

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

---



**Efecto de la regulación por pH y la expresión del factor de transcripción PacC sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en *Acremonium chrysogenum***

**T E S I S**

**que para obtener el grado de**

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**M. en B. Alberto Cristian López Calleja**

**Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino**

**México, D.F. 2014**

**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino y con la asesoría de los Dres. Francisco Fierro Fierro y Octavio Loera Corral.**

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.**

**Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través del la beca de Doctorado No. 224728 y el proyecto “Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*” (ref. 82647).**

México, D.F., a 9 de Diciembre de 2014

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

**“Efecto de la regulación por pH y la expresión del factor de transcripción PacC sobre la  
producción de antibióticos beta-lactámicos en *Acremonium chrysogenum*”**

que presentó

**Alberto Cristian López Calleja**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

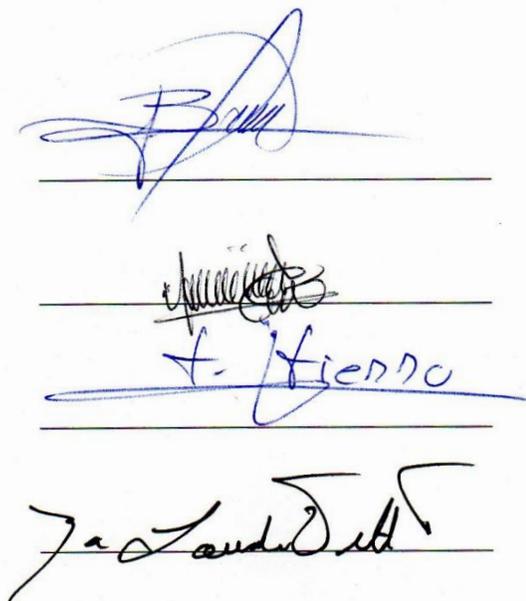
**Jurado:**

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written on a horizontal line. The top signature is the most stylized, the middle one is more legible and appears to be 'F. Fierro', and the bottom one is also stylized.

*“Las cosas que vemos son las mismas cosas que llevamos en nosotros.*

*No hay más realidad que la que tenemos dentro”*

(Hermann Hesse).

A mi familia.

A Mateo, Midori, Bershka, Pim y Meli.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera muy especial al Dr. Francisco José Fernández Perrino por haber dirigido esta tesis y por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo desde hace poco más de siete años. No encuentro manera de agradecer toda la confianza y apoyo incondicional que siempre depositó en mí. Miles de gracias por tu amistad, Paco.

Agradezco profundamente al Dr. Francisco Fierro por sus comentarios, sugerencias y apoyo continuo para la realización de este trabajo. A la Dra. Araceli Tomasini por el apoyo que siempre recibí de su parte. A los Dres. Octavio Loera, Javier Barrios y Lourdes Villa por la exhaustiva revisión de este documento y por las valiosas contribuciones que le aportaron.

Por supuesto que agradezco a todos mis compañeros de trabajo quienes de alguna manera contribuyeron a la culminación de este trabajo. A Jaime, Ulises, Jessie, Hugo y Lalo por el conocimiento y experiencia que amablemente compartieron en muchas ocasiones. También por su apoyo, críticas, ánimos, o simplemente por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, Gracias al Dr. Armando Mejía, Omar, Toño, Korelly, Ari, Wyl, Vicky, Tere, Rox, Moi, Kenia, Alma, Mary, Esme, Ailed... S-154, 153 y 150.

Un agradecimiento muy especial a Abraham, por todo su apoyo y dedicación justamente en las etapas finales del proyecto, que en ocasiones suelen ser las más difíciles de superar.

Finalmente, pero no por eso menos importante, quiero agradecer con el alma y corazón a Ara, mi compañera de vida. Sin todo tu apoyo emocional y sincero, este trabajo no hubiera sido posible ¡Muchas gracias Amor!

## RESUMEN

*Acremonium chrysogenum* es un hongo filamentoso productor de cefalosporina C (CPC), un antibiótico beta-lactámico de amplio espectro y baja toxicidad que sirve de base para la síntesis química de todas las cefalosporinas de uso clínico. Estas características hacen de la CPC un producto de alto valor agregado. Actualmente, *A. chrysogenum* es el único productor de CPC a nivel industrial. La biosíntesis de CPC se encuentra regulada por diversos factores y uno de los más importantes es el pH ambiental, que ejerce su función reguladora a través del regulador global de transcripción PacC. Cuando las condiciones ambientales de pH son entre ácidas y neutras la proteína PacC se encuentra inactiva, en una conformación cerrada. Cuando las condiciones cambian de neutras a alcalinas, se desencadena una cascada de señalización por pH que resulta en el rompimiento proteolítico del factor de transcripción PacC, llevándolo a su forma activa. Una vez activo, PacC regula positivamente la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC. Varios estudios han demostrado que la producción de CPC por *A. chrysogenum* es más alta cuando se utilizan sistemas de cultivo en estado sólido (SSF) en comparación con sistemas sumergidos (SmF). Además, se ha observado que existe un intervalo de valores de pH que favorece la producción de CPC, tanto en SSF como en SmF.

En el presente trabajo se estudiaron, desde un punto de vista molecular, las diferencias entre la producción de CPC en SSF y SmF por *A. chrysogenum*. Se realizó un análisis de expresión de los genes *cefD2* y *cefEF*, que codifican para dos enzimas limitantes de la biosíntesis de CPC, y del gen *cefT*, que codifica para una enzima involucrada en la secreción del antibiótico; en ambos sistemas de cultivo a pH controlado. Se encontraron diferencias importantes en los niveles de transcripción de estos genes, siendo estadísticamente mayor su expresión relativa (ER) en SSF. La ER máxima del gen *cefD2* en SmF fue apenas el 7.46% de la alcanzada en SSF, mientras que la del gen *cefEF* fue del 65.8%, y la del gen *cefT* del 42.4%. Estos resultados son las primeras evidencias que reportan diferencias a nivel transcripcional en los genes biosintéticos de CPC de *A. chrysogenum*, influenciadas por las condiciones del sistema de cultivo. Por otra parte, se activó constitutivamente el factor de transcripción PacC de *A. chrysogenum*, truncando el

gen *pacC* hasta el sitio correspondiente para que su expresión diera lugar a la forma activa de la proteína, creando un fenotipo de mimetismo alcalino. La mutación se introdujo en la cepa silvestre de *A. chrysogenum* y en la cepa de alta producción C10 y se observaron sus efectos sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en dos medios diferentes de cultivo, ambos amortiguados a pH ácido. Se observaron incrementos significativos en la producción específica de antibióticos beta-lactámicos, de hasta 21.3 veces en medio definido y hasta 12.4 veces en medio complejo, por una de las mutantes de la cepa silvestre. Sin embargo, no se observaron mejoras significativas de la producción en las mutantes de la cepa C10, sugiriendo que en esta cepa ya se encuentra desregulada la señalización por pH ambiental. Finalmente, se llevó a cabo la inactivación del factor de transcripción PacC en *A. chrysogenum* mediante la interrupción del gen *pacC* en la región correspondiente al dominio de unión al ADN y la señal de localización nuclear y el silenciamiento del mismo gen utilizando la tecnología del ARN interferente. La interrupción del gen resultó aparentemente letal para la cepa silvestre de *A. chrysogenum*. El silenciamiento del gen afectó negativamente al crecimiento en medio sólido pero no en cultivo líquido. La producción específica de antibióticos beta-lactámicos no resultó ser estadísticamente diferente en las cepas con el gen *pacC* silenciado en comparación con la cepa parental y la cepa control. El presente trabajo continúa con la aplicación de las herramientas moleculares para comprender más en detalle los mecanismos de regulación de la biosíntesis de CPC y persigue mejorar genéticamente la producción de este antibiótico haciendo uso de los conocimientos sobre la señalización por pH ambiental.

## ABSTRACT

*Acremonium chrysogenum* is a filamentous fungus capable to produce cephalosporin C (CPC), a broad spectrum beta-lactam antibiotic with relatively low toxicity. CPC is mainly used to produce the whole array of cephalosporins for clinic use. *A. chrysogenum* is the only known CPC producing microorganism. For these reasons, CPC is a high value-added product of great clinic and industrial interest. The CPC biosynthesis pathway is regulated in several ways. Ambient pH signaling is one of the most important regulating factors. pH regulation is exerted through the general transcription factor PacC. When the pH of the culture medium is acidic to neutral, PacC is inactive. When the pH becomes alkaline a signaling cascade begins, resulting in two successive proteolytic cleavages of PacC, leading to its active form. Once it has been activated, PacC upregulates the transcription of most genes involved in CPC biosynthesis. Some studies had demonstrated that CPC production by *A. chrysogenum* is higher when solid-state fermentation (SSF) systems are utilized, in comparison with submerged fermentations (SmF). Furthermore, it has been observed that there is a pH range in which the CPC production is better in both systems. In this work, we studied, from a molecular point of view, the differences between SSF and SmF during CPC production. We performed an expression analysis of the *cefD2*, *cefEF* and *cefT* genes from *A. chrysogenum*. The first two encode two limiting enzymes for CPC biosynthesis, and the last encodes for a transporter protein involved in the antibiotic exportation. Both types of fermentation were made within a controlled pH interval. We found important differences at transcriptional level for the expression of these genes. In the three cases, the relative expression (RE) of the genes was statistically higher in SSF than in SmF. The highest RE for the *cefD2* gene in SmF was only 7.46% of that observed in SSF, whereas the corresponding to the *cefEF* gene was 65.8%, and for the *cefT* gene was 42.4%. These results are the first evidence of the differences, at the transcriptional level, of the CPC biosynthetic genes, whose expression is influenced by the conditions of the fermentation system. On the other hand, we activated constitutively the transcription factor PacC from *A. chrysogenum*, by truncating the *pacC* gene to the site corresponding for the direct expression of the active form of the protein,

creating an alkaline-mimicking phenotype. The mutation was introduced in the wild type (WT) and C10 (high producer) strains of *A. chrysogenum*, and its effects were observed on the beta-lactam antibiotics production, carried on two different fermentation medium buffered at acidic pH. Significant increases were observed in the specific production (SP) of beta-lactam antibiotics. For example, the P17 mutant of the WT strain, reached up to 21.3-fold the SP observed in the parental strain in a defined medium, and up to 12.4-fold in a complex medium. Nevertheless, no significant increase was observed in the SP of the C10 mutants, which suggests that this strain has already deregulated the ambient-pH-signaling pathway. Finally, we inactivated the transcriptional factor PacC in *A. chrysogenum*, by disrupting the *pacC* gene in the DNA-binding domain and the nuclear localization signal, and silenced the *pacC* gene by interference RNA. Disruption was apparently lethal for *A. chrysogenum* wild type. Silencing negatively affected the growth in solid medium but not in liquid culture. The specific production of beta-lactam antibiotics was not statistically different in *pacC*-silenced strains compared to the wild type and control strains. This work continues with the application of molecular tools to further understanding of the regulation mechanisms of CPC biosynthesis, and attempts to improve genetically CPC production, using the knowledge on the ambient-pH signaling.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xviii
ABREVIATURAS.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	1
1.2. Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	2
1.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos.....	4
1.3. Cefalosporina C.....	5
1.3.1. Biosíntesis de cefalosporina C en <i>A. chrysogenum</i> .....	7
1.3.2. Organización estructural de los genes de biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i> .....	10
1.3.3. Regulación de la biosíntesis de CPC.....	11
1.3.3.1. Precursores.....	12
1.3.3.1.1. Disponibilidad de L- $\alpha$ -AAA.....	12
1.3.3.1.2. Disponibilidad de L-valina.....	12
1.3.3.1.3. Disponibilidad de L-cisteína.....	13
1.3.3.1.4. Disponibilidad y efecto regulador de la metionina.....	13
1.3.3.2. Influencia del fosfato y oxígeno.....	14
1.3.3.3. Regulación por fuente de carbono.....	15
1.3.3.4. Regulación por fuente de nitrógeno.....	16
1.3.3.5. CPCR1 Regulador de cefalosporina C 1.....	17
1.3.3.6. Regulador AcFKH1.....	18
1.3.3.7. AcVEA, regulador global <i>velvet</i> .....	18
1.3.3.8. AcSEPH, proteína de septación H.....	19
1.3.3.9. AcATG1, proteína relacionada a autofagia 1.....	19
1.3.3.10. Regulación por pH ambiental de la biosíntesis de CPC.....	19
1.3.3.10.1. Cascada de señalización por pH.....	21
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1. Mejoramiento genético clásico.....	24
2.2. Utilización de sistemas de cultivo sumergido .....	25
2.3. Utilización de sistemas de cultivo en estado sólido.....	27
2.4. Mejoramiento genético molecular.....	30

2.5. Estudios sobre la regulación por pH ambiental de la biosíntesis de antibióticos	
beta-lactámicos.....	36
3. JUSTIFICACIÓN.....	40
4. HIPÓTESIS.....	42
5. OBJETIVOS.....	43
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	43
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
6. METODOLOGÍA.....	44
6.1. Cepas microbiológicas.....	44
6.2. Vectores plasmídicos.....	45
6.3. Medios de cultivo.....	47
6.3.1. Medios de cultivo para bacterias.....	47
6.3.2. Medios de cultivo para hongos.....	48
6.4. Análisis de expresión de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> Y <i>cefT</i> de <i>A. chrysogenum</i> C10 en sistemas de cultivo sólido y líquido.....	52
6.4.1. Crecimiento de <i>A. chrysogenum</i> C10.....	52
6.4.2. Condiciones de crecimiento para la preparación de inóculo primario.....	52
6.4.3. Cultivo en medio líquido complejo MCFA 2.5X .....	52
6.4.3.1. Determinación de la concentración de CPC, pH y biomasa en cultivo líquido.....	53
6.4.4. Cultivo sólido en soporte impregnado.....	53
6.4.4.1. Determinación de CPC, pH y biomasa en cultivo sólido.....	54
6.4.4.1.1. Determinación de la concentración de CPC por bioensayo de actividad antibiótica frente a <i>E. coli</i> ESS2231.....	54
6.4.4.1.1.1. Preparación de las placas de bioensayo.....	54
6.4.4.1.1.2. Preparación de penicilinas a partir de <i>Bacillus cereus</i> .....	55
6.4.5. Análisis de expresión de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> de <i>A. chrysogenum</i> C10 en cultivos sólido y sumergido.....	56
6.4.5.1. Diseño de cebadores para el análisis de expresión.....	57
6.4.5.2. Obtención de ARN total de <i>A. chrysogenum</i> .....	58
6.4.5.2.1. Consideraciones generales para la extracción y manejo de ARN.....	59
6.4.5.3. Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes de agarosa con formaldehído.....	60
6.4.5.4. Tratamiento del ARN con ADNasa I.....	60
6.4.5.5. Reacciones de RT-PCR a partir de ARN total de <i>A. chrysogenum</i> .....	61
6.4.5.6. Obtención de ADN total de <i>A. chrysogenum</i> .....	62
6.4.5.6.1. Tratamiento con fenol y cloroformo-alcohol isoamílico.....	63



colonia.....	90
6.6.2. Silenciamiento del gen <i>pacC</i> de <i>A. chrysogenum</i> .....	91
6.6.2.1. Diseño de cebadores para el silenciamiento del gen <i>pacC</i> .....	92
6.6.2.2. Reacción de PCR para la amplificación del producto SlnpacC3.....	93
6.6.2.3. Clonación del producto de PCR SlnpacC3 en el vector pGpdPki-RNAi.....	94
6.6.2.4. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> con los vectores pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi....	94
6.6.2.5. Análisis primario de transformantes Sln3 por PCR a partir de colonia.....	94
6.6.2.6. Cultivo en medio líquido MDFA de las transformantes con el gen <i>pacC</i> silenciado..	94
6.7. Análisis estadísticos.....	95
7. RESULTADOS.....	96
7.1. Análisis de expresión de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> de <i>A. chrysogenum</i> en sistemas de cultivo sólido y líquido.....	96
7.1.1. Cultivo sólido de <i>A. chrysogenum</i> C10 en soporte impregnado.....	96
7.1.2. Cultivo en medio líquido complejo MCFA 2.5X.....	97
7.1.3. Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo.....	99
7.1.3.1. Aislamiento de ARN total de <i>A. chrysogenum</i> para cada punto de los cultivos.....	99
7.1.3.2. Reacciones de PCR a partir de ADN genómico de <i>A. chrysogenum</i> .....	99
7.1.3.3. Reacción de PCR a partir de ARN total como control negativo.....	100
7.1.3.4. RT-PCR con gradiente de ciclos para los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> .....	101
7.1.3.5. RT-PCR de los controles externos <i>gpdA</i> y <i>18S</i> .....	101
7.1.5.6. RT-PCR de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> .....	102
7.1.5.7. Expresión relativa de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> , <i>cefT</i> , <i>18S</i> y <i>gpd</i> : análisis de expresión.....	103
7.2. Activación constitutiva del factor de transcripción PacC en <i>A. chrysogenum</i> .....	105
7.2.1. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> WT y C10 con los vectores pPpacC <sup>27</sup> , pSpacC <sup>27</sup> y pLXTtrpC .....	105
7.2.2. Análisis primario de transformantes por PCR de colonia.....	106
7.2.3. Análisis secundario de transformantes por cultivo en sistema líquido.....	108
7.2.3.1. Optimización de un medio definido de cultivo amortiguado a pH ácido.....	108
7.2.3.2. Análisis de transformantes en medio líquido MDFA/MES.....	110
7.2.3.3. Optimización de la concentración de MES en medio complejo MCFA.....	112
7.2.3.4. Análisis de transformantes en medio líquido complejo MCFA/MES 0.3 M.....	114
7.3. Inactivación del factor de transcripción PacC de <i>A. chrysogenum</i> .....	117
7.3.1. Construcción del vector de interrupción del gen <i>pacC</i> .....	117
7.3.1.1. Amplificación de los productos de PCR <i>pacC5'</i> , <i>pacC3'</i> y <i>Hgm2</i> .....	117

7.3.1.2. Construcción del vector pC43 <sub>ΔΔ</sub> XbaI.....	119
7.3.1.3. Construcción del vector pC43 <sub>ΔΔ</sub> XbaI-pacC53.....	120
7.3.1.4. Construcción del vector pΔpacC.....	121
7.3.2. Construcción del vector de silenciamiento del gen <i>pacC</i> .....	122
7.3.2.1. Amplificación del producto de PCR Sln3.....	122
7.3.2.2. Construcción del vector pSlnpacC3.....	123
7.3.3. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> cepa silvestre con los vectores pΔpacC y pULC43 <sub>Δ</sub> XbaI .....	124
7.3.4. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> cepa silvestre con los vectores pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi.....	126
7.3.5. Análisis de transformantes en cultivo líquido.....	127
8. Discusión.....	130
8.1. Análisis de expresión de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> de <i>A. chrysogenum</i> en sistemas de cultivo sólido y líquido.....	130
8.2. Activación constitutiva del factor de transcripción PacC de <i>A. chrysogenum</i> .....	134
8.3. Inactivación del factor de transcripción PacC de <i>A. chrysogenum</i> .....	139
9. Conclusiones.....	143
10. Referencias.....	144
11. Anexo: Solid-state and submerged fermentations show different gene expression profiles in cephalosporin C production by <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	153

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos.....	2
Fig. 2. Esquema general de la biosíntesis de peptidoglicano.....	5
Fig. 3. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C (CPC) en <i>A. chrysogenum</i> .....	9
Fig. 4. Organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i> .....	11
Fig. 5. Activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental.....	23
Fig. 6. Proteína PacC esquematizada mostrando los tipos de mutaciones en ella que conducen a fenotipos de mimetismo alcalino ( <i>pacC<sup>c</sup></i> ) y mimetismo ácido ( <i>pacC<sup>+/-</sup></i> ).....	37
Fig. 7. Estrategia para interrumpir el gen <i>pacC</i> de <i>A. chrysogenum</i> .....	76
Fig. 8. Construcción del plásmido pΔ <i>pacC</i> .....	80
Fig. 9. A) Construcción del vector pSIn <i>pacC</i> 3. B) Mecanismo de silenciamiento por transcripción convergente.....	91
Fig. 10. Cinéticas de: A) producción de CPC, B) formación de biomasa, y C) pH, en cultivo sólido de <i>A. chrysogenum</i> C10 en soporte impregnado con medio MCFA 2.5X.....	96
Fig. 11. Cinéticas de: A) producción de CPC, B) formación de biomasa, y C) pH, en cultivo líquido de <i>A. chrysogenum</i> C10 en medio MCFA 2.5X.....	98
Fig. 12. ARN total de <i>A. chrysogenum</i> en cultivo sólido y líquido en los tiempos 0 a 144 horas .....	99
Fig. 13. Productos de PCR de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> , <i>cefT</i> , <i>18S</i> , <i>gpd</i> , y <i>gpd</i> región intrónica.....	100
Fig. 14. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del gen <i>gpdA</i> , a partir de las muestras de ARN, con los cebadores diseñados en zonas intrónicas del gen.....	100
Fig. 15. Gel de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> , en un gradiente de 30 a 40 ciclos.....	101
Fig. 16. Geles de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los controles externos <i>gpdA</i> y <i>18S</i> . Muestras de los tiempos 0-144 h del cultivo sólido y líquido.....	102
Fig. 17. Geles de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los genes <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> y <i>cefT</i> . Muestras de los tiempos 0-144 h del cultivo sólido y cultivo líquido.....	103
Fig. 18. Expresión relativa de los genes <i>18S</i> y <i>gpd</i> de <i>A. chrysogenum</i> en cultivo sólido y líquido ...	104
Fig. 19. Expresión relativa de los genes: <i>cefD2</i> , <i>cefEF</i> , y <i>cefT</i> de <i>A. chrysogenum</i> en cultivo sólido y líquido .....	104
Fig. 20. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador <i>TtrpC</i> y de un fragmento del gen <i>pacC</i> , de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pP <i>pacC</i> <sup>27</sup> .....	106

