

S2.16. Producción de lovastatina con cepas mutantes de *Aspergillus terreus* por fermentación sumergida

Jaime Daniel Babot¹, Osvaldo Daniel Delgado^{2,3}, Julia Inés Fariña^{1,3}.

¹ PROIMI-CONICET, Av. Belgrano y Pje. Caseros, CP4000, San Miguel de Tucumán, Argentina.

² CITCA-CONICET, Prado 366, CP4700, San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina.

³ FACEN-UNCA, A. Belgrano 300, CP4700, San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina.

Contacto: jifarina@yahoo.com

Resumen

La hipercolesterolemia es el principal causal de las enfermedades cardiovasculares. Recientemente, ha aumentado la venta de estatinas, drogas que disminuyen la concentración de colesterol en sangre. La lovastatina, un metabolito fúngico secundario, es producida industrialmente usando mutantes de *Aspergillus terreus*. El objetivo de este estudio fue analizar la producción de lovastatina, en placas y en fermentación sumergida (FSm), por una cepa *wild type* (*A. terreus* MEC) y dos mutantes (C10'-27 y S12,5'-9) obtenidos previamente. Para ello, extractos orgánicos obtenidos a partir de cultivos de 14 días en un medio agarizado con suero de queso (SQ) y harina de soja desgrasada (HSD) pulverizada se analizaron por TLC y RP-HPLC. Luego, se estudió la morfología de las cepas crecidas en medios sólidos. Finalmente, se evaluó la producción de lovastatina en FSm durante 14 días. Mediante TLC y RP-HPLC, se observó producción de menor cantidad de metabolitos, y en menor concentración, por *A. terreus* S12,5'-9 que por *A. terreus* MEC. Este mutante también mostró diferencias morfológicas más notorias que *A. terreus* C10'-27 respecto a MEC. Además, *A. terreus* S12,5'-9 fue el mejor productor de lovastatina en FSm (403,49 mg/l). Estos resultados sientan las bases para el uso de *A. terreus* S12,5'-9 en la producción industrial de lovastatina.

Palabras clave: *Aspergillus terreus*; producción de lovastatina; cepas mutantes.

1. Introducción

El colesterol cumple un rol vital en el metabolismo corporal y en el transporte de membrana, y actúa como precursor en la síntesis de diversas biomoléculas. Sin embargo, los cambios en los niveles de colesterol llevan a desórdenes cardiovasculares, como aterosclerosis e hipercolesterolemia, que son actualmente la principal causa de muerte a nivel mundial. Es por esto que el control del colesterol mediante la inhibición de su síntesis es una estrategia prometedora. El colesterol es sintetizado a partir de acetil-CoA a través de una vía compleja, en la que el paso limitante de la velocidad es la conversión de HMG-CoA a mevalonato, catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa. Esta enzima es inhibida por la lovastatina, un metabolito secundario fúngico que ya es usado como agente hipolesterolémico. Actualmente, la lovastatina es producida industrialmente usando cepas de *Aspergillus terreus*, sin embargo este proceso puede mejorarse mediante la manipulación genética de las cepas. Es por esto que el objetivo de este estudio fue analizar la producción de lovastatina, en placas y en FSm, por una cepa *wild type* (*A. terreus* MEC) y dos mutantes (*A. terreus* C10'-27 y S12,5'-9) obtenidos previamente.

2. Metodología

Extractos orgánicos obtenidos a partir de cultivos de 14 días de las 3 cepas en un medio agarizado con SQ y HSD pulverizada, optimizado para la producción de lovastatina [Cabral, 2010], se analizaron por TLC (fase móvil: benceno:acetona:ácido acético, 70:30:3) y RP-HPLC (columna C18, gradiente cóncavo de acetonitrilo y ácido acético 0,1 %), de acuerdo a Cabral (2010). Luego, se analizó la morfología de las cepas crecidas por 14 días en medios agarizados (Czapek malta y medio con SQ y HSD pulverizada) y sobre sustrato sólido (conteniendo SQ y HSD texturizada) [Cabral, 2010]. Finalmente, se evaluó la cinética de producción de lovastatina por las 3 cepas en FSm. Para ello, se inoculó el medio con esporas de cada una de las cepas y se incubó 14 días a 25 °C y 200 rpm en un agitador orbital. Se extrajo, con solventes orgánicos, la lovastatina de las muestras tomadas a intervalos regulares, y se cuantificó la misma mediante RP-HPLC.

