselección con FCA le agregó eficiencia a la estrategia general. Se constató que con poco esfuerzo, el uso de la FCA permitió de entrada desechar 26 transformantes y concentrar el esfuerzo en las 10 transformantes que mostraron mayor producción que la parental. De esta manera, la integración de la FCA como parte del método subiría la eficiencia al 40%. Es decir, 40% de las cepas preseleccionadas resultaron sobreproductoras, lo cual es un porcentaje notablemente alto para un método de mejoramiento genético.

En FL, el panorama fue similar, con cuatro transformantes sobreproductoras de las 10 preseleccionadas. No obstante, es importante notar que, aunque la T11 fue la mejor en FS y en FL, las demás mostraron comportamiento diferente en FS y en FL. Por ejemplo, la T08, que fue la segunda mejor en FS, en FL bajó la producción en 16.56%.

De esta manera, en FL la T11 tuvo un incremento en la producción de lovastatina de 40.69%, llegando a una producción de 0.875 mg/mL, la T26 mostró un aumento de 26.84% (1.111 mg/mL) y la T23 un incremento de 18.08% (1.034 mg/mL).

Con la información del Southern blot disponible, se concluyó que todas las transformantes, confirmadas con copia(s) adicional(les) de *lovE*, fueron sobreproductoras de lovastatina en uno u otro sistema de cultivo.

Desde el punto de vista básico, se observó que la sobreexpresión de *lovE* no tuvo un efecto claro sobre la morfología. Sin embargo, los resultados mostraron que sí incide negativamente en la conidiación. No hay ningún antecedente similar en la literatura y es poco probable que LovE pueda interactuar con promotores relacionados con esporulación. Sin embargo es posible que LovE interactúe con elementos de la cascada de señalización cAMP-PKA.

Abstract:

Microbial secondary metabolites are produced mainly by species of the family actinomycetes in bacteria and by filamentous fungi. A considerable amount of these show pharmacological activity, like antibiotics. *Aspergillus terreus* is a fungus that belongs to the Division/Phylum Ascomycota (before Class Ascomycetes), which can produce several interesting natural products. Particularly it produces lovastatin, which reduces cholesterol levels in blood, so it has a high commercial and medicinal value. Lovastatin is conventionally produced by liquid submerged fermentation (SmF), although lately solid-state fermentation (SSF) has become an alternative culture system. However, a disadvantage of SSF is the lack of high producing strains developed for and particularly suited for this system. Hence, this thesis aims to develop methods for genetic improvement of strains for SSF. An advance strategy of genetic improvement is to increase the copy number of a regulatory gene (overexpression).

The objective of this thesis was to evaluate the strategy of increasing the copy number of gene *lovE* (specific transcription factor of the lovastatin gens cluster), and determine its effect on lovastatin production in SSF and in SmF. To this end, *A. terreus* was transformed with gen *lovE*, under the control of a constitutive promoter (*gpdA* from *A. nidulans*). However, since the vector used (pAN52.1) lacks a marker for fungi, it was necessary to use a cotransformation process with vector pULC43. In this way, 36 transformants were obtained and, as a pre-selection stage, their lovastatin production in fermentation in agar plugs (FCA). Only 10 transformants showed increased production in relation to the parental strain, while the control (transformed with empty vectors) showed production slightly lower than the parental. After this, the preselected transformants were characterized further by determining production in solid-state fermentation (SSF) and in submerged fermentation (SmF), at day 7.

In SSF only 4 transformants turned out to be overproducers. T11 displayed a 60.48% production increase, reaching a peak production of 23.27 mg/gdc. The second better was T08 with a 37.17% production increase.

From the standpoint of efficiency of the genetic improvement method, it is seen that from the 36 original transformants, only 4 were overproducers in SSF, representing an efficiency of 11.11%. Probably the co-transformation used lowered this parameter. However, it is also evident that the pre-selection stage with FCA added efficiency to the

general or complete strategy.

It was determined that, with little effort, the use of FCA allowed us to discard 26 lower production transformants. In this way, the integration of FCA as part of the method increases its efficiency to 40%. That is, 40% of the pre selected mutants turned out to be overproducers, which is a very high efficiency for a genetic improvement method.

In SmF, the situation was similar, with 4 overproducers out of 10 preselected transformants. However, it is important to note that, although T11 was the best in SmF and SSF, the rest showed different performance in SSF and SmF. For instance, T08, that was the second best in SSF, in SmF showed a 16.56% lower production than the parental strain.

In SmF, T11 showed a lovastatin production increase of 40.69%, reaching 00.875 mg/mL, and T26 displayed a 26.84% increase (1.111 mg/mL), while T23 a 18.08% increase (1.034 mg/mL).

With the information provided by the Sother blot it was concluded that all confirmed transformants with additional copies of gene *lovE* were lovastatin overproducers in one or the other culture system.

From a basic point of view, it was observed that *lovE* overexpression did not have a clear effect on morphology. However, results showed it does have a negative effect on sporulation. There are no precedents in the literature, and it is unlikely that *lovE* can interact with promoters of sporulation genes. However, it is possible that it can interact with elements of the cAMP-PKA signaling cascade.

AGRADECIMIENTOS

QUIERO AGRADECERLE INFINITAMENTE AL DR. JAVIER BARRIOS POR PERMITIRME REALIZAR MI TESIS BAJO SU SUPERVISIÓN. GRACIAS POR LA PACIENCIA, LOS CONSEJOS Y EL APOYO TOTAL Y DECIDIDO QUE RECIBI DE SU PARTE Y SIN EL CUAL YO NO HUBIERA PODIDO TERMINAR ESTE PROYECTO.

A MIS ASESORES, ARMANDO MEJÍA Y FRANCISCO FIERRO, POR APORTAR SUGERENCIAS Y CORREGIRME EN EL TRANSCURSO DE MÍ TRABAJO. GRACIAS ARMANDO POR TUS ORIENTACIONES.

A TODOS MIS PROFESORES DE LA MAESTRÍA, QUE ME COMPARTIERON Y ME BRINDARON PARTE DE SU CONOCIMIENTO Y EXPERIENCIA.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS, PORQUE CON SU EJEMPLO, APOYO, SUGERENCIAS, COMPRESIÓN Y AMISTAD LOGRE HACER MENOS TENSO Y MÁS LLEVADERO EL TRABAJO CRISTIAN, HUGO, ROXANA, ULISES, OMAR, TERE, ANTONIO, MARIEL, MAURA, VICKY...

A MI GRAN Y HERMOSA FAMILIA QUE SIN ELLOS NO TUVIESE SENTIDO LA VIDA Y A QUIEN DEDICO MUY ESPECIALMENTE ESTE TRABAJO, LAURA (LAS DOS), OCTAVIO, MOISES (LOS DOS). DANY, JESSY, CECY, Y QUIEN SE QUIERA AGREGAR.

A CONACYT POR CREER EN MÍ, Y DARME LA OPORTUNIDAD DE HABER RECIBIDO UN APOYO, GRACIAS POR LA BECA OTORGADA Y OFRECERME UN ESCALÓN DE UNA VIDA DE INVESTIGACIÓN.

A LA UAM-I POR SER EL SOPORTE DESDE EL INICIO PARA SER PROFESIONISTA E INVESTIGADOR.

¡GRACIAS!

INDICE GENERAL

A. INDICE DE FIGURAS.....	14
B. INDICE DE TABLAS.....	16
C. ABREVIATURAS.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	18
1.1.1 Generalidades.....	18
1.2. Metabolismo secundario.....	20
1.3. Lovastatina.....	20
1.4. Producción de lovastatina.....	25
1.5. Fermentación en cultivo sólido.....	26
1.6. Regulación genética.....	27
1.7. Mejoramiento genético.....	28
1.7.1. Métodos de genética clásica.....	28
1.7.1.1. Mejoramiento de una cepa silvestre.....	29
1.7.1.2. Cepas sobreproductoras para FL.....	29
1.7.2. Métodos de selección racional.....	29
1.7.3. Mejoramiento genético molecular de cepas silvestres.....	30
1.7.3.1. Amplificación de genes de producción de metabolitos secundarios.....	31
1.7.3.2. Mejora de otras características que indirectamente benefician el proceso de producción de metabolitos secundarios.....	31
2. ANTECEDENTES.....	35
3. JUSTIFICACION.....	38
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS.....	40

5.1 Objetivo General.....	40
5.2 Objetivos Específicos.....	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	41
6.1.1 Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUB-514.....	41
6.1.2 Cepa fúngica bacteriana: <i>Escherichia coli</i> DH5 α	41
6.1.3 Cepa fúngica <i>Neurospora Crassa</i>	42
6.2 VECTORES PLASMÍDICOS.....	42
6.2.1 pJET.....	42
6.2.2 pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado).....	42
6.2.3 pAN52.1 (Punt <i>et al.</i> , 1990):.....	43
6.3 REACTIVOS.....	44
6.3.1 Ácidos nucleicos.....	44
6.3.2. Oligonucleótidos.....	44
6.3.3. Marcadores.....	44
6.3.4 Enzimas.....	45
6.4 EQUIPO.....	45
6.5 MEDIOS DE CULTIVO.....	45
6.5.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> DH5 α y para <i>Neurospora crassa</i>	45
6.5.1.1 Medio de cultivo Luria-Bertani (LB).....	45
6.5.2. Medios de cultivo para <i>Aspergillus terreus</i>	46
6.6 CONDICIONES DE CULTIVO.....	48
6.6.1 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	48
6.6.2 Crecimiento de <i>Aspergillus terreus</i>	48
6.7 Producción de lovastatina en FS Y FL.....	49

6.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	49
6.8.1 ADN.....	49
6.8.1.1 Extracción de ADN genómico de <i>Aspergillus terreus</i>	49
6.8.1.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	50
6.8.1.2.1 Boiling (Miniprep).....	50
6.8.1.2.2 Midiprep-Kit.....	51
6.8.1.3 Diseño de oligos para obtener el fragmentos del gen <i>lovE</i> de <i>A. terreus</i> con promotor constitutivo.....	52
6.8.1.3.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....	53
6.8.1.3.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	55
6.8.1.3.3 Purificación de insertos por Kid.....	55
6.8.1.4 Clonación del inserto en el vector pAN52.1.....	56
6.8.1.4.1 Digestiones de inserto y vector.....	56
6.8.1.4.2 Ligación.....	57
6.8.1.4.3 Preparación de células electrocompetentes.....	58
6.8.1.4.4 Electroporación de <i>E. coli</i> DH5 α	59
6.8.1.5 Transformación de <i>Aspergillus terreus</i> TUB-514.....	60
6.8.1.5.1 Crecimiento del micelio.....	60
6.8.1.5.2 Obtención de protoplastos.....	60
6.8.1.5.3 CoTransformación.....	61
6.8.1.5.4 Extensión en placa.....	62
6.8.2 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.....	62
6.8.2.1 Siembra por picadura.....	62
6.8.2.2 Fermentación en cilindros de agar (FCA).....	62
6.8.3 FERMENTACIONES.....	63

6.8.3.1 Fermentación líquida.....	64
6.8.3.2 Fermentación sólida.....	64
6.9 CUANTIFICACIÓN.....	64
6.9.1. Lovastatina.....	64
6.9.1.1. Extracción de lovastatina en FS.....	64
6.9.1.2. Extracción de lovastatina en FL.....	64
6.9.1.3. Cuantificación de lovastatina.....	65
6.9.2. pH.....	65
6.9.3 Biomasa y humedad.....	65
6.8.4.1.2 Lovastatina en caldo.....	65
6.8.4.1.3 Lovastatina en micelio.....	65
6.8.4.1.4 pH.....	65
6.9.4. EXPRESIÓN DE GENES.....	65
7. RESULTADOS.....	68
7.1 OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>A. terreus</i>	68
7.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL FRAGMENTO CON EL GEN <i>lovE</i>	69
7.2.1 Diseño de los primers de reconocimiento.....	69
7.2.2. Obtención del gen <i>lovE</i> completo por medio de la técnica de PCR.....	70
7.3 Clonación del fragmento de PCR <i>lovE</i> cds, en el vector plasmídico pAN52.1....	70
7.4. Confirmación de la construcción pUAMJB3.....	71
7.5. Cotransformación de <i>A. terreus</i> con construcción pUAMJB <i>lovE</i> y selección de transformantes.....	73
7.6 Morfología de la cepa parental y de las transformantes.....	73
7.7. Velocidad de Crecimiento Radial.....	77
7.8 Esporulación de la cepa parental y las cepas transformantes.....	78

7.9. Fermentación en cilindro de Agar.....	80
7.10 Fermentación Sólida y Fermentación Líquida.....	82
7.11 Cinéticas de producción de lovastatina en FS de las transformantes T11 y T08.	89
7.12 Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con <i>lovE</i> con promotor constitutivo por medio de PCR.....	92
7.13 Southern blot.	92
7.14. Clonación del gen <i>lovH</i> completo en vector pAN52.1	93
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	98
9. CONCLUSIONES.....	104
10. PERSPECTIVAS.....	105
11. BIBLIOGRAFÍA.....	106

A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química de las estatinas naturales y sus derivados: simvastatina y pravastatina (Manzoni y Rollini, 2002).....	21
Figura 1.2. Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández y col. 2003).....	23
Figura 1.3. Ruta de biosíntesis de la lovastatina, se muestran las enzimas involucradas y los genes codificadores	24
Figura 1.4. Cluster de los genes de biosíntesis de lovastatina.....	25
Figura 1.5. Modelo propuesto de regulación de metabolitos secundarios: Reproducido de Woo y Keller (2004).....	34
Figura 1.6. Integración del control de las señales de transducción en la producción de esporas (conidiación) y del metabolismo secundario en <i>Aspergillus nidulans</i>	34
Figura 6.1. Plásmido utilizado para clonar el inserto <i>lovH</i>	42
Figura 6.2. Plásmido pULC43 el cual tiene marcador de hongos para poder aislar transformantes con la construcción en su genoma.....	43
Figura 6.3. Plásmido pAN52.1, el cual tiene un promotor constitutivo que permite la expresión continua de un gen inserto en su interior.....	44
Figura 6.7. Construcción de la unidad de transferencia para aplicar la Técnica de Southern blot.....	67
Figura 7.1. ADN GENOMICO DE <i>Aspergillus terreus</i>	68
Figura 7.3a Tamaño del gen <i>lovE</i> indicando la localización de los cortes con las enzimas <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i>	69
Fig. 7.3b. Tamaño del gen <i>lovE</i> indicando la localización de los cortes con las enzimas <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i>	70
Figura 7.3.2. Construcción del plásmido pUAMJB3 con promotor constitutivo.....	71
Figura 7.4.1. Resultado de la electroforesis de la digestión del vector pUAMJB3 donde se aprecian el plásmido y el inserto digeridos.....	71
Figura 7.4.2. Porcentaje de la identidad del gen <i>lovE</i>	72
Figura 7.4.3. Porcentaje de similitud del gen <i>lovE</i>	72
Figura 7.5. Transformantes obtenidas por el proceso de cotransformación de <i>Aspergillus terreus</i> donde se introdujeron los plásmidos pJBUAM03 y pULC43.....	74
Figura 7.7.1. Tasa de crecimiento radial de cepa parental y transformantes.....	77
Figura 7.8.1. Esporulación de las transformantes y la cepa parental en Esporas/cm ²	78
Figura 7.8.3. Cinética de esporulación de las cepas transformantes y la parental.....	79

Figura 7.9.1. Placas de Fermentación de Cilindro de Agar donde se evalúa la producción de lovastatina a las transformantes obtenidas en el proceso de transformación.....	80
Figura 7.9.2. Producción de lovastatina en Fermentación en Cilindro de Agar (FCA) de las transformantes obtenidas por cotransformación.....	81
Figura 7.7.1.2. Producción de lovastatina en Fermentación Líquida por las transformantes seleccionadas al séptimo día.....	83
Figura 7.7.1.3. Producción de lovastatina en Fermentación Sólida por las transformantes seleccionadas al séptimo día.....	85
Figura 7.7.3. Cinéticas de Producción de lovastatina de las transformantes T11, T26 y T23 en FL	90
Figura 7.7.4. Cinéticas de Producción de lovastatina de las transformantes T11, T26 y T23 en FS	91
Figura 7.10. Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con <i>lovE</i> con promotor constitutivo por medio de PCR.....	92
Figura 7.11. Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con <i>lovE</i> con promotor constitutivo por medio de la técnica se Southern blot..	92
Figura 7.12 Integridad del ADN de las transformantes seleccionadas.....	93
Figura 7.14.1 Tamaño del gen <i>lovH</i> indicando la localización de los cortes con la enzima <i>NcoI</i>	94
Figura 7.14.2 Secuencia del gen <i>lovH</i> indicando la localización de los cortes con la enzima <i>NcoI</i>	94
Figura 7.14.3 Construcción del plásmido pUAMDM1 con promotor constitutivo donde viene clonado el gen <i>lovH</i> para posteriores transformaciones.....	95
Figura 7.14.4 Amplificación del gen <i>lovH</i> por PCR y comprobación de que el inserto se encuentra en la construcción por medio de la digestión de la Megaprep con la enzima <i>NcoI</i>	95
Figura 7.14.5 Prueba de cortes con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>BamHI</i> del plásmido pUAMDM1 para corroborar la presencia del inserto y del correcto sentido de inseción del gen <i>lovH</i> , si correspondía al simulado por el programa DNAMAN	96
Figura 7.14.6 PCR para confirmar la presencia del inserto en la construcción en el sentido correcto utilizando un primer forward que abarca parte del promotor del pAN52.1 y que incluye 954 pb hasta el sitio de corte <i>NcoI</i> (<i>pLaeAF</i>) y el primer reverse <i>lovHr</i>	97

A. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Linaje del hongo filamentoso <i>Aspergillus terreus</i> (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov)	41
Tabla 6.3.1 Primers para amplificar los genes <i>lovE</i> y <i>lovH</i>	44
Tabla 6.4 Mezcla de reacción para llevar a cabo PCR para amplificación de genes.....	53
Tabla 6.5. Secuencia de pasos del programa del Termociclador para llevar a cabo la Técnica de PCR.....	54
Tabla 6.6. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los plásmidos a los cuales se les va a insertar los genes <i>lovE</i> y <i>lovH</i>	57
Tabla 7.2 Oligos utilizados en la amplificación del gen <i>lovE</i>	69
Tabla 7.3.1. Enzimas de restricción que se utilizaron para cortar el gen <i>lovE</i> y al vector pAN52.1.....	70
Tabla 7.6. Tabla de descripción y comparación de la morfología de las colonias Transformantes obtenidas en el proceso de la cotransformación de <i>Aspergillus terreus</i>	76
Tabla 7.7.2. Comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa parental con las transformantes T08, T11, T23 y T26.....	78
Tabla. 7.8.2. Esporulación de la cepa parental y de las transformantes en Esporas/cm ²	79
Tabla 7.9.4. Producción de lovastatina en FCA, de las transformantes seleccionadas para posterior caracterización.....	81
Tabla 7.10.1. Se muestra el pH y la producción de biomasa en cada una de las transformantes en Fermentación Líquida.....	82
Tabla. 7.10.1.3. Las cepas se organizaron en el orden de Producción de lovastatina de mayor a menor cantidad en Fermentación Líquida apreciándose el porcentaje de incremento (o decremento).....	84
Tabla 7.10.1.4. Porcentajes de incrementos y decrementos en FL, donde el efecto de la transformación para obtener sobreproductoras es más negativa que positiva.....	85
Tabla 7.7.2.1. Se muestra el pH, el porcentaje de humedad y la producción de biomasa en cada una de las transformantes en Fermentación sólida.....	85
Tabla. 7.7.2.2. Las cepas se organizaron en el orden de Producción de lovastatina de mayor a menor cantidad en Fermentación Sólida apreciándose el porcentaje de incremento (o decremento).....	87
Tabla 7.7.2.3. Porcentajes de incrementos y decrementos en FS, donde el efecto de la transformación para obtener sobreproductoras es más negativa que positiva.....	89
Tabla 7.7.2.4. Comparación en la producción de lovastatina entre las mejores productoras tanto en FS como en FL.....	89
Tabla 7.7.3.1 Tabla de Anova de producción de lovastatina de transformantes <i>lovE</i> en FL.....	90
Tabla 7.7.3.2 Comparación de medias de producción de lovastatina de transformantes <i>lovE</i> en FL.....	90
Tabla 7.7.4.1 Tabla de Anova de producción de lovastatina de transformantes <i>lovE</i> en FS.....	91
Tabla 7.7.4.2 Comparación de medias de producción de lovastatina de transformantes <i>lovE</i> en FS.....	91

C. ABREVIATURAS

MS	Metabolismo secundario
FS	Fermentación sólida
FL	Fermentación líquida
PKS I	Policétido Sintasa I
PKS II	Policétido Sintasa II
LOV	Lovastatina
ble	Fleomicina
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
ARN	ácido ribonucleico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
BrEt	Bromuro de etidio
EtOh	alcohol etílico
NaAc	acetato de sodio
epp	eppendor
Ta	temperatura ambiente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SE	Sobreexpresión
rpm	revoluciones por minuto
g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
h	hora
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mg LOV/gms	miligramo lovastatina por gramo medio seco
µg LOV/mg MS	microgramo lovastatina por miligramo micelio seco

1. INTRODUCCION.

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.

1.1.1. Generalidades.

El metabolismo secundario comienza cuando el crecimiento se limita por el agotamiento de un nutriente clave: fuente de C, de N o fosfato, o bien cuando el microorganismo es expuesto a otras condiciones de estrés diferente del estrés nutricional mencionado. La biosíntesis de metabolitos secundarios está sujeta a regulaciones complejas. Debido a que las rutas biosintéticas secundarias están relacionadas a las rutas metabólicas primarias y usan los mismos intermediarios, mecanismos tales como: inducción, regulación catabólica por carbono y/o regulación por producto terminado regulan también su biosíntesis (Brakhage, 1998). Estos mecanismos regulatorios específicos de las rutas operan en conjunto con un control global, el cual está relacionado con la tasa de crecimiento (Bok y Keller, 2004) .

Los metabolitos secundarios microbianos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, efectores de competencia ecológica y simbiótica, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, receptores agonistas y antagonistas, pesticidas, agentes antitumorales y factores de crecimiento de plantas y animales. Tienen un efecto eficaz sobre cuestiones de salud, nutrición y sobre la sociedad en general (Demain, 1998).

Los metabolitos secundarios microbianos son productos de bajo peso molecular, moléculas relativamente pequeñas, cada uno producido por una cepa o por un número limitado de cepas microbianas. En contraste con los metabolitos primarios, parecen no tener una función obvia en el proceso de crecimiento: Las cepas productoras que han perdido por mutación la capacidad de síntesis de estos compuestos exhiben una tasa de crecimiento normal y condiciones características en el laboratorio (Demain, 1998).

El metabolismo secundario puede ser una forma química de diferenciación, sin embargo, en contraste con la diferenciación morfológica, el cual es típico de una especie o de un género, la expresión de un metabolismo secundario es específica de algunas cepas pertenecientes a las mismas especies (Demain, 1998).

La mayoría de los metabolitos secundarios aislados hasta el momento (más de 7000 derivados de cultivos de procariontes) son antibióticos, es decir, sustancias producidas

por organismos vivos que inhiben a bajas concentraciones el crecimiento de varias especies diferentes de microorganismos (Demain, 1998).

Las enzimas involucradas en el metabolismo secundario son normalmente codificadas por genes localizados en clústeres en el genoma, aunque es poco frecuente que se encuentren en plásmidos (Barrios y Mejía, 2007).

La ruta de biosíntesis de una vasta cantidad de antibióticos ha sido descifrada como el resultado de intereses académicos y para el resultado práctico de tales investigaciones, como el incremento en la producción de antibióticos y la obtención de moléculas y moléculas modificadas en su actividad biológica de gran interés comercial (Barrios y Mejía, 2007).

La mayoría de los metabolitos secundarios son el producto de unas pocas rutas biosintéticas. En contraste con la amplia variedad de estructuras químicas presentadas por moléculas de antibióticos y otras sustancias provechosas, las secuencias de reacciones biológicas por las cuales se sintetizan se agrupan dentro de un grupo relativamente pequeño de rutas biosintéticas. Los pasos clave en la biosíntesis de metabolitos secundarios son reacciones de polimerización, por las cuales varias unidades similares son unidas para formar la columna vertebral de una gran molécula (Barrios y Mejía, 2007).

De acuerdo a recientes estudios sobre la similitud de los genes involucrados, se reconocen tres tipos principales de reacciones de polimerización (Barrios y Mejía, 2007):

1. Condensación de unidades de acetato-malonato. Las unidades acetato-malonato (algunas veces unidades de metilmalonato-propionato) son condensadas por un mecanismo conocido como síntesis de policétidos, donde las cadenas son formadas con los grupos ceto y los grupos metileno alternados. Cuando el metilmalonato es sustituido por malonato, la cadena llega a ramificarse frecuentemente con grupos metilo.

La estructura básica de muchos metabolitos secundarios microbianos de origen policétido, es construida por un proceso similar al de los ácidos grasos. Existen dos tipos de complejos de policétidos sintasas, Tipo I y Tipo II (PKSI y PKSII).

La PKSI utiliza una variedad de ácidos como moléculas iniciadoras y alquilmalonatos como unidades extendedoras, obteniéndose macromoléculas cíclicas. Las PKSII utilizan

como unidades extendedoras malonato, omitiendo algunos pasos de reducción y produciendo moléculas aromáticas.

2. Varios antibióticos derivan de modificaciones de moléculas de nucleósidos y nucleótidos. Por ejemplo, la adenosina es el metabolito iniciador del cual se sintetiza el agente antiviral virarabina por *Streptomyces antibioticus*. Las polioxinas son una familia de antibióticos, producidas por *Streptomyces cacaioi*, utilizados como agente antifúngico en la agricultura y todos derivados de la uridina.

3. Las coenzimas y sus precursores pueden ser utilizados como moléculas de inicio para moléculas esenciales. Como ejemplo tenemos a los antibióticos actinomicina y antramicina, obtenidos a partir de la cinurenina, un intermediario de la síntesis del ácido nicotínico.

Algunas rutas contienen una mezcla curiosa de enzimas procarióticas y eucarióticas, que quizás son indicativos de una transferencia de genes horizontal (Demain, 1998).

1.2. METABOLISMO SECUNDARIO.

La diferenciación en los microorganismos comprende la diferenciación morfológica (morfogénesis, esporulación, germinación) y diferenciación química (metabolismo secundario). Frecuentemente estos dos aspectos de diferenciación comparten genes involucrados en la regulación (Demain, 1998).

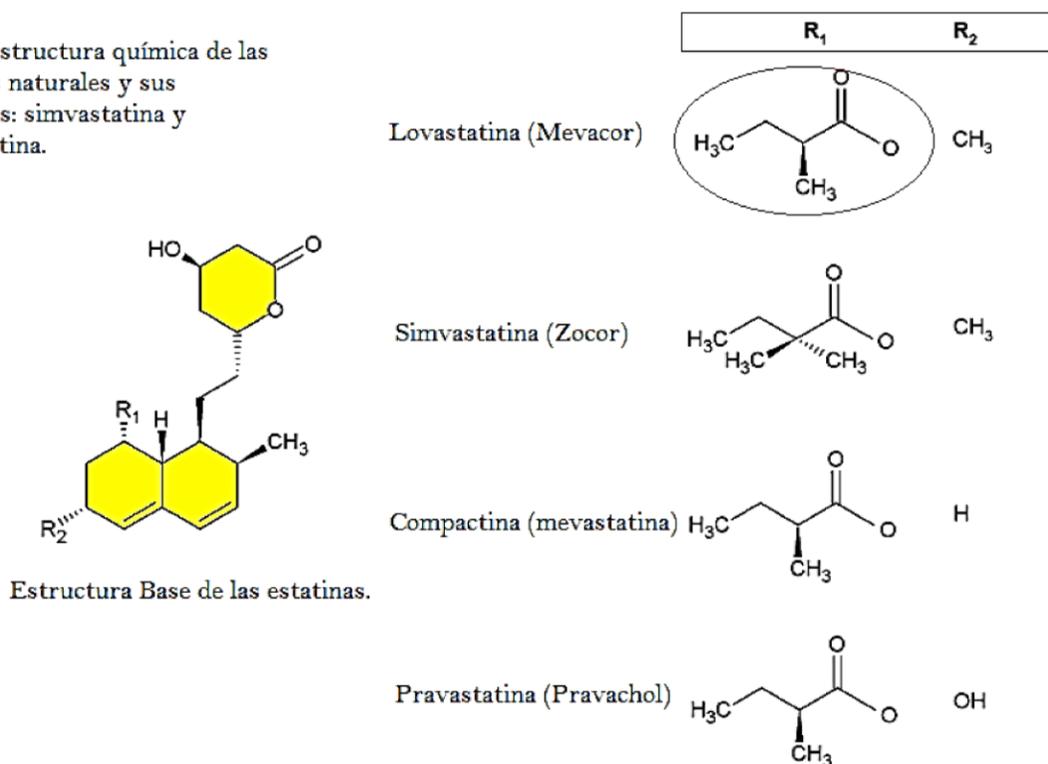
A diferencia del metabolismo primario, las rutas del metabolismo secundario todavía no son entendidas completamente, pero proporcionan una base para desarrollar nuevas y amplias investigaciones sobre enzimología, regulación genética, regulación enzimática y diferenciación (Demain, 1998).