Fig. 21.	Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador <i>TtrpC</i> y de un fragmento del gen <i>pacC</i> , de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pSpac <sup>27</sup> .....	107
Fig. 22.	Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador <i>TtrpC</i> y de un fragmento del gen <i>pacC</i> , de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pLXTtrpC.....	107
Fig. 23.	Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador <i>TtrpC</i> y de un fragmento del gen <i>pacC</i> , de las transformantes de la cepa C10, obtenidas con los vectores pPpac <sup>27</sup> , pSpac <sup>27</sup> y pLXTtrpC.....	108
Fig. 24.	Cinéticas de: pH, biomasa y producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA, utilizando diferentes amortiguadores y valores de pH. Cepa silvestre.....	109
Fig. 25.	Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA amortiguado con MES 100 mM, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa silvestre.....	110
Fig. 26.	Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA amortiguado con MES 100 mM, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa C10.....	112
Fig. 27.	Cinéticas de: pH, biomasa y producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MCFA amortiguado con MES pH 5.0, concentraciones de 0 a 0.5 M.....	113
Fig. 28.	Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio líquido MCFA amortiguado con MES 0.3 M, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa silvestre.....	115
Fig. 29.	Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio líquido MCFA amortiguado con MES 0.3 M, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa C10.....	116
Fig. 30.	Gel de agarosa al 0.8%, con los productos de PCR por gradiente de temperatura: <i>pacC5'</i> , <i>pacC3'</i> y <i>Hgm2</i> .....	117
Fig. 31.	Gel de agarosa al 0.8%, con los productos de PCR por gradiente de temperatura y amortiguadores HF y GC de los productos <i>pacC5'</i> y <i>Hgm2</i> .....	118
Fig. 32.	Gel de agarosa al 0.8%, con los productos de PCR por gradiente de $MgCl_2$ de los productos <i>pacC5'</i> y <i>Hgm2</i> .....	119
Fig. 33.	Mapa de restricción del plásmido pC43 $\Delta\Delta$ XbaI. Minipreps digeridas con <i>XbaI</i> .....	120
Fig. 34.	Mapa de restricción del plásmido pC43 $\Delta\Delta$ XbaI- <i>pacC53</i> . Minipreps digeridas con <i>KpnI</i> y <i>HindIII</i> .....	121
Fig. 35.	Mapa de restricción del plásmido p $\Delta$ pacC. Miniprep 11 digerida con <i>HindIII</i> , <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> + <i>KpnI</i> , y <i>HindIII</i> + <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> . Minipreps digeridas con <i>XbaI</i> .....	122
Fig. 36.	Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR Sln3 por gradiente de temperatura.....	123
Fig. 37.	Minipreps digeridas con <i>NcoI</i> . Amplificación por PCR del producto Sln3 a partir de las minipreparaciones anteriores. Mapa de restricción del plásmido pSlnpacC3.....	124
Fig 38.	Transformantes p $\Delta$ pacC en placa TSA con higromicina. Transformantes p $\Delta$ pacC en placa TSA con fleomicina. Observación al microscopio de una transformante p $\Delta$ pacC con	

	crecimiento incipiente.....	125
Fig. 39.	A) PCR (pacC5'-3') a partir de colonia de las transformantes p $\Delta$ pacC. B) PCR ( <i>ble</i> ) a partir de colonia de tres transformantes pULC43 $\Delta$ Xbal. Geles de agarosa al 0.8 y 1.5%.....	125
Fig. 40	Fig. 40. Cepas transformantes con los plásmidos pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi.....	126
Fig. 41	PCR ( <i>ble</i> ) a partir de colonia las cepas transformantes pSlnpacC3 y de 5 colonias transformantes pGpdPki-RNAi. Gel de agarosa al 1.5%.....	126
Fig. 42	Cinéticas de: producción específica de antibióticos beta-lactámicos, biomasa y pH, en medio líquido MDFA pH 6.8 y 5.0.....	127
Fig. 43	Crecimiento de las transformantes Sln, P17, control y cepa silvestre en placas de medio TSA con diferentes valores de pH.....	129

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cebadores utilizados para el análisis de expresión.....	58
Tabla 2. Mezcla de reacción: Tratamiento de ARN con ADNasa I.....	61
Tabla 3. Mezcla de reacción: RT-PCR para el análisis de expresión.....	62
Tabla 4. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de RT-PCR para el análisis de expresión.....	62
Tabla 5. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR de los genes a analizar.....	67
Tabla 6. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de PCR de los genes a analizar....	67
Tabla 7. Cebadores utilizados para análisis primario por PCR de a partir de colonia (TtrpC y SpacC2).....	72
Tabla 8. Mezcla de reacción: PCR (TtrpC y SpacC2) a partir de colonia de <i>A. chrysogenum</i> .....	72
Tabla 9. Condiciones de operación del termociclador: PCR (TtrpC y SpacC2) a partir de colonia de <i>A. chrysogenum</i> .....	72
Tabla 10. Cebadores diseñados para la interrupción del gen <i>pacC</i> de <i>A. chrysogenum</i> .....	77
Tabla 11. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR para la interrupción del gen <i>pacC</i> .....	78
Tabla 12. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de PCR para la interrupción del gen <i>pacC</i> .....	79
Tabla 13. Mezcla de reacción: Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	86
Tabla 14. Mezcla de reacción: Rellenado de extremos protuberantes de ADN con la enzima Klenow.	87
Tabla 15. Mezcla de reacción: Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.....	88
Tabla 16. Mezcla de reacción: Ligación de fragmentos de ADN.....	89
Tabla 17. Cebadores diseñados para amplificar el gen <i>ble</i> de <i>S. hindustanus</i> .....	90
Tabla 18. Condiciones de operación del termociclador: PCR ( <i>pacC</i> 5'-3' y <i>ble</i> ) a partir de colonia de <i>A. chrysogenum</i> .....	90
Tabla 19. Cebadores diseñados para silenciar el gen <i>pacC</i> de <i>A. chrysogenum</i> .....	92
Tabla 20. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR para el silenciamiento del gen <i>pacC</i> .....	93
Tabla 21. Condiciones de operación del termociclador Reacciones de PCR para el silenciamiento del gen <i>pacC</i> .....	93
Tabla 22. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa silvestre en medio MDFA/MES pH 5.0.....	111
Tabla 23. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa	

	C10 en medio MDFA/MES pH 5.0.....	112
Tabla 24.	Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa silvestre en medio MCFA/MES.....	115
Tabla 25.	Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa C10 en medio MCFA/MES.....	116
Tabla 26.	Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes Sln, P17, pRNAi2 y cepa silvestre en cultivo líquido MDFA.....	128

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math></b>	Coeficiente de significancia	<b>kb</b>	Kilobase
<b>6-APA</b>	Ácido 6-aminopenicilánico	<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>7-ACA</b>	Ácido 7-aminocefalosporánico	<b>L</b>	Litro
<b>7-ADAC</b>	Ácido 7-aminodesacetilcefalosporánico	<b>L-<math>\alpha</math>-AAA</b>	Ácido L- $\alpha$ -aminoadípico
<b>7-ADCA</b>	Ácido 7-amino	<b>M</b>	Molar
<b>7TMD</b>	Proteína de 7 dominios	<b>Mb</b>	Megabases
<b>A<sub>230</sub></b>	Absorbencia a 230 nm de $\lambda$	<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
<b>A<sub>260</sub></b>	Absorbencia a 260 nm de $\lambda$	<b>MFS</b>	Major facilitator superfamily
<b>A<sub>280</sub></b>	Absorbencia a 280 nm de $\lambda$	<b>mM</b>	Milimolar
<b>AC</b>	$\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína	<b>MOPS</b>	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
<b>ACV</b>	$\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina	<b>mV</b>	Milivoltios
<b>ACVS</b>	ACV sintetasa	<b>NAG</b>	N-acetilglucosamina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>NAM</b>	ácido N-acetilmurámico
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Resistencia a ampicilina	<b>PE</b>	Producción específica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>PG</b>	Peptidoglucano
<b>bp</b>	Pares de bases	<b>pg</b>	Picogramo
<b>BSA<sub>ac</sub></b>	Albúmina de suero bovino acetilada	<b>pmol</b>	Picomoles
<b>Ble<sup>R</sup></b>	Resistencia a fleomicina	<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>cm</b>	Centímetro	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Cm<sup>R</sup></b>	Resistencia a cloranfenicol	<b>SmF</b>	Cultivo sumergido
<b>CoA</b>	Coenzima A	<b>SSF</b>	Cultivo en estado sólido
<b>CPC</b>	Cefalosporina C	<b>U</b>	Unidades
<b>CRE</b>	Elemento regulador de represión	<b>UDP</b>	Uridín di fosfato
<b>DAC</b>	Desacetilcefalosporina C	<b><math>\mu</math>F</b>	Microfaradays
<b>DAO</b>	D-aminoácido oxidasa	<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b>DAOC</b>	Desacetoxicefalosporina C	<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato	<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>dNTPs</b>	Mezcla de desoxirribonucleótidos	<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda
<b>D.O.</b>	Densidad óptica	<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>V</b>	Voltio
<b>ER</b>	Expresión relativa	<b>° C°</b>	Grados centígrados
<b>g</b>	Gramo		
<b>g</b>	Gravedades		
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente		
<b>h</b>	Horas		
<b>IAT</b>	acil CoA:isopenicilina N aciltransferasa		
<b>IPN</b>	Isopenicilina N		
<b>IPNS</b>	Isopenicilina N sintasa		

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Acremonium chrysogenum*

*Acremonium chrysogenum* es un hongo filamentosos que, hasta hace algunos años, se ubicaba dentro del grupo de los hongos imperfectos o deuteromicetos por carecer de una etapa de reproducción sexual conocida. Su propagación es estrictamente asexual, mediante la formación de conidiosporas y artrosporas (Hoff *et al.*, 2005; Nash & Huber, 1971). Sin embargo, recientemente se encontraron evidencias genéticas de un hipotético ciclo sexual que lo reclasificarían dentro del grupo de los ascomicetos, a pesar de las disputas taxonómicas que aún giran en torno a este microorganismo (Pöggeler *et al.*, 2008). Pertenece al orden de los Hipocreales, hongos filamentosos que se caracterizan por sus colores brillantes y llamativos, que van desde amarillo o anaranjado hasta rojo (Glenn *et al.*, 1996). Sus hifas consisten de segmentos uninucleados hialinos, con crecimiento apical o ramificado y pueden presentar estructuras conidiales simples. Los conidios son unicelulares, hialinos y semicilíndricos, se forman por abstricción (cercenamiento de un filamento esporógeno mediante septación sucesiva) y quedan agregados dentro de una cabeza mucosa que se forma en el ápice de cada fiálide (célula conidiógena). Las fiálides son simples y alargadas, con forma de punzón y no presentan septo basal. Las hifas se pueden diferenciar en fragmentos hinchados y muy septados llamados artrosporas, que pueden ser multinucleadas conforme pasa el tiempo (Summerbell *et al.*, 2011). Sus colonias generalmente son de crecimiento lento, compactas y húmedas al principio volviéndose pulverulentas o rugosas con el paso del tiempo. Al inicio las colonias son blancas y con el tiempo se vuelven rosadas, amarillas e incluso anaranjadas debido a los pigmentos que se producen (Tollnick *et al.*, 2004).

*A. chrysogenum* es un microorganismo de gran interés a nivel industrial por producir, entre otros compuestos beta-lactámicos, la cefalosporina C (CPC) que es de gran relevancia farmacéutica y que sirve de base para la síntesis química de las cefalosporinas comerciales de uso clínico (Schmitt *et al.*, 2004a).

## 1.2. Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los antimicrobianos con mayor prescripción en la actualidad. Son los más potentes y los menos tóxicos de todos los antibióticos conocidos y los más importantes desde el punto de vista económico (Lotfy, 2007). Varios microorganismos son capaces de producir este tipo de antibióticos, entre los que se encuentran *Aspergillus nidulans*, *Acremonium chrysogenum*, *Penicillium chrysogenum*, algunos estreptomicetos y un pequeño número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Brakhage, 1998). Son estructuralmente péptidos no ribosomales modificados, y tienen rutas biosintéticas muy similares. Se caracterizan principalmente por la presencia de un anillo beta-lactámico de cuatro átomos, que define a este tipo de compuestos, mientras que la ausencia o presencia de otro anillo fusionado es la base para su clasificación (Donowitz & Mandell, 1988). La clasificación de los antibióticos beta.lactámicos se esquematiza en la figura 1.

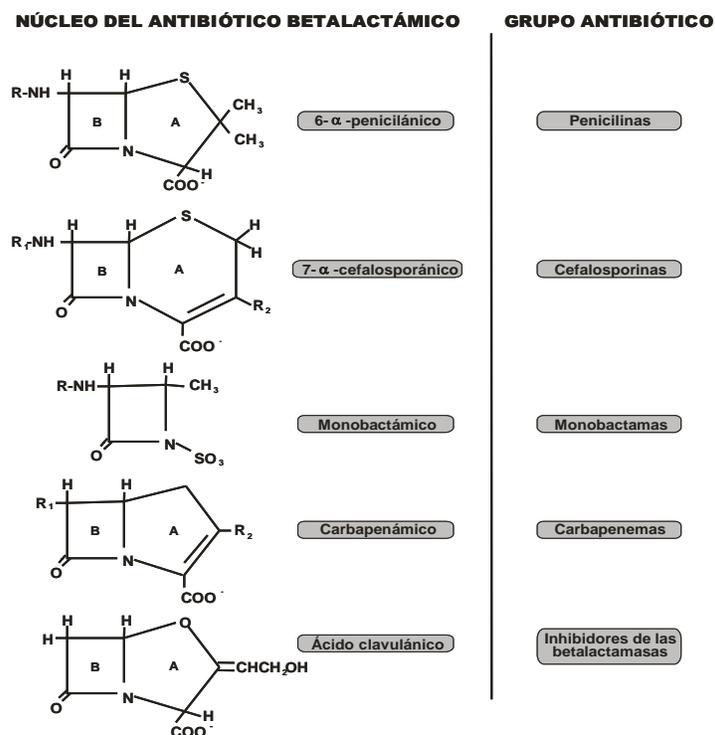


Fig. 1. Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (Marín & Gudíol, 2003).

**Monobactamas:** Tienen una estructura sencilla en la que el anillo beta-lactámico no se encuentra fusionado a ningún otro. Se producen por *Nocardia uniformis*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas acidophila*, entre otros (Marín & Gudiol, 2003).

**Carbapenemas:** El anillo beta-lactámico se encuentra fusionado a un anillo de pirrolidina que le confiere una mayor resistencia a las beta-lactamasas. Las cadenas laterales que contienen incrementan su potencia y espectro antibacterianos, por lo que son los antibióticos beta-lactámicos de más amplio espectro. Se obtienen a partir de microorganismos como *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces olivaceus*, *Erwinia carotovora* y *Serratia sp.* (Birnbaum et al., 1985).

**Penicilinas:** Contienen un sistema bicíclico de anillos en el que el anillo beta-lactámico se encuentra fusionado a un anillo de tiazolidina (5 miembros), dando origen al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), la base de todas las penicilinas. Éstas se diferencian por sus cadenas laterales en la posición 6 del sistema de anillos. La mayoría de las penicilinas son semisintéticas, pero su estructura básica (el 6-APA) se produce principalmente por *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans* (Marín & Gudiol, 2003).

**Cefalosporinas:** Contienen también un sistema bicíclico de anillos, pero en este caso el anillo beta-lactámico se encuentra fusionado a un anillo de dihidrotiazina (6 miembros), dando origen al núcleo cefem característico de las cefalosporinas y cefamicinas. Las modificaciones laterales en el núcleo cefem-3 originan las diversas cefalosporinas. Éstas son antibióticos de amplio espectro y baja toxicidad, derivadas de la CPC o de precursores producidos por *Acremonium chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus* (Donowitz & Mandell, 1988).

**Cefamicinas:** Son compuestos parecidos a las cefalosporinas, que comparten el núcleo cefem-3. Se diferencian de las anteriores por su origen y por la presencia de un grupo metoxilo en lugar de un hidrógeno en la posición 7 del sistema de anillos. Las cefamicinas se obtienen a partir de *Streptomyces lactamdurans* y otros actinomicetos, básicamente del género *Streptomyces* (Stapley et al., 1972).

**Inhibidores de beta-lactamasas:** Conservan en su estructura el anillo beta-lactámico pero con algunas variaciones; por ejemplo el ácido clavulánico, que tiene una estructura parecida al ácido penicilánico pero con una sustitución del azufre en posición 1 por un átomo de oxígeno (anillo oxazolidínico) lo que incrementa la afinidad a esta estructura por parte de las beta-lactamasas (Reading & Cole, 1977).

### **1.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos**

Los antibióticos beta-lactámicos actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis del péptidoglicano (PG) presente en la pared celular bacteriana, debido a que su estructura, en el anillo beta-lactámico, es similar a la del dipéptido D-ala-D-ala, sustrato natural reconocido por unas enzimas denominadas transpeptidasas que catalizan la reacción de entrecruzamiento del PG en la última etapa de su biosíntesis. Forman enlaces covalentes con una serina del sitio activo de las transpeptidasas inactivándolas de manera irreversible (Mediavilla & García-Lobo, 2005).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana que destruye el PG. De este modo, la pared queda debilitada y se rompe frecuentemente por la presión osmótica intracelular (Donowitz & Mandell, 1988). La síntesis de PG y la participación de los antibióticos beta-lactámicos en su inhibición se esquematizan en la figura 2.

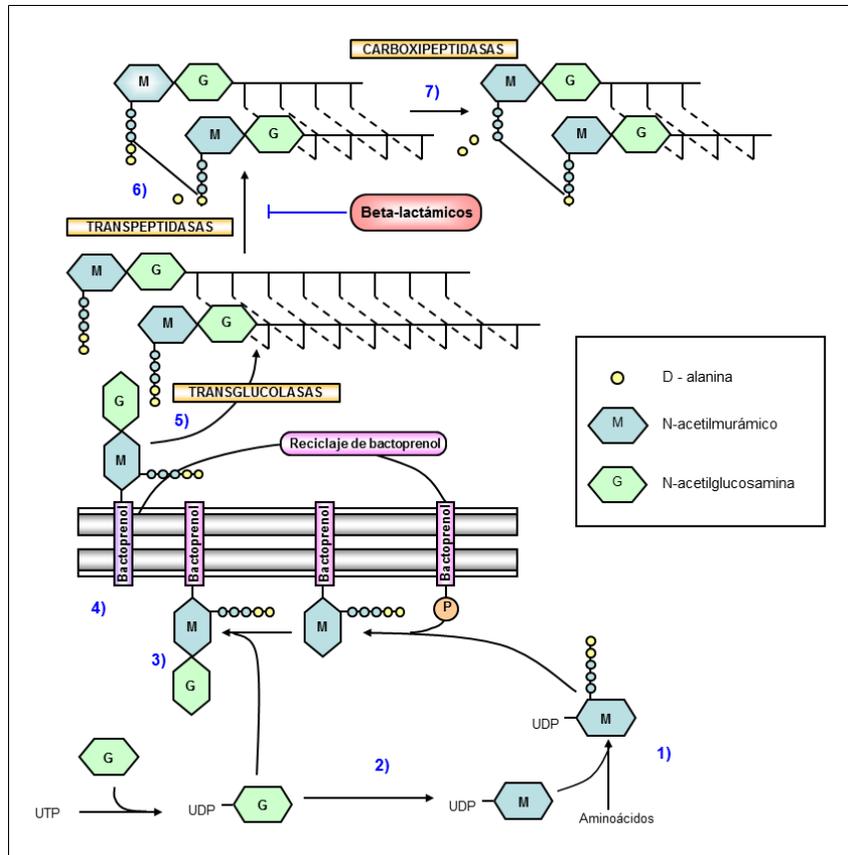


Fig. 2. Esquema general de la biosíntesis de peptidoglicano. 1) Adición de aminoácidos a unidades de UDP-ácido N-acetilmurámico (NAM). 2) Transferencia del UDP-NAM a una unidad de bacteriofenol anclado a la cara interna de la membrana. 3) Unión de UDP-N-acetilglucosamina (NAG) al NAM anclado al bacteriofenol. 4) Difusión del bacteriofenol a la cara externa de la membrana arrastrando la unidad estructural del PG. 5) Polimerización del PG mediante transglucolasas. 6) Las transpeptidasas catalizan la formación de enlaces cruzados entre el aminoácido 3 de un pentapéptido y la D-ala en posición 4 de otro pentapéptido para formar una malla bi o tridimensional. 7) Las carboxipeptidasas eliminan residuos terminales de D-ala de cualquier pentapéptido que no se halle comprometido en entrecruzamiento (Tipper, 1985).

### 1.3. Cefalosporina C

En 1948, mientras analizaba la flora microbiana de una zona cercana a la salida de aguas residuales en el mar de Cagliari, Italia, en busca de microorganismos responsables del aclaramiento de las aguas, Giuseppe Brotzu aisló un hongo filamentoso con cierto parecido a microorganismos del género *Cephalosporium*. Brotzu encontró que los extractos crudos de los caldos de cultivo del hongo eran eficaces en contra de

microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, particularmente de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tify* (Brotzu, 1948). Brotzu denominó en primera instancia a su microorganismo aislado como *Cephalosporium acremonium* pero en 1971 se reclasificaron varias especies de *Cephalosporium* incluyendo al hongo de Brotzu, que fue clasificado como *Acremonium chrysogenum* (Gams, 1971). En 1954 Abraham *et al.* aislaron y purificaron un compuesto hidrofílico a partir de los caldos de cultivo de *Acremonium chrysogenum* que mostraba actividad antibiótica en contra de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tify* y *Escherichia coli*. Dicho compuesto resultó ser el componente activo de los experimentos de Brotzu y le denominaron cefalosporina C (CPC). Sin embargo, la actividad de la CPC frente a los microorganismos mencionados era apenas del 10% comparada con la actividad de la penicilina N, la cual se encontraba ya en diversos estudios químicos. Aunque el panorama era desalentador para el nuevo descubrimiento, el compuesto presentaba características interesantes que podrían justificar el desarrollo de nuevas investigaciones y su futura aplicación: por ejemplo, era estable en medios ácidos diluidos y, sobre todo, era resistente a la penicilinas de *Bacillus subtilis*, lo cual sugería que se trataba de un antibiótico diferente a las penicilinas (Newton & Abraham, 1956). Además, resultaba inocuo cuando se administraban altas dosis intravenosas en pacientes humanos (Florey *et al.*, 1956). En 1961 Abraham & Newton determinaron la estructura de la CPC. Observaron que se comportaba, similar a la penicilina N, como un ácido monoaminodicarboxílico, que además contenía un residuo  $\delta$ -D- $\alpha$ -aminoadipílico unido al resto de la molécula a través de su grupo  $\delta$ -carboxílico, y que su espectro de absorción infrarroja a  $1782\text{ cm}^{-1}$  mostraba una señal fuerte característica de un grupo carbonilo beta-lactámico. Sin embargo, en la hidrólisis ácida de la CPC no se producían compuestos parecidos a los de la hidrólisis de penicilina N, sino fragmentos sulfurados carentes de nitrógeno, por lo que sugirieron que en vez del sistema de anillos  $\beta$ -lactámico-tiazolidina, característico de las penicilinas, se presentaba un sistema de anillos  $\beta$ -lactámico-dihidrotiazina. Esta estructura fue confirmada más tarde mediante cristalografía de rayos X (Hodgkin & Maslen, 1961). El sistema de anillos  $\beta$ -lactámico y dihidrotiazina fusionados constituyen el núcleo cefem-3, que se encuentra presente en todas las

cefalosporinas y demás compuestos beta-lactámicos derivados de la desacetilcefalosporina C (DAC), un compuesto intermediario en la síntesis de CPC (Donowitz & Mandell, 1988).