3. Resultados y discusión

Mediante TLC, se observaron perfiles de bandas similares entre los extractos orgánicos obtenidos a partir de cultivos de *A. terreus* MEC y de *A. terreus* C10'-27, evidenciando algunas de las bandas (entre ellas la correspondiente a lovastatina) mayor intensidad en la cepa mutante. En cuanto al extracto derivado de *A. terreus* S12,5'-9, éste mostró un perfil de bandas más simple que el de *A. terreus* MEC y, a la vez, las bandas presentaron menor intensidad (a excepción de la banda correspondiente a lovastatina, la que mostró una notable mayor intensidad). En concordancia, al analizar los extractos por RP-HPLC se evidenció que la relación entre el área del

pico correspondiente a lovastatina y el área del segundo mayor pico en el cromatograma fue marcadamente mayor para *A. terreus* S12,5'-9 (100:1) que para *A. terreus* C10'-27 (5:1) y *A. terreus* MEC (2:1). Además, el cromatograma correspondiente a S12,5'-9 mostró menor número de picos que los correspondientes a las otras dos cepas. Estos resultados indican que *A. terreus* S12,5'-9 produce mayor cantidad de lovastatina que las restantes cepas y, además, la pureza de dicho metabolito en los extractos orgánicos es notablemente mayor.

Por otro lado, *A. terreus* C10'-27 mostró similar morfología que *A. terreus* MEC en ambos medios agarizados ensayados, así como también en sustrato sólido. Sin embargo, *A. terreus* S12,5'-9 mostró morfología distinta a *A. terreus* MEC: pérdida de coloración (en el medio con SQ y HSD pulverizada) y colonias de menor tamaño y con bordes irregulares (en Czapek malta). Además, en los cultivos en sustrato sólido se observó menor producción de conidios por este mutante que por *A. terreus* MEC y C10'-27 y pérdida de coloración de los mismos. Los cambios morfológicos, e incluso la pérdida de la capacidad para esporular, en *Aspergillus* spp. mutantes hiperproductores de metabolitos secundarios ya han sido informados por otros autores [Adams & Yu, 1998; Calvo y col., 2002; Shimizu & Keller, 2001] y se debería a que los reguladores globales del metabolismo secundario estarían involucrados también en la esporulación y en el crecimiento [Bok & Keller, 2003].

Finalmente, la producción de lovastatina en FSm fue mayor para el mutante *A. terreus* S12,5'-9 que para las otras dos cepas a partir de los 10 días de incubación. La producción final de lovastatina a los 14 días fue de 14,38, 77,52 y 403,49 mg/l para *A. terreus* MEC, C10'-27 y S12,5'-9, respectivamente.

4. Conclusiones

La producción de metabolitos diferentes de lovastatina por el mutante *A. terreus* S12,5'-9 es notablemente menor que en la cepa *wild type*. A su vez, la síntesis de lovastatina en este mutante es marcadamente mayor que en *A. terreus* MEC. Por ello, la purificación de lovastatina a partir de cultivos de *A. terreus* S12,5'-9 sería menos laboriosa y más eficiente, y por tanto, el proceso industrial de producción podría tornarse notablemente más rentable.

5. Bibliografía

- Adams T.H. & Yu J.H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 674-677.
- Bok J.W. & Keller N.P. (2003). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2): 527-535.
- Cabral M.E. (2011). *Producción biotecnológica de estatinas fúngicas de aplicación farmacológica*. Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Calvo A. M., Wilson R. A., Adams T. H. & Keller N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 447-459.
- Shimizu K. & Keller N.P. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 157: 591-600.