1.3. LOVASTATINA.

Un importante metabolito en la industria es la lovastatina. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte. En 2011, cerca de 17 millones de personas fallecieron a consecuencia de alguna de estas enfermedades, cantidad que representa el 30% de la mortalidad a nivel mundial. 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 *et al.*, 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 dos partes 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, 1976, Barrios-González y Miranda, 2010). En años recientes, se ha reportado que la lovastatina tiene otras actividades biológicas y numerosos usos terapéuticos potenciales.

Fig. 1 Estructura química de las estatinas naturales y sus derivados: simvastatina y pravastatina.



Las estatinas naturales son la lovastatina y la compactina, mientras que la pravastatina es

derivada de esta última por biotransformación. La simvastatina, la segunda estatina líder en el mercado, es un derivado semisintético de la compactina.

La lovastatina fue el primer medicamento hipocolesterolémico aprobado por la FDA, USA (Manzoni y Rollini, 2002); y ha sido reportada como agente terapéutico para tratamientos de varios tipos de tumores, inhibiendo la síntesis de compuestos isoprenoides no esteroides (Jones et al., 1994; Newman et al., 1998).

La lovastatina es un inhibidor de la 3 hidroxil-3 metil-glutaril-coenzima A reductasa, enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de colesterol en el ser humano (Alberts *et al.*, 1988). Por este mecanismo, la lovastatina reduce el colesterol en la sangre y también las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o colesterol de baja densidad (“colesterol malo”), mientras que al mismo tiempo incrementa ligeramente las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (“colesterol bueno”) previniendo la formación de placa en el interior de las arterias. Todavía más, las estatinas surgen ahora como fármacos preventivos de vanguardia contra las enfermedades cardiovasculares debido a que se ha demostrado, con base en ensayos clínicos sobre una gran cantidad de pacientes en riesgo de diversos tipos, que las estatinas reducen el peligro de sufrir enfermedades arteriales coronarias e incluso de muerte. Esto explica la importancia y el éxito de las estatinas en los sectores médico y comercial.

En 2006, dos estatinas encabezaron la lista de la revista Forbes de los 20 mejores y más vendidos fármacos de los Estados Unidos de América con ventas y ganancias anuales que van de los \$ 4.4 a los \$ 8.8 mil millones de dólares, además se prevé que el uso de las estatinas se eleve considerablemente en un futuro no muy lejano. Hay que agregar además que las patentes de las principales estatinas están caducando, lo que significa que la disputa por los productos genéricos de estatinas en los próximos años será férrea y extenuante, y por lo tanto, solamente el proceso de producción más eficiente y calificado prevalecerá.

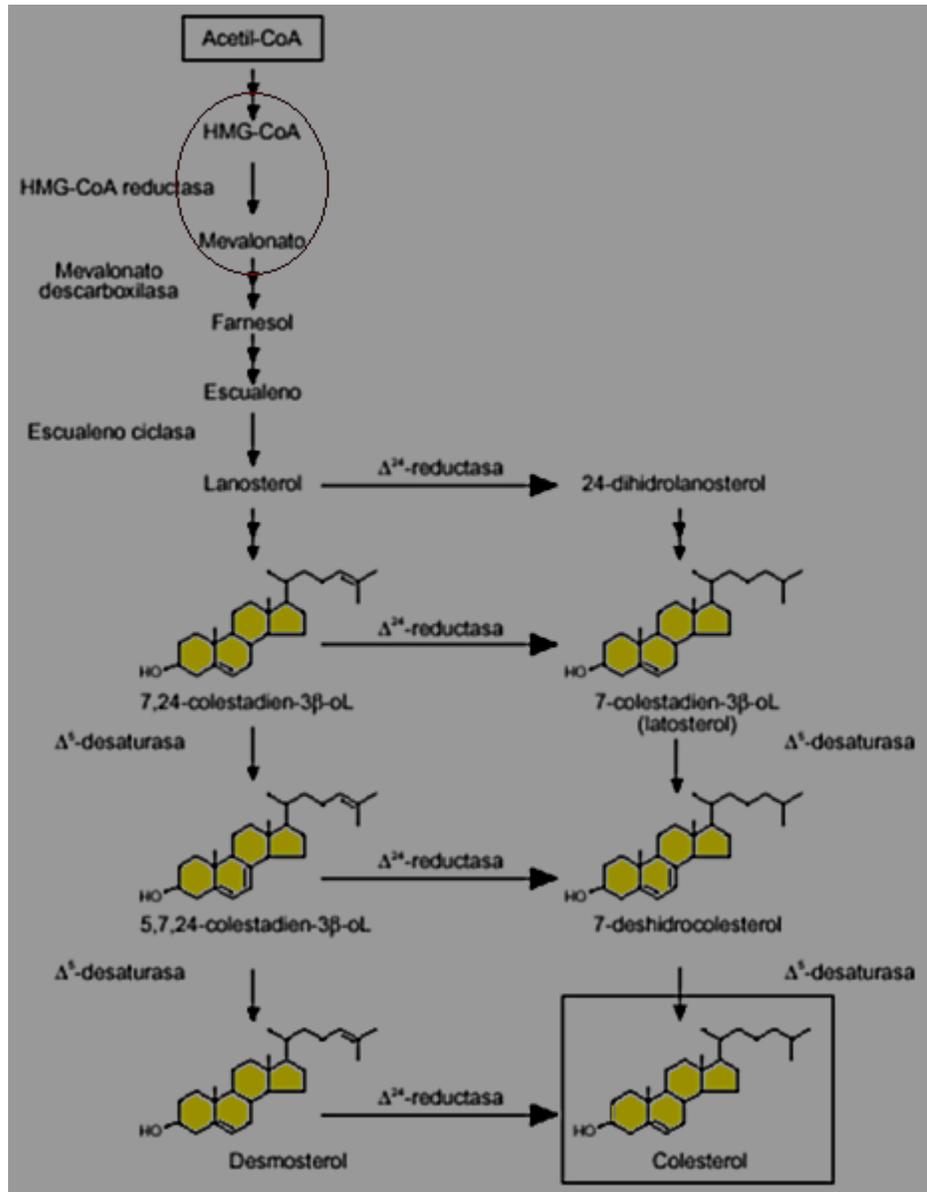
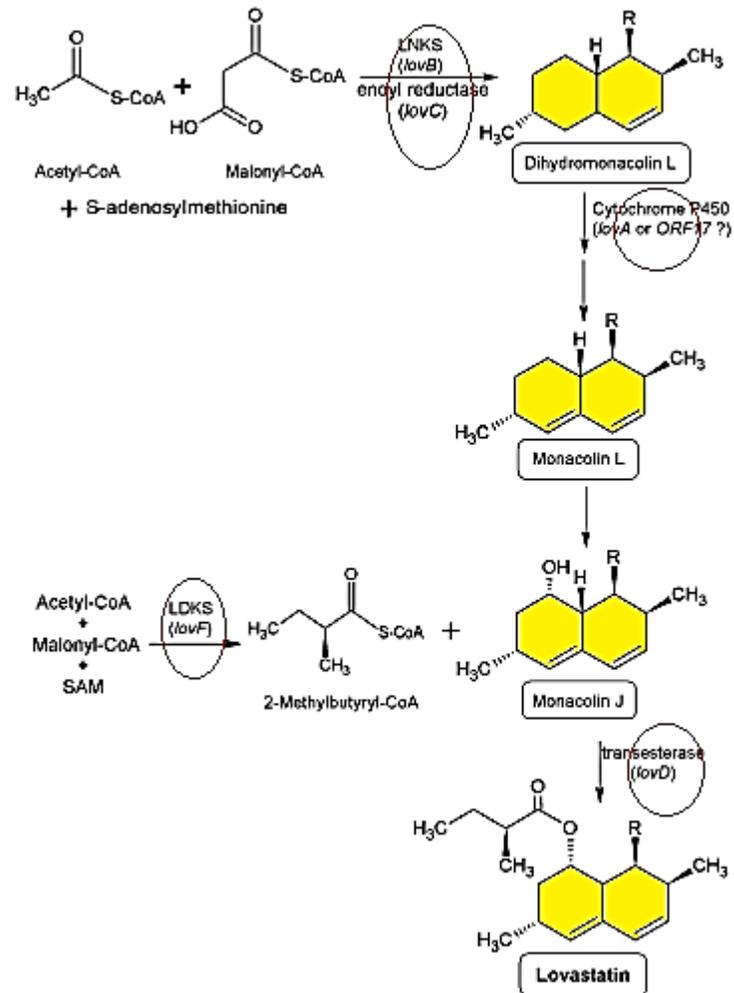


Figura 1.2. Ruta biosintética del colesterol en humanos (Fernández et al., 2003).

Fig.1.3 Ruta de biosíntesis de la lovastatina, se muestran las enzimas involucradas y los genes codificadores.



Los últimos años han sido testigos de importantes avances en los aspectos bioquímicos y genéticos de las estatinas naturales (lovastatina y compactina). Estos y otros estudios han permitido el desarrollo de procesos de producción biotecnológica nuevos e innovadores para estas estatinas y sus derivados (simvastatina y pravastatina). Otros estudios han mostrado que las terapias con estatinas tienen efectos biológicos más allá de los niveles de LDL-Colesterol. Las actividades biológicas de estatinas descubiertas con estos estudios escenifican potenciales aplicaciones en enfermedades como el cáncer, la osteoporosis relacionada con la edad y la demencia senil (enfermedad de Alzheimer) (Barrios-González y Miranda, 2010).

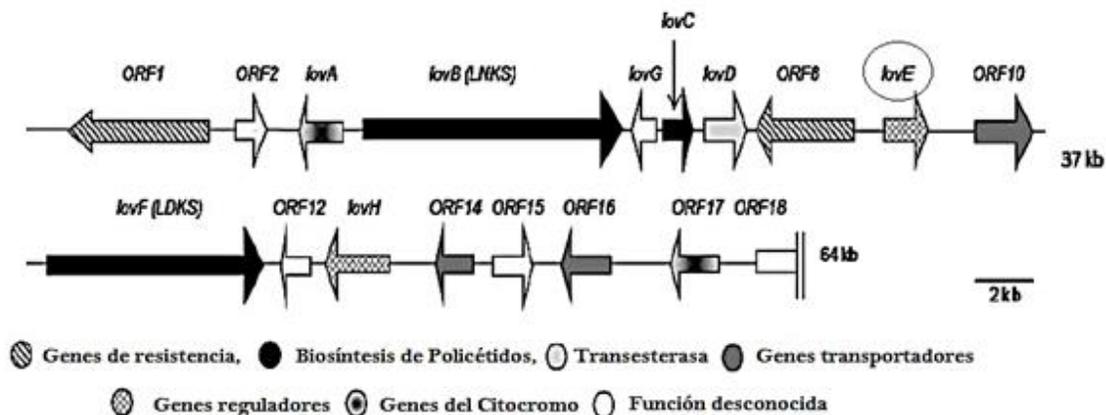


Fig.1.4 Cluster de los genes de biosíntesis de la lovastatina (Modificado de: Kennedy et al 1999; Hutchinson et al. 2000)

1.4. PRODUCCION DE LA LOVASTATINA.

La lovastatina (mevilonin o monacolin K) es producida principalmente por cepas de *Monascus ruber* y *Aspergillus terreus* (laboratorios CIBE Madrid España), y la compactina por *Penicillium citrinum* (Alberts *et al.*, 1980; Bennett *et al.*, 1998). También es producida por diferentes cepas de varias especies del género *Monascus*, en particular *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus* y *M. pubigerus* (Negishi *et al.*, 1986). Sin embargo, la producción comercial de lovastatina se basa en la especie *Aspergillus terreus* en fermentación en lote (Novak *et al.*, 1997; Manzoni *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2000; Casas-López *et al.*, 2003 Rodríguez Porcel *et al.*, 2007; Bizukojc y Ledakowicz, 2007). La fermentación en *Aspergillus terreus* por lo regular se lleva a cabo a una temperatura de 28°C y en un rango de pH de 5.8-6.3, y el nivel de oxígeno disuelto es de más del 40% de aire de saturación (Kumar, Jana *et al.*, 2000). El tiempo de fermentación es de 10 días. Casas-López *et al.* (2003) estudiaron el desarrollo y crecimiento de *Aspergillus terreus*, así como la producción de lovastatina. Sus resultados evidenciaron la influencia de la fuente de carbono (lactosa, glicerol y fructosa) y la fuente de nitrógeno (extracto de levadura, licor de maíz macerado y harina de soya) utilizada y la relación C/N en el medio. Los mayores niveles de producción (30 mg de lovastatina/g de biomasa) se obtienen utilizando lactosa con harina de soya o extracto de levadura siendo 40 la relación carbono nitrógeno ideal. Lai *et al.* (2001) y Casas-López *et al.* (2004) han estudiado el impacto de la composición del medio sobre la producción de lovastatina por medio de la metodología de superficie de respuesta. A partir de sus resultados se estudió la producción de

lovastatina en matraces agitados y en biorreactores de laboratorio, utilizando medios complejos y definidos. Novak *et al.* (1997) y Kumar, Jana, *et al.* (2000) propusieron diferentes estrategias de alimentación en lote para el mejoramiento en la formación de lovastatina, mientras Rodríguez-Porcel *et al.* (2007) sugirieron una estrategia que consiste en dos fases de alimentación.

Adicionalmente, nuevos avances en la bioquímica y genética de la biosíntesis de la lovastatina han permitido el desarrollo de nuevos métodos de producción de simvastatina. Este derivado de la lovastatina puede ser sintetizado de forma eficiente a partir de monacolina J (lovastatina sin un lado de una cadena) por un proceso que utiliza la enzima aciltransferasa LovD, una enzima de la ruta de biosíntesis de lovastatina en *Aspergillus terreus*. Empleando otro método, *Aspergillus terreus* fue rediseñado utilizando la biosíntesis combinacional sobre el gen lovF, resultando un híbrido policétido sintasa capaz de sintetizar in vivo 2,2-dimetilbutirato (el lado de la cadena de la simvastatina). Las cepas transformantes resultantes pueden producir simvastatina (en vez de lovastatina) por fermentación directa, sin necesidad de otro proceso sintético de elaboración (Barrios-Gonzalez J. y Miranda R. 2010).

1.5. Fermentación en cultivo sólido.

La Fermentación Sólida mantiene un importante potencial para la producción de metabolitos secundarios.

Aunque la producción industrial de la lovastatina y otros metabolitos secundarios se lleva a cabo por lo regular en fermentación sumergida, la fermentación sólida se está convirtiendo rápidamente en un sistema de producción industrial alternativo. Varios estudios comparativos enmarcan las ventajas que posee la FS sobre la FL, incluidos niveles de producción prominentes, tiempos más breves de obtención del producto y mejoramiento del proceso. Además, algunos metabolitos son únicamente producidos por FS, aun cuando el hongo productor correspondiente puede ser cultivado fácilmente sobre medio líquido (Hölke y Lenz, 2005; Bigelis *et al.*, 2006). ¿Cuál es la razón por la que se da esta fisiología en medio sólido, que es muy diferente a la que se da en medio líquido? No está lo suficientemente claro, pero por lo regular se le conoce como “Fisiología del Medio sólido”. Hace algunos años, la empresa Biocon Ltd. India, comenzó lo que llegaría a ser una industria muy exitosa de producción de lovastatina (y de otros metabolitos

secundarios) a gran escala utilizando la Fermentación en Medio Sólido (FS). La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos en el 2003 aprobó la utilización de la FS para la generación de fármacos de uso clínico de origen fúngico (Suryanarayan, 2003). Dos sistemas de fermentación sólida destacan y divergen de la naturaleza de la fase sólida utilizada: (a) FS en sustratos sólidos naturales y (b) FS en un soporte inerte impregnado con medio líquido. La empresa Biocon produce lovastatina utilizando el método convencional de FS empleando *Aspergillus terreus* en salvado de trigo. Por lo visto, la tecnología se basa en un biorreactor a gran escala de FS Plafractor (Durand, 2003).

El segundo sistema involucra el cultivo de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con medio líquido. Este método tiene potenciales aplicaciones sobre estudios científicos y también como un sistema de producción comercial (Ooijkaas *et al.*, 2000). Recientemente, nuestro equipo de trabajo diseñó un método de producción de lovastatina por FS en un soporte inerte artificial: Espuma de Poliuretano (PUF, por sus siglas en inglés). Utilizando una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* TBU F-514 en este sistema, la fisiología del medio sólido fue claramente manifiesta, obteniéndose un nivel de producción 30 veces superior a la obtenida en FL en las mismas condiciones de fermentación (20 mg/gms (gramos de materia seca) vs 0.62 mg/mL). Otro indicativo es la producción específica donde la diferencia fue 14 veces más la producción en FS que en FL, 815 µg lovastatina/mg de micelio en FS vs 54.7µg lovastatina/mg de micelio en FL (Baños *et al.*, 2007).

1.6. Regulación genética.

Las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios se relacionan con las rutas metabólicas primarias y usan los mismos intermediarios, mecanismos de regulación como la inducción, la represión por catabolito y la regulación por retroalimentación, aparentemente operado en conjunción con un completo control ligado a la tasa de crecimiento (Sánchez y Demain, 2008).

Dentro de los eventos responsables de la diferencia pronunciada del nivel de producción de lovastatina en la fermentación sólida y líquida, se realizó un análisis de expresión de dos de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis (*lovE* y *lovF*), los resultados exponen que la mayor producción de lovastatina corresponde y correlaciona con la mayor

cantidad de transcritos acumulados para ambos genes (casi 4.5 veces más en FS que en FL para *lovE* y 2 veces más para *lovF*), con una expresión, además, durante un mayor periodo de tiempo (Barrios Gonzalez y Mejía, 2007). Esta puede ser una causa fundamental muy importante del por qué se obtiene una mayor producción de metabolitos secundarios en FS.

Nuestro grupo también llevó a cabo estudios básicos sobre los estímulos ambientales, percibidos por el micelio en FS, los cuales inducen los cambios fisiológicos que conducen a una mayor producción de lovastatina.

Esto nos ha permitido concebir la idea de desarrollar métodos de mejoramiento genético para generar cepas sobreproductoras, particularmente adecuadas a FS. Aplicando estos métodos, se obtuvieron mutantes de una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* TBU-514, que produjo 27.9 mg de lovastatina/g de micelio seco es un sistema de FS con PUF.

1.7. Mejoramiento genético.

Uno de los aspectos positivos de la FS es que las enzimas y los metabolitos son producidos en mucha mayor cantidad que en FL. En relación con la producción de metabolitos secundarios, las respuestas fisiológicas de muchos microorganismos difieren conduciendo a discrepancias en los niveles de producción en ambos sistemas de producción. Aunque con cepas silvestres se obtienen buenas producciones en medio sólido, el mejoramiento genético de estas cepas es muy importante, e inevitable debido a la competitividad en el desarrollo de procesos competitivos para FS. En este sentido, lo que no es claro son la metodología y la estrategia a utilizar para alcanzar este objetivo.

1.7.1. Métodos de la Genética clásica.

El desarrollo de cepas por esta estrategia se basa en la mutagénesis, seguido por un proceso de selección y rastreo aleatorio. La ventaja que tiene este método es la sencillez con la que se lleva a cabo la mutación y selección, por lo que se requiere poco conocimiento de bioquímica, fisiología y genética de la ruta biosintética del producto, debido a que no se requiere entendimiento sobre manipulación de equipo técnico especializado. La desventaja de esta estrategia es que se requiere de intensa labor. En los últimos años, las industrias de fermentación han ido reemplazando estos métodos de rastreo aleatorio por otras técnicas de genética clásica menos empíricas de selección

directa o selección racional.

1.7.1.1. Mejoramiento de una cepa silvestre.

Una estrategia que ha brindado excelentes resultados para FS, es la búsqueda y rastreo de las mejores cepas silvestres y someterlas a un programa de mutación y selección (Baños *et al.*, 2010).

1.7.1.2. Cepas sobreproductoras para FL.

Una estrategia para generar cepas sobreproductoras para procesos de FS es utilizar cepas sobreproductoras para FL disponibles y aislar mutantes que puedan ser evaluadas en FS. Estas mutantes pueden combinar su capacidad de alta producción con un mejor y eficiente rendimiento en FS (Barrios y Mejía, 2007).

1.7.2. Métodos de selección racional.

El rastreo racional permite mejoramientos significativos en la eficiencia de la fase de selección. En este proceso, se realiza una selección para una característica en particular para un determinado genotipo, diferente de aquel de interés pero más fácil de detectar. De esta manera se realiza un rastreo racional efectivo de forma que se eliminan los genotipos indeseables, permitiendo obtener una gran cantidad de aislados para ser evaluados más fácilmente. El diseño de estos métodos requiere algunos conocimientos básicos de los productos del metabolismo y rutas de regulación. Este conocimiento puede ser utilizado para proponer condiciones ambientales, o la adición de algún químico que puede ser un cromogénico, un agente selectivo, un colorante o un organismo indicador. La carencia de saber las particularidades del metabolismo secundario del hongo y la fisiología de la fermentación en medio sólido ha obstaculizado el desarrollo de este tipo de métodos para elegir a las cepas adecuadas para medio sólido. Se han realizado algunas investigaciones básicas sobre la expresión de los genes relacionados con el metabolismo secundario en FS, así como de los factores ambientales y rutas de señalización eventualmente involucradas. Tomando en cuenta esta información, se han diseñado y valorado diferentes métodos de selección racional para aislar mutantes sobreproductoras de lovastatina, particularmente acomodadas para FS. Dos de los factores ambientales estudiados fueron el estrés osmótico y el estrés oxidativo, y diferentes métodos de selección racional fueron planteados y probados. La producción de lovastatina de las

cepas mutantes resistentes obtenidas fue evaluada en FL y FS.

Un alto porcentaje de ambos tipos de mutantes resistentes mostraron incrementos en la producción de lovastatina. Sin embargo, por motivos aun no esclarecidos, las mutantes resistentes al estrés osmótico mostraron mayores incrementos en la producción en FL (Baños *et al.*, 2007). Por otra parte, los métodos de selección racional basados en la resistencia al estrés oxidativo dieron excelentes resultados. Un porcentaje notable de mutantes mostraron producciones altas, la mayor de 27.9 mg de lovastatina/g de materia seca, lo que se traduce en un 80.9% de incremento en FS, mientras que la producción de estas mismas mutantes en FL bajó mucho, hasta -55.4% con respecto a la parental. Actualmente, en nuestro grupo se está llevando a cabo la caracterización de dichas mutantes, junto con estudios sobre la señalización que ocasiona el medio sólido y como son traducidos para inducir la expresión de los genes regulatorios, los factores de transcripción que intervienen y finalmente el clúster de genes de biosíntesis de la lovastatina. La información de estos estudios básicos está siendo utilizada para diseñar métodos de mejoramiento genético molecular para FS.

1.7.3. Mejoramiento genético molecular de cepas silvestres.

Disponemos de herramientas bioquímicas y genéticas moleculares, incluyendo la identificación de la ruta de biosíntesis, vectores adecuados y protocolos de transformación efectivos para cada especie en particular, para llevar a cabo estrategias de mejoramiento genético molecular. En ciertos casos, estas estrategias dependen de la información disponible de los procesos fisiológicos a nivel genético y molecular. Esta es un área complicada, actualmente se están evaluando diferentes estrategias para el mejoramiento genético de cepas industriales para antibióticos y otros metabolitos secundarios, entre las que se incluyen:

1. Amplificación de los genes de las rutas de producción, ya sea el clúster completo o los genes relacionados con el paso limitante de la ruta de biosíntesis.
2. Genes regulatorios; una tarea mucho más complicada que identificar los genes de la ruta de biosíntesis y su clonación es conocer su regulación a nivel molecular. La finalidad de esta estrategia sería inactivar o interrumpir negativamente el actuar de los genes regulatorios y/o amplificarlos positivamente, si así se requiere.

3. Mejorar otras características que beneficien indirectamente el proceso de producción de metabolitos secundarios enfocándose en los genes y funciones que faciliten el crecimiento y la producción en condiciones de FS.

Estos métodos y estrategias están todavía en el proceso de ser aprovechados como métodos generales para mejorar la producción de productos para FL, por lo que las investigaciones han sido muy limitadas para FS.

El incremento en la dosis génica en el clúster de biosíntesis por lo regular resulta en la mejora en la producción de metabolitos secundarios, tanto en FS como en FL.

1.7.3.1. Amplificación de genes de producción de metabolitos secundarios.

La clonación del clúster completo de penicilina en un cosmido (IztapaCos) para ser transformado en *Penicillium chrysogenum* para FL fue evaluada tanto en FS como en FL, obteniéndose producciones del 158.4% y del 93%, respectivamente (Campos *et al.*, 2008).

El incremento de la dosis génica del clúster de genes resultó en una mejora en la producción de penicilina en medio líquido y en medio sólido. En consideración a esto, se prevé que pueda ser la forma más efectiva a seguir para casos específicos del medio sólido.

1.7.3.2. Mejora de otras características que indirectamente benefician el proceso de producción de metabolitos secundarios.

El pH es un parámetro clave en la producción de cefalosporina en bagazo de caña para FS, la cual obstaculiza la producción fuera del rango de 6.4 y 7.8. De manera que los parámetros fueron establecidos ayudando a mantener adecuados valores de pH para la producción de cefalosporina en FS (Cuadra *et al.*, 2008). En cualquier caso, el control de pH en una tarea más complicada para FS que para FL, de ahí que la modificación genética de *Acremonium chrysogenum* manipulando el circuito regulatorio relacionado con el control de pH de los genes de biosíntesis de cefalosporina (factor de transcripción de dominio amplio *pacC*), para construir una transformante insensible al pH, sea una opción interesante. Aunque no hay más ejemplos de este tipo de mejoramiento genético para la producción de MS en FS, un grupo holandés que trabajó con el hongo *Aspergillus oryzae* reportó aplicaciones interesantes de esta estrategia en la producción de enzimas

en FS. Como el hongo penetra el sustrato por medio de sus hifas, secretando enzimas hidrolíticas para degradarlo (lo cual sucede en la punta de las hifas), un mayor número de puntas de hifa aparecen, aumentando probablemente la secreción de enzimas. Te Biesebeke *et al.* (2005) construyeron dos cepas mutantes con incremento en la ramificación en las hifas. Los resultados indicaron que las dos cepas modificadas (interrumpidas) produjeron mayor cantidad de amilasa, glucoamilasa y proteasa, aunque no mejoraron la producción en FL, pero lo que no quedó claro es si ésta era una forma de mejoramiento genético para FS. Por otro lado, la transformación de cepas de hongos y actinomicetos con un gen de hemoglobina bacteriana (procedente de *Vitreoscilla*) es una estrategia que ha sido utilizada para mejorar la captación de oxígeno y también la producción de antibióticos en FL, la cual presenta problemas de transferencia de oxígeno. Con la hipótesis de que el crecimiento en FS podría ser limitada por el oxígeno, se aislaron fragmentos de ADN para dominios de hemoglobina (HBD) de *A. oryzae* y la actividad HBD fue expresada en *A. niger*. Las transformantes mostraron un ligero mayor crecimiento en FS así como mayor actividad amilasa, glucoamilasa y proteasa. También hay que tomar en cuenta que un rápido crecimiento generalmente tiene un impacto negativo en la producción de MS (te Biesebeke R., 2005).