La CPC se utiliza para sintetizar químicamente el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y el ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA) que posteriormente son utilizados para sintetizar todas las cefalosporinas de uso clínico. Las diversas modificaciones introducidas en las cadenas laterales del 7-ACA y 7-ADCA modifican su actividad antimicrobiana y sus características farmacocinéticas, confiriéndoles cada vez mayor potencia, mejor estabilidad y menor toxicidad, haciendo de las cefalosporinas de primera a cuarta generación unos de los antibióticos con mayor prescripción y demanda (Mediavilla & García-Lobo, 2005).

### **1.3.1. Biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum***

La biosíntesis de CPC, al igual que la de los demás antibióticos beta-lactámicos, comienza con la formación del tripéptido  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) que resulta de la condensación no ribosomal de tres aminoácidos precursores: ácido L- $\alpha$ -aminoadípico (L- $\alpha$ -AAA), L-cisteína y L-valina. La condensación comienza con la activación del residuo  $\delta$ -carboxilo del L- $\alpha$ -AAA, seguida de la activación del grupo  $\alpha$ -amino de la cisteína y su posterior reacción para dar lugar al dipéptido  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína (AC). Posteriormente, se lleva a cabo la reacción entre el grupo  $\alpha$ -amino de la L-valina con el dipéptido AC activo, dando como resultado el tripéptido ACV. Todas las reacciones necesarias para su formación son catalizadas por una sola enzima multifuncional llamada ACV sintetasa (ACVS), que a su vez es codificada por el gen estructural denominado *pcbAB* (Gutiérrez *et al.*, 1991).

A continuación, el tripéptido ACV se cicla de manera oxidativa, dando lugar a la formación de un anillo beta-lactámico de cuatro miembros fusionado con un anillo tiazolidínico de cinco miembros, característico de todas las penicilinas. El compuesto resultante se llama isopenicilina N (IPN) y su formación es catalizada por la enzima

isopenicilina N sintasa (IPNS), codificada por el gen *pcbC* (Samson *et al.*, 1985). Hasta este punto, la ruta de biosíntesis de CPC es compartida con los microorganismos productores de penicilinas, en los cuales después la cadena lateral hidrofílica del L- $\alpha$ -AAA de la IPN se intercambia por un grupo acilo hidrofóbico mediante la enzima acil CoA:isopenicilina N aciltransferasa (IAT). La IPN es el precursor tanto de la biosíntesis de penicilina como de cefalosporina C y cefamicinas (Brackhage, 1998).

En el siguiente paso de la biosíntesis, se isomeriza la cadena lateral del L- $\alpha$ -AAA presente en la IPN para dar como resultado su D-enantiómero, denominado penicilina N. La formación de la penicilina N es catalizada por un sistema de varias enzimas. Primero, la isopenicilinil N-CoA sintetasa, codificada por el gen *cefD1*, convierte la IPN a isopenicilinil-CoA. Luego, la enzima isopenicilinil N-CoA epimerasa, producto del gen *cefD2*, transforma la isopenicilinil-CoA a penicilinil-CoA (Ullán *et al.*, 2002a). La formación final de penicilina N requiere de la hidrólisis del tioéster penicilinil-CoA, reacción que ocurre de manera no estereoespecífica por medio de tioesterasas que se encuentren presentes en el ambiente celular (Knihinicki *et al.*, 1991).

Posteriormente, la penicilina N es transformada a desacetoxicefalosporina C (DAOC) mediante la enzima DAOC sintetasa, con actividad expandasa. En este paso el anillo de tiazolidina de 5 miembros, presente en la penicilina N, se expande de manera oxidativa a un anillo dihidrotiazínico de seis miembros, característico de los compuestos con núcleo cefem-3 (cefalosporinas y cefamicinas). Después, el grupo metilo en el carbono 3 de la DAOC es hidroxilado y se oxida para formar desacetilcefalosporina C (DAC), reacción catalizada por la enzima DAC hidroxilasa. Ambas enzimas son codificadas por un mismo gen estructural: *cefEF* (Samson *et al.*, 1987).

Finalmente, un grupo acetilo proveniente de acetil-CoA se transfiere al grupo OH de la DAC para formar cefalosporina C, reacción catalizada por el producto del gen *cefG*, la acetil CoA:DAC acetil transferasa (Gutiérrez *et al.*, 1992). En la figura 3 se muestra un esquema de la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*.

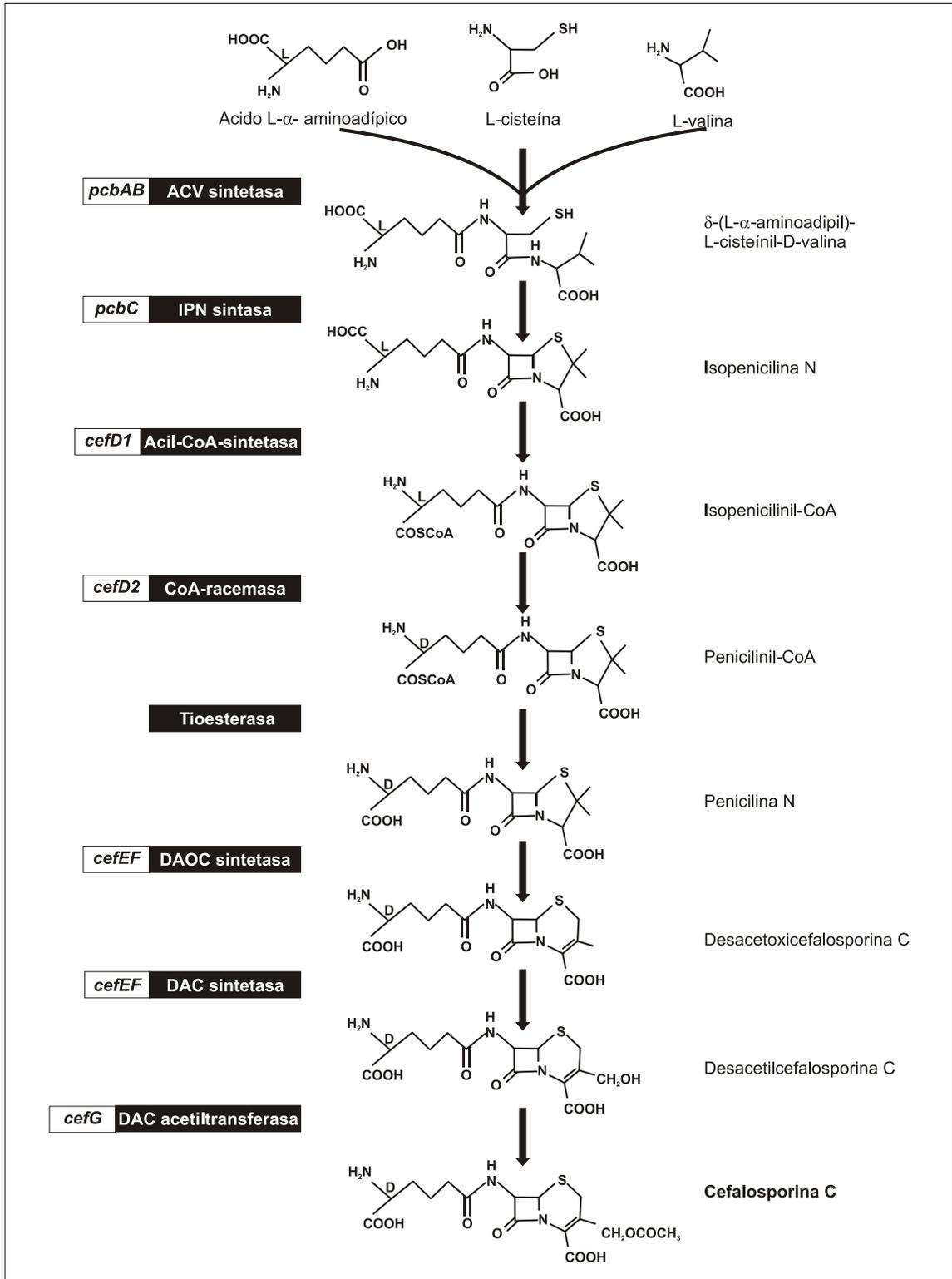


Fig. 3. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C (CPC) en *A. chrysogenum*. (Schmitt *et al.*, 2004a).

### 1.3.2. Organización estructural de los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*

En *A. chrysogenum* C10, los genes *pcbAB* y *pcbC* que codifican para las enzimas de los dos primeros pasos de la biosíntesis de CPC se encuentran estrechamente unidos en el cromosoma VII de 4.6 Mb (Gutiérrez *et al.*, 1991). Los genes *cefD1* y *cefD2* se encuentran en una región río abajo del gen *pcbC*. Estos cuatro genes conforman el clúster temprano de cefalosporina (Ullán *et al.*, 2002a).

Los genes *cefEF* y *cefG*, que codifican para las enzimas involucradas en los pasos finales de la ruta se encuentran, en la misma cepa, estrechamente localizados en el cromosoma I de 2.2 Mb y conforman el clúster tardío de cefalosporina. Los sistemas involucrados en la secreción de metabolitos secundarios son esenciales para evitar el “suicidio” de los microorganismos productores que, en el caso de algunas bacterias, pueden ser susceptibles a estos mismos.

Los genes que confieren resistencia a dichos metabolitos tóxicos se encuentran frecuentemente ubicados dentro de los clústeres biosintéticos. Así, dentro del clúster temprano y localizado corriente abajo del gen *pcbAB*, se identificó el gen *cefT* que codifica una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia principal de facilitadores [Major Facilitator Superfamily; (MFS)] y que funciona como bomba de exportación multidrogas (Ullán *et al.*, 2002b). Más tarde se demostró que se trata de un transportador de compuestos beta-lactámicos hidrofílicos que contienen la cadena lateral del L- $\alpha$ -AAA (por ejemplo IPN, penicilina N y DAC). Si bien la proteína CefT no es esencial para la biosíntesis de CPC, sí se encuentra estrechamente relacionada con su secreción (Ullán *et al.*, 2008). Corriente abajo del gen *cefD1*, localizado del lado opuesto al gen *cefT*, se identificó el gen *cefM* que codifica otra proteína membranal, con 12 dominios transmembranales, perteneciente a la MFS y que es esencial para la biosíntesis de CPC. La proteína CefM parece estar involucrada en la translocación de la penicilina N desde el lumen del peroxisoma, o microcuerpos parecidos a peroxisomas, hacia el citosol (donde posteriormente es convertida a CPC). Anteriormente se creía que todas las etapas de la biosíntesis de CPC eran citosólicas. Sin embargo, la evidencia reciente sugiere que la

epimerización de la IPN a penicilina N es catalizada por enzimas peroxisómicas, lo que involucraría un sistema de transporte a través de la membrana peroxisomal (Teijeira *et al.*, 2009). Más recientemente, se identificó (también dentro del clúster temprano de cefalosporina) otro gen denominado *cefP*, que codifica una hipotética proteína con 11 dominios transmembranales que también se encuentra involucrada en la conversión de IPN a penicilina N (Ullán *et al.*, 2010). A diferencia del gen *cefM*, el gen *cefP* parece estar regulado también por el producto del gen *cefR*, un gen regulador localizado río arriba del gen *cefP* y que funciona principalmente como represor del gen *cefT* (además de que ejerce un pequeño efecto estimulador en los niveles de expresión del gen *cefEF*). El gen *cefR* es el primer ejemplo reportado de regulación de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos mediada por transportadores en *A. chrysogenum* (Teijeira *et al.*, 2011).

La organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC se resume en la figura 4.

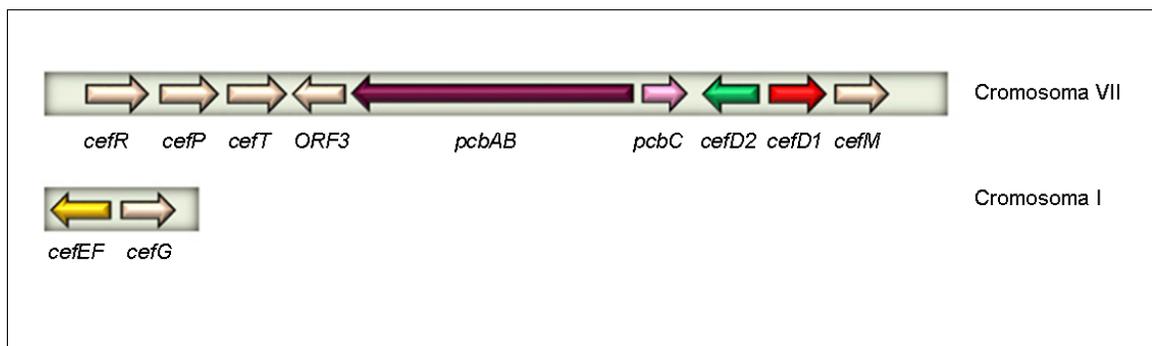


Fig. 4. Organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* (Ozcengiz & Demain, 2013)

### 1.3.3. Regulación de la biosíntesis de CPC

Existen diversos factores que regulan la biosíntesis de CPC, desde la disponibilidad de los precursores y los mecanismos de regulación que actúan sobre la transcripción de los genes biosintéticos o sobre la actividad de las enzimas involucradas hasta la compartimentación de la biosíntesis y los mecanismos de exportación de la CPC o sus intermediarios.

### 1.3.3.1. Precursores

La biosíntesis de todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos está regulada primariamente por la disponibilidad de sus tres aminoácidos precursores: ácido L- $\alpha$ -aminoadípico (L- $\alpha$ -AAA), L-cisteína y L-valina.

#### 1.3.3.1.1. Disponibilidad de L- $\alpha$ -AAA

El L- $\alpha$ -AAA es un intermediario en la ruta de biosíntesis de L-lisina en hongos. Esta comienza con la condensación de  $\alpha$ -cetoglutarato y acetil-CoA dando lugar a la formación de homocitrato, que después de ser isomerizado experimenta una descarboxilación oxidativa seguida de una aminación para formar el L- $\alpha$ -AAA. Posteriormente, el L- $\alpha$ -AAA es convertido a L-lisina mediante otras tres reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la  $\alpha$ -aminoadipato reductasa, la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa (Xu *et al.*, 2006). Dado que el L- $\alpha$ -AAA es el punto de ramificación entre las rutas de competencia de la biosíntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en hongos y de L-lisina, su disponibilidad intracelular resulta ser un parámetro muy importante en la regulación de la biosíntesis de CPC. Se ha observado que altas concentraciones de L-lisina disminuyen la formación de CPC en *A. chrysogenum*, y que la adición de L- $\alpha$ -AAA revierte el efecto. El efecto de la L-lisina sobre el *pool* de antibióticos beta-lactámicos puede ser el resultado de inhibición por retroalimentación, o de represión de ciertos genes y enzimas en la ruta de biosíntesis de L-lisina (Mehta *et al.*, 1979).

#### 1.3.3.1.2. Disponibilidad de L-valina

La biosíntesis de este aminoácido se encuentra estrechamente relacionada con la ruta biosintética de leucina. Su formación comienza con la conversión de dos moles de piruvato a  $\alpha$ -acetolactato, el cual posteriormente es reducido a  $\alpha,\beta$ -dihidroxisoalerato y cetoisoalerato para, finalmente, formar L-valina. Se ha visto que en *A. chrysogenum* altos niveles de L-valina inhiben por retroalimentación los primeros pasos de la ruta, mientras que bajos niveles conducen a una baja producción de CPC, sin mencionar los efectos negativos sobre el crecimiento del microorganismo (Matsumura & Suzuki, 1986).

#### **1.3.3.1.3. Disponibilidad de L-cisteína**

Otro paso limitante en la biosíntesis de CPC es la disponibilidad de L-cisteína, la cual puede formarse mediante cuatro rutas distintas: 1) vía autotrófica, por la cual se asimila azufre inorgánico mediante la serina *O*-acetiltransferasa y la *O*-acetilserina sulfhidrilasa; 2) vía de la sulfhidrilación directa, en la que se incorpora un azufre reducido al intermediario *O*-acetil-L-serina para formar L-cisteína; 3) vía de la transulfuración, en la que la incorporación del azufre es catalizada por la *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa; y 4) transulfuración reversa, en la cual el azufre de la L-metionina es transferido hacia la L-cisteína a través de otros cuatro intermediarios. Aunque *A. chrysogenum* es capaz de llevar a cabo las cuatro rutas, utiliza preferentemente la vía de la transulfuración reversa para abastecerse de la L-cisteína necesaria para la biosíntesis de CPC, mientras que el resto de L-cisteína esencial para su metabolismo es obtenido por la vía autotrófica (Drew & Demain, 1975).

#### **1.3.3.1.4. Disponibilidad y efecto regulador de la metionina**

La metionina ejerce un marcado efecto de estimulación en la formación de penicilina N y CPC en *A. chrysogenum*. Este aminoácido no es requerido para el crecimiento, aunque sí puede ser utilizado como única fuente de nitrógeno o azufre. Además, el átomo de azufre en su estructura es el precursor exclusivo del azufre presente en la molécula de CPC. Se ha observado que altos niveles de metionina en el medio de cultivo, particularmente del isómero D-, estimulan la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y que dichas cantidades de metionina son necesarias para alcanzar una producción óptima de CPC, lo que posiblemente es debido a la degradación de la misma por acción de las aminoácido oxidasas intracelulares (Martín & Demain, 2002). La disponibilidad de metionina parece jugar dos papeles muy importantes en la biosíntesis de CPC: por un lado, es el principal proveedor de L-cisteína mediante la vía de la transulfuración reversa, y por el otro tiene un efecto inductor sobre los genes biosintéticos de CPC, aumentando principalmente los niveles de transcripción de los genes *pcbAB*, *pcbC*, *cefEF* y *cefG* (Martín y Demain, 2002; Velasco *et al.*, 1994). Además, en la

región intergénica de los genes *pcbAB* y *pcbC* se ha encontrado una región consenso CANNTG que es reconocida por ciertos factores de transcripción bHLH (hélice-bucle-hélice) involucrados en las vías de señalización del control por azufre en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que parece sugerir una señalización cruzada de la regulación por azufre con la biosíntesis de CPC (Velasco *et al.*, 1994).

### **1.3.3.2. Influencia del fosfato y oxígeno**

Se ha observado que un exceso de fosfato tiene un efecto negativo sobre la producción de CPC en *A. chrysogenum*, posiblemente debido a que el fosfato incrementa la tasa de consumo de glucosa, acelerando por lo tanto la represión catabólica por fuente de carbono. Además, los altos niveles de fosfato tienen un efecto negativo directamente en la formación de las enzimas ACV sintetasa, IPN sintasa y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa, por lo que también afecta en este punto a la biosíntesis de CPC (Zhang *et al.*, 1988). Se ha sugerido también que el fosfato podría actuar sobre las enzimas IPNS y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa formando complejos con el hierro requerido para su actividad enzimática (Lübbe *et al.*, 1984).

La disponibilidad de oxígeno es muy importante para la producción de antibióticos beta-lactámicos. Es prerequisite tener siempre una buena aireación para obtener altos títulos de dichos antibióticos, posiblemente debido a que las mismas enzimas IPNS y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa requieren también de oxígeno para llevar a cabo su actividad (Hilgendorf *et al.*, 1987). Aunque también se han observado incrementos en la expresión de los genes *acvA* e *ipnA*, que codifican las enzimas responsables de los dos primeros pasos en la biosíntesis de beta-lactamas en *Penicillium chrysogenum*, cuando los niveles de oxígeno son bajos, posiblemente como parte de una respuesta a estrés (Renno *et al.*, 1992).

### 1.3.3.3. Regulación por fuente de carbono

La regulación por fuente de carbono parece actuar en diferentes puntos de la biosíntesis de beta-lactámicos, como: flujo del  $\alpha$ -AAA, transcripción de genes biosintéticos y regulación postranscripcional de los mismos.

Diferentes fuentes de carbono ejercen marcados efectos en la producción de CPC, aquellas que favorecen un crecimiento rápido de *A. chrysogenum* ejercen un fuerte control negativo sobre la producción de CPC. Cuando *A. chrysogenum* crece en una fuente de carbono rápidamente utilizable, como glucosa, maltosa o fructosa, o bien, en fuentes de asimilación más lenta como la sacarosa y galactosa, el orden de disminución en la tasa de crecimiento es glucosa-maltosa-fructosa-galactosa-sacarosa, pero el nivel de producción de antibióticos que se produce es el orden inverso. El efecto negativo de los azúcares rápidamente asimilables en la producción de CPC en *A. chrysogenum* es debido principalmente a varios factores que incluyen: a) inhibición catabólica de actividad sintetasa por la fuente de carbono, como en el caso de la ACVS, y b) represión a nivel transcripcional o traduccional algunas enzimas involucradas en la biosíntesis, como la IPNS y DAOC/DAC sintetasa (Jekosch & Kück, 2000a).

La glucosa promueve el crecimiento en los hongos productores de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pero a altas concentraciones tiene un efecto negativo sobre la producción de los mismos. Por ejemplo, los niveles altos de glucosa, cuando se usa en vez de lactosa, disminuyen el *pool* de  $\alpha$ -AAA en *P. chrysogenum* y por lo tanto disminuye también su flujo hacia la formación del tripéptido ACV. En *P. chrysogenum*, la glucosa reprime la formación de las enzimas ACV sintetasa e IPN sintetasa, aunque no inhibe su actividad (Revilla *et al.*, 1986). A diferencia de lo que ocurre en *P. chrysogenum*, en *A. nidulans* los altos niveles de glucosa afectan muy poco la expresión de la ACV sintetasa, aunque sí tienen un fuerte efecto negativo sobre su actividad. En ambos casos, las altas concentraciones de glucosa afectan la formación de IPN. Se han observado resultados similares cuando se usan otras fuentes de carbono represoras, como por ejemplo la sacarosa (Espeso & Peñalva, 1992). En *A. chrysogenum*, la formación de CPC depende mucho de la fuente de carbono utilizada.

Por ejemplo, la actividad expandasa se ve marcadamente reprimida, pero no inhibida, cuando se usan fuentes de carbono rápidamente utilizables. También, se ha visto represión de la actividad ciclasa, aunque menos pronunciada. Además, se ha observado la disminución en los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *cefEF* en cultivos de *A. chrysogenum* en medios con glucosa, con hasta cinco veces una disminución en la producción de CPC (Jekosch & Kück, 2000a).

En *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei* la represión de la transcripción por glucosa se encuentra regulada por los represores CREA y CRE1, respectivamente. En *Penicillium chrysogenum* se ha observado que el factor transcripcional CreA reprime la expresión del gen *pcbAB* uniéndose a secuencias reguladoras consenso en el promotor del gen, y provocando de esta forma una disminución en los niveles de producción de penicilina (Cepeda-García *et al.*, 2014). En *A. chrysogenum* se logró identificar y aislar el gen codificante de una proteína Cre1 con alta similitud con los represores CREA/1 de *A. nidulans*, *T. reesei* y *P. chrysogenum*. La proteína CRE1 de *A. chrysogenum*, al igual que las otras, contiene dos dedos de zinc del tipo Cys<sub>2</sub>-Hys<sub>2</sub>, los cuales reconocen secuencias consenso de unión 5'-SYGGRG-3'. Los promotores de los genes *pcbC* y *cefEF* contienen varios sitios supuestos de unión a CRE1, a través de los cuales el factor de transcripción podría reprimir la expresión de dichos genes. Además, el factor CRE1 se encuentra autorregulado, al presentar sitios de unión para CRE1 en las regiones promotoras del gen codificante *cre1* (Jekosch & Kück, 2000b).

#### **1.3.3.4. Regulación por fuente de nitrógeno**

La biosíntesis de compuestos  $\beta$ -lactámicos en *A. chrysogenum* está fuertemente regulada por la fuente de nitrógeno empleada, siendo los iones amonio los que tienen el efecto más fuerte. Los altos niveles de amonio inhiben la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* (Sánchez *et al.*, 1981) y en *A. chrysogenum* las concentraciones superiores a 100 mM interfieren notablemente en la producción de CPC. La adición de amonio reprime la ACV sintetasa y la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa, mientras que la L-asparagina y la L-

arginina resultan ser mejores fuentes de nitrógeno sin interferir en la producción de CPC (Shen *et al.*, 1986).

La represión catabólica por fuente de nitrógeno es un sistema regulador de amplio dominio, que opera para asegurar que una provisión constante de nitrógeno esté rápidamente disponible para el crecimiento en respuesta a variables o cambios ambientales. En ausencia de las fuentes de nitrógeno favoritas para el microorganismo, como amonio o glutamina, serían utilizadas otras fuentes secundarias, como nitrato, purinas, proteínas y amidas. Pero esto requeriría la síntesis *de novo* de permeasas y enzimas catabólicas, cuya expresión está fuertemente regulada por el circuito regulador de nitrógeno (Caddick *et al.*, 1994). En *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, el factor regulador global por fuente de nitrógeno se encuentra codificado por los genes *areA* y *nre*, respectivamente (Brakhage, 1998). Cada uno de esos factores contiene un solo dedo de zinc del tipo Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys que, en conjunto con una región básica corriente abajo, conforman el dominio de unión a ADN que reconoce la secuencia consenso GATA (Marzluf, 1997). Se ha encontrado una secuencia consenso GATA en las regiones intergénicas de los genes *acvA* e *ipnA* en *A. nidulans*, seis en las regiones correspondientes en *P. chrysogenum* y quince en las de *A. chrysogenum*, lo que sugiere que dichos genes están sometidos a regulación por fuente de nitrógeno (Haas & Marzluf, 1995; Menne *et al.*, 1994).

#### **1.3.3.5. CPCR1, regulador de cefalosporina C 1**

CPCR1 es un factor de transcripción que se encuentra involucrado en la regulación de la biosíntesis de CPC. La eliminación del gen *cpcr1* no previene la producción de CPC pero sí reduce significativamente sus niveles. CPCR1 se une en forma de dímero al promotor de los genes *pcbAB* y *pcbC* y promueve su transcripción, aunque es más probable que su interacción se dé preferentemente con otro tipo de proteínas reguladoras (Hoff *et al.*, 2005). Es el primer miembro de la familia RFX de factores de transcripción descrito en hongos. Los factores RFX forman parte de un grupo de proteínas de unión al ADN que contienen el motivo hélice-giro-hélice modificado conocido como

“winged helix” y se encuentran involucradas en mecanismos de regulación que no son específicos para la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos en hongos, tales como la reparación del ADN, divisiones meióticas e, incluso, la respuesta inmune en los humanos. Además del dominio de unión al ADN, la proteína CPC1 presenta un sitio de homodimerización, sin el cual su actividad resulta nula (Schmitt *et al.*, 2004a). El regulador CPC1 controla la fragmentación de hifas en *A. chrysogenum* y, por lo tanto, la formación de artrosporas (Hoff *et al.*, 2005).

En *Penicillium chrysogenum* se ha encontrado un ortólogo de este gen, denominado *Pcrfx1*, cuyo producto regula la expresión de los genes de penicilina, aunque no parece estar involucrado en la morfología y desarrollo del hongo (Domínguez-Santos *et al.*, 2012).

#### **1.3.3.6. Regulador AcFKH1**

La proteína AcFKH1 es un factor de transcripción similar al regulador CPC1, pero del tipo “forkhead”. Se caracteriza por poseer dos dominios conservados: el dominio asociado a forkhead (FHA) en la región N-terminal, el cual podría estar involucrado en interacciones con fosfoproteínas, y el dominio de unión al ADN en la región C-terminal. El regulador se une a dos sitios consenso para forkhead presentes en la región promotora de los genes *pcbAB* y *pcbC*. Aunque el regulador AcFKH1 parece no tener efecto directo en la morfogénesis de *A. chrysogenum*, sí se requiere su interacción con el regulador CPC1 para la función de este último (Schmitt *et al.*, 2004b).

#### **1.3.3.7. AcVEA, regulador global *velvet***

En hongos, el producto del gen *velvet* (*veA*) es un regulador global de la morfogénesis. Mientras que la conidiación ocurre siempre en presencia de luz (en las cepas silvestres), una mutación en el gen *veA* elimina tal dependencia originando cepas capaces de producir conidios aún en la oscuridad. La eliminación completa del gen *veA* origina cepas incapaces de producir estructuras sexuales (cleistotecio) y la sobreexpresión del gen permite el desarrollo de cleistotecio aún en condiciones desfavorables. Estas observaciones condujeron a la conclusión de que el producto del gen *veA* regula

negativamente el desarrollo asexual, a la vez que regula positivamente el desarrollo sexual. Además, también regula la expresión de los genes biosintéticos de beta-lactamas en *A. nidulans* (Kato *et al.*, 2003). En *A. chrysogenum*, el polipéptido AcVEA regula positivamente la transcripción de los seis genes biosintéticos de CPC. La interrupción del gen *AcveA* disminuye la expresión de los genes biosintéticos, particularmente del gen *cefEF*, y por lo tanto disminuye drásticamente la producción de CPC en aproximadamente el 80% (Dreyer *et al.*, 2007).

#### **1.3.3.8. AcSEPH, proteína de septación H**

AcSEPH es una proteína con alta similitud a las proteínas de septación H de otros hongos filamentosos. En su región amino terminal presenta un dominio catalítico proteín-cinasa-serina/treonina altamente conservado. Está involucrada en los procesos de septación y diferenciación celular de *A. chrysogenum*. Su inactivación mediante interrupción del gen *AcsepH* afecta negativamente la diferenciación y la biosíntesis de CPC, disminuyendo significativamente la expresión del gen *cpcR1*, cuyo producto regula la formación de atrosporas y la transcripción del gen *pcbC*. La interrupción del gen *AcsepH* también reduce significativamente los niveles de expresión de los genes *cefEF*, *cefD1* y *cefD2* (Long *et al.*, 2013).

#### **1.3.3.9. AcATG1, proteína relacionada con autofagia 1**

AcATG1 es una proteín-cinasa serina/treonina involucrada en los procesos de autofagia, metabolismo de lípidos, crecimiento, diferenciación celular y producción de metabolitos. La interrupción del gen *Acatg1* en *A. chrysogenum* y su homólogo en *P. chrysogenum* disminuyen significativamente la formación de conidios en ambos microorganismos y aumentan la producción de CPC y penicilina, respectivamente. En *A. chrysogenum* la interrupción de este gen aumenta significativamente la expresión de los genes biosintéticos de CPC y evita la degradación de algunas enzimas biosintéticas (por ejemplo, la IPNS) en las etapas tardías del cultivo. Esto demostraría que la autofagia en *A. chrysogenum* ejerce un papel importante en la producción de CPC (Wang *et al.*, 2014).

### 1.3.3.10. Regulación por pH ambiental de la biosíntesis de CPC

Todos los microorganismos tienen que adaptarse al pH de su medio ambiente. En muchos de ellos, el pH juega un papel importante al determinar los niveles de transcripción de los genes cuyos productos finales tienen que funcionar extracelularmente o en las fronteras celulares. Los genes regulados por el pH ambiental incluyen permeasas, algunas enzimas secretadas, enzimas intracelulares que participan en la síntesis de productos exportados como toxinas, antibióticos y compuestos capaces de modificar el pH ambiental (Peñalva & Arst, 2004). Muchos hongos filamentosos son capaces de sobrevivir y crecer en un amplio intervalo de pH ambiental, el cual puede ser tan ácido como 2 o tan alcalino como 10. Aparte de su capacidad homeostática, estos organismos tienen que adaptar la secreción de enzimas y de metabolitos secundarios en respuesta al pH ambiental. Tanto las penicilinas como las cefalosporinas se producen en cantidades elevadas siempre a pH ambiental alcalino (Schmitt *et al.*, 2004a).

La regulación genética mediada por el pH ambiental es un sistema ampliamente utilizado en el reino de los hongos. Estudios intensivos en mutantes con defectos en la regulación por pH condujeron a la identificación y aislamiento del gen *pacC* en *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), luego en *P. chrysogenum* (Suárez & Peñalva, 1996), *A. niger* (MacCabe *et al.*, 1996) y *A. chrysogenum* (Schmitt *et al.*, 2001). La proteína PacC es un factor de transcripción que contiene tres dedos de zinc tipo Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, de los cuales solamente dos hacen contacto con el sitio de unión al ADN, mientras que el dedo uno interactúa con el dedo dos. PacC se une a sitios consenso de unión 5'-GCCAAG-3' en las regiones promotoras de los genes que regula (Espeso *et al.*, 1997). En condiciones ácidas predomina la forma PacC<sup>72</sup>, el producto de traducción de 72 kDa, conformado por 674 aminoácidos. Tres regiones de interacción de PacC<sup>72</sup> lo mantienen aparentemente en una forma inactiva, previniendo su procesamiento proteolítico. Con el cambio del pH ambiental a neutro y/o alcalino, PacC<sup>72</sup> experimenta dos roturas proteolíticas sucesivas. La primera es dependiente de la señal de transducción por pH y la segunda ocurre de manera independiente del pH ambiental y es llevada a cabo por el proteosoma. Los dos procesamientos proteolíticos conducen a la forma activa del factor de transcripción PacC<sup>27</sup>.

### 1.3.3.10.1. Cascada de señalización por pH

Además del gen *pacC*, otros seis genes se encuentran involucrados en la regulación por pH: los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *pall*, cuyos productos, junto con el factor de transcripción PacC, conforman toda una ruta de señalización en respuesta al pH ambiental. La señalización por pH en hongos se encuentra mejor estudiada en *Aspergillus nidulans* y se detalla a continuación (revisado por Peñalva *et al.*, 2008).

La proteína PalH es un receptor de siete dominios transmembranales (7TMD) que funciona como sensor del pH extracelular (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999). PalH interactúa con la proteína membranal Pall, la cual podría funcionar también como sensor del pH extracelular (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007), aunque su participación clave es más bien ayudar a la localización de PalH en la membrana plasmática (Denison *et al.*, 1998).

Cuando las condiciones de pH cambian de neutras a alcalinas, el extremo C-terminal de PalH interactúa fuertemente con PalF, una proteína del tipo de las arrestinas (proteínas que facilitan la regulación cascada abajo de la señalización mediada por receptores 7TMD). PalF se fosforila y se multi-ubiquitina, conduciendo a la internalización de la membrana para iniciar la formación de un complejo endosomal (Herranz *et al.*, 2005; Lefkowitz & Shenoy, 2005).

Por otro lado, la proteína PalC es secuestrada hacia las estructuras corticales con sitios de interacción PalF-PalH, donde se une al complejo de distribución endosomal requerido para transporte III (ESCRT-III), a través de su dominio de unión Bro1 (Peñalva *et al.*, 2008). Los complejos ESCRT-III y Vps32 forman un entramado en la membrana endosomal. Cuando la proteína PalC se une a ESCRT-III, se promueve el secuestro de las proteínas PalA hacia el complejo endosomal, permitiendo la interacción de PalA con el subcomplejo Vps32 mediante su dominio de unión Bro1, lo que lleva a la interacción de Vps32-PalA con ESCRT-III (Vincent *et al.*, 2003).

Después, una proteína del tipo de las calpaínas denominada PalB se une al complejo activado de ESCRT-III a través de su dominio de unión e interacción con microtúbulos

(MIT). La formación de este complejo endosomal termina con el secuestro del factor de transcripción PacC<sup>72</sup> (conformación cerrada de aproximadamente 678 aminoácidos), que se une a las dos proteínas palA del complejo mediante sus dos sitios de unión YPXL. Los dominios de unión a palA en el factor de transcripción PacC flanquean una región de 24 residuos denominada “caja de la proteasa señalizadora” que será el sitio de rotura para PalB, que posiblemente desempeña el papel de proteasa señalizadora (Díez *et al.*, 2002). PalB elimina alrededor de 180 aminoácidos desde el extremo C-terminal para dar lugar a la conformación PacC<sup>53</sup> (forma intermedia de aproximadamente 495 aminoácidos) (Rodríguez-Galán *et al.*, 2009). Posteriormente, el factor de transcripción PacC<sup>53</sup> experimenta el segundo rompimiento proteolítico, independiente del pH ambiental y catalizado por el proteosoma, que elimina aproximadamente otros 245 residuos del extremo C-terminal, dejando intacta la región de los dedos de zinc (dominio de unión al ADN) y dando lugar a la forma funcional PacC<sup>27</sup>, de alrededor de 250 residuos. En condiciones ácidas, las interacciones intramoleculares de PacC<sup>72</sup> prevendrían el acceso al proteosoma (Hervás-Aguilar *et al.*, 2007).

El factor de transcripción en su forma activa PacC<sup>27</sup> se une los sitios blanco en los promotores de genes expresados preferencialmente a pH alcalino para activar su expresión y etiqueta sitios en los promotores de los genes expresados preferentemente a pH ácido para prevenir su expresión (Peñalva *et al.*, 2008). La activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental en *A. nidulans* se resume en la figura 5.

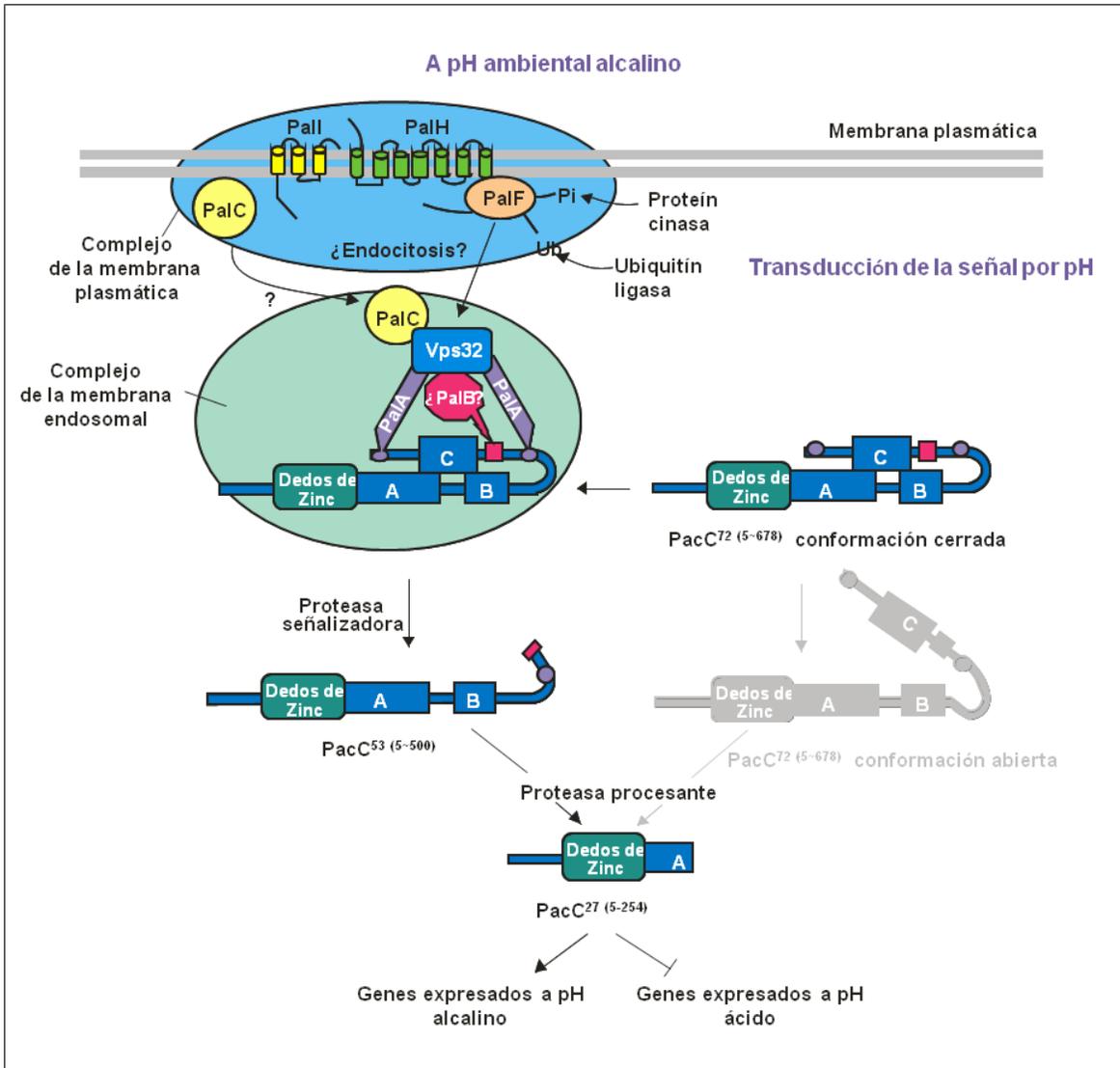


Fig. 5. Activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental (Peñalva *et al.*, 2008).

## 2. ANTECEDENTES

Gracias al avance en el conocimiento de las técnicas bioquímicas y moleculares se ha logrado describir las rutas biosintéticas de los antibióticos beta-lactámicos y sus mecanismos de regulación en hongos productores. Aunque el mayor progreso en el campo de los antibióticos beta-lactámicos se ha alcanzado con estudios sobre la biosíntesis de la penicilina en *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum*, hoy en día ya se conoce la ruta de biosíntesis de CPC en *Acremonium chrysogenum* y algunos de sus mecanismos reguladores (Schmitt *et al.*, 2004a).

Hasta hace algunos años, muchos de los avances en el mejoramiento de la producción de antibióticos beta-lactámicos por hongos productores estuvieron limitados a las herramientas de mejoramiento genético clásico, como mutagénesis al azar, selección bioquímica y fusión de protoplastos (Skatrud *et al.*, 1987). Aunque hoy en día las técnicas clásicas de mejoramiento genético se encuentran cada vez más en desuso, han sido una herramienta clave para incrementar a grandes niveles la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por los organismos productores, aún con el escaso marco teórico que se tiene sobre las rutas de biosíntesis y/o su regulación.

### 2.1. Mejoramiento genético clásico

La genética ha tenido una larga historia de contribuciones a la producción de metabolitos microbianos. Los enormes incrementos en la productividad y las notables reducciones en los costos han sido resultado de mejoramientos obtenidos principalmente mediante mutagénesis, recombinación y selección de cepas altamente productoras (Adrio & Demain, 2006).

El mejoramiento de cepas mediante mutación y selección es todavía parte esencial de los programas de mejoramiento de la producción convencional de antibióticos, permitiendo el bloqueo de actividades enzimáticas no deseadas, removiendo regulaciones negativas, incrementando las dosis génicas, etc. Se pueden incluso seleccionar nuevas cepas para cubrir propósitos específicos, como el incremento de la producción de

antibióticos, el uso de sustratos crudos más baratos, cultivos a diferentes temperaturas o con demandas reducidas de oxígeno, periodos más cortos de cultivo, morfologías celulares especiales, etc. (Díez *et al.*, 1997). Hace ya más de 60 años desde que se consiguió la primera cepa mutante sobreproductora de penicilina, *Penicillium chrysogenum* X-1612, después de un tratamiento de mutagénesis con rayos X, con lo cual se marcó el comienzo de una larga y satisfactoria relación entre la microbiología industrial y la genética mutacional (Hersbach *et al.*, 1984). El mejoramiento de la producción de penicilina mediante estrategias clásicas convencionales ha sido el resultado de la aceleración de la expresión genética y de la amplificación de genes. Derivado del uso de estos métodos, se han encontrado en cepas sobreproductoras de *P. chrysogenum* incrementos en los niveles de ARNm correspondientes a tres de las enzimas biosintéticas de penicilina G (Smith *et al.*, 1990). Mientras que en otras cepas altamente productoras se han encontrado regiones con cinco a seis repeticiones en tándem de genes biosintéticos (Fierro *et al.*, 1995). Gracias a las técnicas clásicas de mejoramiento genético se han logrado obtener cepas de *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum* sobreproductoras de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, con títulos de hasta 70 g/L de penicilina en cultivos industriales de *P. chrysogenum* y 30 g/L de cefalosporina C en *A. chrysogenum* (Elander, 2003).