La FS se está convirtiendo en una alternativa tecnológica para la producción industrial de MS. Como en FL, la cepa es un factor crucial para obtener un proceso competitivo. Los procesos que involucran la FS requieren cepas especiales adecuadas al cultivo sólido, y aunque las cepas silvestres tienden a producir muy bien en cultivo sólido, el mejoramiento genético es inevitable. La pregunta es, ¿qué métodos deben de ser utilizados? Con los métodos de mejoramiento genético clásico se han obtenido muy buenos resultados comenzando con la mejor cepa silvestre aislada, mutagénesis y selección al azar. También por selección de mutantes de una cepa sobreproductora desarrollada para FL se han conseguido buenos resultados. El desarrollo de métodos de selección racional y métodos de genética molecular ha sido obstaculizado por la carencia de conocimientos básicos sobre la fisiología de los hongos en medio sólido, y particularmente del MS.

Con el modelo de producción de lovastatina en FS (sobre un soporte inerte), se ha demostrado que una mayor producción de metabolitos, comparada con la obtenida en FL, fue relacionada con una mayor expresión del factor de transcripción (*lovE*) y de los genes de biosíntesis en FS. Algunos resultados indican que la capacidad de contender con el

estrés osmótico y con estrés oxidativo es importante para la producción de lovastatina en FS. Estos tipos de estrés han sido la base para la selección de métodos racionales efectivos para mutantes sobreproductoras para FS.

En relación con el mejoramiento genético molecular, los resultados muestran que incrementando la dosis del cluster completo de biosíntesis de penicilina, es una estrategia eficiente de mejoramiento genético molecular para FS así como para FL.

Un conocimiento más profundo de esta área permitiría una mejor selección de los métodos para el mejoramiento genético con genes regulatorios. Estos podrían darse directamente sobre los genes reguladores y/o sobre los genes biosintéticos en la ruta de señalización que podría tener un mayor efecto general, induciendo una mejor fisiología del medio sólido.

Las cepas silvestres producen lovastatina con buenos rendimientos en FS, una vez optimizadas las condiciones que parecen mejorar la fisiología del medio sólido como el estrés osmótico, la disponibilidad del agua, el pretratamiento, el contenido de humedad inicial, la concentración del medio y la aireación. Estudios de respiración de los metabolitos secundarios en FS llevados a cabo en nuestro laboratorio, muestran aspectos más sutiles de esta eficiente producción en FS, indicando que hay ciertas particularidades del metabolismo secundario que requiere de un mejor entendimiento y que sería un punto de partida que promete generar conocimiento y sentar las bases para desarrollar procesos eficientes, así como desarrollar una metodología para la generación de cepas adecuadas particularmente para FS.

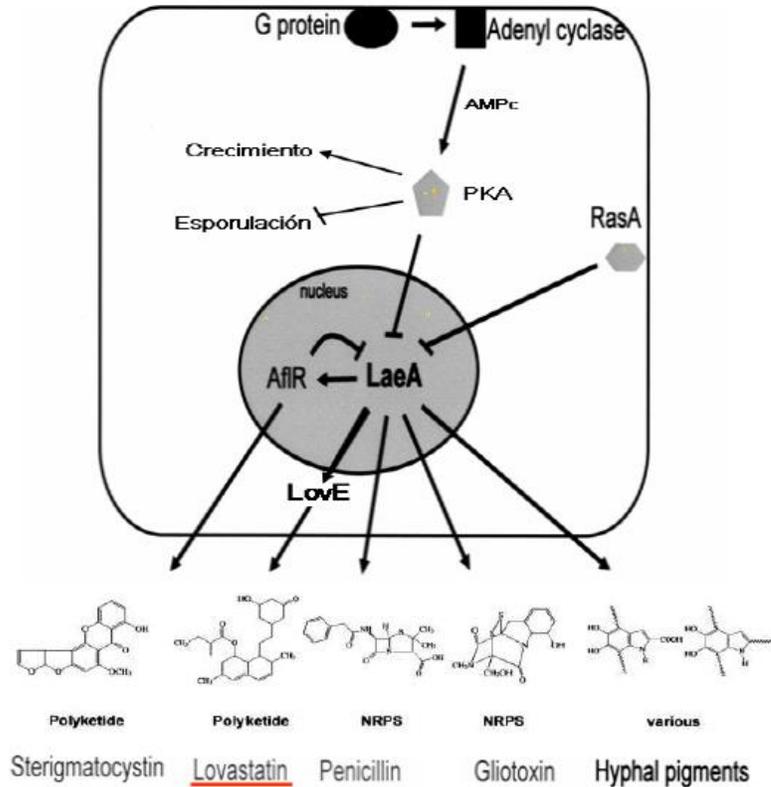


Fig. 1-5. Modelo propuesto de regulación de metabolitos secundarios: reproducido de Woo & Keller (2004).

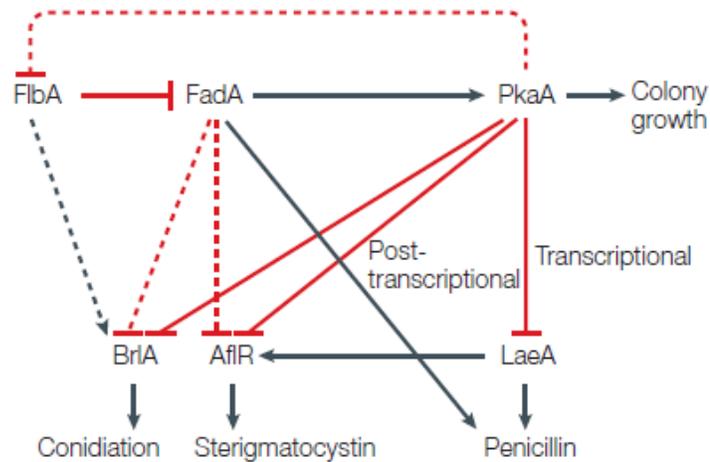


Fig. 1-6 Integración del control de las señales de transducción en la producción de esporas (conidiación) y del metabolismo secundario en *Aspergillus nidulans*. Las líneas sólidas indican las rutas conocidas y las punteadas las rutas hipotéticas. La subunidad heterótrimerica de la proteína G, FadA. Una proteína reguladora que tiene un dominio RGS (regulador de la proteína de señalización G); PkaA, subunidad catalítica de la proteína quinasa A; Bria, un factor de transcripción específico de conidiación; AfIR (regulador aflatoxina), un factor de transcripción específico de esterigmatocistina /aflatoxina.

2. ANTECEDENTES

En vista de la cada vez mayor demanda que se tiene en el uso de la lovastatina y de su espectacular escenario a futuro, se requiere producirla en mayor cantidad y con mayor competitividad para reducir los costos, por lo que nuestro grupo de investigación de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), dirigido por el Dr. Javier Barrios González, desarrolló un eficiente sistema de producción de lovastatina que logra obtener hasta 30 veces más que por el método usual (de 0.62 mg/mL a 19.95 mg/gms), con una producción específica de 59 µg/mg micelio en fermentación líquida (FL) frente a 816 µg/mg micelio en fermentación sólida (FS), señalando que la fisiología que muestra el micelio es diferente en FS que en FL (Baños *et al.*, 2010).

Es necesario realizar mejoramiento genético de la cepa para perfeccionar el sistema. Recientemente se están comenzando a aplicar técnicas de ingeniería genética, ya sea amplificando los genes de la ruta biosintética del metabolito secundario o, en una forma más refinada, amplificándose los genes reguladores positivos o bloqueándose los genes reguladores negativos.

Se están evaluando diferentes estrategias para el mejoramiento genético molecular de cepas adecuadas para FS. En relación a la estrategia de incrementar la dosis de genes biosintéticos, en trabajos de investigación en *A. nidulans* se descubrió el gen *laeA*, que es un regulador global de metabolitos secundarios (Woo y Keller, 2004).

En nuestro grupo se demostró que la amplificación de este gen regulador global positivo en *Aspergillus terreus* conduce a una producción elevada de lovastatina de 16.8 mg/gms en FS, con un incremento de 138.64%. y de 1.39 mg/mL en FL, con un incremento del 111% respecto a la cepa parental (Pérez-Aguirre *et al.*, 2009).

También en nuestro grupo, se han llevado a cabo estudios moleculares para establecer las causas de la superior producción de lovastatina en un proceso de fermentación en estado sólido (FS) en relación con una fermentación líquida sumergida (FL), (20 mg/g vs 0.65 mg/mL). En FS, el transcrito del gen biosintético *lovE* se acumula en altos niveles del día 1 al 7. En este periodo, el nivel de transcrito de *lovE* fue 4.6 veces mayor que el más alto nivel detectado en FL (día 5). Estos resultados muestran que la más alta producción de lovastatina en FS está relacionada con una más intensa transcripción de este gen biosintético. Sin embargo, cuando en un medio líquido de concentración idéntica al usado en FS fue utilizado en FL, la producción de lovastatina descendió en un 50%, mientras

que la acumulación de transcrito de *lovE* fue de entre 6 y 20 veces menor que en FS, mostrando que la fisiología es diferente en FL y FS, y que el estrés osmótico por sí solo no es responsable de la alta expresión genética en FS (Baños *et al.*, 2010).

El gen *lovE* codifica un factor transcripcional que regula la expresión de genes cuyos productos participan en esta ruta. Esos resultados muestran, por vez primera, que la más alta producción de lovastatina en FS es, al menos parcialmente, debida a la altísima transcripción de sus genes biosintéticos y, todavía más importante, que sus niveles de muy alta transcripción son el resultado de niveles altos de LovE. Más aún, es muy probable que esta sea una importante causa subyacente de la alta producción reportada por otros metabolitos secundarios en FS. Bajo condiciones similares de actividad de agua en los dos sistemas, la expresión del gen *dgldb* indicó que *A. terreus* sintió un estrés osmótico similar en sólido y en fermentación sumergida (Barrios-González y Mejía, 2007). Sin embargo, la producción de lovastatina y la expresión de los genes de biosíntesis fueron completamente diferentes. La producción de lovastatina en SmF fue aún menor que en el medio convencional 1x. (0.353 mg/mL en vez de 0.65 mg/mL). Más aún, la expresión de los genes *lovE* y *lovF* fue aún menor que en las condiciones previas. En este caso, los niveles de acumulación de los transcritos de los genes *lovE* y *lovF* fueron 20 y 6 veces mayores, respectivamente en FS. Debido a que mecanismos regulatorios similares pueden estar involucrados en el control de la producción de otros metabolitos secundarios, los genes biosintéticos deberían seguir siendo rastreados. (Baños, 2010). Los resultados del Northern Blot mostraron muy altos niveles de acumulación de *lovE* después del día 1 de SSF. Después, en los días 3 y 5, aunque todavía muy altos, los niveles de transcrito mostraron un decremento de aproximadamente 40%. Este patrón de acumulación de *lovE* concuerda con la tendencia de acumulación de lovastatina observado en SSF, y eso es consistente con el rol regulatorio del factor de transcripción codificado en este gen.

Por medio de la utilización de mutantes a los cuales se les interrumpieron los genes *lovE* y *lovH*, perdiendo su funcionalidad (J. Kennedy, C. Park y C.R. Hutchinson, unpubl.) se logró comprobar que son esenciales para la producción de lovastatina en *A. terreus*. Estos genes codifican proteínas con los dominios de dedos de zinc característicos de factores de transcripción de eucariotas tales como GAL4 y HAP1 (Todd y Andrianopoulos, 1997), por lo que se supone que regulan la producción de lovastatina a nivel transcripcional.

Este último comportamiento es típico de los genes de regulación porque sus productos usualmente son sintetizados en cantidades mínimas. Por otro lado, lo que no resulta obvio es como la biosíntesis de lovastatina utiliza dos genes regulatorios cuando la mayoría de los clústeres de metabolitos secundarios solamente contiene un solo gen regulador (Keller y Hohn 1997, Hutchinson *et al.*, 2000).

Por métodos de genética molecular se ha obtenido una cepa que fue modificada añadiendo el gen *laeA*, con un incremento en la producción del 100% (Pérez Aguirre, 2009). En este trabajo se plantea evaluar el efecto de incrementar el número de genes de *lovE*, algo ya evaluado en FL (Hutchinson *et al.*, 2000) pero que no se ha realizado en FS. Tampoco se ha probado qué sucede al aumentar la dosis génica del gen *lovH*, aunque al interrumpirse lo que sucede es que no hay producción.

3. JUSTIFICACION.

En investigaciones anteriores del grupo como ya se había mencionado, se desarrollaron FS sobre soporte inerte y se establecieron principios que gobiernan el metabolismo secundario en FS (Barrios-González y Mejía, 2007). También se demostró que las cepas sobreproductoras de metabolitos secundarios disponibles fueron desarrolladas para FL no desarrollan su potencial en FS (Barrios-González *et al.*, 1988). Para que la FS pueda competir favorablemente con los procesos convencionales de FL se necesita desarrollar metodología para generar cepas especiales para FS.

Estudios sobre los factores ambientales involucrados en la producción de lovastatina en FS han permitido diseñar métodos de mejoramiento genético por métodos clásicos (Baños *et al.*, 2010). Sin embargo, los avances en el conocimiento básico de la regulación de la biosíntesis de los metabolitos secundarios, y de la lovastatina en particular, hacen posible tratar de desarrollar métodos de mejoramiento genético molecular.

Por lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue estudiar el efecto de la sobreexpresión del gen *lovE* sobre la producción de lovastatina y otras características en *A. terreus*, con el fin de obtener un método de mejoramiento genético para FS y/o FL.

4. HIPOTESIS.

El introducir copias extra del gen *lovE* en *Aspergillus terreus* con promotor constitutivo, causará un incremento en la producción de lovastatina. Dicho incremento será diferente en FS, en relación al mostrado en FL. Además, esto no tendrá efecto en la esporulación ni en el crecimiento radial.

Se podrá obtener, por PCR, el gen *lovE* de *A. terreus* TUB F-514 con su propio promotor y con su terminador, usando primers diseñados con base en la secuencia disponible en la base de datos NCBI (*A. terreus* NIH 2624 (ó FGSC A 1156)). De igual manera, se podrá obtener la región codificante del gen *lovH* de *A. terreus* TUB F-514, para futuros estudios.

5. OBJETIVOS:

5.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *lovE* sobre la producción de lovastatina y sobre otros aspectos fisiológicos en *Aspergillus terreus* en FS y FL.

5.1.1. Objetivos específicos.

1. Comprobar el estado de la construcción pUAMJB3 (pAN52.1+ cds *lovE*) para expresar al gen *lovE* a partir de un promotor constitutivo, y transformar *A. terreus*.
2. Aislar transformantes de *A. terreus* que muestren alta producción en cilindro de agar.
3. Evaluar la producción de las mejores transformantes en FS y en FL.
4. Confirmar integración de la construcción en las mejores transformantes.
5. Clonar el gen *lovH* y hacer una construcción para expresarlo a partir de un promotor constitutivo, para utilizarlo en futuros estudios.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Microorganismos utilizados.

6.1.1 Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUB-514.

La cepa fue proporcionada por la Technical University of Budapest (TUB), Hungría (Szakács *et al.*, 1998). Es un hongo filamentoso el cual produce metabolitos secundarios relevantes, principalmente estatinas, su genoma haploide es de aproximadamente 35 Mb, organizado en 8 cromosomas. Su linaje se esquematiza en la tabla 6.1.

DOMINIO	EUKARYA
REINO	FUNGI
SUBREINO	DIKARYA
PHYLUM	ASCOMYCOTA
SUBPHYLUM	PEZIZOMYCOTINA
CLASE	EUROTOMYCETES
SUBCLASE	EUROTOMYCETIDAE
ORDEN	EUROTIALES
FAMILIA	TRICHOCOMACEAE
SUBFAMILIA	MITOSPORIC TRICHOCOMACEAE
GENERO	ASPERGILLUS
ESPECIE	TERREUS
NOMBRE NOMINAL	<i>Aspergillus terreus</i>

Tabla 6.1. Linaje del hongo filamentoso *Aspergillus terreus* (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov, 2007).

6.1.2 Cepa bacteriana: *Escherichia coli* DH5 α .

Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a su alta eficiencia (hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN) (Hanahan, 1983). Entre sus características más útiles está la de poseer una omisión en el gen Z del operon lac, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación.

6.1.3. Cepa fúngica *Neurospora crassa*.

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

6.2 VECTORES PLASMÍDICOS.

6.2.1 pJET

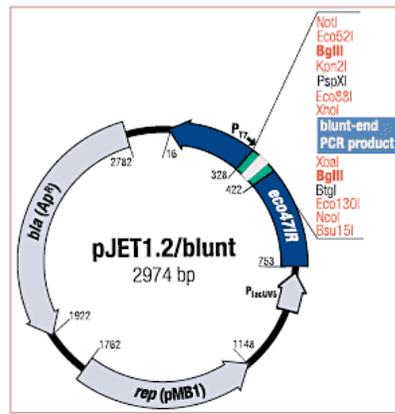


Fig. 6.1. Plásmido utilizado para clonar el inserto *lovH*.

El kit de clonación CloneJETTMPCR es un sistema de selección positiva para la mayor eficiencia de clonación de productos de PCR generados con varias enzimas polimerasas. Cualquier fragmento de ADN, ya sea con extremos romos o con extremos adheribles, puede ser exitosamente clonado. Este vector tiene un gen letal el cual es interrumpido por ligación de un fragmento de ADN dentro del sitio de clonación, obteniéndose como resultado que solamente células con plásmidos recombinantes son capaces de propagarse y eliminando la necesidad de un costoso rastreo.

El vector contiene un sitio de clonación múltiple, así como un promotor T7 para la transcripción *in vitro* (Fig. 6.1.).

6.2.2 pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado):

Plásmido de 4.9 kb. Contiene el gen de resistencia a fleomicina *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (0.4 kb) expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC*

de *Penicillium chrysogenum* (0.8 kb). Contiene, asimismo la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* (0.3 kb).

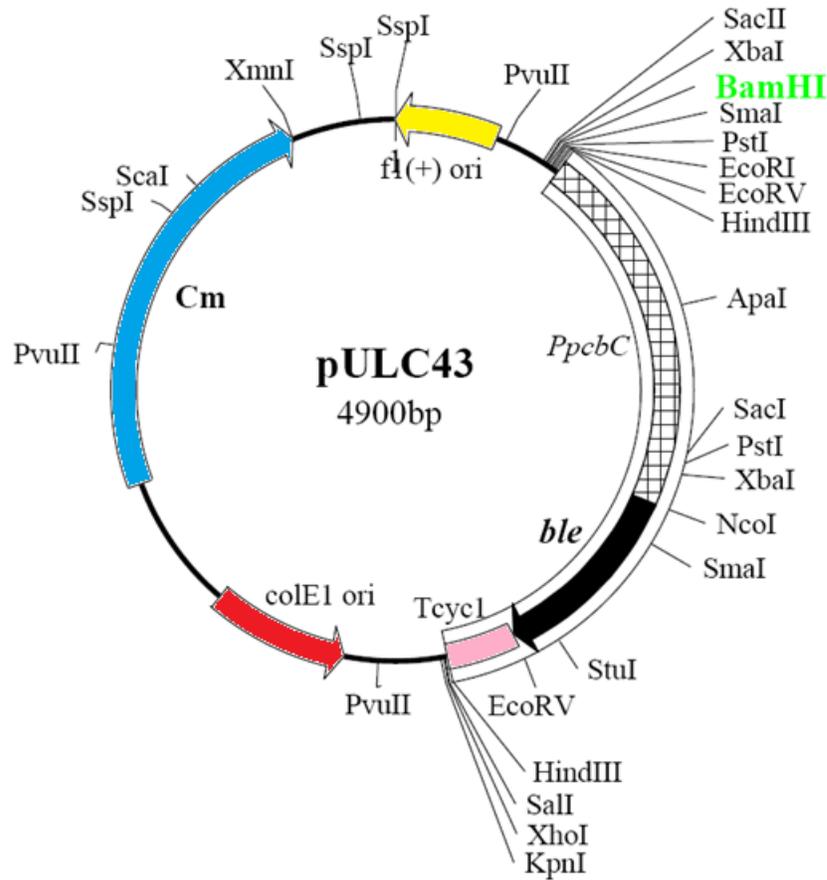


Fig. 6.2. Plásmido pULC43 el cual tiene marcador de hongos para poder aislar transformantes con la construcción en su genoma.

6.2.3 pAN52.1 (Punt *et al.*, 1990).

Plásmido derivado del pUC19, con el promotor del gen *gpd* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) de *Aspergillus nidulans* como inserto. Este promotor ha sido usado por su alto nivel de expresión en hongos.

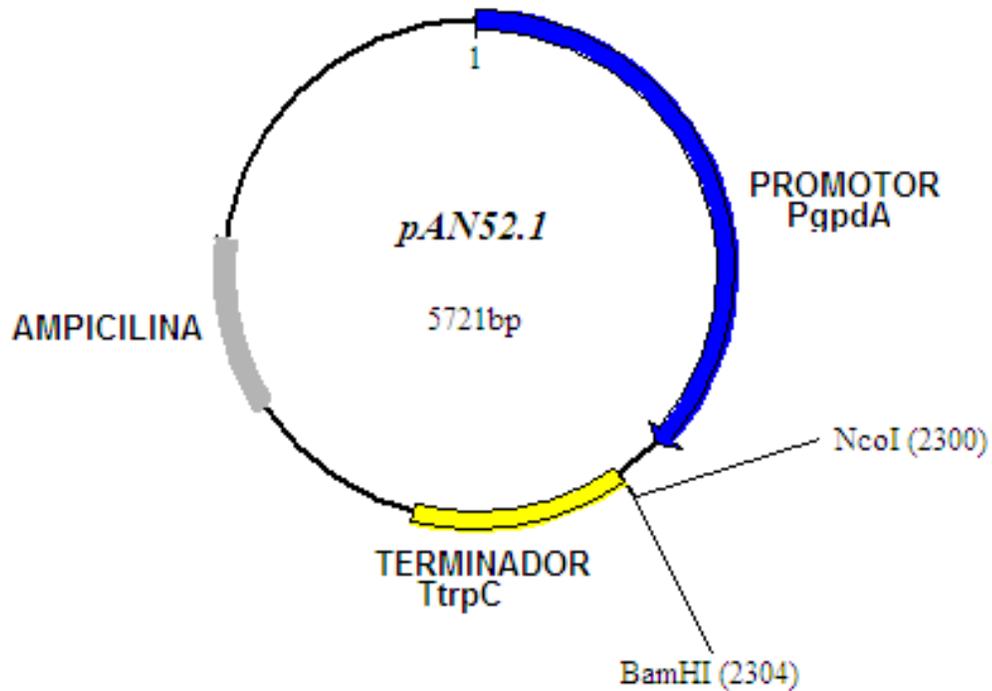


Fig. 6.3. Plásmido pAN52.1, el cual tiene un promotor constitutivo que permite la expresión continua de un gen inserto en su interior.

6.3. REACTIVOS.

6.3.1 Ácidos nucleicos

6.3.2. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores (“*primers*”) en los experimentos de amplificación de ácidos nucleicos utilizados como fragmentos para la clonación en vectores plasmídicos se describen a continuación (Tabla 6.3.1.):

Primers Secuencia (5' → 3')	
<i>lovEf</i>	CTC CAG GAT CCG AGT TCA CGG TGC
<i>lovEr</i>	AGG CGG ATC CGT CTC AAC TAC AGC
<i>lovHf</i>	ACC TAT CAC CAT GGC CCC TCC G
<i>lovHr</i>	GGA CTC CAG GAT CCA CTC TTG G

Tabla 6.3.1. Primers para amplificar los genes *love* y *lovH*.

6.3.3. Marcadores.

El GeneRuler 1kb ADN Ladder fue utilizado como marcador de tamaños en los geles de electroforesis, adquirido a Fermentas.

6.3.4 Enzimas.

Las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nco*I fueron suministrados por Fermentas.

La enzima ARNasa A de páncreas bovino y ADN ligasa del fago T4 fueron adquiridos a Invitrogen Inc.

La enzima *Vent* ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* con una fidelidad de 5 – 15 veces mayor que la *Taq* ADN polimerasa, utilizada en la amplificación de fragmentos fue suministrada por BioLabs Inc.

La enzima lítica Driselase usada en la obtención de protoplastos se adquirió a la compañía Sigma - Aldrich Co.

6.4. EQUIPO.

El equipo utilizado durante el presente trabajo fue: autoclave, balanza analítica, baños con temperatura controlada (Stuart Scientific), cámara de electroforesis, campana de flujo laminar (Veco), centrífuga refrigerada (Eppendorf 5417R), congeladores de -20 y -80°C, cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC) (WatersTM), equipo de filtración al vacío (Waters, Millipore), espectrofotómetro, incubadoras (Lab-Line), microcentrífugas (Eppendorf 5415C), microondas (Sanyo), micropipetas, microscopio óptico (Olympus), parrillas con agitación magnética, potenciómetro, sistema de fotodocumentación GelDoc 2000 (Bio-Rad), sistema de purificación de H₂O MiliQ (Millipore), sonicador (Branson 1210), termociclador (Eppendorf), termomezclador, transiluminador, vortex y columnas Qiagen (Midi Kit).

6.5. Medios de cultivo.

6.5.1 Medio de cultivo para *Escherichia coli* DH5a y para *Neurospora crassa*.

6.5.1.1 Medio Luria-Bertani (LB):

Medio Líquido	g/L
Bactotripton	10.0
NaCl	10.0
Extracto de levadura	5.0

Medio Sólido	g/L
Bactotripton	10.0
NaCl	10.0
Extracto de levadura	5.0
Agar	20.0

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

6.5.2 Medios de cultivo para *Aspergillus terreus*.

6.5.2.1 Medio Czapek: De esporulación y mantenimiento.

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

Los anteriores medios de esporulación y mantenimiento fueron propuestos por Casas-Lopez *et al.*, (2003) con algunas modificaciones (Baños, 2010).

6.5.2.2 Medio PMI: medio de esporulación y mantenimiento.

	g/L
Bacto pectona	5.0
Lactosa	5.0
NaCl	4.0
Sólidos de maceración	1.0
K ₂ HPO ₄	0.06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.003
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001

Medio de esporulación y mantenimiento propuesto por Casas-Lopez y colaboradores (2003).

6.5.2.3 Medio Power: De esporulación y mantenimiento.

Medio de esporulación y mantenimiento propuesto por Casas-Lopez y colaboradores (2003) y medios de producción de micelio modificado para este estudio.

Medio PMI	500 mL
Medio CZAPEK	500 mL
Agar 2%	

6.5.2.4 Solución de sales 20X. (SS20X): Guardar a temperatura ambiente.

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

6.5.2.5 Solución de elementos traza (SET):

	g
Sacarosa	30.0
NaNO ₃	2.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
CoCl ₂ ·5H ₂ O	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.11
Na ₄ EDTA	5.0

Se fueron adicionando los sólidos en orden sobre 80 mL de H₂O destilada, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 100 mL, finalmente se esterilizó.

6.5.2.6 Medio completo para *Aspergillus terreus*: obtención de micelio.

Medio de esporulación y mantenimiento propuesto por Casas-Lopez et al., (2003) y

medio de producción de micelio modificado para este estudio.

SS20X	5 mL
SET	100 μ L
Glucosa	1g
Peptona	1g
Extracto de levadura	0.05g

Se llevó a 100 mL de volumen y se ajustó el pH a 6.5 con KOH al 10%. Por cada matraz Erlenmeyer de 125 mL, se colocaron 35 mL de medio completo, se esterilizó 15 min a 120°C. Se inoculó con una asada de esporas y se incubó a 30°C durante 18 h.

6.5.2.7 Antibióticos suplementados.

Se empleó Ampicilina (Sigma) para la selección de transformantes y el mantenimiento del plásmido con resistencia a éste. El stock se preparó en una concentración de 100 mg/mL. Se esterilizó por filtración, empleando membranas de 0.20 μ m de poro (Millipore). Se guardó en alícuotas de 500 mL a -20°C. Cuando se requirió, el medio LB fue suplementado con ampicilina en una concentración de 100 mg/mL.

Se empleó fleomicina (ble) para selección de transformantes en *A. terreus*. El stock para ble se preparó en una concentración de 20 mg/mL. Se esterilizó por filtración empleando membranas de 0.20 μ m de poro (Millipore). Se realizaron alícuotas de 500 μ L a -20°C. Cuando se requirió, fue suplementado el medio Czapeck con sorbitol y fleomicina en una concentración de 160 μ g/mL.