## **2.2. Utilización de sistemas de cultivo sumergido**

La mayoría de los cultivos para la producción de antibióticos beta-lactámicos, tanto experimentales como industriales, se llevan a cabo preferentemente en cultivos líquidos, denominados también cultivos sumergidos (SmF). Desde hace décadas, *Acremonium chrysogenum* ha sido el microorganismo de elección para la producción de CPC. Industrialmente, se ocupan grandes cultivos sumergidos en lote o alimentados, por lo que se han centrado muchos esfuerzos para mejorar los rendimientos de antibiótico en la optimización de los medios y las condiciones de cultivo. El conocimiento de la regulación de la biosíntesis de CPC por *A. chrysogenum* ha sido la clave para el desarrollo de medios de cultivo que promuevan la producción de CPC y eviten algún tipo de represión catabólica o regulación negativa. Por ejemplo, Caltrider & Niss (1966) encontraron que la

metionina tiene un efecto estimulador para la producción de CPC, además de que el átomo de azufre contenido en su molécula proviene exclusivamente de ésta. Años más tarde Sawada *et al.* (1980) y Zhang *et al.* (1987) demostraron su efecto inductor en la formación de varias enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis. Velasco *et al.* (1994) demostraron asimismo su efecto inductor en la transcripción de algunos de los genes biosintéticos de CPC. Kennel & Demain (1978) estudiaron los efectos de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de  $\beta$ -lactamas por *A. chrysogenum*, encontrando que las mejores fuentes en un medio definido son glucosa (en baja concentración, la cual se utilizaría rápidamente durante la trofofase) y sacarosa (en mayor proporción, para ser consumida durante la idiofase).

Shen *et al.* (1984) probaron fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno para estudiar sus efectos reguladores sobre la producción de compuestos  $\beta$ -lactámicos por *A. chrysogenum*, y encontraron que las fuentes orgánicas (como la asparragina o la arginina) funcionan mejor que las sales de amonio, además de que evitan la represión por nitrógeno de la actividad expansada durante la biosíntesis de  $\beta$ -lactamas.

Kozma & Karaffa (1996) estudiaron el efecto del oxígeno sobre el sistema respiratorio y la producción de CPC en cultivos de *A. chrysogenum*, encontrando que altos niveles de oxígeno tienen un efecto positivo en la sobreproducción del antibiótico y confirmando la necesidad de una buena aireación durante los cultivos sumergidos. La mayoría de los procesos de producción de CPC utilizan preferentemente cultivos sumergidos con medios de producción complejos, obtenidos a partir de sustratos baratos como melaza de caña, extracto de carne, licor de maíz remojado, aceite de soya, etc., con altos niveles de productividad (lo cual puede ser favorecido por los factores de crecimiento presentes en los bioproductos agrícolas). Las ventajas de los medios de cultivo complejos son la alta densidad de biomasa y las altas producciones alcanzadas, aunque en ocasiones éstas son superadas por las desventajas. La alta viscosidad del medio y los altos requerimientos de oxígeno se traducen en un mayor gasto de energía para el bioproceso, lo que también incrementa los costos de producción. Además, la turbidez del medio y la presencia de residuos sólidos en él dificultan el análisis, la recuperación y la

purificación del producto, sin mencionar el hecho de que el medio de cultivo debe ser diluido para recuperar el producto, lo que disminuye drásticamente la productividad (Seidel *et al.*, 2002a).

Se han realizado muchos otros estudios de optimización que utilizan cultivos sumergidos en medios sintéticos, semisintéticos y complejos, en combinación con sistemas de reactor en lote o alimentados para mejorar los títulos de producción de CPC y eliminar las variables que interfieren con una buena productividad (El-Sabbagh *et al.*, 2008; Jürguens *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 2002a y 2002b; Zhou *et al.*, 1992).

### **2.3. Utilización de sistemas de cultivo en estado sólido**

Una alternativa para mejorar la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos ha sido el empleo de sistemas de cultivo en estado sólido (SSF). Estos sistemas ofrecen ventajas ecológicas para el crecimiento de hongos y actinomicetos, por lo que podrían ser una opción altamente eficiente para la sobreproducción de sustancias de alto valor agregado (Barrios-González & Mejía, 1996). Recientemente se han considerado como los sistemas más baratos y más amigables con el medio ambiente, en comparación con los sistemas de cultivo sumergido (SmF) (Mienda *et al.*, 2011). Los sistemas de SSF, a pequeña escala y utilizando ciertos sustratos sólidos (principalmente residuos agrícolas), parecen ofrecer varias ventajas sobre la tecnología de los cultivos sumergidos para la producción de enzimas, esporas, biocombustibles y diversos metabolitos (Holker *et al.*, 2004). Algunas de las ventajas que ofrecen los sistemas de SSF frente a SmF son: 1) La baja disponibilidad de agua reduce la posibilidad de contaminación por bacterias o levaduras, permitiendo en algunos casos trabajar bajo condiciones no asépticas; 2) La alta aireación resulta ser adecuada para procesos que tienen una gran demanda de oxígeno; 3) Las condiciones ambientales resultan ser similares al hábitat natural de la mayoría de microorganismos utilizados en SSF; 4) Los requerimientos de energía para los sistemas de SSF son bajos, por lo que podrían reducirse los costos de producción en algunos casos en los que no se requiera de agitación mecánica, tratamiento por vapor, autoclavado o altas condiciones de aireación; 5) Los volúmenes de efluentes contaminantes son pequeños, además de que

el requerimiento de disolventes para la extracción de los productos son bajos debido a la alta concentración de estos últimos; 6) Las condiciones de humedad utilizadas podrían facilitar la producción de compuestos que probablemente no se producirían, o lo harían pobremente, en SmF. Por otro lado, algunas de las desventajas que presentan los sistemas de SSF son: 1) En algunos casos los sustratos requieren de pretratamiento, como reducción del tamaño de partícula por tamizado, hidrólisis física, química o enzimática, cocción o tratamiento por vapor, etc.; 2) Los sistemas de SSF se ven limitados principalmente al uso de microorganismos que no requieran altas condiciones de humedad; 3) En ocasiones se dificulta el monitoreo de parámetros como pH, contenido de humedad, formación de biomasa, concentración de sustratos, consumo de oxígeno, etc., debido a la propia naturaleza sólida de los sustratos; 4) La aireación también podría dificultarse, debido a la presencia de altas concentraciones de sólidos. A pesar de estas desventajas y algunas otras sin mencionar, aún se cree posible solucionar mediante ingeniería de biorreactores los problemas que se han ido presentado en los sistemas de SSF (Mienda *et al.*, 2011).

Varios autores han utilizado los sistemas de SSF para mejorar la producción de antibióticos beta-lactámicos, tratando de aprovechar las ventajas metabólicas que ofrecen estos sistemas y de minimizar ciertos problemas asociados con la producción de metabolitos secundarios en cultivos líquidos, como fuerzas cortantes, incremento en la viscosidad debido a la secreción de metabolitos, morfología fúngica y reducción en la estabilidad metabólica (Bhargav *et al.*, 2008).

Por ejemplo, Barrios-González *et al.* (1988) utilizaron un sistema de SSF en bagazo impregnado con medio de cultivo para producir penicilina a partir de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951. Demostraron que un contenido inicial del 70% de humedad en el soporte se traducía en una alta producción, con rendimientos superiores, en comparación con un sistema líquido, además de que el uso de un medio de cultivo concentrado aceleraba y favorecía la producción. Años más tarde, Domínguez *et al.* (2000) demostraron que al disminuir el contenido de bagazo en este sistema, la formación de penicilina se veía favorecida, posiblemente debido a que en estas condiciones también

disminuye la provisión de nutrientes, generándose mejores condiciones metabólicas para la producción de antibióticos. En otros ejemplos, se han utilizado los sistemas de SSF para producir cefamicina C por *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces clavuligerus* y *Nocardia lactamdurans*, concretamente soportes de trigo crudo suplementados con pasta de semilla de algodón sin aceite y semilla de girasol (Kota & Sridhar, 1999). Wang *et al.* (1984) investigaron la producción de CPC en SSF utilizando varios tipos de grano de arroz como sustrato, encontrando que al utilizar arroz Tsilai se obtenía la mayor producción. Estos autores optimizaron los siguientes parámetros de cultivo: densidad de inóculo =  $2.8 \times 10^8$  esporas/g de sustrato, humedad inicial = 49-51%, temperatura = 25°C. Después de 7 días de cultivo con *A. chrysogenum* M8650-R-3 observaron una producción máxima de hasta 6420 µg de CPC/g de sustrato.

En 1989, Jermini & Demain utilizaron cebada como soporte y la cepa C10 de *A. chrysogenum*, alcanzando una producción máxima de CPC de 950 µg/g de sustrato a los 10 días de cultivo.

Adinarayana *et al.* (2003) optimizaron los aditivos y los parámetros de temperatura, contenido de humedad, cantidad de inóculo, etc., para alcanzar un máximo en la producción de CPC usando *A. chrysogenum* y varios sustratos, encontrando que el trigo crudo era la mejor opción. Obtuvieron una producción de CPC de hasta 22281 µg/g de sustrato a los 5 días de cultivo a 30°C, con una humedad inicial del 80%, pH de 6.5 y un inóculo de  $2 \times 10^7$  esporas/g de sustrato.

En estudios realizados por Cuadra (2004), se establecieron en nuestro laboratorio las condiciones para la producción de CPC por *A. chrysogenum*, utilizando un sistema de cultivo sólido en dos fases soporte-sustrato. Cuadra probó como soporte el bagazo de caña y la espuma de poliuretano, encontrando que en el bagazo de caña la producción de CPC resultaba ser más estable. Cuadra *et al.* (2008) optimizaron la producción de CPC por *A. chrysogenum* C10 en SSF, demostrando que al comenzar el cultivo con un valor de pH de 5.8 y utilizando tampón de fosfatos en una concentración de 75 mM se lograba mantener por más tiempo valores de pH que favorecían la producción de CPC. También

demonstraron que al utilizar una concentración de medio de cultivo más elevada (2.5 X) se conseguía elevar el rendimiento de CPC, desde 468 hasta 3200  $\mu\text{g/g}$  de sustrato.

#### **2.4. Mejoramiento genético molecular**

El creciente conocimiento en la genética molecular de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos ha abierto nuevas posibilidades para mejorar de manera racional las cepas productoras de dichos antibióticos. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante para la producción de metabolitos secundarios ha sido de gran interés, a este respecto (Díez *et al.*, 1997). Algunas de las herramientas moleculares más utilizadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios incluyen: clonación y sobreexpresión de genes biosintéticos (inclusive de clústeres completos), incremento en la dosis génica de genes reguladores positivos (factores de transcripción u otros reguladores pleiotrópicos), disrupción o disminución de la dosis génica de genes reguladores negativos, intercambio de promotores débiles por promotores fuertes, eliminación de ciertos genes para eliminar reacciones indeseables no productivas, evolución dirigida de genes biosintéticos, inactivación de genes involucrados en la reparación del ADN tipo NHEJ (non-homologous end joining) para mejorar mecanismos de integración de ADN foráneo y silenciamiento de genes para knock-down, análisis transcriptómicos y/o proteómicos, ingeniería metabólica, “shuffling” genómico, etc. (Ozcengiz & Demain 2013).

Uno de los blancos más importantes para el mejoramiento genético con herramientas moleculares de la producción de antibióticos beta-lactámicos ha sido, desde hace años, el hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum*. En la década de 1980's se logró la optimización de un sistema eficiente de transformación integrativa para *A. chrysogenum* (Queener *et al.*, 1985; Skatrud *et al.*, 1987), con lo cual dio comienzo una nueva etapa de estudios y uso de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de este microorganismo. El desarrollo de plásmidos integrativos con promotores fuertes o inducibles y marcadores de selección adecuados para hongos han permitido clonar, sobreexpresar, eliminar o silenciar genes de interés, ya sea con fines de mejoramiento genético o simplemente para el estudio de microorganismos de interés

industrial. Preferentemente se han utilizado tres diferentes marcadores de selección: los genes bacterianos para la resistencia a higromicina B y fleomicina, y una versión mutada del gen de la  $\beta$ -tubulina de *A. chrysogenum*, que confiere resistencia al fungicida benomilo. Con dichas herramientas moleculares disponibles, se han realizado esfuerzos por tratar de mejorar genéticamente la producción de CPC. Algunas de las estrategias utilizadas han sido el aumento en el número de copias de los genes biosintéticos, la utilización de promotores más fuertes y el mejoramiento del metabolismo aeróbico. Algunos ejemplos de estas estrategias se describen a continuación.

En 1989, Skatrud & Queener aumentaron el número de copias del gen *pcbC* en *A. chrysogenum*, sin obtener un incremento significativo en la producción de CPC. Esto estaría indicando que la actividad isopenicilina N sintasa (o ciclasa) no es una etapa limitante en la biosíntesis de los antibióticos beta-lactámicos. Ese mismo año, Skatrud *et al.* (1989) reportaron un incremento del 15% en la producción de CPC utilizando una cepa industrial de *A. chrysogenum* (394-4) transformada con una copia extra del gen *cefEF* (DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa). Sin ellos saberlo, el gen *cefG* también fue incrementado junto con el gen en estudio, pues se encuentran contiguos en el genoma. Poco después, Matsuda *et al.* (1992) y Mathison *et al.* (1993) clonaron sólo el gen *cefG* y lo transformaron en una cepa silvestre de *A. chrysogenum*, aumentando su número de copias alrededor de cinco veces. Con ello, obtuvieron un aumento de tres veces en la producción de CPC, demostrando que exclusivamente las copias adicionales del gen *cefG* y los niveles correspondientes de su ARNm estaban directamente relacionados con los títulos de CPC y sugiriendo que esta enzima podría ser un paso limitante en la ruta biosintética.

En otra investigación se utilizó también el gen *cefG*, aunque expresado bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans* y del promotor fuerte no constitutivo del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. En general, se observó un alto nivel de transcripción del gen en todas las transformantes obtenidas, confirmando que el gen *cefG* es limitante para la biosíntesis de CPC (Gutiérrez *et al.*, 1997).

Dado que la biosíntesis de CPC se ve regulada también por el contenido de oxígeno en el medio (Hilgendorf *et al.*, 1987) y que bajos niveles de éste reducen drásticamente la producción de CPC, DeModena *et al.* (1993) mejoraron el metabolismo aeróbico de *A. chrysogenum* al expresar el gen *vgb* de *Vitreoscilla sp.* (que codifica para una proteína bacteriana análoga a la hemoglobina) bajo el control del promotor constitutivo TR1 de *Trichoderma reesei*. El resultado fue la obtención de títulos de CPC hasta cinco veces más altos que los controles.

Otro ejemplo interesante lo constituyó el aumento en el número de copias del gen *mecB*, el cual codifica para la enzima cistationina- $\gamma$ -liasa, necesaria para la biosíntesis de cisteína vía transulfuración reversa. Algunas de las transformantes obtenidas con múltiples copias del gen *mecB* mostraron alta actividad de la enzima, y una de ellas mostró alta producción de cefalosporina, concluyéndose que sólo los niveles moderadamente incrementados de cistationina- $\gamma$ -liasa estimulan la producción de CPC, pero en exceso son perjudiciales tanto para el crecimiento como para la producción (Kosalková *et al.*, 2001).

En 2004, Ullán *et al.* introdujeron copias adicionales de un fragmento que contenía los genes *cefD1* y *cefD2* de *A. chrysogenum*, obteniendo como resultado un incremento del 80-100% en la producción de CPC.

Otra razón para la construcción de cepas de *A. chrysogenum* modificadas genéticamente es el intento de producir otros intermediarios de las cefalosporinas de uso clínico, que sean más útiles que la misma CPC para generar modificaciones químicas. Tal es el caso del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA) y del ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA), los cuales usualmente se obtienen enzimáticamente o químicamente a partir de la CPC o de la penicilina G. En un intento por obtener 7-ACA directamente por la conversión de CPC, Isogai *et al.* (1991) transformaron *A. chrysogenum* con el ADNc para una D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solani* y el gen de una glutaril acilasa proveniente de *Pseudomonas diminuta*, con lo que lograron obtener cantidades detectables de 7-ACA en los caldos de cultivo, aunque sin ser comercialmente

significativas. Más recientemente, Liu *et al.* (2010a) introdujeron un gen sintético *ecs* en *A. chrysogenum* que codifica para una CPC acilasa expresado bajo el control del promotor endógeno del gen *pcbC*, obteniéndose como resultado la formación de hasta 1701 µg/mL de 7-ACA directamente *in vivo*.

En otro ejemplo, Velasco *et al.* (2000) obtuvieron 7-ADCA utilizando la desacetoxicefalosporina C (DAOC) producida endógenamente por *A. chrysogenum*. En primer lugar, obtuvieron una cepa de *A. chrysogenum* que acumulaba DAOC, al interrumpir el gen *cefEF* y reemplazar su actividad por la del producto del gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus* expresado bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. A continuación, la DAOC obtenida fue transformada a ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA) mediante dos reacciones enzimáticas consecutivas, catalizadas por una D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* y una glutaril oxidasa de *Acinetobacter sp.*

Crawford *et al.* (1995) expresaron el gen *cefEF* de *A. chrysogenum* en *P. chrysogenum* con el propósito de utilizar su actividad expandasa/hidroxilasa para formar ácido adipoil-7-amino desacetilcefalosporánico (adipoil-7-ADAC) a partir de la adición de ácido adípico al medio de crecimiento. Después, se transformó la cepa obtenida con una copia del gen *cefG* de *A. chrysogenum*, lo que permite la conversión del adipoil-7-ADAC en ácido adipoil-7-amino cefalosporánico (adipoil-7-ACA), que mediante una conversión *in vitro* mediada por una glutaril-7-ACA-acilasa, originaría finalmente el 7-ACA (Monti *et al.*, 2000).

Otra estrategia novedosa consistió en expresar todo el clúster de cefalosporina (*cefD1*, *cefD2*, *cefEF* y *cefG*) de *A. chrysogenum* en una cepa de *P. chrysogenum* a la que le faltaba la actividad isopenicilina N aciltransferasa, provocando la acumulación intracelular de cantidades significativas de cefalosporina C y desacetilcefalosporina C (Ullán *et al.*, 2007). Sin embargo, la cepa recombinante de *P. chrysogenum* carece aún de un mecanismo eficiente para la secreción de la CPC.

En 2008, Nijland *et al.* expresaron los genes *cefEF* y *cmcH* de *A. chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus*, respectivamente, en *P. chrysogenum* para conseguir la formación de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cephem-4-carboxílico (ad7-ACCCA). Posteriormente, expresaron también el gen *cefT* de *A. chrysogenum* y obtuvieron una producción dos veces mayor de cefalosporina a partir de *P. chrysogenum*, demostrando que la producción de cefalosporinas por *P. chrysogenum* está limitada por la capacidad del hongo para secretar tales compuestos.

Liu *et al.* (2010b) realizaron construcciones plasmídicas con combinaciones de los genes *cefEF*, *cefG* y *cefT* de *A. chrysogenum* y el gen *vgb* de *Vitreoscilla sp.* y transformaron con ellas una cepa industrial de *A. chrysogenum* (84-3-8), encontrando que varias transformantes con múltiples copias del gen *cefG* aumentaron significativamente la producción de CPC, y que la mejor combinación que aumentó drásticamente la producción fue una copia extra de los genes *cefG* y *cefEF*, además de la integración del gen *vgb*.

Teixeira *et al.* (2011) encontraron dentro del clúster temprano de CPC un gen que codifica para la proteína reguladora CefR, que contiene un dominio de unión al ADN “fungal-trans” y un sitio de localización nuclear, posiblemente involucrada en el transporte de compuestos beta-lactámicos. Demostraron que la inactivación de este gen retrasa la expresión del gen *cefEF*, incrementa la acumulación de IPN y disminuye la producción de CPC, mientras que su sobreexpresión disminuye la secreción de IPN hasta en un 60%, asegurando la posterior formación de precursores e incrementando la producción de CPC. Encontraron también que CefR actúa como un represor del gen *cefT* y ejerce un pequeño efecto estimulador en los niveles de expresión del gen *cefEF*.

En 2013, Gsaller *et al.* describieron el uso del primer promotor inducible en *A. chrysogenum* para aplicaciones moleculares de expresión génica condicional. Utilizaron el promotor del gen *mir1* de *A. chrysogenum*, una ORF cuyo producto de traducción mostraba alta similitud con proteínas transportadoras de sideróforos de *A. nidulans* y *Gibberella zeae*. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular capaces de quelar

el hierro, que pueden ser excretados por algunos microorganismos cuando estos detectan que hay escasez de este metal en su medio ambiente. Después de que los sideróforos secuestran el hierro, los complejos son absorbidos por el microorganismo a través de proteínas transportadoras de sideróforos. Los autores probaron el promotor de dicho gen fusionándolo a la proteína verde fluorescente (GFP) o a un gen de resistencia a fleomicina. Sus resultados demostraron que los genes expresados con el promotor *Pmir1* eran susceptibles a los cambios en la disponibilidad de hierro, es decir, que su expresión se veía favorecida cuando las condiciones de hierro eran limitantes y que, por otro lado, su expresión disminuía en cuanto se agregaba hierro al medio de cultivo. Aunque estos resultados no impactaron en el mejoramiento genético de *A. chrysogenum*, si contribuyeron enormemente a aumentar el *pool* de herramientas moleculares disponibles para este microorganismo, ya que el promotor *Pmir1* es el primer reporte que se tiene de un promotor inducible para ser utilizado como herramienta molecular en *A. chrysogenum*.

Un año más tarde, Blatzer *et al.* (2014) describieron la aplicación de otro promotor para expresión génica condicional de genes heterólogos en *A. chrysogenum*, el promotor endógeno inducible por xilano y/o xilosa *Pxil1*, cuyo análogo en *P. chrysogenum* había sido utilizado ya exitosamente en diversos hongos como el mismo *P. chrysogenum*, *A. nidulans*, *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa*, pero que no había tenido efectos positivos para *A. chrysogenum*. Recientemente, Bloemendal *et al.* (2014) reportaron la aplicación exitosa del promotor inducible por xilosa *Smxyl* de *Sordaria macrospora* en *A. chrysogenum* como estrategia para la manipulación genética de este microorganismo, con la posibilidad de reducir o eliminar el uso de marcadores de selección químicos. Estos mismos autores reportaron también que una eliminación del gen *ku70* de *A. chrysogenum* aumenta enormemente las probabilidades de recombinación homóloga, lo cual resulta de gran interés porque la recombinación homóloga es un evento que ocurre con poca frecuencia en hongos, y es aún mucho más raro en *A. chrysogenum*. El gen *ku70* codifica para una subunidad del heterodímero Ku70/80 que está involucrado en el mecanismo de reparación del ADN tipo NHEJ y que es el responsable de que los eventos de integración de ADN foráneo al genoma de este hongo ocurran preferencialmente de forma ectópica.

Con mayores posibilidades de recombinación homóloga se podría facilitar el análisis y la manipulación genómica de *A. chrysogenum* para futuras investigaciones de índole básica o aplicada (Bloemendal *et al.*, 2014).

## **2.5. Estudios sobre la regulación por pH ambiental de la biosíntesis de antibióticos $\beta$ -lactámicos**

Se ha observado que tanto las penicilinas como las cefalosporinas se producen en grandes cantidades bajo condiciones alcalinas. Por lo tanto, es clara la importancia que tiene el pH ambiental en la determinación de los niveles de transcripción de muchos genes, entre los que se encuentran los que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos (Peñalva *et al.*, 2008).

A través de los años, se han realizado varios estudios para comprender mejor el mecanismo de la regulación por pH sobre la producción de tales antibióticos. Las mutaciones de inactivación en cualquiera de los seis genes *pala*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, o *pall*, conducen a una alta expresión de los genes que se expresan preferencialmente en condiciones ácidas y a bajos niveles de expresión de los genes expresados en condiciones alcalinas, produciendo un mimetismo de tipo ácido, evidenciado en *A. nidulans* por niveles elevados de fosfatasa ácida y niveles reducidos de fosfatasa alcalina y de penicilina (Peñalva & Arst, 2004).

En contraste, algunas mutaciones en el gen *pacC* mimetizan los efectos de un crecimiento a pH alcalino. Por ejemplo, al truncar el factor de transcripción PacC entre 250 y 586 residuos del extremo C-terminal, ya sea a través de salto de marco de lectura o por terminación de cadena, se puede observar el fenotipo de mimetismo alcalino *pacC<sup>C</sup>*. En este fenotipo los genes expresados preferencialmente en condiciones alcalinas son altamente expresados, mientras que los genes expresados preferencialmente en pH ácido se expresan pobremente. Además se observan elevados niveles de fosfatasa alcalina, niveles reducidos de fosfatasa ácida, fosfodiesterasa y  $\gamma$ -aminobutirato (GABA) permeasa, morfología anormal con conidiación reducida a pH ácido, sensibilidad aumentada a

neomicina y sobreproducción de penicilina en *A. nidulans* (Arst *et al.*, 1994; Caddick *et al.*, 1986; Espeso *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1991).

Al truncar la proteína PacC desde el extremo C-terminal y hasta aproximadamente el aminoácido 590 se puede obtener el fenotipo  $pacC^{+/-}$ , que es también un ejemplo de mimetismo ácido, muy parecido al que origina la inactivación de cualquiera de los genes *pal*, pero menos extremo, manifestando crecimiento pobre a pH alcalino (Espeso & Arst, 2000; Orejas *et al.*, 1995, Tilburn *et al.*, 1995). En la figura 6 se esquematizan los dos tipos de mutaciones en el gen *pacC* que conducen a fenotipos de mimetismo ácido ( $pacC^{+/-}$ ) o alcalino ( $pacC^C$ ).

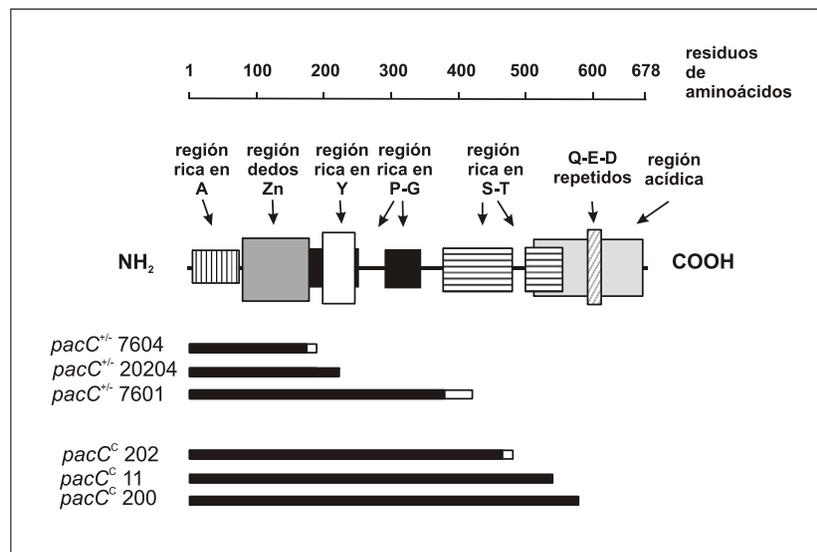


Fig. 6. Proteína PacC esquematizada mostrando los tipos de mutaciones en ella que conducen a fenotipos de mimetismo alcalino ( $pacC^C$ ) y mimetismo ácido ( $pacC^{+/-}$ ) (Tilburn *et al.*, 1995)

La mayoría de los estudios enfocados a la regulación genética por pH ambiental se han realizado principalmente en el modelo de estudio *A. nidulans*. Estos involucran mutaciones en los genes de la vía de señalización Pal o en el factor de transcripción PacC (Denison *et al.*, 1998; Díez *et al.*, 2002; Espeso & Arst, 2000; Espeso *et al.*, 1997 y 2000). Sin embargo, la mayoría de estas mutaciones han sido obtenidas a través de métodos de genética clásica, físico-químicos y mecanismos de recombinación homóloga (Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 2003; Mingot *et al.*, 1999; Peñalva & Arst, 2002).

Varios genes o funciones son regulados por el factor de transcripción PacC, particularmente los genes que codifican para enzimas extracelulares, permeasas y enzimas involucradas en la exportación o síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, los enfoques de los estudios anteriores se han dirigido básicamente a observar los efectos sobre la diferenciación celular, esporulación y patogénesis en microorganismos como *A. nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, etc. Por ello, no existen suficientes estudios aún que describan los efectos de dichas mutaciones sobre la expresión de los genes biosintéticos y la producción de CPC en *A. chrysogenum*.

La existencia de cinco posibles sitios de unión a PacC en la región promotora del gen *pacC* de *A. chrysogenum* sugieren una fuerte autorregulación del gen. Aunque PacC no es un regulador específico de la biosíntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos o cefalosporinas sí tiene un efecto general en la expresión de sus genes biosintéticos. En *A. chrysogenum*, la región promotora intergénica entre los genes *pcbAB* y *pcbC* contiene dos sitios de unión para PacC. Lo mismo ocurre en el caso de las regiones promotoras de los genes *cefEF* y *cefG*, genes específicos de la biosíntesis de cefalosporinas (Schmitt *et al.*, 2001).

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se llevaron a cabo algunos estudios moleculares sobre la regulación por pH ambiental en la producción de CPC en *A. chrysogenum* (Cuadra, 2008). Los resultados confirmaron la importancia del pH como elemento clave regulador en la producción de CPC, apoyando la hipótesis de que sólo algunos de los genes involucrados en la producción están regulados por el pH ambiental (entre ellos, el gen *cefT* y el gen *cefD2*). Además, se observó el efecto del aumento del número de copias del gen *pacC* en la cepa C10 de *A. chrysogenum*, con lo que se consiguió un aumento del 55% en la producción de CPC por una de las transformantes obtenidas.

También, en otro trabajo anterior, se realizaron las construcciones de dos vectores para expresar una mutación en el gen *pacC* de *A. chrysogenum*, truncando la cadena original hasta el par de bases número 971, a partir del codón de inicio de la traducción (lo que correspondería al sitio del segundo rompimiento proteolítico en la cadena de aminoácidos de la proteína PacC), con el propósito de obtener la expresión del factor de

transcripción directamente en su forma activa. En uno de los vectores, la mutación se expresaría bajo el control del propio promotor del gen *pacC*, mientras que en el otro la mutación se expresaría constitutivamente bajo el control del promotor *Pgpd* de *A. nidulans* que regula la expresión de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Los vectores se introdujeron en la cepa silvestre de *A. chrysogenum* y se observaron sus efectos sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en el medio convencional de producción: al menos tres de las cepas obtenidas mostraron una mayor producción significativa en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, en ese estudio fueron pocas las cepas mutantes que se lograron obtener y analizar. Además, el medio de producción convencional no hizo posible la observación real de los efectos esperados de mimetismo alcalino, ya que la mayor parte del cultivo se desarrolló a valores de pH alcalino (López-Calleja, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Acremonium chrysogenum* es el único productor industrial de CPC (Blatzer *et al.*, 2014). Todas las cefalosporinas de uso clínico son semisintéticas y se derivan a partir de la CPC, la cual pertenece al grupo de los antibióticos beta-lactámicos (Brakhage, 1998). Por su alta especificidad son utilizadas eficientemente para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes a otros antibióticos. La continua resistencia microbiana hacia otros antibióticos ha aumentado la demanda de cefalosporinas (Weil *et al.*, 1995). En 2009, se calculó que el mercado mundial tan sólo de las cefalosporinas llegó a los US\$11,900 millones. Actualmente las ventas anuales de cefalosporinas representan el 28% del mercado mundial de antibacterianos (Hamad, 2009). Todas estas características, entre otras, hacen de la CPC un producto de alto valor agregado.

Sin embargo, a pesar de más de 50 años de mejoramientos en la producción mediante tecnología de cultivos y algunos mejoramientos genéticos, la producción de CPC aún no es completamente satisfactoria en comparación con los títulos de penicilina que se obtienen actualmente. Se estima que las cepas industriales de *Penicillium* más recientes producen hasta cien mil veces más penicilina que la cepa original de *Penicillium notatum* aislada por Alexander Flemming (Flemming, 1929), alcanzando producciones de hasta 60 g/L, en comparación con los 30 g/L de CPC alcanzados por *A. chrysogenum* en los cultivos de nivel industrial (Seidel *et al.*, 2002a). Lo anterior conduce a la búsqueda de nuevas estrategias fisiológicas o de mejoramiento genético que permitan alcanzar producciones mayores de CPC.

La aplicación de la tecnología del ADN recombinante a la producción de metabolitos secundarios en diversos microorganismos ha sido de gran interés (Diez *et al.*, 1997). Es posible utilizar diversas aplicaciones de manipulación genética para la comprensión y el mejoramiento genético de las rutas biosintéticas de antibióticos beta-lactámicos, lo que ha permitido obtener excelentes incrementos en su producción (Adrio & Demain, 2006). Es por eso que la aplicación de la ingeniería genética, sustentada en el conocimiento de la

biología molecular de la biosíntesis de CPC y de su regulación, resulta ser una posibilidad interesante para perseguir el mejoramiento genético de la producción de este antibiótico beta-lactámico.

Es poco el conocimiento que se tiene sobre el papel que desempeña el pH en la regulación de la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*, debido a que la mayoría de los estudios de la regulación por pH ambiental ha estado dirigida hacia otras particularidades fisiológicas como virulencia, patogenicidad, diferenciación celular y esporogénesis en otros microorganismos modelo como *A. nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Por tal razón, y con base en las observaciones fisiológicas del papel que desempeña el pH en las cultivos de producción de antibióticos beta-lactámicos y la participación clave del factor de transcripción PacC como regulador positivo de la expresión de los genes *pcbAB*, *pcbC*, *cefEF* y *cefG*, resulta de gran interés profundizar en los estudios a nivel molecular de la regulación por pH de la biosíntesis de CPC, haciendo del gen *pacC* un blanco interesante para el mejoramiento genético de *A. chrysogenum*.

Tomando en cuenta las observaciones previas sobre la existencia de un intervalo de pH que favorece la producción de CPC en SSF en soporte impregnado, y las variaciones en la expresión de los genes biosintéticos en SmF, que sugieren la existencia de una regulación por pH (Cuadra, 2008), el presente trabajo pretende estudiar, en primer lugar, las diferencias a nivel molecular de la producción de CPC entre ambos sistemas de cultivo en condiciones de pH controlado, y en segundo lugar, la regulación por pH ambiental (desde un punto de vista molecular) de la producción de CPC en *A. chrysogenum* mediada por el factor de transcripción PacC.

#### 4. HIPÓTESIS

A) Si la regulación de la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* se encuentra relacionada con las condiciones del tipo de cultivo en que se lleva a cabo (como la difusión del medio, la disponibilidad de nutrientes y la secreción de productos), entonces existirán diferencias significativas a nivel de la transcripción de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum*, (que codifican enzimas de pasos limitantes de la biosíntesis) entre dos diferentes sistemas de cultivo.

B) Si la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos se encuentra regulada por el pH ambiental, mediada por el factor de transcripción PacC, y éste debe ser activado mediante dos rompimientos proteolíticos sucesivos como resultado de la cascada de señalización por pH, entonces al truncar el gen *pacC* de *A. chrysogenum* en una región que conduzca directamente a la expresión de su forma activa, se observará un fenotipo de mimetismo alcalino *pacC<sup>C</sup>* y la producción de antibióticos beta-lactámicos aumentará significativamente de manera independiente del pH ambiental. Contrariamente, si inicialmente se inactiva el factor de transcripción PacC, por interrupción o silenciamiento del gen *pacC*, entonces la producción de antibióticos beta-lactámicos disminuirá significativamente y el crecimiento se verá afectado.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Ampliar el área de conocimiento sobre la regulación de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos en *A. chrysogenum* y la participación clave del factor de transcripción PacC en respuesta al pH ambiental.

### 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

A)

- ❑ Analizar la expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 en sistemas de cultivo sólido y líquido, a pH controlado.

B)

- ❑ Originar una mutación de mimetismo alcalino en las cepas silvestre y C10 de *A. chrysogenum*, activando constitutivamente el factor de transcripción PacC, y evaluar sus efectos sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos.
- ❑ Inactivar el factor de transcripción PacC mediante interrupción o silenciamiento del gen *pacC* y evaluar sus efectos sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos.

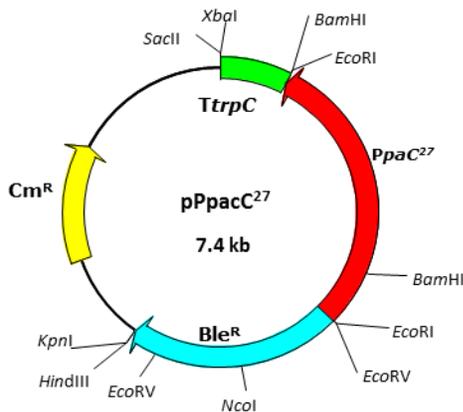
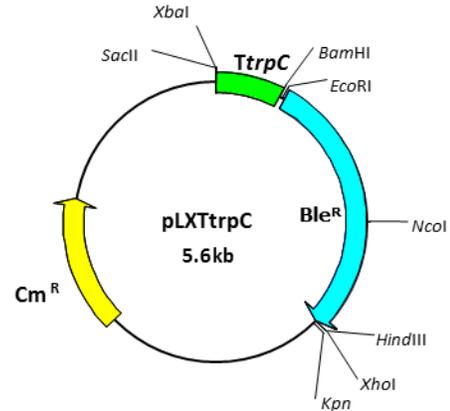
## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Cepas microbiológicas

- ❑ *Acremonium chrysogenum* ATCC 11550 (WT): Cepa silvestre, productora de cefalosporina C, desacetilcefalosporina C y penicilina N (Brotzu, 1948). A lo largo del trabajo, esta cepa será referida como “cepa silvestre”.
- ❑ *Acremomium chrysogenum* ATCC 48272 (C10): Cepa altamente productora de cefalosporina C, desarrollada por PanLabs (Demain, 1983).
- ❑ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células quimiocompetentes y electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $1 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Posee una eliminación en el gen *lacZ*, lo que permite seleccionar de manera fácil colonias transformantes con plásmidos capaces de originar  $\alpha$ -complementación.
- ❑ *Escherichia coli* XL1-Blue: Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes por el método químico y electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $1 \times 10^9$  y  $7.5 \times 10^9$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN, respectivamente). También permite la selección por el mecanismo de  $\alpha$ -complementación.
- ❑ *Escherichia coli* ESS2231: Cepa supersensible a antibióticos beta-lactámicos, utilizada para la cuantificación de cefalosporina C mediante bioensayo.
- ❑ *Bacillus cereus* UL1: Bacteria Gram-positiva productora de beta-lactamasa A, una penicilinas extracelular que se utiliza para degradar antibióticos beta-lactámicos similares a las penicilinas que puedan interferir con la cuantificación de cefalosporina C mediante bioensayos.

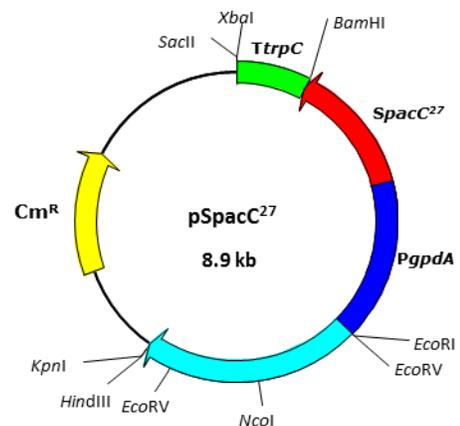
## 6.2. Vectores plasmídicos

**pLXT<sub>trpC</sub>** (Cuadra, 2008): Plásmido derivado del vector pULC43 (Gutiérrez, 1994). Contiene un marcador de selección en hongos conformado por el gen de resistencia a fleomicina (*ble*) de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo la región promotora del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae*. Lleva también un gen de resistencia bacteriana a cloranfenicol. Adicionalmente, contiene el terminador *TtrpC*, proveniente del plásmido pAN52.1 (Punt *et al.*, 1991) unido al sitio múltiple de clonación.

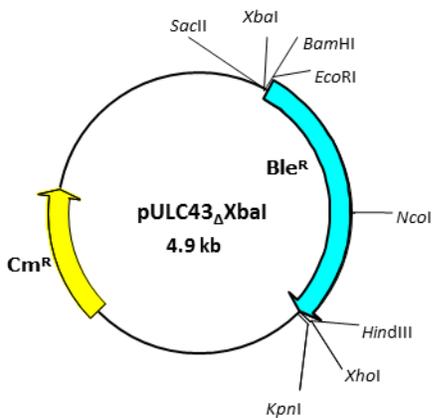
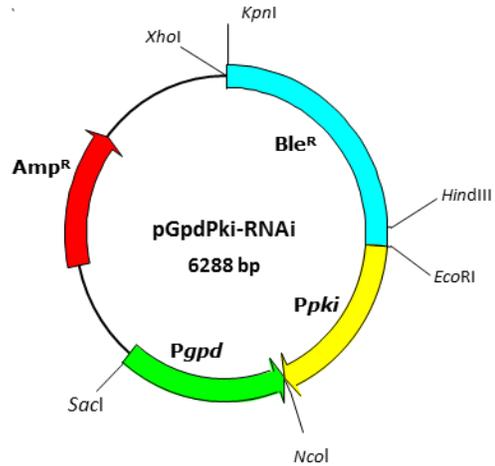


**pPpac<sup>27</sup>** (López-Calleja, 2010): Plásmido derivado del vector pLXT<sub>trpC</sub>. Contiene una mutación en el gen *pacC* de *A. chrysogenum*, que resulta en la forma activa del factor de transcripción PacC, expresada bajo el control del propio promotor del gen *pacC*.

**pSpac<sup>27</sup>** (López-Calleja, 2010): Plásmido derivado del vector pLXT<sub>trpC</sub>. Contiene la misma mutación en el gen *pacC* de *A. chrysogenum* que el vector pPpac<sup>27</sup>, pero expresada bajo el control del promotor constitutivo *Pgpda* de *Aspergillus nidulans*.

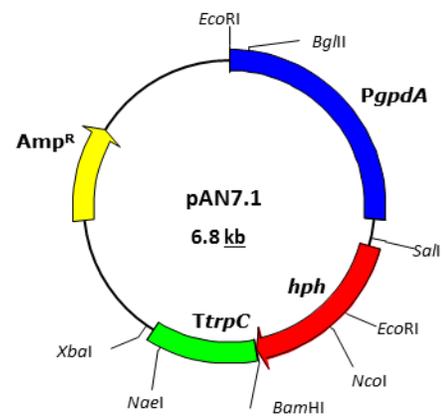


**pGpdPki-RNAi** (Marcial-Quino, 2011). Plásmido derivado del vector pJL43b1 (García-Rico *et al.*, 2007). Contiene el promotor *Pgpd* de *A. nidulans* y el promotor *Ppki* de *A. niger* en sentido opuesto y enfrentados, separados por un único sitio de restricción *NcoI*. También posee un *cassette* de resistencia a fleomicina como marcador de selección en hongos, y un marcador de resistencia bacteriana a ampicilina. Es utilizado para el silenciamiento de genes en hongos.



**pULC43 $\Delta$ XbaI** (Sierra, 2005). Plásmido derivado del vector pULC43 (Gutiérrez, 1994) diferenciándose de éste solamente por la ausencia de un sitio de restricción *XbaI*, ubicado originalmente en la parte media del promotor del gen *pcbC*, en el cassette de resistencia a fleomicina.

**pAN7.1** (Punt *et al.*, 1987). Plásmido de expresión en hongos. Contiene un marcador de resistencia bacteriana a ampicilina y un cassette de resistencia a higromicina como marcador de selección en hongos, basado en el gen *hph* de *E. coli* que codifica para la enzima Higromicina B fosfotransferasa, expresado bajo el promotor del gen *gpd* y el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*.



### 6.3. Medios de cultivo

#### 6.3.1. Medios de cultivo para bacterias

**LB** o Luria-Bertani (Medio de cultivo para *Escherichia coli*; Miller, 1972) (g/L):

Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar (medio sólido)	20
Ajustar pH a 7.5	

**SOB** (Medio de cultivo para *Escherichia coli*; Hanahan, 1983) (g/L):

Bactotripton	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0.5844
KCl	0.1864
MgCl <sub>2</sub>	2.0332
MgSO <sub>4</sub>	2.464
Agar (medio sólido)	20
Preparar con agua nanopura	

**SOC** (Medio de recuperación para *Escherichia coli*; Hanahan, 1983) (g/L):

Glucosa	3.6
Bactotripton	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0.5844
KCl	0.1864
MgCl <sub>2</sub>	2.0332
MgSO <sub>4</sub>	2.464
Preparar con agua nanopura	

**TB** (Medio de crecimiento para *Escherichia coli*, para la obtención de ADN plasmídico; Sambrook & Rusell, 2001) (g/L):

Extracto de levadura	24
Bactotripton	10
Glicerol	4 mL

Se añade agua destilada hasta 900 mL, después de esterilizar se añaden 100 mL de una solución estéril de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  720 mM.