6.6 CONDICIONES DE CULTIVO:

6.6.1 Crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α .

Para el crecimiento de la bacteria *E. coli* se utilizó el medio LB con la adición del antibiótico ampicilina (por el plásmido que confiriera dicha resistencia).

6.6.2 Crecimiento de *Aspergillus terreus*.

La cepa *Aspergillus terreus* TUB-514 fue propagada en medio Power o PDA durante 4 días a 30°C para su esporulación. Las esporas fueron recolectadas con perlas de vidrio estériles y una solución de Tween 80 al 0.05%. Posteriormente la solución de esporas fue inoculada en medio completo (1×10^8 esporas/mL) para su germinación y obtención de

ADN genómico, así como para la producción de protoplastos y las fermentaciones para la producción de lovastatina.

6.7 Producción de lovastatina en FS Y FL.

Para FL, 50 mL de medio de producción de lovastatina (Szackacs *et al.*, 1998), y modificado (Baños *et al.*, 2010), fueron repartidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos fueron inoculados a una concentración de 2×10^6 esporas/mL e incubados a 30°C a una agitación de 200 r.p.m. durante 7 días.

Para FS, una concentración de 2.5 veces del medio de producción de lovastatina (2.5X) fue inoculado con esporas de *A. terreus* (2×10^6 esporas/mL), y empleado para impregnar el soporte sólido inerte a un contenido de humedad del 85%. Se empleó espuma de poliuretano de alta densidad de 20 kg/m^3 , el cual fue pretratado con una solución de NaOH al 40% y HCl al 10%. Los cubos de 1 cm^3 , fueron impregnados con el medio inoculado, y 6 g de este medio sólido fue colocado en cada matraz Erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron cubiertos con papel aluminio y parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA) como lo describió Baños *et al.* (2010).

Para ambos tipos de fermentación, cada punto de muestreo se realizó por triplicado.

6.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

6.8.1 ADN

6.8.1.1 Extracción de ADN genómico de *Aspergillus terreus*.

El método usado para obtener ADN total de hongos a gran escala fue esencialmente el descrito por Specht *et al.* (1982), posteriormente se fue modificando. Se germinaron esporas frescas de *Aspergillus terreus* sobre medio completo y se incubaron a 30°C durante 20 h. El micelio producido se recogió con palillo estéril, se secó con papel absorbente y se colocó en un mortero frío, se añadió N_2 líquido y se molió. En tubos Eppendorf (epp) fríos se colocaron 0.5 mL de micelio y se le adicionó a cada uno 800 μL de buffer de extracción 1, y se incubó a 68°C por 30 min. Inmediatamente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Al sobrenadante se le agregó 50 μL de acetato de potasio 5 M pH 4.2, se mezcló suavemente por inversión y se colocó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se transfirieron 700 μL del sobrenadante a otro tubo epp y se adicionaron 700 μL de isopropanol, se mezcló

suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se resuspendió el pellet con 400 µL de TE2 y se agregaron 40 µL de acetato de sodio (NaAc) 3 M pH 7.0. La mezcla se calentó a 68°C durante 1 h. Se dio un breve pulso en vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a Ta, después se transfirió el sobrenadante a otro tubo epp para proseguir con la extracción. Se agregó 1 mL de Etanol (EtOH) 95%, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se lavó 2 veces el pellet con 800 µL de EtOH 70%, desprendiendo el pellet con la punta, mezclando por inversión suavemente y centrifugando a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADN en 100 µL de TE con RNasa3 a una concentración de 100 µg/mL. La mezcla se calentó a 68°C por 5 min para resuspender el ADN y se incubó a 37°C durante 1.5 h. Después se le adicionaron 300 µL de TE. Se extrajo el ADN con 1 volumen de CIA (Cloroformo - Alcohol isoamílico), se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se recogió la fase acuosa y se añadió 1/10 volumen de NaAc 3 M pH 5.2 (aprox. 40 µL) y 2.5 volumen de Etanol frío, se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C. El ADN se lavó con 800 µL de EtOH 70%, se secó y resuspendió en 30 µL de H2O de alta pureza. Se conservó a -20°C.

6.8.1.2 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.

6.8.1.2.1 Boiling (Miniprep).

El método seguido para obtener ADN plasmídico (ADNp) a pequeña escala fue una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981). El ADN plasmídico a pequeña escala se obtuvo de los vectores: pULC43 y pAN52.1, pUAMJB3 y pUAMDM1.

¹ Buffer de Extracción: EDTA 50 mM y SDS 0.2%.

² TE: EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

³ RNasa: Se disolvió la RNasa a una concentración de 10 mg/mL en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5. La mezcla se hirvió durante 15 min y se dejó enfriar lentamente a Ta. Posteriormente se repartió en alícuotas y se conservó a -20°C.

Se picaron con palillos estériles las colonias seleccionadas crecidas por el método de electroporación, éstas se inocularon en otra caja Petri con LB/Amp o Cm y los palillos con las colonias se colocaron cada uno en un tubo epp. con 1 mL de LB suplementado con Amp o Cm a una concentración de 100 µg/mL o 30 µg/mL respectivamente. Después de un rato se retiró el palillo del tubo epp. y se incubó a 37°C, 200 rpm aproximadamente 16 h. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se resuspendió el pellet en 350 µL en solución STET y se incorporaron 20 µL de solución de lisozima a una concentración de 10 mg/mL en la tapa del tubo epp, se agitó 2 min. en el mixer hasta la resuspensión y se dejó hervir 45 segundos en baño maría. Inmediatamente se precipitaron los restos celulares centrifugando a 14,000 rpm por 10 min a Ta y se eliminó el pellet con palillo estéril. Se añadió al sobrenadante 45 µL de NaAc 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezcló por inversión, dejando reposar 5 min a Ta y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a Ta. Se lavó el pellet con 400 µL de EtOH 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta.

Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADNp en 30 µL de H₂O de alta pureza. Se conservó a -20°C.

6.8.1.2.2 Midiprep-Kit.

El método seguido para obtener ADN plasmídico (ADNp) a gran escala fue mediante columnas de Qiagen-100. El ADN plasmídico a gran escala se obtuvo de 4 vectores: pULC43 y pAN52.1, pUAMJB3, pUAMDM1.

Se inoculó la colonia seleccionada del miniprep en caja de Petri con LB/Amp/Agar y se incubó a 37°C durante 19 h. Transcurrido el tiempo se inoculó la colonia seleccionada en 100 mL de medio LB con Amp o Cm a una concentración de 100µg/mL o 30 µg/mL respectivamente y se incubó a 37°C, 300 rpm durante 16 h. Durante este tiempo se añadió solución de RNasa al Buffer P1 y se conservó a 4°C, se verificó Buffer P2 por la precipitación de SDS, si fue necesario se disolvió el SDS por calentamiento a 37°C, se pre-enfrió el Buffer P3 a 4°C y soportes para tubos de 50 mL translucidos.

⁴ STET: EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

⁵ Lisozima: Se pesó 0.01 g de lisozima y se disolvió en 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

Transcurrido el tiempo, el medio LB con la colonia crecida se pasó a tubos translucidos de 50 mL estériles. Se cosecharon las células bacterianas centrifugando a 4,000 rpm por 20 min en los soportes previamente enfriados y se eliminó sobrenadante. Se resuspendió el pellet bacteriano de cada tubo en 2 mL de Buffer P1, se pipeteó de arriba abajo y se pasaron las bacterias resuspendidas a un tubo translucido de 10 mL estéril. Se añadió 2 mL de Buffer P2, se mezcló por inversión de 4 a 6 veces y se incubó de 15-25°C por 5 min. Se añadió 2 mL de Buffer P3 enfriado, se mezcló inmediatamente por inversión de 4 a 6 veces y se incubó en hielo 15 min. Se equilibraron los tubos en una balanza y después se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4°C en centrifuga Beckman con rotor F-1010. Se transfirió el sobrenadante que contiene ADNp en otro tubo de 10 mL. Nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C y se transfirió sobrenadante en otro tubo falcón de 15 mL estéril. Se equilibró el QIAGEN-100 aplicando 4 mL de Buffer QBT y se permitió a la columna vaciarse por flujo gravitacional en un matraz de 125 mL con su soporte correspondiente. Después se aplicó el sobrenadante de los tubos al QIAGEN-100 y se permitió que entrara a la resina y vaciarse por flujo gravitacional. Se lavó 2 veces el QIAGEN-100 con 10 mL de Buffer QC. Se pasó la columna a un tubo falcón de 45 mL. Se eluyó el ADNp con 5 mL de Buffer QF y se colectó el eluyente. Se hicieron alícuotas de 800 µL del eluyente en tubos epp. Se precipitó el ADNp adicionando a c/tubo epp. 560 µL (0.7 volumen total) de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4°C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó el pellet (ADNp) con 800 µL de EtOH 70% a Ta, se desprendió el pellet con punta y se mezcló por inversión, después se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADNp de cada tubo epp. en 50 µL de H₂O de alta pureza. Finalmente se juntaron los tubos en uno solo y el contenido de este se conservó a -20°C.

6.8.1.3. Diseño de oligos para obtener el fragmento del gen *lovE* de *A. terreus* con promotor constitutivo.

Para el diseño de los oligos (“*primers*”), se tomó como base el gen *lovE* del genoma de *Aspergillus terreus* ubicado en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se encontró el gen *lovE* y el gen *lovH* en *Aspergillus terreus* publicado en esta base de datos con número de acceso al GenBank: XM_001210764.1. Seleccionado el tamaño de los fragmentos del gen *lovE* y del gen *lovH* en *A. terreus*, se

prosiguió al diseño de oligos, incluyendo secuencia de reconocimiento para enzimas de restricción destinadas con un colchón de 3 nucleótidos en el extremo 5' y pinza o clamp en el extremo 3' (3 ó 4 G/C), obteniendo el diseño de oligos con un tamaño entre 18-25 nucleótidos.

6.8.1.3.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

Esta técnica es, conceptualmente, un método muy simple para la amplificación de ácidos nucleicos (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987). El método se basa en la repetición de 3 pasos: desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación, efectuados de forma sucesiva en condiciones de temperatura determinada y controlada. Se preparó en un tubo epp. de 500 μ L en orden la siguiente mezcla de reacción sobre hielo Tabla 6.4.

Componentes	Inserto <i>lovE</i> con Promotor Constitutivo (2.5 kb)	Inserto <i>lovH</i> Con promotor Constitutivo (2.5 kb)
	(μ L)	(μ L)
H2O estéril	72.5	73.5
Buffer ThermoPol 10X6	10	10
Cebador Forward (10 mM)	5	5
Cebador Reverse (10 mM)	5	5
dNTP's7 (10 mM)	4	4
MgSO4 (100 mM)	2	-
ADN molde	1	2
Vent ADN polimerasa (2 U/ μ L)	0.5	0.5
TOTAL	100	100

Tabla 6.4. Mezcla de reacción para llevar a cabo PCR para amplificación de genes.

Se buscó la temperatura de hibridación mínima en los cebadores F y R, a ésta se le restó 10°C y el resultado se consideró como la temperatura máxima para realizar el gradiente, con un rango de 1-2°C, obteniendo al final 5 temperaturas para obtener la temperatura óptima de hibridación de los cebadores mediante la función de gradiente en el Termociclador. Ya obteniendo las 5 temperaturas consideradas, se repartió la mezcla de reacción en 5 tubos de 500 μ L y se metieron en el Termociclador Eppendorf. Previamente se programó dicho aparato de la siguiente manera:

- Se encendió regulador y Termociclador
- Se tecleó: Options, Gradient, T = Tm intermedia, G = 2-4°C.
- Se eligió columna dependiendo del tubo con su temperatura asignada

- d) Se regresó al Menú principal: *Exit* (2 veces)
- e) Se tecleó: Files, New, Block, Tube.
- f) Se tecleó: Lid: 105°C, Wait, Fix.
- g) Se metió el programa desglosado en la siguiente tabla:

1	T=94°C	► Fix =3´	↵ Sel
2	T=94°C	► Fix=30´´	↵ Sel
3	T=Tminterm	► Fix=50´´	◀ 3 Opt
3	R=3°C/s	► G=2-4°C	↵ Sel
4	T=72°C	Fix=Tiempo	↵ (4 veces) Sel
5	Goto=2	Rep=35	↵ Sel
6	T=72°C	Fix=10´	↵ (2 veces) Sel
7	Hold=22	↵ Exit	↵

Tabla 6.5. Secuencia de pasos del programa del Termociclador para llevar a cabo la técnica de PCR.

- h) Se pidió salvar el programa: *Save = Yes*↵
- i) Se dio el nombre del programa eligiendo cada palabra con la tecla *Sel* > ↵, *Exit*↵
- j) Se colocaron los tubos de acuerdo a la columna que le corresponda en base a su temperatura.
- k) Se tapó y eligió el tipo de tubo en la parte superior del Termociclador. Tubo PCR = 0.2mL
- l) Se tecleó *Start*↵ *Elegir programa* ↵ ↵ ↵
- m) Para saber a qué hora se terminan los ciclos de PCR, se tecleó Opt.

Ya que se eligió la temperatura óptima de hibridación de los cebadores en PCR mediante electroforesis. Se prosiguió a realizar nuevamente PCR con dicha temperatura y en mayor volumen para posteriormente hacer la purificación de dicha amplificación.

⁶ Buffer de Reacción ThermoPol 1X:
KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10
mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.8, MgSO₄ 2
mM y Tritón X-100
0.1%.

⁷ dNTP's (mezcla de nucleótidos):
Mezcla de dATP, dCTP,
dGTP y dTTP, en una concentración de
10 mM cada uno de
ellos.

6.8.1.3.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se siguieron los métodos descritos por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Se utilizó agarosa SeaKem LE (FMC, Ref. 50004) en una concentración de 1% (p/v) para obtener fragmentos de ADN separados de 0.5-10 kb, la agarosa se disolvió por calentamiento con microondas en tampón TAE 1X durante 1 min y se dejó enfriar, se vació en la base con peine y se dejó solidificar. Las muestras de ADN se mezclaron con un quinceavo del volumen final de tampón de carga concentrado y H₂O de alta pureza hasta completar 20 µL. Las muestras se cargaron en el gel ya metido en la cámara de electroforesis bañado en tampón TAE 1X y se dejó correr a 70V durante aproximadamente 45 min. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio¹⁰ (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg/mL (el BrEt se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización tras iluminarse el gel con luz ultravioleta (UV)). Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador GelDoc 2000 Bio-Rad (emite luz con longitud de onda de 302 nm).

El marcador de tamaño usado es el ADN Ladder de 1 kb que contiene fragmentos de ADN individuales purificados.

6.8.1.3.3 Purificación de insertos por Kid.

El kit GeneClean II (Bio101, USA) se basa en que el DNA se une a unas bolitas de sílice cuando la concentración salina es alta, pero se libera de las mismas en presencia de agua o solución amortiguadora de baja fuerza iónica. a).-Añadir 3 volúmenes de la solución de NaI (NaI Stock Solution) a la muestra. Ejemplo: si la muestra tiene 50 µl, añadirle 150 µl de NaI. Nota: Agitar vigorosamente la suspensión GlassMilk (GlassMilk Suspension) mediante un agitador tipo vórtex hasta conseguir dispersarla uniformemente. b).-Añadir 5 µl de la suspensión GlassMilk a la muestra. Comprobar previamente que la suspensión GlassMilk está dispersada.

⁸ TAE 1X: 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g Tris base y H₂O dd hasta completar 1 L.

Tomar 100 mL de esta solución y llevar a 5 L con H₂O dd.

⁹ Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y Xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esterilizó a 15 lb/in² durante 20 min. Se conservó a 4°C.

¹⁰ Bromuro de etidio: Se preparó una solución 10 mg/mL en agua y se conservó a 4°C. Para 1 L de H₂O dd se requieren 50 µL de esta solución.

En caso contrario se cogería poca (sobrenadante) o demasiada (precipitado) resina. Nota: Como regla general, 5 μ l de GlassMilk son suficientes para purificar hasta 5 μ g de DNA. Puede añadirse más GlassMilk para purificar cantidades superiores de DNA. c).- Mezclar bien e Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente o en hielo picado. Se obtienen mejores resultados si se mezcla de vez en cuando y/o si se incuba toda la noche en hielo picado. d).-Centrifugar a máxima velocidad (16.000 g = 14.000 rpm en microfuga 5415C Eppendorf; Hamburg, Alemania) durante 5 segundos. Retirar y guardar el sobrenadante por decantación o con micropipeta. Procurar recoger todo el sobrenadante. Nota: En este momento, el DNA debe estar unido a las bolitas de sílice. El sobrenadante se guarda por si se desea realizar una segunda extracción y como medida de seguridad. En cualquier caso, puede tirarse una vez comprobado que el DNA ha sido recuperado de las bolitas, al final de este protocolo. e).-Añadir 400 μ l de la solución NewWash. Agitar para dispersar la resina y precipitar centrifugando a máxima velocidad durante 5 segundos. f).-Repetir el lavado anterior dos veces más. Al final procurar eliminar todo el sobrenadante. Colocar el Eppendorf boca abajo sobre papel absorbente en estufa a 37°C para favorecer la evaporación de los restos de etanol presentes. Generalmente la muestra se seca en unos 5 a 10 minutos. g).-Una vez comprobado que la resina está seca, añadir 10 μ l de agua o solución amortiguadora TE. Mezclar bien con la pipeta e incubar a 55°C durante 5 minutos. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 segundos y recoger el sobrenadante (que contiene el DNA). Repetir el proceso añadiendo otros 10 μ l de agua al precipitado, mezclar, incubar y centrifugar. Recoger el sobrenadante y mezclarlo con el obtenido previamente. Nota: La segunda elución, aunque no es imprescindible, permite recuperar entre un 10 y un 20% del DNA. h).-Cuantificar el DNA purificado (ver más adelante). i).-Guardar a -20°C.

6.8.1.4 Clonación de los insertos en el vector pAN52.1

6.8.1.4.1 Digestiones de inserto y vector.

Se realizaron las digestiones indicadas en la Tabla 6.6.

Insertos	Vectores	Enzimas de Restricción.
Gen <i>lovE</i> con promotor y terminador	pAN52.1	<i>Bam</i> HI y <i>Nco</i> I
Gen <i>lovH</i> completo	pAN52.1	<i>Nco</i> I

Tabla 6.6. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los plásmidos a los cuales se les va a insertar los genes *lovE* y *lovH*.

Cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condiciones de pH (estas 2 últimas características las proporciona el tampón de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas.

En un tubo epp. de 1.5 mL se mezcló en orden, los siguientes componentes:

- H₂O dd estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.
- Tampón de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere la décima parte del volumen final de la mezcla).
- Microgramos (µg) de ADN disuelto en H₂O de alta pureza.
- 5 unidades de enzima.

Posteriormente se incubó a la temperatura adecuada durante 2 horas. El ADN digerido se purificó añadiendo 1/10 del volumen final de NaAc 3 M pH 5.2 y 2 del volumen de EtOH 100%, se mezcló y se incubó a Ta por 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se lavó con EtOH 70% desprendiendo pellet con punta y se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADN digerido proveniente del PCR (insertos) en 10 µL de H₂O de alta pureza y el ADNp proveniente de los midiprep en 40 µL de H₂O de alta pureza.

6.8.1.4.2 Ligación.

A una cantidad de ADN vector de entre 10 y 40 ng se le añadió ADN inserto en una proporción de 1:8 vector/inserto. Se añadió H₂O de alta pureza para alcanzar un volumen final de reacción de 10 µL y se calentó la mezcla a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes. Se enfrió en hielo y se agregó 1 µL de tampón 10X de reacción para la ADN ligasa y 1 µL de ADN ligasa del bacteriófago T4.

Se incubó la reacción toda la noche a 16°C. Los vectores con inserto generados durante este proceso son posteriormente transformados en la cepa de *E. coli* DH5 α .

6.6.1.4.3 Preparación de células electrocompetentes.

A la hora de introducir ADN en *E. coli* por medio de procesos de transformación se requiere disponibilidad de la bacteria, se debe facilitar el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Este estado es lo que se denomina como “competencia” y las células que lo presentan se denominan “células competentes”.

La preparación de células competentes de *E. coli* se realizó por un método básico. Se bañaron 2 gradillas para tubos epp. de 1.5 mL con H₂O dd, se enfriaron a -70°C y a 4°C el glicerol al 10% estéril. En un frasco de 20 mL se sembró una colonia de *E. coli* DH5 α con 5 mL de medio LB y se incubó a 37°C, 200 rpm de 16-18 h. En un matraz de 125 mL, se añadió 50 mL de medio LB y una alícuota de 50 μ L del medio LB inoculado anteriormente con *E. coli* DH5 α y se incubó a 37°C a 150 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica dentro del rango de 0.4 a 0.6 a 600 nm (turbio pero que aún penetre la luz, aproximadamente 3 h).

Se retiró el cultivo de la incubadora y se colocó en hielo por 15 min agitando suavemente en forma continua para enfriar uniformemente. Se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos epp y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Se mantuvieron las muestras en gradilla previamente enfriada y se tiró sobrenadante. Se agregó al pellet 1 mL de glicerol al 10% frío, se resuspendieron las células suavemente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se tiró sobrenadante.

Se repitió nuevamente el paso anterior. Finalmente se resuspendieron las células en 50 μ L de glicerol al 10% frío y se dejaron las muestras en una gradilla previamente enfriada. Se conservaron a -70°C.

¹² Tampón de reacción 5X para ADN ligasa del bacteriófago T4:
ATP 5 mM, Polietilenglicol-8000 25% (p/v), DTT 5 mM,
MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl 250 mM pH 7.6.

6.8.1.4.4 Electroporación de *E. coli* DH5α

Anteriormente se realizó la ligación respectiva del vector y del inserto. Se hicieron placas con medio LB y su antibiótico respectivo, con concentraciones de Cm de 30 µg/mL y de Amp de 100 µg/mL. Se enfriaron las celdas de electroporación de 0.1 cm a 4°C (dependiendo el número de transformaciones, es el número de cubetas a enfriar). En condiciones estériles, se extrajeron los tubos epp. con células electrocompetentes previamente a -70°C y se dejaron descongelar en hielo. Se agregó 1 µL de ADN (Si es ligación 2 µL) y se dejó la mezcla en hielo previo a un suave agitado. Se encendió el electroporador y se ajustó el voltaje a 1,100 V. Se vació esta mezcla de células y ADN en la celda fría de 0.1 cm, se tapó y se metió al carril del electroporador con una esquina al frente y se llevó la celda hasta el final del carril. Se dieron 2 pulsos en el botón, cuando apareció nuevamente el voltaje se sacó la cubeta. En forma simultánea se midieron 400 µL de medio LB y se agregaron en la celda al sacarla (Si es ligación 200 µL). Se traspasó el medio LB con las células electroporadas en un tubo epp. y se incubó a 37°C, 200 rpm durante 1 h. Se sembraron en las placas: 10, 50, 100 µL (Si es ligación 50 y 150 µL).

NOTA: Se tomaron controles los cuales a continuación se describen:

- 1) Se electroporaron células sin ADN y se sembraron en placas con LB sin antibiótico para saber si las células vivieron a la electroporación y en placas con LB con antibiótico para ver si el antibiótico funcionó y su concentración fue la adecuada.
- 2) Se electroporaron células con vector entero sin digerir ni ligar, para una comparación sobre las demás y se sembraron en medio LB con antibiótico.
- 3) Se electroporaron células con vector digerido y ligado pero sin inserto, para saber si la ADN ligasa trabajó bien y se sembraron en medio LB con antibiótico.
- 4) Se electroporaron células con vector digerido y ligado con inserto, para observar transformantes y se sembraron en medio LB con antibiótico.

Se seleccionaron las colonias aisladas y grandes, se realizó extracción de ADNp a pequeña escala mediante el método de Boiling. Se hizo digestión y electroforesis para seleccionar a la colonia con el tamaño adecuado.

A la colonia seleccionada se le extrajo ADNp a gran escala mediante columnas de Qiagen-100 como se indicó en la sección 5.8.1.2.2.

.

6.8.1.5 Transformación de *Aspergillus terreus* TUB-514

En la transformación en *A. terreus* es necesaria la utilización de un marcador para la selección de transformantes, esta selección puede conseguirse con un marcador que confiera resistencia al efecto de un compuesto tóxico (en nuestro caso el antibiótico fleomicina). La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). La resistencia se produce por inactivación o bloqueo físico de la fleomicina por parte de una proteína codificada por el gen *ble* localizado en el ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptomyces hindustanus*. La fleomicina es un antibiótico de amplio espectro activo sobre la mayor parte de levaduras y hongos y es tóxico para las células vegetales y animales en concentraciones que van desde 0.1 a 50 µg/mL. Actúa a nivel del ADN originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario (Hertzberg *et al.*, 1985).

La construcción pUAMJB3 y pUAMDM1 no contiene el gen *ble*, marcador de selección para hongos, por lo tanto se realizó una cotransformación utilizando el plásmido pULC43 que contiene dicho marcador. La transformación de la cepa *A. terreus* TUB-514, se realizó siguiendo un método modificado a partir del descrito por Yelton *et al.* (1984).

6.8.1.5.1 Crecimiento del micelio.

En matraces de 125 mL con 25 mL de medio Power se inocularon 100 µL de esporas de *A. terreus* y se incubó a 30°C por 4 días. Transcurrido el tiempo, a un matraz esporulado se añadió 10 mL de Tween 80% estéril, se agitó con perlas de vidrio estériles, esta suspensión se pasó al siguiente matraz esporulado, para al final obtener el mismo volumen pero más concentrado de esporas. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y en una caja de Petri con 20 mL de medio completo se inoculó 1×10^8 esporas/mL y se incubó a 30° C, 200 rpm por 17 h. Al observar en microscopio poca ramificación del micelio se recuperó éste en un filtro de nilón Nyltal con poro de 30 µm y se lavó el micelio con 100 mL de NaCl 0.9%, se secó el micelio con papel filtro en campana.

6.8.1.5.2 Obtención de protoplastos.

En un tubo falcon de 15 mL se agregó 10 mL de solución de protoplastos (SP 2X) y 150

mg de enzimas líticas en condiciones estériles (espátula estéril en papel aluminio) para tener una concentración de 15 mg/mL, se agitó bien en vortex y se filtró con membrana de 0.22µm. Se pesó 1 g de micelio, se colocó en matraz de 250 mL y se agregaron los 10 mL de SP 2X/enzimas líticas previamente preparada.

Se incubó a 28°C a 75 rpm y se monitoreo el micelio cada hora en la formación de protoplastos, la reacción paró aproximadamente en 3.5 h, cuando se observaron protoplastos aislados al igual que conglomerados sin membrana celular.

Se filtró nuevamente el micelio en un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro poro y el filtrado se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a Ta. Se concentró el pellet (protoplastos) en 3 mL del mismo sobrenadante y se distribuyeron 1,000 µL de esta solución en tubos epp., nuevamente se centrifugó.

Se tiró sobrenadante y se agregó a cada tubo epp. 500 µL de SP 2X y se centrifugó a 4,000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavó el pellet con 1 mL de KCM14 y se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a 4°C. Se resuspendió el pellet (protoplastos) con 100 µL de KCM (5 veces volumen del pellet) y se agregó 10 µL de PCM15 (1/10 del volumen final).

6.8.1.5.3 Cotransformación.

En tubos epp. nuevos y en hielo se agregó 10 µL de la construcción (plásmido con inserto) pUAMJB3 y pULC43 (con marcador resistente a fleomicina), y se añadió 100 µL de protoplastos (se tomó un tubo epp. sólo con 100 µL de protoplastos como control y para la obtención de la sensibilidad basal de *A. terreus* a fleomicina), se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min en hielo. Se agregó 500 µL de PCM, se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min a Ta.

Para diluir el polietilenglicol, se agregó 600 µL de KCM, se mezcló bien y se dejó a Ta hasta la extensión en placa.

¹³ SP 2X: Hacer una solución KCl 1.1 M y ácido cítrico 0.1 M,

después ajustar pH 5.8 con KOH 1.1 M.

¹⁴ KCM: KCl 0.7M, CaCl₂ 50 mM y MES 10 mM pH 5.8.