**GYT** (Medio de cultivo para almacenar células electrocompetentes de *E. coli*; Sambrook & Rusell, 2001) (g/L):

Glicerol	100 mL
Extracto de levadura	1.25
Bactotripton	2.5

**Bactocasitone** (Medio para obtención de penicilinas por *B. cereus*; Difco®) (g/L):

Casaminoácidos	20
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
Solución de $\text{FeSO}_4$ (1 mg/mL)	1 mL
Ajustar a pH 7.3 con KOH	

### 6.3.2. Medios de cultivo para hongos

**LPE** (Medio de esporulación-mantenimiento, modificado; Le Page & Campbell, 1946) (g/L)

Glucosa	1
Extracto de levadura	2
NaCl	1.5
$\text{CaCl}_2$	10
Agar	20
Ajustar pH a 6.8	

**CCM (Medio completo; Minuth *et al.*, 1982) (g/L)**

Caldo de tripticaseína de soya	5
Sacarosa	3
Extracto de levadura	11
Extracto de carne	1
Glucosa	15
NaCl	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Agar (medio sólido)	20
Ajustar pH a 7.0	

**MMC (Medio definido de crecimiento de *A. chrysoenum*; Queener *et al.*, 1985) (g/L)**

Sacarosa	31.6
Glucosa	2.2
Sólidos de maceración del maíz	0.5
L-Asparagina	7.5
Acetato amónico	0.22
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	21
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.18
CaCl <sub>2</sub>	0.06
Solución de sales	1 mL

**Solución de sales (g/L):**

Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	15
Mn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.8
Ajustar pH a 7.0 con NaOH	

**TSB** (Caldo de tripticaseína de soya. Medio enriquecido de crecimiento para microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Marshall, 1993) (g/L):

Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
*, ** Agar	20
Ajustar pH a 7.0	

\* Cuando se le agrega agar se denomina TSA.

\*\* Para su uso en bioensayos se agregaron 10 g/L de agar.

**TSAS** (Medio osmótico de regeneración para protoplastos; Queener *et al.*, 1985) (g/L):

Sacarosa	103
Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
Agar	20
Ajustar pH a 7.0	

**MSMA** (Medio semilla modificado; Adinarayana *et al.*, 2003) (g/L):

Glucosa	10
Sólidos de maceración de maíz	5
Almidón soluble	15
Extracto de levadura	4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1
CaCO <sub>3</sub>	1
Ajustar a pH 7.0	

**MCFA** (Medio complejo de cultivo de *Acremonium*; Caltrider & Niss, 1966) (g/L)

CaCO <sub>3</sub>	1.5
Sólidos de maceración de maíz	5
Melaza de caña	30
Extracto de carne	30
Agar (Medio sólido)	20
Ajustar pH a 6.8.	

**MCFA 2.5X** (Medio complejo de cultivo concentrado; Cuadra *et al.*, 2008) (g/L)

Sólidos de maceración de maíz	12.5
Melaza de caña	75
Extracto de carne	75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.7625
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15.325
Ajustar pH a 6.8.	

**MDFA** (Medio definido de cultivo para *A. chrysogenum*, Shen *et al.*, 1986) (g/L)

Sacarosa	36
Glucosa	27
DL-Metionina	3.2
L-Asparagina	12
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O,	1.656
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3456
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0288
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.0288
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0072
* K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.49
** KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4688
CaCl <sub>2</sub>	0.072
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.16

\*, \*\* Cuando se utiliza un amortiguador diferente de tampón potásico, deberán sustituirse de la siguiente manera: (g/L) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.064; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.28.

#### **6.4. Análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* C10 en sistemas de cultivo sólido y líquido**

Se analizó la expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* C10 en dos sistemas de cultivo diferentes. Para esto, se estableció un cultivo sólido en soporte de bagazo de caña impregnado con medio de cultivo y un cultivo sumergido. Se utilizó un medio de cultivo concentrado 2.5X, amortiguado con tampón fosfato-potásico para mantener el pH controlado.

##### **6.4.1. Crecimiento de *A. chrysogenum* C10**

Se sembraron 100  $\mu$ L de *A. chrysogenum* C10 provenientes de un vial de almacenamiento en glicerol al 40%, o bien, aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de micelio proveniente de una placa de crecimiento almacenada a 4°C durante no más de 30 días. Se extendieron con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada sobre placas de agar LPE o CCM, con aproximadamente 25 mL de medio. Se incubaron a 28°C durante 6-7 días.

##### **6.4.2. Condiciones de crecimiento para la preparación de inóculo primario**

Cuando se preparó el inóculo para los cultivos realizados, se recogió el micelio proveniente de tres placas de medio CCM y se maceró, con ayuda de perlas de vidrio de 5 mm de diámetro y vortex, en 5 mL de NaCl 0.9 % (v/v) estéril. Se recuperó el micelio macerado con ayuda de una punta cortada de 5 mL y se preinoculó en 45 mL de medio MSMA, incubándose a 25°C y 250 rpm durante 38 horas.

##### **6.4.3. Cultivo en medio líquido complejo MCFA 2.5X**

Se tomaron 10 mL de inóculo primario de *A. chrysogenum* C10 y se agregaron a 90 mL de medio líquido MCFA 2.5X contenidos en un matraz de 500 mL con triple indentación, incubándose a 28°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas, con agitación orbital de 250 rpm. El pH inicial se fijó en 5.8 y el experimento se llevó a cabo por triplicado.

#### **6.4.3.1. Determinación de la concentración de CPC, pH y biomasa en cultivo líquido**

Se filtraron muestras de 10 mL a través de una membrana de nylon de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, el extracto se colectó y se separaron muestras para medir la concentración de antibióticos beta-lactámicos como se describe en la sección 6.4.4.1.1. El resto del extracto filtrado se utilizó para medir inmediatamente el pH con ayuda de un potenciómetro. La biomasa que quedó en el filtro de nylon, se lavó tres veces con 10 mL de agua destilada estéril, se recuperó con ayuda de vacío en un filtro de papel Whatman® No. 4 previamente pesado y se lavó con 10 mL de acetona para finalmente llevar el papel de filtro hasta peso constante durante 24 horas a 60°C.

#### **6.4.4. Cultivo sólido en soporte impregnado**

Se hirvió el bagazo de caña, previamente molido, durante 5 minutos en agua destilada, con el propósito de eliminar residuos de azúcar u otras sustancias solubles en agua. Se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se tamizó con las mallas N° 30 y 50. Se separó la fracción que quedó retenida entre las dos mallas para ser usada como soporte en el cultivo sólido. Se utilizó el mismo lote de bagazo de caña en todos los experimentos.

El bagazo tamizado se mezcló con aproximadamente el 35% del agua total a utilizar en el cultivo, se tapó con papel de aluminio y se sometió a vaporización en autoclave (válvula abierta) durante 30 minutos, procediéndose después de esto a la esterilización durante 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión.

El bagazo pretratado se impregnó al 70% de humedad con medio de cultivo líquido MCFA 2.5X inoculado (de manera que el inóculo quedara al 0.1% peso seco biomasa/peso de soporte humedecido). Posteriormente se empacaron columnas de cultivo de 2.2 cm de diámetro con 12 g de soporte previamente impregnado e inoculado, a una densidad de empaque de 0.26 g/mL. El cultivo se ajustó con un sistema de aireación de 28 mL/min y se

mantuvo a 25°C en un tanque con agua y temperatura controlada. El pH inicial fue de 5.8 y el experimento se llevó a cabo por triplicado.

#### **6.4.4.1. Determinación de CPC, pH y biomasa en el cultivo sólido**

Para la determinación de la concentración de CPC se tomó 1 g de cada columna y se resuspendió en 6 mL de amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 5.5. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2700 rpm ( $\approx 1000 \times g$ ). El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de CPC como se describe en la siguiente sección. Para determinar el pH, se resuspendió 1 g de muestra en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se agitó durante 10 min con agitador magnético, posteriormente se determinó el pH con un potenciómetro. La biomasa se determinó anteriormente al presente trabajo mediante respirometría, midiendo el consumo de O<sub>2</sub> (Cuadra, 2008).

##### **6.4.4.1.1. Determinación de la concentración de CPC por bioensayo de actividad antibiótica frente a *E. coli* ESS2231**

La concentración de antibióticos beta-lactámicos en las muestras a analizar se midió de acuerdo a la técnica convencional de bioensayo que reta el crecimiento de *E. coli* ESS2231, una cepa supersensible a estos antibióticos, frente a la cantidad de antibióticos beta-lactámicos presente en las muestras (Aharonowitz & Demain, 1977). Para la determinación solamente de CPC, se agregó a las placas de bioensayo una solución de penicilinas capaz de degradar compuestos beta-lactámicos con excepción de aquellos que presentan núcleo cefem-3, como las cefalosporinas (Ullán *et al.*, 2007).

##### **6.4.4.1.1.1. Preparación de las placas de bioensayo**

Por cada placa de bioensayo, se mezclaron 15 mL de una solución de células de *E. coli* ESS2231 D.O.<sub>600</sub> = 1.0 (en NaCl 0.9%), 2 mL de solución de penicilinas (volumen estimado previamente, como se detalla más adelante) y 220 mL de medio TSB al 1%, mantenido a 48°C. La mezcla se vertió en una placa estéril para bioensayo de 9 × 9 pulgadas. Una vez solidificadas las placas, se realizaron perforaciones de 6 mm de

diámetro con ayuda de un sacabocados estéril. En los pozos resultantes se depositaron 60  $\mu$ L de las soluciones estándar de CPC o de muestra de cultivo, con o sin dilución.

Las soluciones estándares de CPC que se utilizaron fueron: 1.0, 2.5, 5.0, 10, 15 y 20  $\mu$ g/mL. Se prepararon a partir de una solución stock de 500  $\mu$ g/mL, elaborada a partir de una solución de 1 mg/mL de cefalosporina C, sal de zinc (Sigma-Aldrich®), disuelta previamente en EDTA 10 mM. La solución stock y los demás estándares se prepararon con agua destilada estéril. Al término del tiempo de cultivo, se colocaron los estándares de CPC y las muestras dentro de los pozos previamente asignados. Las determinaciones de los estándares para su respectiva curva patrón, se hicieron por triplicado.

Se dejaron reposar las placas durante una hora a 4°C para permitir la difusión del antibiótico a través del medio. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 12-15 horas. Al término de la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición y los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón obtenida de cada placa, que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de antibióticos beta-lactámicos con el diámetro del halo de inhibición.

#### **6.4.4.1.1.2. Preparación de penicilinas a partir de *Bacillus cereus***

A partir de un vial de almacenamiento en glicerol al 40% se sembró *Bacillus cereus* en una placa de agar TSA al 2% y se incubó a 30°C durante 18-24 h. Posteriormente, se tomó una colonia y se sembró en 100 mL de medio Bactocasitone al que se le agregaron 50 U/mL de penicilina G (1 mg de penicilina G sódica = 1670 U). Se incubó a 30°C durante 18 h. Pasado el tiempo de incubación, se recogió el caldo por centrifugación a 4000 rpm y 10 min. Posteriormente se esterilizó por doble filtración.

A continuación, se hicieron pruebas agregando diferentes volúmenes de esta preparación de penicilinas (0, 50, 100, 200 y 250  $\mu$ L) en placas con 30 mL de agar TSA 1% y 2 mL de una solución de células de *E. coli* ESS2231 D.O.<sub>600</sub> = 1.0 (volúmenes proporcionales a las placas de bioensayo), retando la degradación de 60  $\mu$ L de una

solución de penicilina G 100 mg/mL. En los bioensayos de CPC se utilizó un volumen de la solución de penicilinas proporcional al utilizado para degradar totalmente la penicilina en estos bioensayos.

#### **6.4.5. Análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* C10 en cultivo sólido y cultivo sumergido.**

El análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* C10 se realizó por medio de RT-PCR semicuantitativo, utilizando como controles externos los genes de expresión constitutiva *gpd* y 18S de *A. chrysogenum*, a partir de ARN total obtenido de muestras tomadas de los cultivos descritos anteriormente en los tiempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h.

Una vez que se realizó la extracción de ARN de cada una de las muestras (sección 6.4.5.2), se verificó su integridad en un gel de agarosa-formaldehído (6.4.5.3). Posteriormente se cuantificó (6.4.5.6.5) y se diluyó adecuadamente de forma que se tuviera aproximadamente la misma cantidad de ARN para cada muestra. Las muestras se trataron con DNasa I para eliminar posibles alteraciones en los resultados debido a amplificaciones de productos de RT-PCR a partir de restos de ADN (6.4.5.4). Para verificar que se eliminó todo el ADN de las muestras de ARN, se realizó una reacción de PCR convencional (6.4.5.7), usando como molde el ARN de cada una de las muestras y los cebadores *gpd-int* (6.4.5.1), diseñados en una región intrónica del gen *gpd* de *A. chrysogenum*.

Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR (6.4.5.5) para los controles externos del análisis de expresión semicuantitativo (genes *gpd* y 18S), los cuales fueron seleccionados debido a su expresión fuerte y constitutiva. Para cada reacción se utilizó la misma cantidad de ARN y se verificó que la expresión de estos genes se mantuviera constante a lo largo del cultivo.

También fue necesario hacer un experimento previo a las reacciones de RT-PCR de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT*, para determinar el número de ciclos de desnaturalización-anillamiento-polimerización con que habrían de llevarse a cabo dichas reacciones, ya que era preciso seleccionar un número de ciclos en el que la señal de los productos de PCR en los geles de agarosa fuera comparable, evitando en lo posible que las reacciones de amplificación se encontraran en una fase de meseta, en la que la intensidad de las bandas sería muy similar a pesar de que la expresión de los genes fuera muy contrastante. Este experimento consistió en realizar unas reacciones de RT-PCR (6.4.5.5) con muestras aleatorias de ARN de los cultivos, manejando un gradiente de 30, 33, 36 y 40 ciclos.

Finalmente, se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* (6.4.5.5). Los productos de amplificación fueron analizados densitométricamente en geles de agarosa, con ayuda del software Image Lab (BioRad®), designándose como unidad de expresión relativa (ER) aquellas bandas cuyos valores de volumen relativo (dato obtenido con el software) fueron similares, para cada gen por separado. Los valores de ER se normalizaron dividiendo el valor obtenido de cada banda entre su correspondiente valor de densidad en píxeles para el control externo.

#### **6.4.5.1. Diseño de cebadores para el análisis de expresión**

Los cebadores para el análisis de expresión se diseñaron a partir de las secuencias codificantes para los genes *cefD2*, *cefEF*, *cefT*, *18S* y *gpd* de *A. chrysogenum*. Todos estos cebadores se diseñaron de manera que sus productos de amplificación por RT-PCR tuvieran un tamaño aproximado de entre 550 y 600 pares de bases. También se diseñó, como ya se indicó en el apartado anterior, un par de cebadores a partir de una región intrónica del gen *gpd* de *A. chrysogenum* para utilizarse como control negativo en las reacciones de RT-PCR. Los cebadores diseñados se enlistan en la tabla 1.

Se realizaron reacciones de PCR convencional a partir de ADN total de *A. chrysogenum* para probar las temperaturas de hibridación de los cebadores (sección 6.4.5.7).

Tabla 1. Cebadores utilizados para el análisis de expresión.

Cebador	Secuencia 5' - 3'	Región	No. Acceso GenBank
<b>18Sf</b>	TGGTGATTCATGATAACTTCTCG	189-772	U43971
<b>18Sr</b>	CCACACGTCCTATTTTATTATTCC		
<b>gpdf</b>	CGTCGAGGTCGTTGCTGTC	78-673	E03375
<b>gpdr</b>	CGTTGAGGTCGGGGATGA		
<b>cefD2f</b>	TCCCGCCGGCCAACATCCTC	449-1028	AJ507632
<b>cefD2r</b>	GTCCGCCCGTCCAATCACC		
<b>cefEFf</b>	CTGCCCGCCTCTGCTGATG	514-1111	AJ404737
<b>cefEFr</b>	CCGTACGGGGCCAAGTTTCCTC		
<b>cefTf</b>	GCCTTCTCCGCGCCGATGACT	559-1112	AJ487683
<b>cefTr</b>	CAGCACGCCGAGAGCACGACAC		
<b>gpd-intf</b>	CATTACCCCTCCATAACCTCTG	907-1851	E03375
<b>gpd-intr</b>	CGTTGTTAGTTGTTTCGTTCTGC		

#### 6.4.5.2. Obtención de ARN total de *A. chrysoenum*

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen®), siguiendo las indicaciones del proveedor. Para el sistema de cultivo sólido, se recogió el soporte junto con el micelio, al término de cada tiempo de cultivo, y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido. Se pulverizó con ayuda de un mortero y se almacenó a -70°C. Para el sistema de cultivo líquido, se recogió el micelio por filtración a través de un filtro de nylon estéril, de 30 µm de diámetro de poro, y se lavó con un volumen de NaCl al 0.9% (p/v) estéril. Inmediatamente se congeló el micelio en nitrógeno líquido y se pulverizó en morteros de porcelana previamente enfriados a -70°C, agregando nitrógeno líquido constantemente. Sin dejar que las muestras se descongelaran, se tomaron, con ayuda de una espátula fría y estéril, aproximadamente 200 µL de volumen de los pulverizados, depositándose en microtubos estériles de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de Trizol® a cada muestra y se homogeneizaron vigorosamente en vórtex. Se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 200 µL de cloroformo. Se mezclaron vigorosamente durante otros 15 segundos y se incubaron a temperatura

ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugaron a 4°C y 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa (superior) a otros tubos estériles.

El ARN presente en la fase acuosa se precipitó con 500  $\mu$ L de isopropanol. Se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 4°C y 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó a 4°C y 8000 rpm ( $\approx 5000 \times g$ ) durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar brevemente a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. El ARN se resuspendió en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada libre de ARNasas y se colocó en un baño de hielo durante 10 minutos; posteriormente se incubó a 65°C durante 10 minutos, con agitación constante de 500 rpm. El ARN se cuantificó como se describe en el apartado 6.4.5.6.5 y su integridad se verificó en un gel de agarosa-formaldehído al 1.2 % (p/v), descrito en la sección 6.4.5.2.

#### **6.4.5.2.1. Consideraciones generales para la extracción y manejo de ARN**

El material de porcelana (morteros y pistilos), de vidrio (matraces y frascos para soluciones) y metálico (espátulas y pinzas) se limpiaron primero con etanol y luego con cloroformo. Se envolvieron en papel de aluminio y se esterilizaron dos veces en autoclave, después se esterilizaron por calor seco a 300°C durante al menos 2 horas. El material de plástico (puntas para pipetas, microtubos de 1.5 mL, tubos para PCR de 200  $\mu$ L, etc.) se esterilizaron dos veces en autoclave y se secaron a 60°C durante 12 horas. La mesa de trabajo y las pipetas se limpiaron primero con SDS al 1% (p/v), luego con etanol y finalmente con cloroformo. Durante la extracción de ARN se mantuvieron las espátulas, pinzas, morteros y pistilos lo más fríos posible. El H<sub>2</sub>O destilada necesaria para preparar soluciones que la requirieron, así como para resuspender el ARN, fue tratada primero con DEPC<sup>1</sup>, con el fin de inactivar posibles ARNasas. Se esterilizó dos veces en autoclave para eliminar completamente el DEPC.

---

<sup>1</sup> **Tratamiento con DEPC (Dietilpirocarbonato):** Se agregó 0.1 % (v/v) de DEPC a la solución a tratar (a excepción de las que lleven Tris-HCl), se mezcló por agitación con una barra magnética durante toda la noche a temperatura ambiente.

#### 6.4.5.3. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído

Para que la movilidad electroforética del ARN fuera dependiente de su tamaño fue necesario desnaturalizar con formaldehído sus estructuras secundarias, por lo que los geles de electroforesis se prepararon de la siguiente manera: agarosa 1.2% (p/v), amortiguador MAE 1X y formaldehído 5.5 % (v/v). Primero se disolvió la agarosa en H<sub>2</sub>O DEPC por calentamiento con microondas, después de dejó enfriar a aproximadamente 50°C y se agregó el amortiguador MAE 10X<sup>2</sup> y el formaldehído al 37% (se trabajó en campana de extracción), luego se vertió sobre la cámara de electroforesis previamente lavada con SDS 1% y enjuagada con H<sub>2</sub>O DEPC.

Después de que el gel solidificó, se colocó la cámara de electroforesis con el gel en el tanque previamente lavado con SDS 1% y enjuagado con H<sub>2</sub>O DEPC. Se agregó amortiguador MAE 1X al tanque y se cargaron las muestras previamente preparadas en amortiguador de carga para ARN 1X<sup>3</sup> y calentadas a 55°C durante 5 minutos; posteriormente, se aplicó un voltaje de 10 V/cm de gel durante 45-90 minutos. Los geles se fotografiaron en un equipo de fotodocumentación Gel Doc EZ Imager (BioRad®).

#### 6.4.5.4. Tratamiento del ARN con ADNasa I

Después de haber extraído el ARN, fue necesario eliminar el ADN contaminante, para evitar la posible interferencia de este último en las técnicas siguientes. Para esto se utilizó la endonucleasa ADNasa I (Promega®), que degrada tanto el ADN de doble cadena como el de cadena sencilla (Moore, 1981). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 2.

---

<sup>2</sup> **Amortiguador MAE 10X: MAE 10x:** MOPS 0.2 M, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM. Se ajustó a pH 7.0. Se esterilizó por filtración y se guardó protegido de la luz a 4°C.

<sup>3</sup> **Tampón de carga para ARN 1.25X:** Para preparar 4 mL se mezclaron 2.2 mL de formamida desionizada, 0.8 mL de formaldehído 37%, 0.5 mL de MAE 10x, 0.4 mL de glicerol al 80% (v/v), 0.1 mL de azul de bromofenol al 2% (p/v) y 20 µL de bromuro de etidio 0.1% (p/v). Se almacenó a -20°C.

Tabla 2. Mezcla de reacción: Tratamiento de ARN con ADNasa I.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd DEPC}}$	-----	2
Amortiguador (10X)	1X	5
ADN 5' fosforilado (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	10 $\mu\text{g}$	40
DNasa I (1 U/ $\mu\text{L}$ )	1 U/ $\mu\text{g}$ ARN	5
Volumen de reacción		50

Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción agregándole 5  $\mu\text{L}$  de la solución RQ1 DNase Stop, provista junto con la enzima y el amortiguador, sin que fueran necesarios pasos adicionales. Como alternativa, se eliminó la enzima mediante una extracción con fenol-cloroformo, precipitándose el ARN con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3.0 M pH 5.2, durante 12 horas a -20°C, centrifugando posteriormente a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) y 4°C durante 20 minutos, lavando después con etanol al 75 % (v/v), centrifugando a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) y 4°C durante 5 minutos, dejando secar a temperatura ambiente y resuspendiendo finalmente el ARN en 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas.