¹⁵ PCM: CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH 5.8 y Polietilenglicol-8000 50% (p/v).

6.8.1.5.4 Extensión en placa.

Para obtener la sensibilidad basal de la cepa parental de *A. terreus* a fleomicina en protoplastos se realizó lo siguiente: en cajas de Petri de 5 cm de diámetro se vertieron 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) a 50°C adicionó el antibiótico fleomicina en una concentración de 120 µg/mL. El medio se homogeneizó totalmente y se dejó solidificar. Después, en un tubo falcón de 15 mL, se agregó 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) a 50°C y fleomicina en la concentración antes mencionada y 300 µL de mezcla de transformación (sin ADN), se homogeneizó y se vació en las cajas de Petri con bases solidificadas anteriormente y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día.

Para las transformantes en cajas de Petri chicas se vació 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) a 50°C y fleomicina a una concentración de 120 µg/mL. Se dejó solidificar. Por otra parte, en un tubo falcón de 15 mL, se agregó 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) a 50°C, fleomicina a la misma concentración y 300 µL de mezcla de transformación, se vació en las cajas de Petri con bases solidificadas anteriormente y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día para encontrar transformantes.

6.8.2 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.

6.8.2.1 Siembra por picadura

Las transformantes obtenidas en la transformación de *A. terreus* TUB-514 con la construcción pUAMJB3 se volvieron a sembrar por picadura en cajas de Petri chicas con 10 mL de medio Czapek (agar 2%) y fleomicina a una concentración de 160 µg/mL. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día para hallar crecimiento nuevamente de las transformantes. Las transformantes reales se esporularon en medio Power y se conservaron las esporas en viales con glicerol al 30%.

6.8.2.2 Fermentación en cilindros de agar (FCA).

El método de Agar en taco y Bioensayo por *Neurospora crassa* es descrito por Kumar *et al.*, (2000 b). En cajas de Petri chicas conteniendo 10 mL de medio Power solidificado se dejó esporular micelio, crecido a partir de 10 µL de la solución de transformantes y la

parental como control, se incubó a 30°C por 4 días. Por otro lado, en cajas de Petri de vidrio se colocó papel Whatman No. 1 y encima de éste 2 cubreobjetos, se acomodaron las cajas en el soporte de metal destinado para ello y se esterilizaron. Se preparó medio de producción 2.5X, se esterilizó y se vaciaron 20 mL de este medio en cajas de Petri grandes, se dejó solidificar en campana de flujo laminar. Ya solidificado se hicieron cilindros de agar con sacabocados de 6 mm de diámetro y 5 mm de alto. Se colocaron los cilindros sobre los cubreobjetos de las cajas de Petri de vidrio previamente preparados y se inocularon con palillo estéril sobre los cilindros de agar esporas recientes de las transformantes. Se añadió 2 mL de H₂O de alta pureza (BM) en el papel filtro de la caja sin mojar el cubreobjeto ni los cilindros de agar. Se cubrió con parafilm la caja Petri y se depositó en una caja para bioensayo. Se añadió H₂O dd hasta cubrir la mitad de la caja de bioensayo y se incubó a 30°C por 7 días. Simultáneamente, se creció *Neurospora crassa* en medio SDA y se incubó a 30°C por 7 días. Pasado el tiempo, se recolectaron esporas de *N. crassa* con 10 mL de Tween 0.8%, se cuantificó la concentración. Respecto a los cilindros de agar ya esporulados, se metió cada cilindro en tubos de ensayo de 10 mL y se les adicionó 2 mL de acetato de etilo y con la ayuda de una varilla de vidrio se maceró el taco hasta casi disolverlo, se dejó reposar 2 h. Se prepararon 120 mL de medio SDA, se esterilizó y ya mantenido a 45°C se sembraron 5 X 10⁷ esporas de *N. crassa*. Se vació el medio en una caja de bioensayo y se dejó solidificar. Se cortaron discos de 6 mm de diámetro de papel Whatman No. 1 y se adicionaron 10 µL del extracto de los tacos ya macerados, se contó con controles positivos adicionando 10 µL de lovastatina pura en forma de β-hidroxiácida, en concentraciones conocidas de 0 a 3 µg/mL en un rango de 0.5 µg/mL. Se dejaron secar los discos y con la ayuda de pinzas estériles se pasaron a la caja de bioensayo donde se inoculó *N. crassa*. Se incubó a 30°C durante 18 h y se midió el halo de inhibición y la concentración de β-hidroxiácida producida, cada transformante se obtuvo con la linearización de una curva estándar cuyas concentraciones fueron de 0 a 3 µg/mL de β-hidroxiácida utilizadas como controles positivos.

6.8.3. FERMENTACIONES.

En 3 matraces de 125 mL con 25 mL de medio Power se inoculó a c/u 100 µL de esporas de *A. terreus* (parental y transformantes) y se incubó a 30°C durante 4 días. Transcurrido el tiempo, a un matraz esporulado se añadió 10 mL de Tween 80% estéril, se agitó con perlas de vidrio estériles para así desprender las esporas, esta suspensión se pasó al

siguiente matraz esporulado, de tal forma que al final se obtuvo el mismo volumen pero más concentrado de esporas. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer.

6.8.3.1 Fermentación líquida.

En cada matraz de 250 mL se preparó 50 mL de medio de producción de lovastatina 1X y se esterilizó. Se inoculó 1×10^8 esporas por cada matraz y se incubó a 30°C de 150-200 rpm. Se realizó la fermentación de la parental y transformantes por duplicado y triplicado.

6.8.3.2 Fermentación sólida

Se utilizó el poliuretano como soporte inerte para la fermentación sólida, el cual fue cortado en cuadritos de $1 \times 1 \times 1$ cm³, se pretrató con 2 lavados de NaOH al 40%, 2 lavados con HCl al 10% y con varios lavados al agua corriente hasta que el pH fuera de 7. Se hicieron los cálculos correspondientes para pesar el poliuretano por cada matraz para tener una humedad del 85%, siendo de $0.21 \text{ g} \pm 0.005 \text{ g}$. Se pesó y adicionó el poliuretano en matraces de 250 mL secos, se taparon con papel aluminio y se

6.9. CUANTIFICACION.

6.9.1 Lovastatina.

6.9.1.1. Extracción de lovastatina en FS.

Se pesó 1 g de soporte húmedo, al cual se le adiciono 10 mL de acetonitrilo al 50% con agua, con agitación durante 30 min a 200 r.p.m. y después 30 min en el sonicador (Branson 120), la muestra se pasó a través de una membrana de 0.40 mm de poro (Millipore). Las muestras se guardaron en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

6.9.1.2. Extracción de lovastatina en FL.

Se tomaron dos tipos de muestra, una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo, al cual se le adicionaron 2 mL de acetonitrilo al 50%; la otra proveniente del micelio, se pesó 1 g de micelio húmedo el cual se pasó a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo al 50%, seguida de una agitación en el vortex durante 2 min. Los tubos se colocaron en el sonicador durante 30 min, la muestra se paso

a través de una membrana Millipore de 0.40 mm de poro. Todas las muestras fueron guardadas en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

6.9.1.3. Cuantificación de lovastatina.

Se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4mm), 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 b-hidroxiácida se determinó a 238 nm. con un detector de arreglo de diodos.

6.9.2 pH.

pH en FS.

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

pH en FL.

Se tomó directamente del caldo de fermentación después de haber filtrado el micelio.

6.9.3. BIOMASA Y HUMEDAD.

Humedad en FS.

Se tomaron unos cubos de soporte húmedo y se secaron al horno a 60°C durante 48 h; por diferencia de peso se conoció la humedad. La biomasa se determinó por el método de Glucosamina (Tomasselli *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 al horno a 60°C durante 48 h.

6.9.4. EXPRESIÓN DE GENES.

En FS.

En una caja de Petri, se colocaron de 5 cubos de soporte húmedo, los cuales se congelaron con N₂ líquido. Se extrajo el ADN de las muestras como se indica en la sección 6.8.1.1. Posteriormente los ADN de las muestras se guardaron a -70°C hasta su ulterior procesamiento.

En FL.

Se tomó el micelio completo de un solo matraz, el cual fue pasado a través de un filtro Nital estéril. La biomasa se colocó dentro de una caja Petri y se procedió a la extracción del ADN como lo indica la sección 5.8.1.1., después se congeló con N₂ líquido y se guardaron las muestras a -70°C para su posterior procesamiento.

6.9.4.1. Técnica de Southern blot.

Se digirió el ADN a aproximadamente 10 ug. por cada muestra a analizar. Después se digirió una cantidad apropiada de ADN genómico de cada una de las muestras con una o más enzimas de restricción. Se concentró el ADN fragmentado de las muestras al finalizar la digestión por precipitación con etanol. Después se disolvió el ADN en 25 µl de TE. Una vez realizada la digestión se corrió un 1/10 de la reacción en un gel para la revisión de la digestión de cada una de las muestras. Posteriormente se corrió el volumen total de las digestiones en un gel de agarosa de 0.8% durante 6 h. Acto seguido se recirculó el TAE a las 3 horas y se tomó una imagen del gel (junto con la escala de una regla). Enseguida se realizó la depurinación ácida con HCl 0.25 N, haciendo 2 lavados, cada uno de 15 minutos. Se lavó el gel con agua destilada.

Se desnaturalizó el ADN, sumergiendo el gel en solución de NaOH 0.5 N, 1.5 M NaCl. 2 lavados, de 15 minutos cada uno. Se lavó con agua destilada. Se neutralizó el ADN, sumergiendo el gel 2 veces durante 15 minutos cada lavado en una solución Tris-HCl 0.5 M y 1.5 M NaCl (pH 7.4). Se humedecieron 2 membranas de nylon cargadas positivamente en SSC 20 x.

El tamaño de la membrana debe ser igual a la del gel. Se recortaron 4 piezas de papel Whatman del mismo tamaño del gel y se humedecieron también en SSC 20x. Se construyó una unidad de transferencia como en la Fig 6.7. Enseguida se dejó la transferencia entre 24 y 72 horas. Transcurrido el tiempo se marcó la posición de los pocillos en el filtro, y se lava con cuidado en SSC 5x. Posteriormente se deja secar el filtro y se fijan covalentemente los ácidos nucleicos mediante irradiación mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker).



Fig. 6.7. Construcción de la unidad de transferencia para aplicar la técnica de Southern blot.

7. RESULTADOS.

7.1. Obtención de ADN total de *Aspergillus terreus*.

Se llevó a cabo la electroforesis del ADN genómico purificado por el método descrito anteriormente, la calidad del mismo es muy importante para la aplicación de la técnica de PCR, puesto que un exceso en alguno de los reactivos puede inhibir a la enzima ADN-polimerasa (Fig. 7.1).

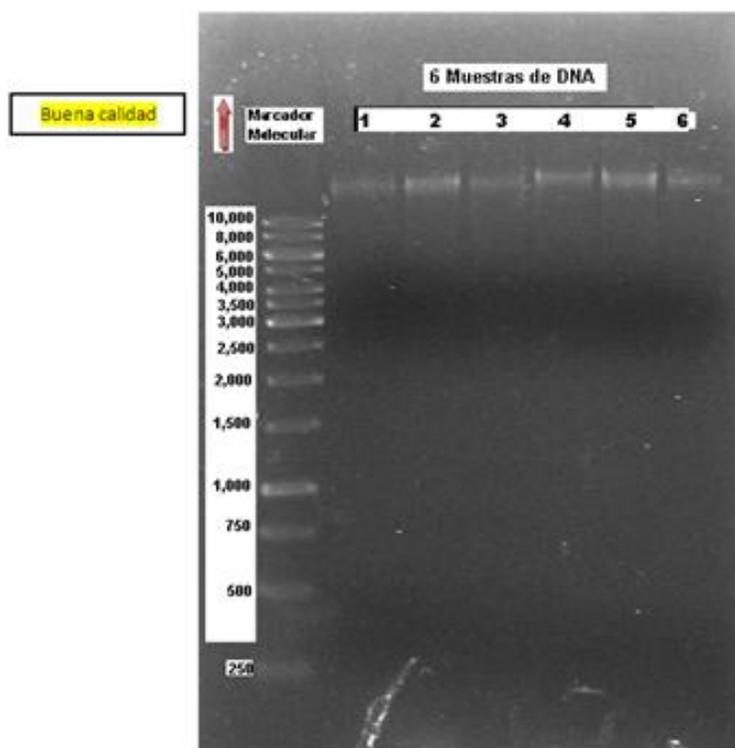


FIG. 7.1. ADN GENOMICO DE *Aspergillus terreus*.

La electroforesis revela una excelente extracción de ADN genómico, con la presencia de bandas bien definidas que manifiestan buena integridad del material genético debido a la casi ausencia de barrido en cada uno de los 6 carriles que representan a las 6 muestras tomadas durante la extracción de ADN de *Aspergillus terreus*.

Cualquiera de las muestras tomadas puede ser utilizada para la posterior aplicación que consiste en la obtención del fragmento del gen para *lovE*.

7.2. Amplificación por PCR del fragmento con el gen *lovE*.

7.2.1. Diseño de los primers de reconocimiento.

Los oligos que se diseñaron junto con el tamaño del fragmento esperado se describen en la Tabla. 7.2.

Diseño de los oligos para amplificar el fragmento del gen <i>lovE</i>		
Gen	Oligos (5' → 3')	Tamaño del fragmento (pb).
<i>lovE</i>	GGG C/CA TGG CTGCAGATC AAGGTATAT TCA CG	1459
	GCT G/GA TCC GTTCATGGA GGAATATTG TTG AGG	

Tabla. 7.2. Oligos utilizados en la amplificación del gen *lovE*.

Los oligos diseñados para obtener la sección con el gen *lovE* completo de 1459 pb a partir del ADN genómico de *Aspergillus terreus* constan de 33 nucleótidos y contienen 2 secuencias de reconocimiento, una para la enzima *NcoI* y otra para la enzima *BamHI*. Los cortes se localizan el primero que corresponde a la enzima *NcoI* dos nucleótidos antes del inicio de la secuencia de la parte codificante del gen y el segundo a tres nucleótidos después del segmento completo. El gen *lovE* obtenido dentro de esta sección contiene solamente la secuencia codificante (Fig. 7.3).

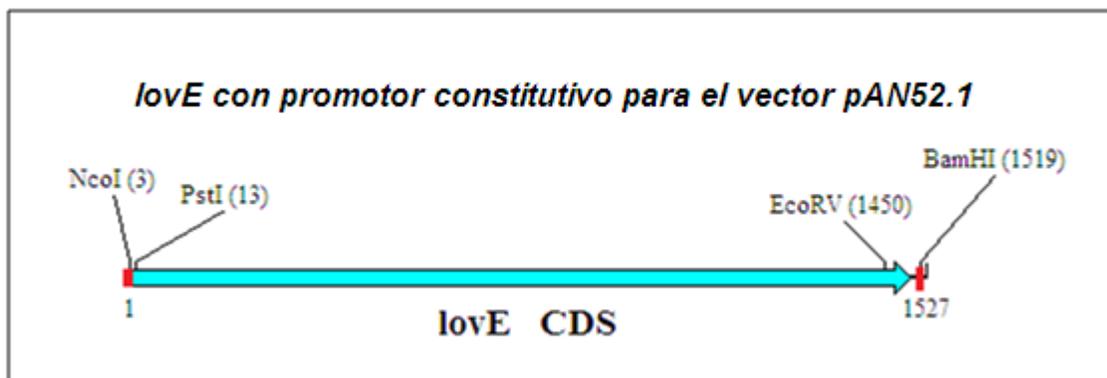


Fig. 7.3a. Tamaño del gen *lovE* indicando la localización de los cortes con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

7.2.2. Obtención del gen *lovE* completo por medio de la técnica de PCR.



Fig. 7.3b. Secuencia del gen *lovE* indicando la localización de los cortes con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

7.3 Clonación del fragmento de PCR *lovE* cds, en el vector plasmídico pAN52.1

Se muestra a continuación

Fragmento	Vector	Enzima	Tamaño final
Gen <i>lovE</i> completo.	pAN52.1	<i>NcoI</i>	7237 pb
		<i>BamHI</i>	

Tabla. 7.3.1. Enzimas de restricción que se utilizaron para cortar el gen *lovE* y al vector pAN52.1

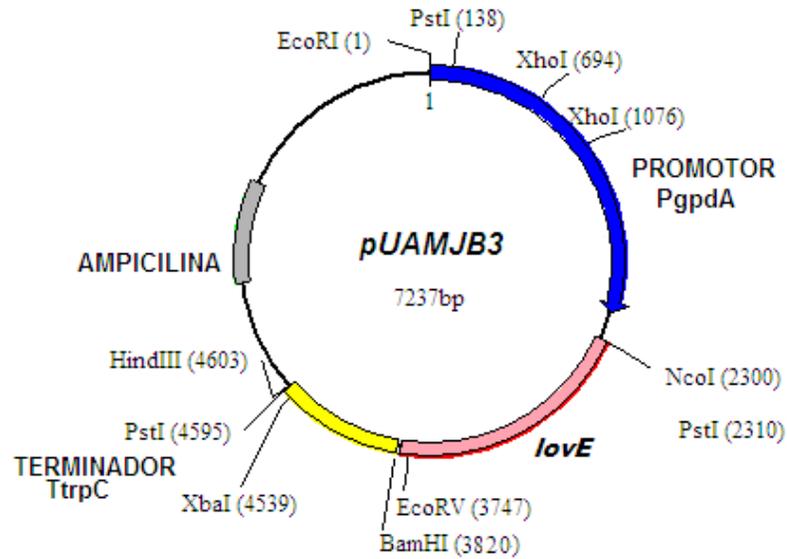


FIG. 7.3.2. Construcción del plásmido pUAMJB3 con promotor constitutivo.

7.4. Confirmación de la construcción pUAMJB3.

Amplificación del gen *lovE* clonado.

Por medio de la técnica de amplificación utilizando el kit se logra obtener 500 μ L de la construcción con una concentración de 250 μ g/ μ L, los cuales se depositaron en un tubo de eppendorf para posteriores pruebas.

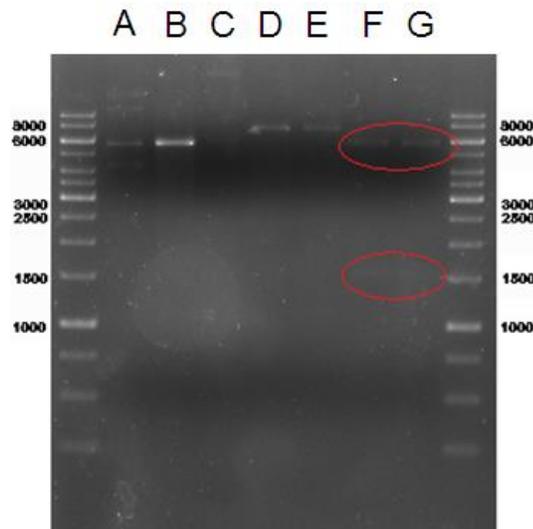


FIG. 7.4.1. Resultado de la electroforesis de la digestión del vector pUAMJB3 donde se aprecian el plásmido y el inserto digeridos.

Posteriormente los resultados de la digestión del plásmido pUAMJB3 mostraron que efectivamente la construcción está formada por el plásmido pAN52,1 como se muestra en la imagen y el correspondiente gen *lovE* secuencia codificadora con un tamaño de 6000 pb y un poco arriba de 1500 pb respectivamente, lo cual demuestra la construcción del plásmido ya referido.

Secuencia y Blast.

Como una prueba que nos permitiera asegurarnos que el inserto clonado es el que originalmente buscamos se hizo la secuenciación del vector obteniéndose los siguientes resultados:

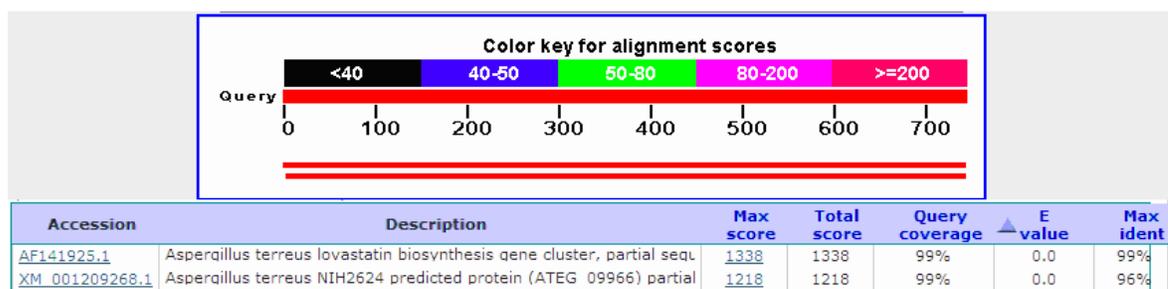


Fig. 7.4.2. Porcentaje de la identidad del gen *lovE*.

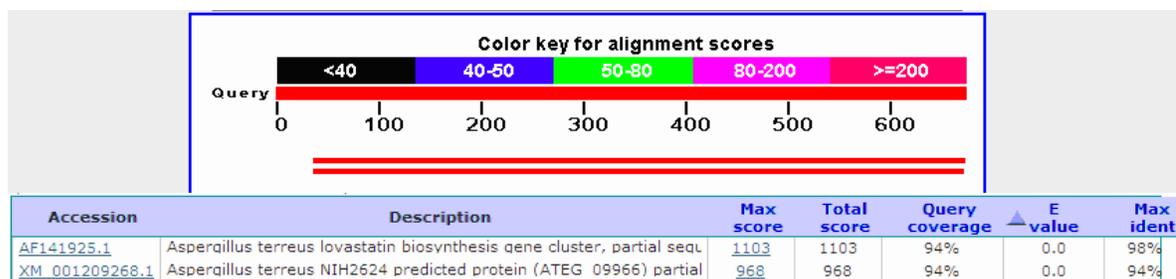


Fig.7.4.3. Porcentaje de similitud del gen *lovE*.

La secuenciación del gen *lovE* (secuencia codificadora) y la alineación de los nucleótidos fue realizada por el programa Blast del NCBI de la página www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi donde se obtienen porcentajes de identidad del 98% con el gen *lovE* del clúster de los genes de biosíntesis de lovastatina de *Aspergillus terreus*.

7.5. Cotransformación de *A. terreus* con construcción pUAMJBlovE y selección de transformantes.

Obtención de transformantes:

Se realizó el proceso de cotransformación, técnica que involucra la introducción del plásmido pULC43 (30 µg/mL) con su respectivo marcador de fleomicina y el vector pUAMJB3(25 µg/mL), al que se sometió *Aspergillus terreus* por el método de los protoplastos, el cual llevó a la obtención de 36 transformantes, aunque hay que agregar que también se hizo la transformación solamente con el plásmido pULC43 para obtener transformantes que nos sirviera de control en la fermentación en cilindro de agar (FCA).

Cada proceso de cotransformación en promedio arrojaba como resultado la producción de 2 transformantes, por lo que hubo que hacer la cotransformación varias veces para así de esa forma obtener las 36 transformantes junto con el control y la parental, de forma que pudiéramos asegurarnos de que realmente estamos obteniendo cepas modificadas genéticamente, al menos, al poder reconocerlas con el marcador de hongos.

7.6. Morfología de la cepa parental y de las cepas transformantes

Se realizó una tabla comparativa, (Fig. 7.6) de manera que se pudieran apreciar las diferencias morfológicas de cada una de las transformantes con respecto a la parental y al control que solamente contiene al vector pULC43.

La siguiente tabla muestra la morfología de la cepa parental y de las cepas transformantes, donde se plasma desde el color hasta la forma de la colonia, pasando por el borde, grado de elevación, textura y transparencia.



Transformantes 1, 2, 3, 4, 5,6.

Transformantes 7, 8, 9,10.

Transformantes 11, 12, 13, 14, 15,16.

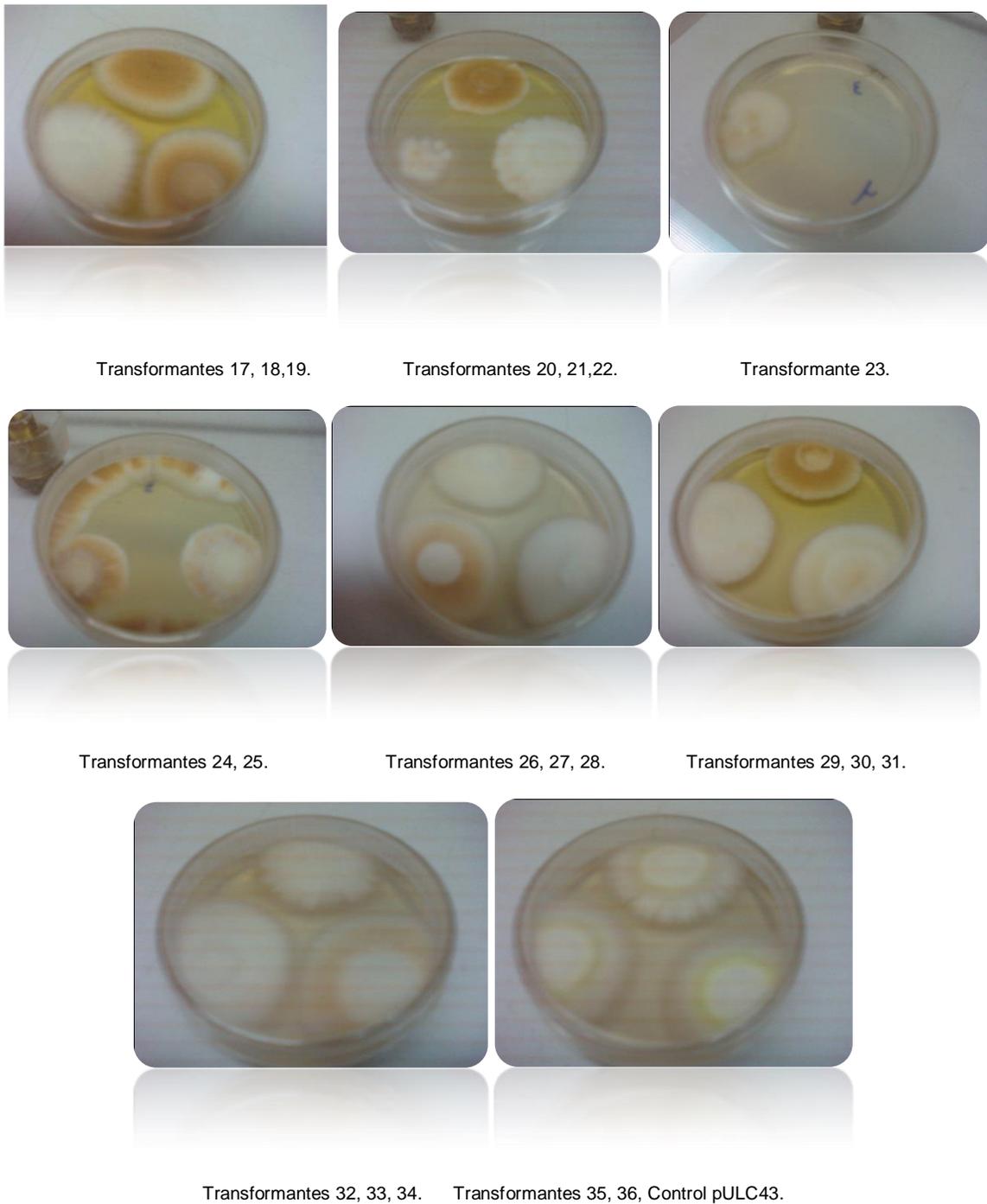


Fig. 7.5. Transformantes obtenidas por el proceso de cotransformación de *Aspergillus terreus* donde se introdujeron los plásmidos pJBUAM03 y pULC43.

CUADRO COMPARATIVO DE DIFERENCIAS MORFOLOGICAS DE LAS TRANSFORMANTES CON LA PARENTAL Y EL CONTROL pULC43

CEPA	COLOR	FORMA	BORDE	ELEVACION	TEXTURA	TRANSPARENCIA
PARENTAL	Café (canela)	Circular	Entero	Plana	Lisa	Opaca
CONTROL	Blanco con un aro amarillo	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
1	Amarillo con un botón blanco al centro y dos anillos blanco y café.	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
2	Amarillo, blanco y café.	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
3	Café con un aro radial amarillo, un .	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
4	Café, amarillo y blanco en forma de anillos.	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
5	Café con partes amarillos.	Filamentosa.	Dentado	Plana	Granular	Opaca
6	Café con amarillo en forma de anillo.	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
7	Café con centro blanco.	Rizoide	Filamentoso	Plana	Granular	Opaca
8	Café, amarillo en forma de anillos, centro blanco.	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
9	Café suave con centro blanco.	Rizoide	Dentado	Plana	Lisa	Opaca
10	Café, amarillo en forma de anillos y radial.	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
11	Blanco con anillo café	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Granular	Opaca
12	Amarillo, blanco y café anillados	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
13	Amarillo con café	rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
14	Café con amarillo radial	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
15	Amarillo y café anillados	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
16	Café con centro amarillo	Rizoide	Dentado	Crateriforme	Granular	Opaca
17	Blanco	Rizoide	Entero	Crateriforme	Rugosa	Opaca
18	Café con anillos blancos	Rizoide	Entero	Crateriforme	Lisa	Opaca
19	Café con anillos blancos	Rizoide	Entero	Crateriforme	Lisa	Opaca
20	Blanco	Rizoide	Lobulado	Umbilicada	Granular	Opaca
21	Café con anillo blanco.	Circular	Entero	Crateriforme	Lisa	Opaca
22	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca

23	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
24	Café con anillos blancos	Rizoide	Filamentoso	Umbilicada	Lisa	Opaca
25	Blanco con anillo café	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
26	Café con anillos blancos	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
27	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
28	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
29	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Plana	Lisa	Opaca
30	Café con anillos blancos	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
31	Blanco con anillos	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
32	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Plana	Lisa	Opaca
33	Blanco	Rizoide	Filamentoso	Plana	Lisa	Opaca
34	Blanco con un aro amarillo	Rizoide	Filamentoso	Crateriforme	Lisa	Opaca
35	Blanco con un aro amarillo	Rizoide	Filamentoso	Umbilicada	Lisa	Opaca
36	Blanco con un aro amarillo	Rizoide	Filamentoso	Umbilicada	Lisa	Opaca

Tabla. 7.6. Tabla de descripción y comparación de la morfología de las colonias transformantes obtenidas en el proceso de la cotransformación de *Aspergillus terreus* resaltándose las que resultaron mejores sobreproductoras de lovastatina.

La parental mostró la siguiente morfología: color café o canela como se describe comúnmente, con forma circular, teniendo un borde entero, esto es que se encuentra íntegra sin ninguna deformación, una elevación plana, con textura lisa y opaca, mientras que la mayoría de las transformantes involucran colores desde café claro, pasando por amarillo y blanco, la mayoría con forma rizoide y con bordes filamentosos y dentados con una elevación en su mayoría en forma de cráter (boquete) y algunas planas, la textura para la mayoría de las transformantes es de forma granular y lisa y todas sin excepción son opacas.

En referencia al color, la cepa parental y el control con pULC43, mostraron una tonalidad café y blanco amarillo respectivamente, las transformantes tuvieron los siguientes tonos de color, 27.77% blancas, 27.77% café y blanco, 22.22% de café con amarillo, 13.89% de café, blanco y amarillo, 8.33% son blancas con amarillo.

Con respecto a la forma, la parental enseña una forma circular y la cepa control una forma rizoide, las transformantes exhiben las siguientes formas: 94.44% de las transformantes tuvieron una forma rizoide, 2.77% una forma filamentososa y el otro 2.77% otra forma que

es circular y que también coincide con la de la parental.

Ahora, en correspondencia con el borde, donde la cepa silvestre mantiene un borde entero y la cepa control un borde filamentosos, las transformantes presentan las siguientes manifestaciones: 61.11% un borde filamentosos, 25% un borde dentado, 11.11% un borde entero igual a la parental y un 2.77% de borde lobulado.

En relación con la elevación se revela que la cepa silvestre tiene una elevación plana y la cepa control una elevación crateriforme, o sea en forma de anillos y las transformantes evidencian las siguientes elevaciones: 72.22% una elevación crateriforme, 16.66% una elevación plana y 11.11% una elevación umbilicada.

7.7. Velocidad de crecimiento radial.

Se midió la velocidad radial de crecimiento de las colonias en centímetros del diámetro, por día, aunque hay que tomar en cuenta que se consideró la etapa de crecimiento, que duró en algunas colonias 4 días como mínimo y en otras 7 como máximo, debido a que llega el momento que la colonia detiene su crecimiento.

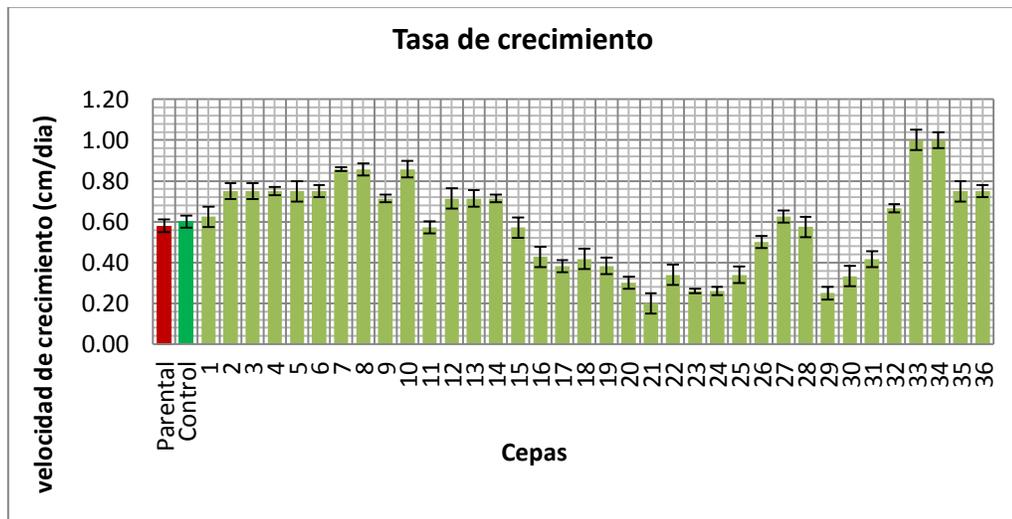


Fig. 7.7.1. Tasa de crecimiento radial de cepa parental y transformantes.

En la Figura 7.7.1 se evalúa la tasa de crecimiento de las cepas, donde se aprecia a simple vista que varias transformantes, e inclusive el control incrementan la tasa de crecimiento en un porcentaje que va del 15.51 al 72.41%. Se puede ver que la cepa parental tiene una tasa de crecimiento de 0.58 ± 0.03 cm/día, mientras que las

transformantes sobreproductoras de lovastatina como la transformante T08 tiene una tasa de crecimiento de 0.86 ± 0.01 cm/día, la transformante T11 de 0.57 ± 0.03 cm/día, las transformante T23 de 0.26 ± 0.01 cm/día y la transformante T26 de 0.50 ± 0.03 cm/día Fig. 6.7.2.

Transformantes con pUAMJB3	Tasa de Crecimiento	
	Velocidad de crecimiento (cm/día)	Incremento %
Parental	0.58 ± 0.03	0
T08	0.86 ± 0.01	48.27
T11	0.57 ± 0.03	-1.72
T26	0.26 ± 0.01	-55.17
T23	0.50 ± 0.28	-13.79

Tabla 7.7.2. Comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa parental con las transformantes sobreproductoras de lovastatina T08, T11, T23 y T26.

7.8. Esporulación de la cepa parental y las cepas transformantes.

Se llevó a cabo un conteo de esporas de las diferentes cepas, la parental y las transformantes seleccionadas por FCA, todas hasta el séptimo día.

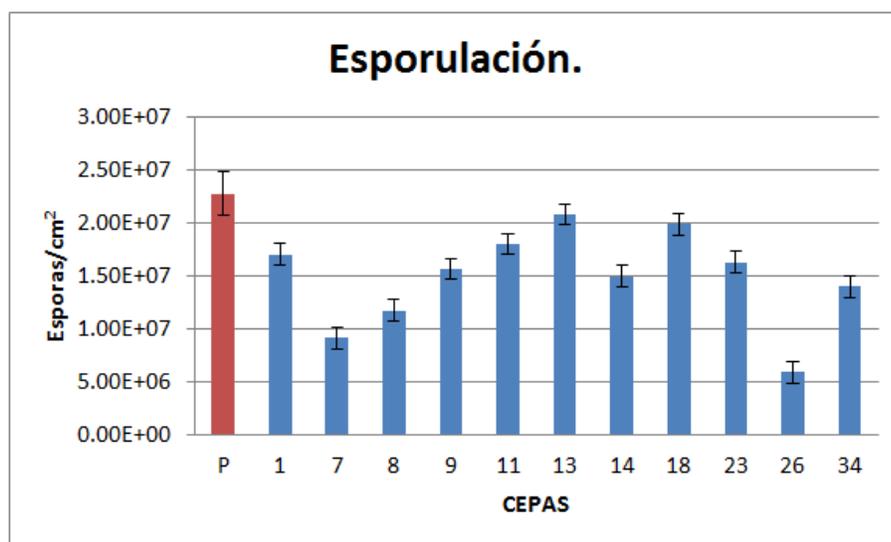


Fig.7.8.1. Esporulación de las transformantes y la cepa parental en esporas/cm²

P	1	7	8	9	11	13	14	18	23	26	34
2.2E+07	1.7E+07	9.1E+06	1.1E+07	1.5E+07	1.8E+07	2.1E+07	1.5E+07	2E+07	1.6E+07	5.8E+06	1.4E+07

Tabla. 7.8.2. Esporulaci3n de la cepa parental y de las transformantes en Esporas/cm²

La parental tuvo una esporulaci3n de 2.27x10⁷ esporas/cm², la transformante que esporul3 mejor fue la 13, con una conidiaci3n de 2.08x10⁷ esporas/cm², una disminuci3n del 8.37% con respecto a la parental mientras que la que esporul3 menos fue la transformante 26, con una conidiaci3n de 5.85x10⁶ esporas/cm², una fuerte disminuci3n del 74.23% con respecto a la parental.

Se llev3 a cabo una cin3tica de esporulaci3n hasta las 192 h de las mejores transformantes para la FS y FL, obteni3ndose la comprobaci3n de lo que anteriormente se venía proponiendo, que ninguna de las mejores transformantes logr3 esporular mejor que la parental.

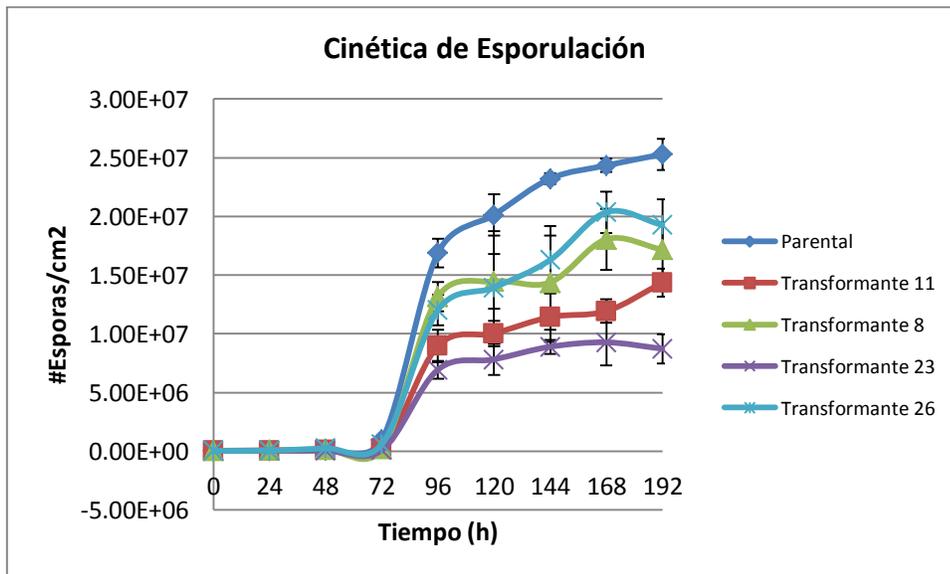


Fig. 7.8.3. Cin3tica de esporulaci3n de varias cepas transformantes y la parental.

Utilizando la prueba estadística de Tukey, se observa que la esporulaci3n en FS de las transformantes T11, T8, T23, T26 y la parental es significativamente diferente (p<0.05). La T26 (con promotor constitutivo) fue la que mejor producci3n de conidios tuvo, la cual fue

de 1.8×10^7 esporas/cm², con un decremento del 20% respecto a la parental. El resultado sugiere que el gen *lovE* afecta negativamente la producción de conidios.

7.9. Fermentación en cilindro de Agar.

Se realizó una fermentación en cilindro de agar, en medio LB utilizando *Neurospora crassa* como organismo indicador, de manera que por medio de halos de inhibición determinemos la concentración de lovastatina que produce *A. terreus* de cada una de las cepas transformantes y de la parental, con el propósito de hacer una preselección de las mejores transformantes en este medio a manera de filtro para encontrar a las que habrá de analizarse para la FS y FL (Fig. 7.9.1.).

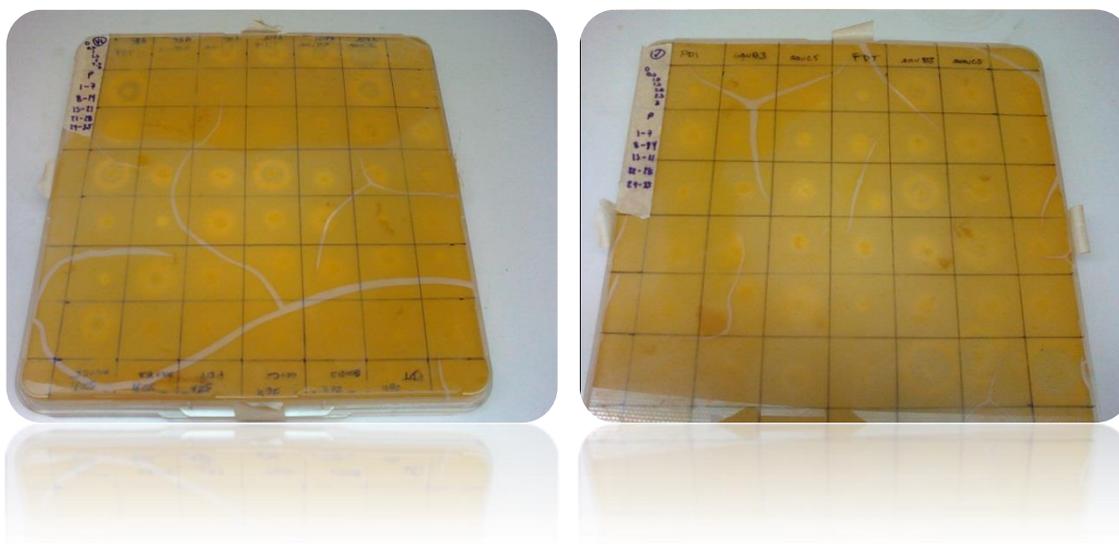


Fig. 7.9.1. Placas de Fermentación de Cilindro de Agar donde se evalúa la producción de lovastatina a las transformantes obtenidas en el proceso de transformación.

Se muestra en la Fig. 7.9.2. la gráfica de producción de las cepas parental y las cepas transformantes, para seleccionar aquellas con las que continuará su caracterización para FS y FL, y después se corrobore la decisión tomada con la tabla de producción a manera de hacer la selección definitiva para las fermentaciones mencionadas.

La Tabla. 7.9.4 contiene a las diez transformantes con la mayor producción de lovastatina en relación con la producción de la cepa parental y que están marcadas en la gráfica con color dorado.

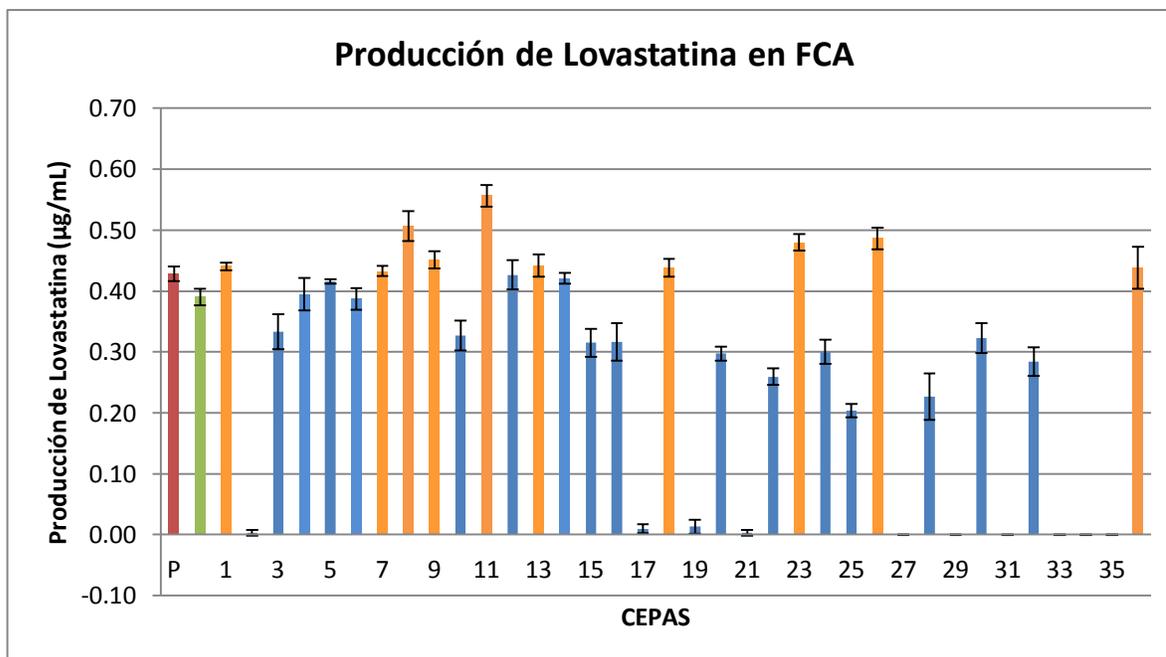


Fig.7.9.2. Producción de lovastatina en Fermentación en Cilindro de Agar (FCA) de las transformantes obtenidas por cotransformación (La barra roja, corresponde a la cepa parental; verde, control con el plásmido pAN52.1 sin lovE; dorada, transformantes sobreproductoras seleccionadas para evaluación en FS y FL; y azul, transformantes sin seleccionar).

CEPA	P	C	T1	T7	T8	T9	T11	T13	T18	T23	T26	T36
PRODUCCION DE LOVASTATINA (µg/mL)	0.43	0.39	0.44	0.44	0.51	0.44	0.56	0.44	0.44	0.45	0.45	0.44

Tabla. 7.9.4. Producción de lovastatina en FCA, de las transformantes seleccionadas para posterior caracterización.

Las mejores transformantes para la producción de lovastatina en Fermentación en Cilindro de Agar (FCA) que rebasaron la producción de la parental (0.43 µg/mL) o que al menos igualaron la producción fueron: la T11 que produjo 0.56 µg/mL, 30.23% mayor producción que la parental, la T8 con una producción de 0.51 µg/mL, 18.6% mayor producción que la parental, la T23 y la T26 con una producción de 0.45 µg/mL cada uno con incremento en la producción del 4.6%, y las transformantes T1, T7, T13, T18, T36 y T9 con producciones de 0.44 µg/mL, 2.3% mayores producciones que la parental.

Así, tenemos que, el porcentaje de sobreproductoras de lovastatina en FCA fue del 27.7% de la población total de transformantes.

7.10 Fermentación sólida y líquida (FS y FL).

7.10.1 Fermentación líquida

7.10.1.1 Parámetros que caracterizan a la cepa parental y a las transformantes (pH, biomasa) durante la FL.

CEPA	P	T1	T7	T8	T9	T11	T13	T14	T18	T23	T26	T34
pH	6.95	7.50	7.39	6.49	6.84	6.43	7.37	6.99	7.05	7.11	7.22	7.73
Biomasa (mg/mL)	13.4	15.2	10.4	11.9	9.6	13.1	11.9	14.8	12.5	12.8	13.7	11.0

Tabla 7.10.1. Se muestra el pH y la producción de biomasa en cada una de las transformantes en Fermentación Líquida.

El pH final del cultivo de la parental fue de 6.95 ± 0.05 mientras que las transformantes muestran un rango de variación en el pH desde 6.49 ± 0.02 para la transformante 8 hasta un pH de 7.73 ± 0.01 para la transformante 34. Esto indica que la FL se realizó en condiciones normales.

La biomasa producida para la parental fue de 0.0134 ± 0.0011 g/mL mientras que las transformantes tuvieron un rango de variación en la producción de biomasa de 0.0096 ± 0.0002 para la transformante 9 hasta 0.0152 ± 0.0004 g/mL para la transformante 1(uno). Fig. 6.7.1.

7.10.1.2 Producción de lovastatina por Fermentación Líquida.

Se realizaron FLs a 7 días, con las transformantes seleccionadas, para determinar el efecto del incremento de copias del gen *lovE* sobre la producción en FL. También, para identificar las mejores productoras.

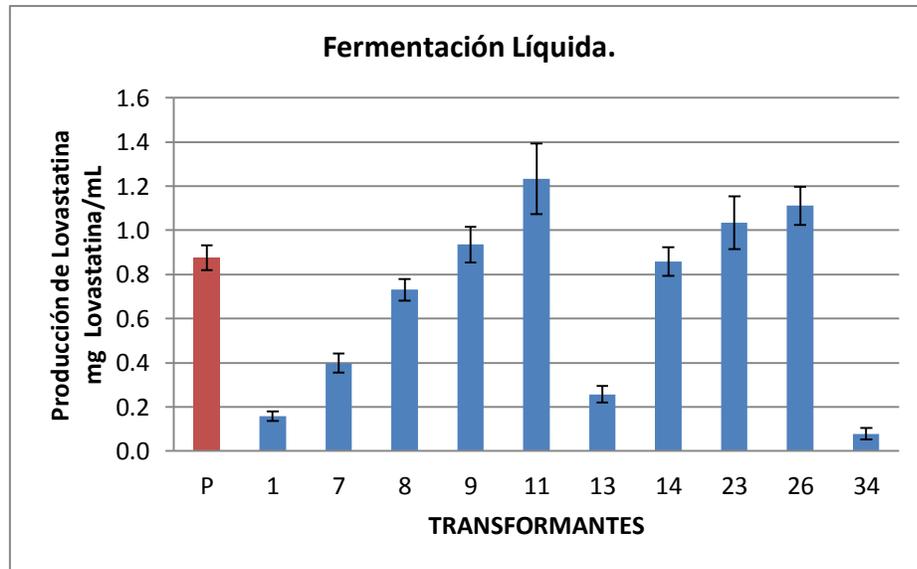


Fig. 7.7.1.2. Producción de lovastatina en Fermentación Líquida por las transformantes seleccionadas al séptimo día.

Las transformantes que superaron la producción de la parental (cuya producción de lovastatina fue de 0.875 ± 0.055 mg Lov/mL) de forma significativa fueron la 11, con una producción de lovastatina de 1.232 ± 0.16 mg/mL que representa un incremento del 40.6% y la 26, que tuvo una producción de 1.111 ± 0.085 mg/mL, que representa un incremento del 26.8% y la 23 con producción de 1.034 ± 0.12 mg/mL. Las demás mostraron disminuciones de la producción de lovastatina donde la más afectada fue la transformante 34 junto con la transformante T1 donde la producción para ellas fue de 0.078 ± 0.025 y de 0.159 ± 0.022 mg/mL que representan un porcentaje del 91.03% y un 81.82% de la parental respectivamente además de la transformante 13 que produjo 0.257 ± 0.036 mg/mL, por lo que la disminución de la producción para esta transformante fue del 70.61% y una última que es la T8, también disminuyó su producción, aunque no de manera tan drástica como las anteriores, cuya producción fue de 0.730 ± 0.048 mg/mL en un porcentaje del 16.62% en comparación con la parental.

Como puede verse en la Fig.7.7.1.2, solamente 3 transformantes fueron sobreproductoras, la T11, la T26 y la T23, para el caso de fermentación líquida.

Otras mostraron niveles de producción iguales a la parental como la T23, la T09 y la T14, mientras otro grupo produjo menos que la parental como la T1, la T07, la T13, la T08 y la T34.

Solamente el 30% de las transformantes fueron sobreproductoras para la fermentación líquida mientras que el 50% de todas disminuyeron la producción y el 20% se mantuvo en producciones iguales a la parental en fermentación líquida como se puede notar en la Tabla 7.10.1.3.

CEPA	PRODUCCION EN FERMENTACION LIQUIDA. (mg Lov/mL)	INCREMENTO EN LA PRODUCCION DE LOVASTATINA. (%)
PARENTAL	0.875±0.0558	0
T11	1.232±0.1600	40.69
T26	1.111±0.0859	26.84
T23	1.034±0.1206	18.08
T09	0.935±0.0812	06.76
T14	0.858±0.0641	-01.99
T08	0.730±0.0480	-16.56
T07	0.398±0.0438	-54.48
T13	0.257±0.0369	-70.62
T01	0.159±0.0220	-81.82
T34	0.078±0.0252	-91.03

Tabla. 7.10.1.3. Las cepas se organizaron en el orden de producción de lovastatina de mayor a menor cantidad en Fermentación Líquida apreciándose el porcentaje de incremento (o decremento).

En la Tabla 7.10.1.4 se puede observar el efecto de la transformación para generar cepas sobreproductoras para FL, donde la mayor sobreproductora llego a rebasar a la parental en un 40.69%.

RANGO DE PORCENTAJES DE INCREMENTOS Y DECREMENTOS EN LA PRODUCCION DE LOVASTATINA EN FERMENTACION LIQUIDA.

RANGO DE INCREMENTOS (%)	+40.69 a +6.76
RANGO DE DISMINUCIONES (%)	-1.99 a -70.62

Tabla. 7.10.1.4. Porcentajes de incrementos y decrementos en FL, donde el efecto de la transformación para obtener sobreproductoras es más negativa que positiva.

7.10.2.2 Producción de lovastatina por Fermentación Sólida.

Se realizaron FSs, a 7 días, con las transformantes seleccionadas para determinar el efecto del incremento de copias del gen *lovE* sobre la producción de lovastatina en FS. También, para identificar las mejores productoras.

7.10.2.2.1. pH para Fermentación Sólida.

El pH para la parental fue de 6.33 ± 0.1 , las transformantes obtuvieron un pH desde 6.13 ± 0.04 hasta 7.22 ± 0.14 para las transformantes 23 y 34 respectivamente.

La humedad que obtuvo la parental fue de 0.8811 ± 0.0072 , mientras que las transformantes tuvieron humedades relativas de 0.8845 ± 0.0020 para la transformante T09 hasta 0.9016 ± 0.0007 para la transformante T01.

CEPA	P	T1	T7	T8	T9	T11	T13	T14	T18	T23	T26	T34
pH	6.33	7.17	6.38	6.91	7.00	6.21	6.50	6.93	6.32	6.13	6.80	7.22
Humedad %	88.11	90.16	89.41	90.10	88.45	89.71	89.32	89.84	89.38	88.94	89.60	88.60
Biomasa (mg gss)	26.54	20.28	22.13	21.04	21.40	22.76	27.49	20.27	24.65	24.79	21.38	27.43

Tabla 7.7.2.1. Se muestra el pH, el porcentaje de humedad y la producción de biomasa en cada una de las transformantes en Fermentación sólida.

La humedad que se midió en la cepa parental fue de 0.8811 ± 0.0072 , mientras que las transformantes presentaron humedades relativas de 0.8845 ± 0.0020 para la transformante

9 hasta 0.9016 ± 0.0007 para la transformante 1.

La biomasa obtenida en la fermentación sólida para la parental fue de 26.54 ± 0.67 mg/gms, las transformantes tuvieron un intervalo de variación de entre 20.27 ± 0.66 mg ms para la transformante 14 hasta 27.49 ± 1.18 mg ms para la transformante 13.

7.10.2.2.2. Producción de lovastatina de las transformantes en Fermentación Sólida.

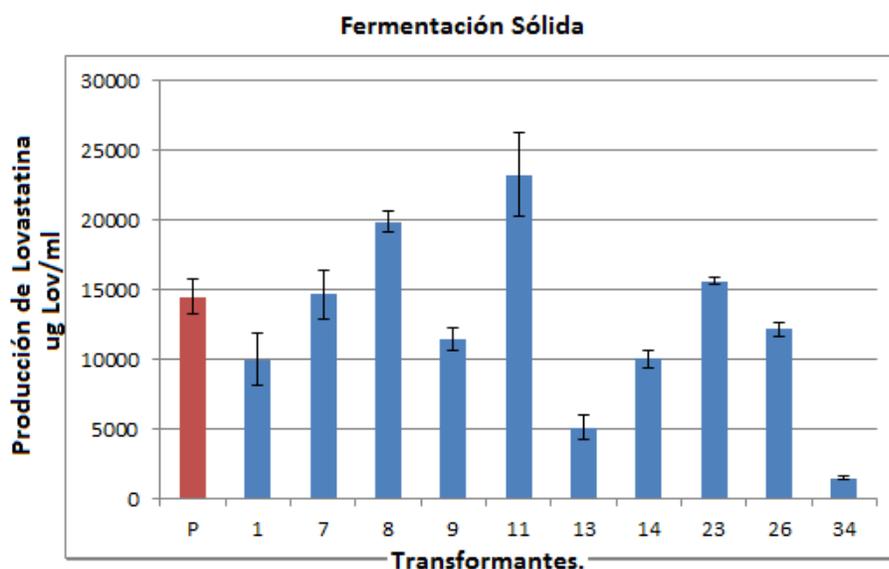


Fig. 7.7.1.3. Producción de lovastatina en Fermentación Sólida por las transformantes seleccionadas al séptimo día.

La parental para fermentación sólida tuvo una producción de lovastatina de 14.50 ± 1.25 mg Lov/mL, mientras que las transformantes tuvieron una producción que va para la que disminuyo de forma drástica de 1.47 ± 0.12 que representa una caída en la producción del 89.83% y que corresponde a la transformante 34 mientras que las mejores sobreproductoras fueron la 8 con producción de lovastatina de 19.89 ± 0.78 mg/mL y la transformante 11 con una producción de 23.27 ± 0.30 mg/mL lo que representa porcentajes del 160.53 y 137.19 respectivamente. El rango de producción cubre porcentajes que van del -89.83% hasta 60.53%.

Las mejores transformantes (sobreproductoras) fueron la 11 con una producción de 23.27 ± 0.30 mg/mL y la transformante 8 con producción de lovastatina de 19.89 ± 0.78 mg/mL. Esto representa porcentajes de incremento en la producción de lovastatina de

60.53 % y 37.19 % respectivamente Fig. 6.7.1.2.

CEPA	PRODUCCION DE LOVASTATINA EN FERMENTACION SOLIDA. (mg/mL)	PORCENTAJE DE PRODUCCION CON RESPECTO A LA SILVESTRE. (%)
PARENTAL	14.50±1.25	0
T11	23.27±3.02	60.48
T08	19.89±0.79	37.17
T23	15.62±0.28	07.72
T07	14.65±1.75	01.03
T26	12.17±0.54	-16.06
T09	11.49±0.84	-20.76
T14	10.03±0.63	-30.83
T01	10.00±1.87	-31.03
T13	5.13±0.85	-64.62
T34	1.47±0.12	-89.86

Tabla. 7.7.2.2. Las cepas se organizaron en el orden de producción de lovastatina de mayor a menor cantidad en Fermentación Sólida apreciándose el porcentaje de incremento (o decremento).

T23 mostró un pequeño incremento de 7.7%, y la T07 un incremento pequeño en producción, sin embargo éste no fue estadísticamente significativo. Las demás transformantes manifiestan producciones por debajo de la parental (Tabla 7.7.2.2).

Solamente las transformantes T11 y T08 superaron la producción de la parental, lo que representan el 20% de las transformantes analizadas (preseleccionadas), mientras que las transformantes T23 y T07 solamente igualaron el nivel de producción de la silvestre las cuales figuran con un 20% también de las examinadas y las demás transformantes

exhibieron una caída en sus niveles de producción que en conjunto representan un 60% de las transformantes estudiadas.

Las cepas se ordenaron en el orden de producción en Fermentación Sólida de mayor a menor (Tabla 7.7.2.2.). La cepa parental tuvo una producción de 14.50 ± 1.25 , por lo que a partir de ella se hace la comparación con las cepas transformantes donde la sobresaliente resulto ser la T11 que mostro una producción de 23.27 ± 3.02 mg/mL que resulta en un incremento en la producción del 60.48% con respecto a la parental, seguida de la T08 que exhibe una producción de 19.89 ± 0.79 mg/mL.

La T23 y la T07 no mostraron sobreproducción con respecto a la parental de forma significativa, las producciones de las aludidas fueron respectivamente 15.62 ± 0.28 mg/mL y 14.65 ± 1.75 mg/mL, por lo que se considera que su producción igualó a la parental.

Las demás transformantes manifiestan producciones por debajo de la parental, donde la que menos consiguió expuso una producción de 1.47 ± 0.12 mg/mL que representa un porcentaje del -89.86% de disminución y que fue la transformante 34, seguida de la transformante T13 que presento una producción del 5.13 ± 0.85 mg/mL, la transformante T01 obtuvo 10.00 ± 1.87 mg Lov/mL como producto final, la transformante T14 consigue alcanzar una producción de 10.03 ± 0.63 mg/mL, les siguen finalmente las transformantes T09 y la T26 las cuales lograron producciones menores a la parental de 11.49 ± 0.84 y 12.17 ± 0.54 mg/mL respectivamente.

Solamente las transformantes T11 y T08 superaron la producción de la parental, lo que representan el 20% de las transformantes analizadas, mientras que las transformantes T23 y T07 solamente igualaron el nivel de producción de la silvestre las cuales figuran con un 20% también de las examinadas y las demás transformantes exhibieron una caída en sus niveles de producción que en conjunto representan un 60% de las transformantes estudiadas.

Por lo que se sugiere es llevar a cabo una cinética de las mejores transformantes para ambos sistemas, para comparar si realmente las mejores transformantes mantienen su producción a lo largo del tiempo y lograr establecer en que periodo es recomendable llevar a cabo un análisis estadístico de medias que me permita establecer diferencias significativas entre llas transformantes con respecto a la parental.

RANGO DE PORCENTAJES DE INCREMENTOS Y DECREMENTOS EN LA PRODUCCION DE LOVASTATINA EN FERMENTACION SÓLIDA.

RANGO DE INCREMENTOS (%)	+60.48 a +1.03
RANGO DE DISMINUCIONES (%)	-16.06 a -89.86.

Tabla. 7.7.2.3. Porcentajes de incrementos y decrementos en FS, donde el efecto de la transformación para obtener sobreproductoras es más negativa que positiva.

Transformantes con pUAMJB3	FERMENTACIÓN SÓLIDA (FS)		FERMENTACIÓN LIQUIDA (FL)	
	Producción LOV (mg Lov/gms)	Incremento %	Producción LOV (mg Lov/mL)	Incremento %
Parental	14.50 ± 1.25	0	0.875 ± 0.05	0
T11	23.27 ± 3.02	60.48	1.232 ± 0.16	40.69
T08	19.89 ± 0.79	37.17	0.730 ± 0.05	-16.56
T26	12.17 ± 0.54	-16.06	1.111 ± 0.09	26.84
T23	15.62 ± 0.28	7.72	1.034 ± 0.12	18.08

Tabla 7.7.2.4. Comparación en la producción de lovastatina entre las mejores productoras tanto en FS como en FL.

La tabla 7.7.2.4. nos permite observar de manera rápida las producciones de las mejores transformantes en ambos sistemas y a la vez podemos notar que pasa con esa misma sobreproductora en un sistema con respecto de el otro.

7.11 Cinéticas de producción de lovastatina en FS de las transformantes T11 y T08.

Se puede apreciar en las cinéticas (Fig. 7.7.3 y Fig 7.7.4) lo que en la fermentación al 7º día nos venía indicando, que la transformante 11 supera en producción a la parental y a las transformantes 23 y 26, que también en FL superan a la parental, observándose para todas que para el día 7 (168 horas) la producción ya no se incrementa, se mantiene constante, por lo que con esperar 7 días de producción es más que suficiente para iniciar un proceso de separación.

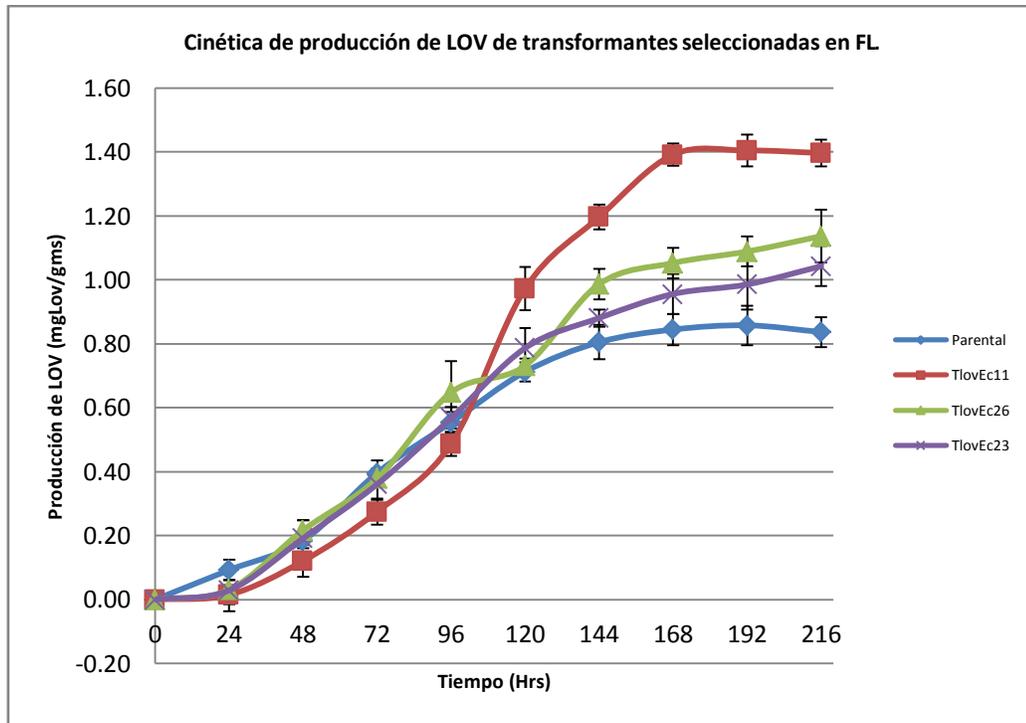


Fig. 7.7.3. Cinéticas de Producción de lovastatina de las transformantes T11, T26 y T23 en FL.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.203	3	.068	23.542	.000
Intra-grupos	.023	8	.003		
Total	.226	11			

Tabla 7.7.3.1 Tabla de anova de producción de lovastatina de transformantes lovE en FL.

	Condición	N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	Parental	T23 y T26
HSD de Tukey(a)	1.00	3	.8750		
	4.00	3		1.0346	
	3.00	3		1.1133	1.1133
	2.00	3			1.2333
	Sig.		1.000	.340	.096
Duncan(a)	1.00	3	.8750		
	4.00	3		1.0346	
	3.00	3		1.1133	
	2.00	3			1.2333
	Sig.		1.000	.110	1.000

Tabla 7.7.3.2 Comparación de medias de producción de lovastatina de transformantes lovE en FL.

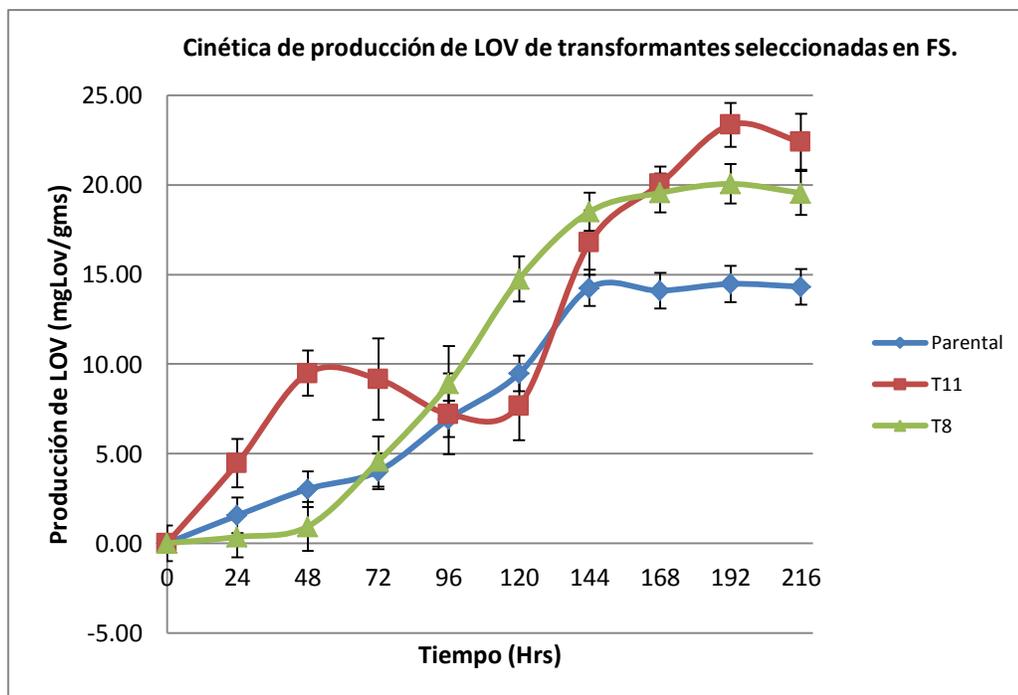


Fig. 7.7.4. Cinéticas de Producción de lovastatina de las transformantes T11, T26 y T23 en FS.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	92.974	2	46.487	582.056	.000
Intra-grupos	.479	6	.080		
Total	93.453	8			

Tabla 7.7.4.1 Tabla de Anova de producción de lovastatina de transformantes lovE en FS.

	Condición	N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	Parental	T8
HSD de Tukey(a)	1.00	3	14.7467		
	2.00	3		18.8667	
	3.00	3			22.6167
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan(a)	1.00	3	14.7467		
	2.00	3		18.8667	
	3.00	3			22.6167
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Tabla 7.7.4.2 Comparación de medias de producción de lovastatina de transformantes lovE en FS.

7.12 Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con *lovE* con promotor constitutivo por medio de PCR.

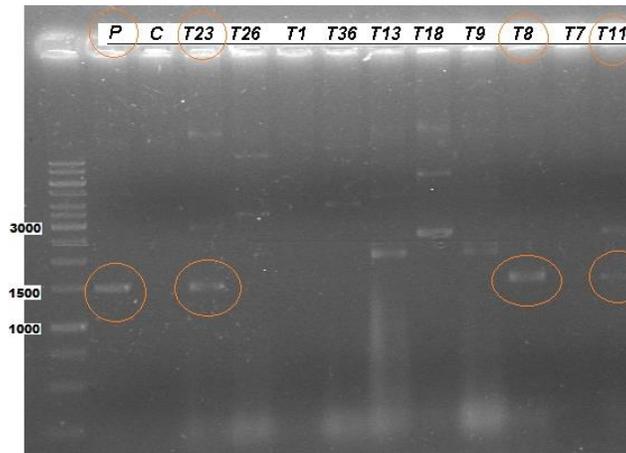


Fig. 7.10. Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con *lovE* con promotor constitutivo por medio de PCR.

Se aprecia a simple vista que las transformantes 8 y 11 muestran bandas más intensas que la parental, y también, aunque de manera más tenue las transformantes 7, 14 y 23. Esto sugiere que efectivamente estas transformantes antes mencionadas tienen el inserto de interés y sea la explicación por la cual efectivamente hubo una sobreproducción de lovastatina debido al incremento de la dosis génica en *Aspergillus terreus*.

7.13 Southern blot.

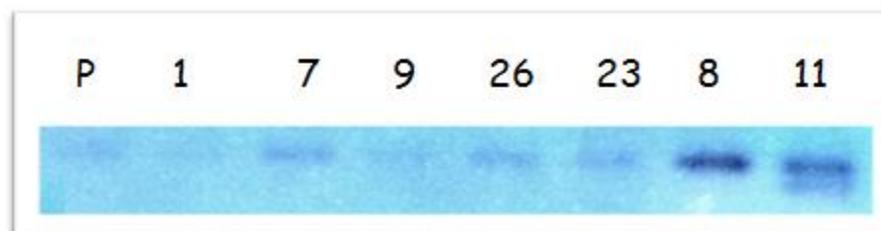


Fig. 7.11. Comprobación de la Integración de la construcción a las transformantes con *lovE* con promotor constitutivo por medio de la técnica de Southern blot.

Se aprecia a simple vista que las transformantes 8 y 11 muestran bandas más intensas que la parental, y también, aunque de manera más tenue las transformantes 7, 14 y 23. Esto sugiere que efectivamente estas transformantes antes mencionadas tienen el inserto de interés y sea la explicación por la cual efectivamente hubo una sobreproducción de lovastatina debido al incremento de la dosis génica en *Aspergillus terreus*.

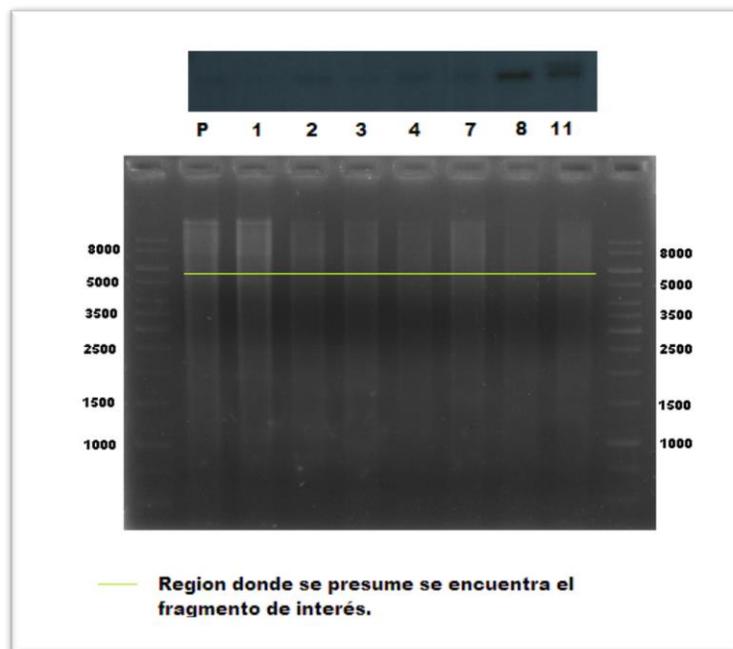


Fig. 7.12 Integridad del ADN de las transformantes seleccionadas.

Se llevó a cabo la técnica de Southern blot para confirmar la presencia indudable e inequívoca de la construcción. Según el resultado, solamente las transformantes T8 y la T11 se les puede apreciar que incrementaron su dosis génica al notarse bandas más intensas que las demás transformantes.

7.14. Clonación del gen *lovH* completo en vector pAN52.1

Se consultó la base de datos NCBI para obtener la secuencia del gen *lovH* (Fig. 7.14.2) para diseñar los primers para amplificar este gen previo análisis de cortes con enzimas (Fig. 7.14.1).

Respecto al vector pAN52.1 no se tenía suficiente por lo que se tuvo que amplificar, se realizó transformación en *E. coli*. Los ADNs plasmídicos se digirieron con la enzima *NcoI* y se seleccionó la colonia 3 (Fig. 7.14.4) ya que presentó el tamaño correspondiente de 5.5 kb al linearizarse y buena concentración. Finalmente la colonia 3 que lleva el vector pAN52.1 se amplificó a gran escala para proseguir con la clonación con el gen *lovH* cds.

Se procedió a la digestión, con *NcoI* del vector pAN52.1 y del gen *lovH* cds. Después se efectuó la ligación, la transformación de *E. coli* y finalmente las minipreps.

Se observó que dicha construcción, llamada pUAMDM1, sin digerir presenta mayor

tamaño molecular respecto a las demás y al digerirse con *NcoI* se corta en 2 fragmentos obteniéndose el gen *lovH* cds (2.25 kb) y el plásmido linearizado (5.7 kb) de tamaños adecuados. Acto seguido se realizó una prueba de cortes con diferentes enzimas, demostrándose que el inserto se encontraba en el sentido de lograrse transcribir adecuadamente (Fig. 7.13.1). Finalmente esta construcción se amplificó a gran escala para proseguir en un futuro con la transformación en *A. terreus* (Fig. 7.13.2).

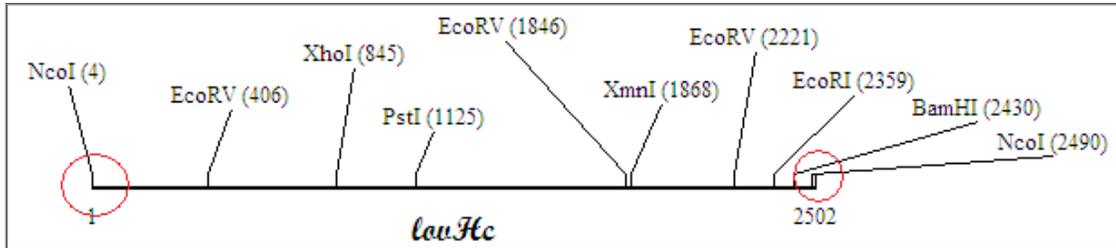


FIG. 7.14.1 Tamaño del gen *lovH* indicando la localización de los cortes con la enzima *NcoI*.

```

Del 26115 al 28617
Tamaño del inserto: 2502 pb.
CORTES NcoI
C/CATGG
tagaacacata ccagaaccv catggcaatct ctataacgggc etatatagta gtctctcaata
togaattatg tctctctcca taataagaac aaattogett ttggetagtea tctcaatgccc
aagtggaaaag tgggagaagt tctcaatgccc aagtgaaaag tgggggaaaac caaggcattg
gcccagcatea ttgctcaagca aatctctgggt tgcctctcca gaaggagtcg caattgtccc
atccattggt attctctctoy ggttgaagta tatgtcccag aactggccgt ctccgggtac
accaaagcggg ctgattatcca agttatatga agagccgggtg ctagtgtgctg tagtggagcgc
attggcgaca tctgtaatcca tctagggttg etctgtccat gaggggcgttg gaettcgtga
tatcgttctg ggaataaaaa gcctctctctc taaattctgg agggaggaggg caatatcgtct
accagcactg gccacttggc ttaatttctga ccagatagat gcagatgacc tattggatgc
cgaaocggctc gtgtatatgy cgaagaaaagt gaggatctcc atgtctctgt aatggatcgg
ctggtctctcc tcccacatgt ggaactagat tcccctgact gagatccaaag aatagttcag
gaaatgctca tgaagtacat ccccaggtta ggtatgctg aagagggctcg caccggaaagc
ttactctgctg aaattgctga aaccagattt acacccatcg cacaattgct tgaaccagcat
cagacaaatcc ccagcgtggt gtaggccagac agcccccctt tctctgctcc aaatgctgtt
atgcagaaagt acccaaccgc tccagagctgc aaactccacc tgcctgtgacc agatatactc
ttccagagggc ctattccggat ctccggtaag ccagtaactgc tcaatgttcca cgtgcacatg
gctaaagtctt ccagcacttc tccggataag gggggggaag ccactctgct ccattttgct
ggattttgct gactataagc ccagatatac ctctccaaag atgaatgcca agcgtatcgg
tgcgcgaaaa gcattttgta gtgggcgagc ggagtcctat ggaggccaatg gtaocgtgca
gtcaatagag ggcaataggg aggccttgcg ccccaatgat gatacgtgct tctaaatctc
atagtaagcg aaatgctcag aaaaagaaagc aagtttttga cgaaccatga ccaggaagat
gctccagaae aagtctttag gctggtgcgc cccagccccc tctctcgttg gggggctcgt
tctcgttcaa tggagtcaca tgaactcggc caactcgcag aactgagcaa agatagtcag
aaaaattgoc aaatccaaat actccattgc ccaactgccc ttagtataat aaagtccagc
caagtcccaa aggttaggctt gtaagaagca ccaacacaaa gaggccocgt atattcgata
gocggggttt aacaagagtt tccaatcgat tatagcaatg cctgatatta ccagcagggc
ttatgatcat ataatctatt ggtatgtctt gctctgtgca tcccacagat ttgttcgcaa
ttgatgtttg agtcagggcc tgaagccaaa tgcagttgaa agaggtcaatc caaacccaggt
ccggagggccc agttctgatt gtgtaactgag attcacatgc gtcacataata gtctgtgacc
taaatatagc gactcgtgga tgcagctctt tgaatatctc gttgatagac ggtccacata
gagcgcggggg tggagagagc ggggagaaag tatcgttttc ggatgcgat agtgttggga
tactctcaat gatctgttga agcgtttctc tgcctcagc caccctcagc ccacacagctg
accagcttg ggggtccaaat gggacactct ctgcgaactg gcccctggctc atatcgacgc
gtacccaaag agtttaggttg gctttagcag cctgtgcctc catgacagat gaaacaaaag
agccataaac gtggagaggg cagaatccat ctctctcggg ggggtgaagt tgtttgctcg
agcaaaagt tactccacac tctctgagc tgggtgagct tgtgtaccgc cttctctgtg
actgtggcct tgatagatca cgaagccctt gatgggcaat aataaaagga aggcactcgtt
ggagggccatg ttgatatact ccaacccagc tcccagactt ctgcagctgc ccgcgcctg
ctgagagctca gaaagacagc tatttgacc aaatatagac cactctctca cttaccattt
tctctgttgg ttgaccctgtg taaactttgt ggagaaatca cagggttaggt tatatcggag
gcaatggggc caactttggc cctctctgct gcattggacc ttaccggacc ggcactctc
actgcaaggc aatgctctgc gcttgaaga caactctgca ctctc | catggcaaaac | ca
    
```

Fig. 7.14.2 Secuencia del gen *lovH* indicando la localización de los cortes con la enzima *NcoI*.

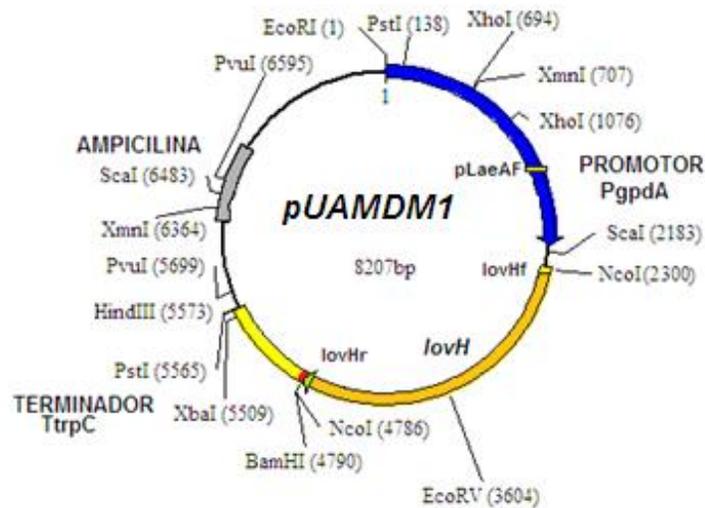


FIG. 7.14.3. Construcción del plásmido pUAMDM1 con promotor constitutivo donde viene clonado el gen *lovH* para posteriores transformaciones.

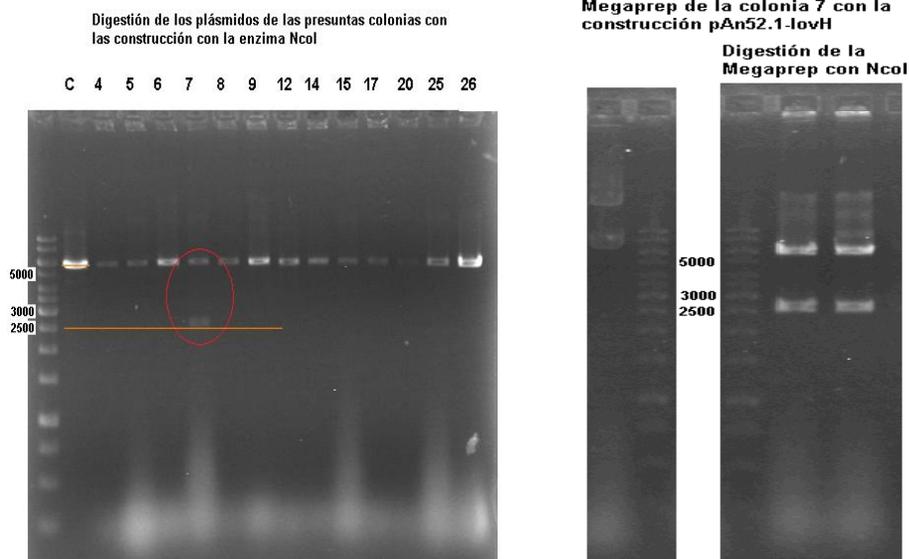


FIG. 7.14.4 Amplificación del gen *lovH* por PCR y comprobación de que el inserto se encuentra en la construcción por medio de la digestión de la Megaprep con la enzima *NcoI*.

Mapa de la construcción (Fig. 7.14.3) mostrando su promotor, inserto, terminador, resistencia a ampicilina, junto con el sentido de la transcripción. Podemos observar que el sentido de la transcripción del inserto va en sentido contrario al sentido del promotor, esto va a generar un gen antisentido que si se transformara como reporta Hutchinson interrumpiría al gen *lovH* en *A. terreus*, impidiendo la producción de lovastatina.

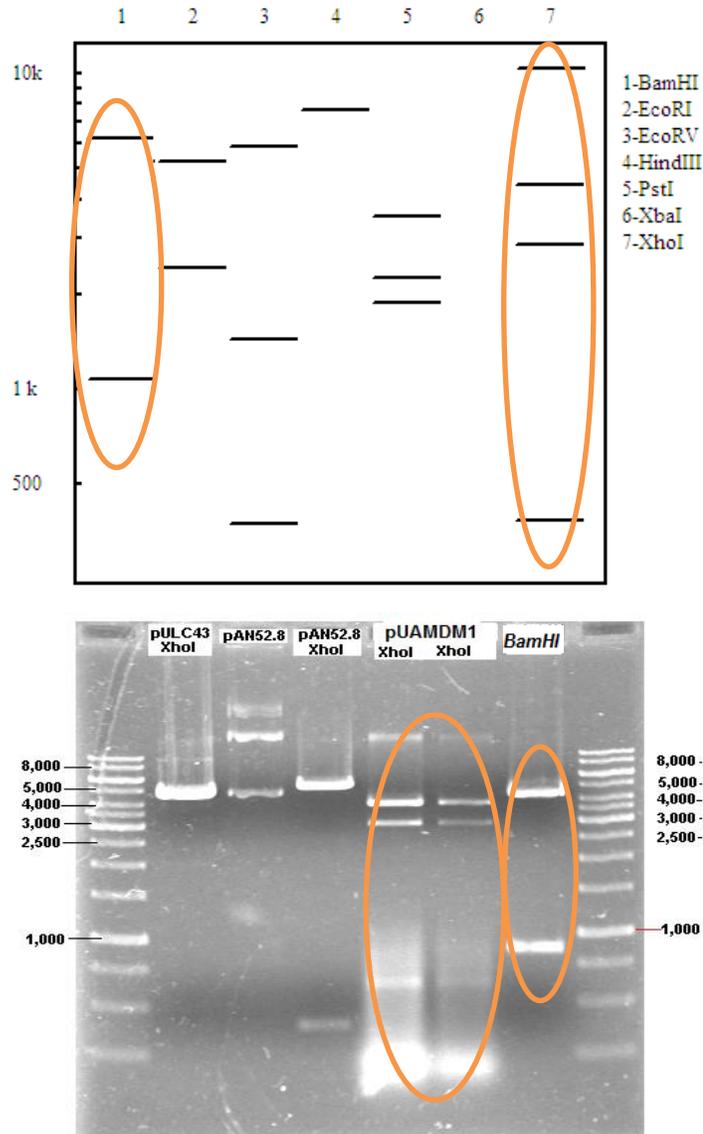


FIG. 7.14.5. Prueba de cortes con las enzimas *XhoI* y *BamHI* del plásmido pUAMDM1 para corroborar la presencia del inserto y del correcto sentido de inyección del gen *lovH*, si correspondía al simulado por el programa DNAMAN.

Mostramos la miniprep (Fig. 7.14.5) donde se muestran dos bandas definidas que coinciden con la predicción hecha con el DNAMAN sobre los cortes hipotéticos de esta construcción dándonos 2 bandas de 2500 pb y de 5800 pb aproximadamente. Indicándonos el sentido erróneo con el que el inserto se ligó al vector.

Se llevó a cabo un PCR (Fig. 7.14.6) para confirmar la presencia del inserto en la construcción en el sentido correcto utilizando un primer forward que abarca parte del promotor del pAN52.1 y que incluye 954 pb hasta el sitio de corte NcoI (pLaeAF) y el primer reverse *lovHr* (Los primer *lovHf* y *lovHr* ayudan a amplificar el gen *lovH* del genoma de *Aspergillus terreus*).

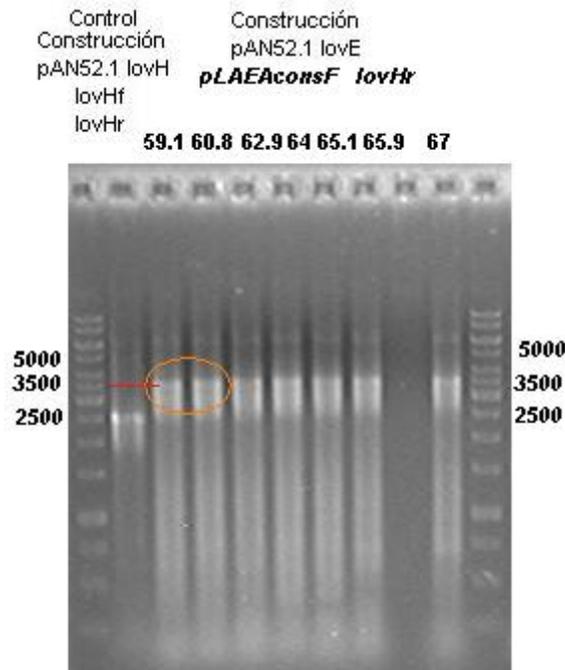


FIG. 7.14.6 PCR para confirmar la presencia del inserto en la construcción en el sentido correcto utilizando un primer forward que abarca parte del promotor del pAN52.1 y que incluye 954 pb hasta el sitio de corte NcoI (pLaeAF) y el primer reverse *lovHr*

8. DISCUSION DE RESULTADOS.

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *lovE* sobre la producción de lovastatina y sobre otros aspectos fisiológicos en *Aspergillus terreus*, en FS y FL. Esta sobreexpresión se realizaría al incrementar la dosis génica del gen *lovE*, el cual sería expresado desde un promotor constitutivo.

Esto se llevó a cabo transformando una cepa de alta producción de lovastatina con la construcción pUAMJB1 la cual tiene la región codificadora del gen *lovE* unida al promotor (constitutivo) del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans*.

Desde el punto de vista aplicado, interesaba evaluar lo anterior como estrategia para incrementar la producción de lovastatina en el mejoramiento genético para *A. terreus*. También se deseaba ver si con esta estrategia se podían generar cepas sobreproductoras con ventajas en FS y/o en FL.

Desde la óptica de ciencia básica, resultaba interesante ver si esta sobreexpresión afectaba otras características como crecimiento, morfología y esporulación (con regulación más arriba en la cascada de transducción de señales cAMP-PKA).

En esta tesis se clonó el gen *lovH*, que es otro gen regulador dentro del cluster de lovastatina, que sin embargo no ha sido estudiado. La región codificadora del gen *lovH* se unió a un promotor constitutivo en el vector pAN52.1, en forma análoga a lo que se hizo con el gen *lovE*. Esto prepara el camino para una investigación sobre el papel del gen *lovH*.

En cuanto al gen *lovE*, en esta tesis se transformó la construcción en *A. terreus* y se aislaron 36 transformantes, de las cuales sólo 4 pudieron confirmarse con la construcción integrada.

Confirmación de la construcción pUAMJB3

Se comprobó que el plásmido pUAMJB1 contiene el gen estructural o región codificadora del gen *lovE*. Esto se hizo por medio de una doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*, liberando el gen del vector. En un gel de agarosa se detectaron dos bandas: el vector de clonación pAN52.1 con un tamaño de 5,701 pb y la banda inferior cuyo tamaño coincide con el tamaño de la secuencia codificadora del gen *lovE* que es de 1,516 pb. La secuenciación de este fragmento confirmó que se trata de la región codificadora del gen *lovE* de *A. terreus*.

Cotransformación

Debido a que esta construcción pUAMJB1 no contiene un marcador para hongos que haga posible su selección, fue necesario utilizar la técnica de cotransformación junto con el plásmido pULC43, el cual tiene un marcador de resistencia a fleomicina. Sin embargo, el proceso de cotransformación fue poco eficiente, pues sólo se obtuvieron 2 ó 3 transformantes en cada proceso. Así, fue necesario repetirlo varias veces para obtener las 36 transformantes estudiadas.

Efecto sobre la morfología

Se observó en todas las transformantes una morfología de colonia diferente a la de la parental. Sin embargo, un control transformado sólo con el vector mostró una morfología similar a la de las transformantes. Por lo anterior se concluye que la variación en morfología no parece ser debida a la sobreexpresión del gen *lovE* sino que muy probablemente se debió a cualquiera de los dos vectores.

Efecto sobre la Tasa de Crecimiento Radial (TCR)

Algunas transformantes mostraron TCR más alto que la parental, sobresaliendo la transformante confirmada T8.

Otro grupo mostró una TCR similar a la parental, sobresaliendo las confirmadas T11 y T26. En el grupo con TCR menor a la parental sobresalió la confirmada T23 con una tasa muy baja.

El control mostró un incremento también en la TCR, por lo que pensamos que la TCR puede estar relacionada solamente con la producción de lovastatina como una forma de regular el crecimiento de la colonia de *Aspergillus terreus*.

Efecto sobre la esporulación

En este caso todas las transformantes mostraron un efecto negativo sobre este parámetro, bajando su índice de esporulación. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del gen *lovE* está influenciando genes o proteínas más arriba en la vía de señalización cAMP-PKA. En un trabajo futuro sería interesante comparar la expresión del gen *bria* en las transformantes con la parental, para ver si es a ese nivel que la

sobreexpresión de *lovE* afectó a la esporulación.

Preselección de transformantes por fermentación en cilindro de agar.

En este trabajo, el método de preselección de FCA fue de gran utilidad ya que permitió reducir el grupo de 36 transformantes a sólo 10 con aparente producción mayor a la parental, en las cuales fue posible concentrarnos en la caracterización posterior.

También se observó que la cepa control, transformada sólo con el vector, mostraba un nivel de producción ligeramente menor a la parental, indicando que el efecto sobre la producción observado era debido al gen *lovE*.

Las 4 transformantes que exhibieron mayor producción de lovastatina en FCA fueron T11>T08>T23>T26.

Resulta destacable que estas mismas transformantes fueron las que mayor producción mostraron en FS y en FL. El orden de nivel de producción de las primeras 3, descrito arriba, fue el mismo en FS.

Finalmente, el porcentaje de sobreproductoras de lovastatina en FCA fue del 27.7% de las transformantes obtenidas originalmente.

Producción de lovastatina por Fermentación Líquida y Solida.

En un segundo paso de selección, se determinó la producción de lovastatina de las transformantes preseleccionadas en FL y FS a un tiempo de 7 días.

Fermentación Líquida

A pesar de los resultados en FCA, sólo 3 de las transformantes preseleccionadas produjeron más que la parental en FL: T11, T26 y T23.

En esta parte se determinó que la cepa parental tuvo una producción de lovastatina de 0.875 ± 0.055 mg Lov/mL.

La mejor transformante fue la T11, con una producción de 1.232 ± 0.16 mg Lov/mL que representa un incremento del 40.6%.

La segunda resultó la T26, que tuvo una producción de 1.111 ± 0.085 mg Lov/mL, lo cual representa un incremento del 26.8%.

En tercer lugar quedó la T23 con producción de 1.034 ± 0.12 mg/mL (18.08% de incremento).

Estos resultados son interesantes, pues los niveles de producción para FL son mayores a la generalidad de los reportados en la literatura, que están entre 0.06 a 0.8 mg/mL (Novak *et al.*, 1997; Hajjaj, 2001; Jia *et al.*, 2009).

Es intrigante el que 5 de las cepas transformantes tuvieron una fuerte disminución en su producción, hasta de -91.6% en la T34. Esto podría explicarse por el sitio de inserción de la construcción en el ADN genómico.

Fermentación Sólida

El panorama de producción fue similar en FS de 7 días. Hubo también 3 transformantes sobreproductoras en FS: T11, T08 y T23.

Así, las mejores productoras en FS fueron la T11 con una producción de 23.27 ± 0.30 mg Lov/mL y la transformante T8 con producción de lovastatina de 19.89 ± 0.78 mg Lov/mL. Esto representa incrementos en la producción de lovastatina de 60.53 % y de 37.19 %, respectivamente.

Los importantes incrementos en producción de lovastatina causados por la sobreexpresión del gen *lovE* hacen que el nivel de producción de T11 sean superiores a cualquiera que haya sido publicado en la literatura, donde los más altos son 20 mg/gms, publicado por nuestro grupo (Baños *et al.*, 2010), seguido de los 16.78 mg de lovastatina/gms reportados por Valera *et al.* (2005).

Otro punto interesante es que la T11 fue la mejor en FS y FL. Esto es algo que no habíamos visto en trabajos anteriores en los que se habían estudiado métodos de mejoramiento genético molecular para penicilina y para lovastatina. En estos estudios se han encontrado transformantes buenas para FS o para FL, pero no para los dos (Campos *et al.*, 2008; Baños, 2010).

En un intento por correlacionar esta capacidad de producir bien en uno u otro sistema, con alguna característica fisiológica (fácilmente medible), encontramos cierta correlación con la TCR y el crecimiento en FL. Los resultados encontrados sugieren que la TCR tiene cierta relación con la capacidad de crecer y producir bien en FS. En contraparte, el crecimiento obtenido en FL también parece tener relación con la capacidad de producir

bien en FL.

Resultó interesante que la T11, es buena en ambos sistemas (la mejor), mostrando una TCR y crecimiento en FL similar a la parental.

También que la T8, considerada especialista en FS (no produce bien en FL), mostró una TCR muy alta (0.88) junto con un crecimiento bajo en FL (11.9). En forma opuesta, la T26, especialista en FL, tuvo una TCR relativamente baja (0.52), pero un crecimiento en FL ligeramente superior a la parental (13.7). Estos datos sugieren que la capacidad de lograr alta producción en FS está relacionada con una TCR alta.

Aunque son pocos los datos, la hipótesis es muy interesante y potencialmente de gran utilidad para desarrollar métodos para encontrar (screening) cepas sobreproductoras para FS. También es interesante para investigarlo desde el punto de vista de la llamada fisiología del medio sólido, es decir la fisiología especial que muestran los hongos en FS y que está relacionada con una mayor producción de metabolitos secundarios y enzimas (Barrios-González y Mejía, 2007). En estudios futuros sería muy interesante confirmar esto, ya que podría aplicarse a métodos de selección racional para cepas especiales para FS, al seleccionar para esta característica fácilmente detectable.

Cinéticas de producción

FL

Las cinéticas de producción mostraron que la obtenida en T11 se debe a una mayor tasa de producción a partir de las 96 h y a que continúa produciendo hasta las 168 h, mientras que la parental produce sólo hasta las 144 h.

FS

En FS también la T11 supera a la parental y a las otras transformantes con una producción muy alta (23.27 ± 3.02). Esto es debido a que continúa produciendo hasta las 192 h, mientras que la parental dejó de producir a las 144 h. La T08 también deja de producir a las 144 h, pero muestra una tasa de producción mayor y muy constante.

Las cinéticas de producción mostraron que las diferencias con la parental de las 2 transformantes estudiadas se dan por causas distintas: en la T11, mayor tiempo de producción en FS pero mayor tasa de producción en FL. En la T08 fue por una tasa de producción mayor en FS.

En FL las T23 y 26 por mayor tiempo de producción. Así, al parecer, el efecto de la sobreexpresión de *lovE* es el incremento en el tiempo de producción, que puede también

revelarse como una mayor tasa de producción.

Confirmación de la integración de la construcción

Para verificar que se trataban de verdaderas transformantes, con más copias del gen *lovE*, se estudió la integración de la construcción a las transformantes (gen *lovE* con promotor constitutivo) por medio de PCR y por Southern blot.

Por PCR se encontró que la T23, T8 y T11 tienen la construcción y quizás la T26.

Por Southern blot, con bandas muy intensas la T8 y T11 (multi copia) y también, aunque de manera más tenue la T23 y T26.

Tomado junto, lo anterior indica que efectivamente las transformantes T08 y T11 tienen la construcción con el gen *lovE*, y de hecho en varias copias, ya que fueron confirmadas por ambos métodos y el Southern blot indicó que tienen varias copias.

Se concluye que también la T23 tiene la construcción, pues fue confirmada por PCR y en Southern blot, aunque parece tener menos copias que las dos anteriores.

La T26 mostró resultados parecidos en Southern blot, aunque en PCR no mostró resultados claros.

Por lo anterior, se concluyó que las T11, T08, T23 son verdaderas transformantes, y probablemente también la T26.

Construcción del plásmido pUAMDM1.

Los resultados del patrón de cortes con las enzimas *XhoI* y *BamHI* cumplen satisfactoriamente con el propósito de corroborar el sentido de la transcripción del gen *lovH* en el vector, debido a que como tiene dos cortes *NcoI*, pudo haberse integrado en el sentido inverso, lo que daría como resultado el bloqueo de la traducción del factor de transcripción *LovH*, debido a que se generarían copias con la secuencia complementaria formando un duplex que impediría la unión de los codones del ARN mensajero con los anticodones presentes en los ribosomas.

El patrón de cortes arrojado por el DNAMAN coincide con el obtenido en el gel de electroforesis donde se llevó a cabo la digestión de la construcción con las enzimas mencionadas anteriormente, lo que indica una excelente integración del mismo, pero además se llevó a cabo una amplificación por PCR del vector pUAMDM1, cumpliendo también con el tamaño que aunque se esperaba de 3440 pb, resultó de 3500 pb, lo que nos sugiere que efectivamente el plásmido construido es el que pretendíamos.

9. CONCLUSIONES

Con el método propuesto es posible el mejoramiento genético de cepas productoras de lovastatina para FS, pero también para la FL. Algunas transformantes pueden ser sobreproductoras para ambos sistemas.

Sin embargo, el sistema de cotransformación utilizado le quitó eficiencia a este método de mejoramiento genético. Es decir que de 36 transformantes originales sólo 4 fueron verdaderas transformantes con *lovE*. Es decir, sólo el 11.1%.

La técnica de preselección con FCA le agregó eficiencia a la estrategia general ya que, con poco esfuerzo, permitió de entrada desechar 26 transformantes y concentrarnos en las 10 transformantes que mostraron mayor producción que la parental en FCA. Así, la integración de la FCA como parte del método subió la eficiencia global del proceso a 40% (es decir 40% de las cepas preseleccionadas resultaron sobreproductoras, lo cual es un porcentaje notablemente alto para un método de mejoramiento genético).

Con la información del Southern blot disponible, se concluye que todas las transformantes confirmadas con copia(s) adicional(es) de *lovE* fueron sobreproductoras de lovastatina en uno u otro sistema de cultivo. Su desempeño se resume a continuación.

En FS, la T11 mostró un incremento de producción de 60.48 %, llegando a 23.27 mg de lovastatina/gms. Siguió la T08 con incremento de 37.17% (19.89 mg/gms), y después la T23. Por el contrario, la T26 (2ª mejor productora en FL) mostró un decremento en producción de 16% en este sistema. En FL, la T11 tuvo un incremento en la producción de 40.69% (0.875 mg/mL), la T26 mostró un aumento de 26.84% (1.111 mg/mL), y la T23 un incremento de 18.08% (1.034 mg/mL). En FL la T08 (segunda mejor en FS) tuvo una pérdida en producción de 16.56%.

Por otro lado, los resultados sugieren que la sobreexpresión de *lovE* incide negativamente en la conidiación. No hay ningún antecedente similar en la literatura. Es poco probable que LovE pueda interactuar con promotores relacionados con esporulación, sin embargo es posible que LovE interactúe con elementos de la cascada de señalización cAMP-PKA.

Disponemos también de una construcción pUAMD1, la cual tiene el gen *lovH* en un promotor constitutivo, pero se requiere introducirle un marcador para hongos, previamente antes de transformar en *Aspergillus terreus*.

10. PERSPECTIVAS.

Está a la vista el diseño de un método de mejoramiento genético similar pero mucho más eficiente: sobreexpresar el gen *lovE* desde un promotor constitutivo, pero esta vez utilizando un vector con marcador para hongo (que puede ser el mismo pAN52.1 con el gen de resistencia a fleomicina), de manera que se evite la cotransformación. Esto eliminaría la baja obtención de verdaderos transformantes con la construcción.

También sería prometedor incrementar el número de copias de *lovE*, simultáneamente con otros genes reguladores como *laeA*.

En estudios futuros sería muy interesante confirmar la hipótesis de que la capacidad de alta producción de lovastatina en FS está relacionada con una alta TCR. Confirmando esto, se podría desarrollar fácilmente un método de selección racional para cepas especiales para FS, ya que es una característica fácilmente detectable.

Por último, con el gen *lovH* ya clonado (y con un promotor constitutivo) sería ya factible evaluar su efecto sobre la producción de lovastatina y quizás esclarecer un poco la función de este segundo factor transcripcional en el cluster de lovastatina.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Alberts A. W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., López M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers- Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J. y Springer J (1980). Mevinolin a highly potent competitive inhibitor of hidroxymethylglutaryl CoA reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. 77: 3957-3961.
2. Baños JG, Mejía A., Garay A. y Barrios Gonzalez J, (2007) Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidativo, XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería June 25. Morelia, Michoacán, México.
3. Baños JG, Tomasini A, Szacás G, Barrios Gonzalez J, (2010). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng* 108:105-110.
4. Barrios-González, J. y 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: 262-296.
5. Barrios-González J, Miranda Uri R. (2010) Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85:869-883.
6. Bennet J. W. *Mycotechnology* (1998). The role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 1998. 66: 101-107.
7. Berdy, J. (1980). Bleomycin type antibiotics. *Handbook of antibiotic compounds*. 4:459-491.
8. Bigelis R, He H, YangHY, Chang LP, GreensteinM(2006) Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:815–826
9. Bizukocjc M., Pawlowska B y Ledakowicz S. (2007). Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatina biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 127: 258-268.
10. Bok JW, Keller NP. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell.*; 3(2):527-35.
11. Brakhage AA.(1998). Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(3):547-85.

12. Campos, C., Fernández, J. F., Sierra, C. E., Fierro, F., Garay, A. y Barrios-González, J. (2008). Improvement of penicillin yields in solid-state and submerged fermentation of *Penicillium chrysogenum* by amplification of the penicillin biosynthetic gene cluster. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:3017-3022.
13. Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J. M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E. y Chisti Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb. Technol.* 2003. 33: 270-277.
14. Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J. M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E. y Chisti Y. (2004). Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of the response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 33: 170-177.
15. Cuadra T. Fernández F.J., Tomasini A. y Barrios-González J. (2008). Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Lett Appl Microbiol.* 46:216- 220.
16. Demain A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl Microbiol* 1: 259–264.
17. Durand A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13:113–125.
18. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K (1976) Competitive inhibition of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72:323–326
19. Fernández J., Hernandez M., Rios G. y Gutierrez C. (2003). Cholesterol biosynthetic pathway *J. Antibiot.* 16:234-246.
20. Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P (2001) Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2596–2602.
21. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-580.
22. Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J. y Hecht, S.M. (1985). ADN methylation diminishes bleomycins-mediated strand scission. *Biochem.* 24:5285-5289.
23. Hölker U. y Lenz J. (2005). Solid-State Fermentation are there any biotechnological advantages?. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 301-306.
24. Holmes, D. S. y Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem.* 114: 193-197.

25. Hutchinson R, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J,(2000) Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 287-295.
26. Jia Z, Zhang X y Cao X (2009) Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 2009; 4: 672–677.
27. Jones K.D., Couldwell W.T., Hinton D.R., Su Y.H., He D.K., Anker L., Law R.E. (1994). Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 205: 1681-1687.
28. Keller, N. P., y Hohn, T.M. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 21:17–29.
29. Kumar M.S., Jana S.K., Senthil V., Shashanka V., Kumar S.V. y Sadhukhan A.K. (2000 b). Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochem.* 36: 363-368.
30. Kumar, S. M., Kumar, M. P., Sarnaik, M. H. y Sadhukhan, K. A. (2000). A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *J of Microbiol Methods.* 40: 99-104.
31. Kumar M.S., Pallapothu M.K., Hemant M.S. y Sadhukhan A.K. (1999). A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *J. Microbiological Methods.* 40: 99-104.
32. Lai L.S.T., Kuo C.M. y Tsai S.Y. (2001). Influence of increased dissolved oxygen tensions by agitation on secondary metabolite production by a mutant of *Aspergillus terreus* in a 5L fermentor. *J. Chinese Inst. Chem. Engrs.* 32: 135-142.
33. Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
34. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs (2002). *Applied Microbiology biotechnology.* 58: 555-564.
35. Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of ADN *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155: 335-350.
36. Newman A., Clutterbuck R.D., Powles R.L., Millar J.L. (1998). Selective inhibition of primary acute myeloid leukemia cell growth by lovastatin. *Leukemia.* 8: 2022-2029.
37. Novak N, Gerdin S, Berovic M (1997) Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-Batch process. *Biotechnol Lett* 19: 947-948

38. Ooijkass LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J, Rinzema A (2000) Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol* 18:356-360.
39. Pérez-Aguirre, A. Mejía-Álvarez, F. Fierro-Fierro, J. Barrios- González (2009) Clonación y sobreexpresión del gen regulador global *laeA* en *Aspergillus terreus* TUB-514: Efecto sobre la producción de lovastatina en fermentación sólida y líquida. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21 al 26 de junio, Acapulco, Gro.
40. Punt, P. J., Dingemans, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D. M., Pouwels, P. H. y Van den Hondel, C.A.M.J.J. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* 93:101-109.
41. Rodríguez-Porcel EM, Casas-López JL, Sánchez-Pérez JA, Chisti Y (2007) Enhanced production of lovastatin in a bubble column by *Aspergillus terreus* using two-stage feeding strategy. *J Chem Technol Biotechnol* 82:58–64.
42. Sanchez S, Demain AL . (2008). Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microb Biotechnol*.1(4):283-319.
43. Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
44. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Nueva York.
45. Specht, C. A., DiRusso, C. C., Novotny, C. P., y Ulrich, R. C. (1982). A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119:158-163.
46. Suryanarayan S. (2003). Current industrial practice in solid state fermentation for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem. Eng. J.* 13: 189-195.
47. Szakács György, Morovján György y Tengerdy P. Robert (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*. 20:411-415.
48. te Biesebeke R., Levin A., Sagt C., Bartels J., Goosen T., Ram A., Punt P.J., Van den Hondel C., and Punt P. (2005). Identification of growth phenotype-related genes in *Aspergillus oryzae* by heterologous macroarray and suppression subtractive hybridization in Solid State and Submerged Cultivated *Aspergillus oryzae*, *Mol. Genet. Genomics*. 273: 33-42.

49. Todd RB, Andrianopoulos A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol.* 1(3): 388-405.
50. Valera, H.R, J. Gomes, S. Lakshmi, R. Gururaja, S. Suryanarayan y D. Kumar. (2005). Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*.. *Enzyme and Microbial Technology.* 37:521–526.
51. Woo, B. J. y Keller, P. N. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell.* 3(2):527-535.
52. Yelton, M. M., Hamer, J. E. y Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using *trpC* plasmid. *P Natl Acad Sci U.S.A.* 81:1470-1474.

México D.F., a 25 de Enero del 2012.

El Jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM unidad Iztapalapa, aprobó la
Tesis
EFECTO DE LA SOBREEXPRESION DEL GEN *lovE* SOBRE LA PRODUCCION DE
LOVASTATINA, POR *Aspergillus terreus*, EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA.

Qué presentó

Agustín Daniel Martínez Velasco

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Dr. Francisco Fierro Fierro.

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dra. María del Rosario Terragó Castellanos

Vocal: Dra. Roxana Uri Miranda Labra