#### 6.4.5.5. Reacciones de RT-PCR a partir de ARN total de *A. chrysogenum*

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el kit One Step RT-PCR de Quiagen®, el cual permite realizar, en un sólo tubo para cada muestra, las reacciones de transcripción reversa utilizando dos transcriptasas provenientes del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). Posteriormente las transcriptasas se inactivan, al mismo tiempo que se activa la actividad "HotStar" de una ADN polimerasa (*Taq*) recombinante, encargada de llevar a cabo la amplificación de los productos de PCR a partir del ADNc recién sintetizado mediante transcripción reversa. Las reacciones se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor, siguiendo el protocolo que usa la solución Q. Las condiciones de las reacciones y de operación del termociclador se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Mezcla de reacción: RT-PCR para el análisis de expresión.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H <sub>2</sub> O Libre de ARNasas	-----	13
Amortiguador (5X)	1X	10
Solución Q (5X)	1X	10
Mezcla de dNTP (10 mM)	400 µM	2
Cebador F (20 µM)	0.6 µM	1.5
Cebador R (20 µM)	0.6 µM	1.5
ARN molde (=10 ng/µL)	100 ng	10
Mezcla de enzimas	2 µL	2
<b>Volumen de reacción</b>		<b>50</b>

Tabla 4. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de RT-PCR para el análisis de expresión.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	
1	Transcripción reversa	50°C	30'
1	Inactivación de las transcriptasas y activación de la polimerasa.	95°C	15'
	Desnaturalización	94°C	1''
36	<i>cefD2</i>		
	<i>cefEF</i>	68°C	
6	Hibridación	<i>cefT</i>	45''
31 ( <i>cefT</i> )		<i>18S</i>	60°C
		<i>gpd</i>	66°C
	Polimerización	72°C	1'
1	Polimerización	72°C	8'

#### 6.4.5.6. Obtención de ADN total de *A. chrysogenum*

Se llevó a cabo la obtención de ADN total de *Acremonium chrysogenum* para incluir muestras de ADN como controles positivos en las reacciones de RT-PCR descritas anteriormente. La extracción se realizó de acuerdo al método descrito por Specht *et al.*, (1982), modificado por Fernández (1997).

Se recogió el micelio resultante de 100 mL de cultivo de *A. chrysogenum* en medio CCM líquido, a través de un filtro de nylon estéril de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. El micelio retenido se lavó con un volumen de NaCl al 0.9% (p/v) y, a continuación, con otro volumen de amortiguador A<sup>4</sup>.

Posteriormente, se secó con papel de filtro y se congeló rápidamente con nitrógeno líquido, o se liofilizó. Se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. Posteriormente, se maceraron 0.5 g de micelio liofilizado con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, y se recogió parte del polvo obtenido en un microtubo de 1.5 mL (aproximadamente 25 mg de micelio pulverizado). A continuación se le añadieron 0.5 mL de amortiguador de lisis I<sup>5</sup>, se homogeneizó suavemente la mezcla y posteriormente se le añadieron 0.5 mL de fenol neutro<sup>6</sup> y 0.5 mL de CIA<sup>7</sup>. Se mezcló lentamente por inversión y se incubó a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos (con mezclas por inversión cada 5 minutos). Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa, la cual contiene el ADN total extraído. Posteriormente se eliminaron las proteínas por fenolización y el ARN por tratamiento con ARNasa.

#### 6.4.5.6.1. Tratamiento con fenol y cloroformo-alcohol isoamílico

La fase acuosa con el ADN extraído se homogeneizó con un volumen de fenol-neutro, se mezcló suavemente por inversión durante 2 a 5 minutos y después se centrifugó a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante otros 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL estéril donde se le agregó medio volumen de fenol neutro y medio volumen de CIA, se mezcló suavemente por inversión de 2 a 5 minutos y se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior. Se repitió esta extracción con fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (no fueron necesarias más de cinco

---

<sup>4</sup> **Amortiguador A:** Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 100 mM pH 8.0.

<sup>5</sup> **Amortiguador de lisis I:** EDTA 100 mM pH 8, SDS 1% (p/v), Tris-HCl 0.2 M. Se ajusta el pH a 8.2.

<sup>6</sup> **Fenol neutro:** Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Se deja reposar hasta que se separen claramente dos fases. Los lavados se repiten hasta que el fenol alcance un pH neutro. El fenol ácido se prepara mezclando un volumen de fenol en cristales con un volumen de  $\text{H}_2\text{O}$ , se agita y se deja reposar, luego se retira la fase acuosa.

<sup>7</sup> **CIA:** 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico.

extracciones). La fase acuosa se recuperó y se homogeneizó con sólo un volumen de CIA, se mezcló por inversión de 2 a 5 minutos y se centrifugó en las condiciones antes descritas.

#### **6.4.5.6.2. Precipitación del ADN**

Se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril para precipitar el ADN, agregando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2. Se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante 20 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 14000 rpm ( $\approx 15300 \times g$ ) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente (el tubo se dejó con la tapa abierta). El ADN, obtenido como un precipitado blanco, se resuspendió en 50  $\mu$ L de TE<sup>8</sup> o en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se conservó a 4°C cuando fue resuspendido en TE o a -20°C cuando fue disuelto en agua.

#### **6.4.5.6.3. Tratamiento con ARNasa**

A cada muestra de ADN se le agregó ARNasa<sup>9</sup> en una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. La mezcla se incubó a 37°C durante 90 minutos. Pasado el tiempo de incubación se eliminó la ARNasa con una extracción de fenol-CIA y otra de CIA. El ADN se precipitó como en el apartado anterior, y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% cuantificándose posteriormente como se indica en la sección 6.4.6.5.5.

#### **6.4.5.6.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La técnica se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos por Sambrook & Russell (2001) para la electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó agarosa en concentraciones entre 0.7% y 2% (p/v), disuelta por calentamiento con microondas en

---

<sup>8</sup> **TE:** EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

<sup>9</sup> **ARNasa 10 mg/mL.** Se disuelve en Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM. Hervir durante 15 minutos, se enfría lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C o -70°C. Cuando se especifica por el proveedor, la ARNasa puede diluirse directamente en H<sub>2</sub>O destilada estéril a 10 mg/mL sin necesidad de tratamiento alguno, conservándose a -20°C o -70°C.

amortiguador TAE<sup>10</sup> 1X. Las muestras de ADN se mezclaron con H<sub>2</sub>O destilada estéril y amortiguador de carga 6X<sup>11</sup> en un volumen necesario para obtener una concentración de 1X, se calentaron de 5 a 10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo. Se utilizó amortiguador TAE 1X para sumergir los geles antes de ser cargados con las muestras de ADN y el marcador de peso molecular (1 kb, Promega® ó 100 bp O'rangeRuler de Thermo Scientific®) previamente preparados. Se les aplicó un voltaje de 10 V/cm de gel durante 45 a 90 minutos (dependiendo del tamaño del gel).

Posteriormente, se tiñeron los geles en un baño de bromuro de etidio<sup>12</sup> 1% (p/v) durante aproximadamente 20 minutos y después se fotografiaron en un equipo de fotodocumentación Gel Doc EZ Imager (BioRad®). Alternativamente al uso de bromuro de etidio, se utilizó colorante Gel Red® para la tinción de ácidos nucleicos, disolviéndose 0.1 µL por cada 35 mL de agarosa fundida durante la preparación del gel.

#### 6.4.5.6.5. Cuantificación y verificación de pureza de ácidos nucleicos

La cuantificación de las muestras de ADN o ARN se realizó por espectrofotometría con ayuda de un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®). La pureza de las muestras se verificó de acuerdo con lo descrito por Sambrook & Rusell (2001). Se prepararon diluciones en agua destilada estéril o agua DEPC, en caso de las muestras de ARN, y se midieron sus absorbancias a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm, utilizando agua como blanco. Después se analizaron los cocientes  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  utilizando los siguientes criterios:

---

<sup>10</sup> **TAE 50X:** Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M pH 8.0 100 mL. Agua destilada hasta 1 litro.

<sup>11</sup> **Amortiguador de carga 6X:** Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), sacarosa al 40% (p/v), xilenocianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza y se conserva a 4° C.

<sup>12</sup> **Solución stock de bromuro de etidio:** 10 mg/mL en H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se conserva a 4°C.

- ❑ El cociente  $A_{260}/A_{280}$  debe ser cercano a 1.8 (ADN) y 2.0 (ARN) si están libres de impurezas que absorben en el ultravioleta. Cocientes menores se deben a contaminación por proteínas, fenol o material insoluble.
- ❑ El cociente  $A_{260}/A_{230}$  debe ser mayor que 2 y menor que 2.4 tanto para ADN como para ARN. Cocientes menores se deben a contaminación por una sal de guanidina o por  $\beta$ -mercaptoetanol.
- ❑ Una unidad de densidad óptica a 260 nm ( $O.D._{260}$ ) equivale a la de una solución con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN de doble cadena ó 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN.

#### **6.4.5.7. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)**

La técnica de la reacción en de la ADN polimerasa (PCR) descrita por Saiki *et al.* (1985) consiste en reproducir *in vitro* las condiciones celulares de la replicación del ADN, utilizando oligonucleótidos sintéticos como cebadores y una enzima ADN polimerasa altamente termoestable purificada, proveniente principalmente de microorganismos termoextremófilos. En la reacción se incluyen el ADN molde en el que hibriden los cebadores; los desoxirribonucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP, que formarán parte de las nuevas cadenas de ADN,  $\text{Mg}^{+2}$  como cofactor para la ADN polimerasa y amortiguadores necesarios para que la reacción pueda llevarse a cabo *in vitro*.

La técnica hace uso de varios ciclos repetidos en los cuales se lleva a cabo la amplificación del ADN, o replicación *in vitro* acotada por los cebadores. Cada ciclo consiste de tres etapas con diferentes temperaturas, que son: 1) Desnaturalización de la doble cadena del ADN, entre 94 y 98°C, durante un tiempo corto, suficiente para separar las dos cadenas del ADN; 2) Hibridación o anillamiento de los cebadores al ADN, con una temperatura óptima de hibridación que depende de las características fisicoquímicas de estos y un tiempo de hibridación también relativamente corto; 3) Elongación o polimerización, la cual depende de la temperatura óptima de la ADN polimerasa: generalmente se lleva a cabo a 72°C, pero puede variar entre 68 y 74°C. El tiempo de elongación depende de las características bioquímicas de la polimerasa. Después de varios ciclos, es posible obtener teóricamente, dependiendo del rendimiento y del grado de

optimización de la reacción, un producto de amplificación de hasta  $(2^n - 2n)X$ , donde  $n$  es el número de ciclos y  $X$  es el número de moléculas de ADN molde. Se utilizó la enzima altamente termoestable *Taq* polimerasa (Thermo Scientific®), proveniente del microorganismo *Thermus aquaticus*. Las condiciones de reacción y de operación del termociclador se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa entre 0.7 y 1.5 % (p/v).

Tabla 5. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR de los genes a analizar.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (μL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	29.75
Amortiguador (10X)	1X	5
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	2.5 mM	5
Mezcla de dNTP (10 mM)	200 μM	1
Cebador F (20 μM)	1 μM	2.5
Cebador R (20 μM)	1 μM	2.5
ADN molde (≈25 ng/μL)	100 ng	4
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/μL)	1.25 U	0.25
<b>Volumen de reacción</b>		<b>50</b>

Tabla 6. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de PCR de los genes a analizar.

CICLOS	Proceso	Temperatura	Tiempo	
<b>1</b>	Desnaturalización	94°C	5'	
	Desnaturalización	94°C	1'	
<b>30</b>	Hibridación	<i>cefD2</i>	45''	
		<i>cefEF</i>		68°C
		<i>cefT</i>		
		<i>18S</i>		60°C
		<i>gpd</i>		66°C
		<i>gpd-int</i>		61°C
<b>1</b>	Polimerización	72°C	1'	
	Polimerización	72°C	8'	

## **6.5. Activación constitutiva del factor de transcripción PacC en *A. chrysogenum* WT y C10**

Se introdujo una mutación en las cepas silvestre y C10 de *A. chrysogenum* para activar constitutivamente el factor de transcripción PacC, creando un fenotipo de mimetismo alcalino. Para esto se utilizaron los vectores de expresión pSpacC<sup>27</sup> y pPpacC<sup>27</sup> previamente obtenidos en nuestro grupo de trabajo. Ambos vectores introducen el gen *pacC* truncado hasta el par de bases número 971, seguido de un codón de terminación de la traducción. Este sitio corresponde en el gen *pacC* con el lugar del segundo rompimiento proteolítico en la proteína para dar lugar a la forma activa del factor de transcripción PacC<sup>27</sup> (López-Calleja, 2010).

El vector pSpacC<sup>27</sup> porta la mutación expresable bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpdA* de *A. nidulans*. El vector pPpacC<sup>27</sup> la expresa bajo el control del propio promotor del gen *pacC* de *A. chrysogenum*. También se utilizó el plásmido pLXTtrpC (Cuadra, 2008), que no introduce ninguna mutación, únicamente los componentes del vector.

### **6.5.1. Transformación de protoplastos de *A. chrysogenum***

Se utilizó la técnica descrita por Queener *et al.* (1985) y Skatrud *et al.* (1987) basada en la obtención de protoplastos de *A. chrysogenum* mediante tratamiento de micelio joven con ditioneitol (DTT) y enzimas líticas para debilitar y degradar la pared celular. Posteriormente se lleva a cabo la transformación de protoplastos asistida por altas concentraciones de polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular.

#### **6.5.1.1. Crecimiento del micelio para preparación de protoplastos**

Se inocularon 50 mL de medio MMC o CCM con las esporas procedentes de tres placas de medio LPE (o micelio en caso de la cepa C10), incubadas previamente durante seis días a 28°C. El cultivo se incubó a 25°C durante 20 horas, con 250 rpm de agitación orbital. Transcurrido el tiempo de incubación se recogió el micelio por filtración auxiliada

de vació a través de un papel de filtro Whatman® No 1; el filtrado se lavó con 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v) y se recuperó el micelio de la misma manera.

#### **6.5.1.2. Obtención de protoplastos**

Se resuspendió el micelio en 50 mL de TPC<sup>13</sup> suplementado con DTT 10 mM y se incubó desde 30 minutos hasta 2 horas a 28°C con agitación de 250 rpm. La incubación con DTT se realizó para reducir las uniones disulfuro de los componentes de la pared celular y facilitar el proceso de liberación de protoplastos. A continuación se recogió el micelio correspondiente a 15 mL de cultivo de la misma forma que en el apartado anterior y se lavó tres veces con TPC. El filtrado se resuspendió en 4 mL de TPC.

En otros 4 mL de TPC se disolvieron 160 mg de enzimas líticas de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich®) o de Driselase (Sigma-Aldrich®), para obtener una concentración final de 20 mg/mL. En el caso de las enzimas Driselase se centrifugó durante un minuto a 4000 rpm para eliminar el almidón no soluble. La solución de enzimas líticas se adicionó al micelio previamente resuspendido en TPC. La mezcla obtenida se colocó en un matraz de 250 mL y se incubó durante el tiempo necesario para la liberación de protoplastos (no más de 5 horas) a 28°C con agitación orbital de 100 rpm. Se observó la liberación de protoplastos en un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos, con intervalos de una hora.

Una vez observada la liberación de protoplastos en la proporción adecuada, se filtró la suspensión protoplastos/restos de micelio a través de una doble membrana de nylon de 30 µm de diámetro de poro previamente colocada sobre un embudo (todo ello esterilizado), con el fin de separar los protoplastos de los restos de micelio. En seguida se recuperaron los protoplastos por centrifugación a 2500 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. El agregado celular obtenido se lavó con 5 mL de NaCl 0.8 M, recuperándose por centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente; el lavado con NaCl se repitió tres veces consecutivas. Luego se lavó el agregado celular con 5

---

<sup>13</sup> TPC NaCl 0.8 M, amortiguador fosfato potásico 50 mM pH 7, después de esterilizar, añadir MgSO<sub>4</sub> 0.02 M.

mL de amortiguador NCM<sup>14</sup> y se centrifugó de la misma manera. Los protoplastos se resuspendieron en NCM a una concentración de  $1 \times 10^8$  protoplastos/mL (aproximadamente 5 veces el volumen del precipitado) y se añadió 1/10 del volumen total de amortiguador CCM<sup>15</sup>. Se mezcló suavemente y se mantuvo esta suspensión de protoplastos en hielo hasta el momento de la transformación.

#### 6.5.1.3. Transformación

Se mezclaron 100  $\mu$ L de la suspensión de protoplastos con 10  $\mu$ g de ADN plasmídico (lineal o circular) en el fondo de tres tubos de 1.5 mL, se homogeneizaron las mezclas por inversión y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 500  $\mu$ L de amortiguador CCM, se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos más. Luego se agregaron 600  $\mu$ L de amortiguador NCM a cada tubo para disolver el polietilenglicol presente en el amortiguador CCM. Se mantuvo la mezcla de transformación a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo. También se preparó una mezcla de transformación utilizando agua estéril en lugar de ADN plasmídico para utilizarse como control negativo y verificar la actividad del antibiótico usado para la selección.

#### 6.5.1.4. Plaqueo

Se prepararon las bases de las placas de transformación, extendiendo 5 mL de medio TSAS con fleomicina en concentración final de 20  $\mu$ g/mL para la cepa silvestre y 50  $\mu$ g/mL para la cepa C10 (de acuerdo a un experimento previo de concentración mínima inhibitoria de fleomicina contra protoplastos de *A. chrysogenum* WT y C10), en cajas de Petri de 60 mm de diámetro y se dejaron gelificar. Cuando se utilizó resistencia a higromicina como marcador de selección, la concentración fue de 30  $\mu$ g/mL para la cepa silvestre.

---

<sup>14</sup> **Amortiguador NCM** NaCl 0.8 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7.

<sup>15</sup> **Amortiguador CCM** CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7, PEG 8000 18% (p/v).

A continuación, se homogeneizaron 100 µL de las mezclas de transformación junto con otros 5 mL de medio TSAS al 1% con la misma concentración de antibiótico, sin gelificar aún (aproximadamente a 48°C), y se plaquearon en forma de cobertera sobre las bases de las placas de transformación previamente preparadas. Se dejaron solidificar y se incubaron a 28°C durante siete días.

Las colonias transformantes que aparecieron durante el tiempo de incubación fueron sembradas por punción en placas de agar CCM con el doble de la concentración utilizada de antibiótico, la resiembra se realizó dos veces para asegurar que las colonias obtenidas se trataran de verdaderas transformantes (expresando la resistencia al antibiótico) y eliminar la posibilidad de haber obtenido heterocariontes.

#### **6.5.2. Análisis primario de transformantes por PCR a partir de colonia**

Se tomó una colonia de 6 días de crecimiento en medio CCM y se disolvió con ayuda de un micropistilo Eppendorf® estéril en 50 mL de una solución de enzimas líticas de *Trichoderma reesei* (20 mg/mL) en TPC, se incubó a 37°C y 500 rpm durante una hora. Al término de la incubación se le agregaron 150 µL de solución de dilución<sup>16</sup> y se inactivaron las enzimas líticas en un baño de agua a 95°C durante 3 minutos; a continuación se dejó reposar la mezcla en un baño de hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se le agregaron 200 µL de cloroformo y se centrifugó a 13200 rpm y 4°C durante 5 min. Se tomaron 5 µL del sobrenadante y se realizó la reacción de PCR. Como sonda para el análisis primario se utilizaron cebadores para amplificar la región correspondiente al terminador *TtrpC*, región perteneciente únicamente a los componentes del vector. También se utilizó un par de cebadores para amplificar una región del gen *pacC* de *A. chrysogenum* como control positivo de la técnica de PCR a partir de colonia. Los cebadores utilizados se enlistan en la tabla 7. Las condiciones de reacción y de operación del termocaldor se muestran en las tablas 8 y 9, respectivamente.

---

<sup>16</sup> **Solución de dilución:** Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM.

Tabla 7. Cebadores utilizados para análisis primario por PCR de a partir de colonia (TtrpC y SpacC2).

Cebador	Secuencia 5'-3'
<b>TtrpCF</b>	GGATCCACTTAACGTTACTG
<b>TtrpCR</b>	TCTAGAAAGAAGGATTACCTCTAA
<b>SpacC2F</b>	TCTCCCCCGCCCCGAC
<b>SpacCR</b>	<u>GATGGATCCTTAGGACGAGGGGTTCGATCTCAC</u>

Tabla 8. Mezcla de reacción: PCR (TtrpC y SpacC2) a partir de colonia de *A. chrysogenum*.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (μL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	31.5
Amortiguador (10X)	1X	5
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	2.5 mM	5
Mezcla de dNTP (10 mM)	200 μM	1
Cebador F (20 μM)	1 μM	-----
Cebador R (20 μM)	1 μM	2.5
ADN molde (≈25 ng/μL)	100 ng	4
Taq polimerasa (1 U/μL)	1 U	1
Volumen de reacción		50

Tabla 9. Condiciones de operación del termociclador: PCR (TtrpC y SpacC2) a partir de colonia de *A. chrysogenum*.

CICLOS	Proceso	Temperatura		Tiempo
<b>1</b>	Desnaturalización	94°C		5'
	Desnaturalización	94°C		30''
<b>30</b>	Hibridación	<b>TtrpC</b> <b>52°C</b>	<b>SpacC</b> <b>65°C</b>	30''
	Polimerización	72°C		1'
<b>1</b>	Polimerización	72°C		5'

### **6.5.3. Análisis secundario de transformantes por cultivo en medio líquido**

Las transformantes que dieron positivo para el análisis primario por PCR a partir de colonia se llevaron a un segundo análisis mediante un cultivo en medio líquido definido, el cual tuvo que ser optimizado a un pH ácido que permitiera observar los efectos de la mutación del gen *pacC* que resultaría en un fenotipo de mimetismo alcalino.

### **6.5.4. Optimización de un medio definido de cultivo amortiguado a pH ácido**

Se utilizó como base el medio químicamente definido MDFA reportado por Shen *et al.* (1986) para probar con tres diferentes sistemas amortiguadores (todos en una concentración de 100 mM): acetatos (pH 4.0, 5.0 y 6.0), citratos (pH 4.0, 5.0 y 6.0) y MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico] pH 5.0.

Se tomaron 5 mL de inóculo primario de *A. chrysogenum*, cepa silvestre o cepa C10, preparado de acuerdo a la sección 6.4.2 y se agregaron a 45 mL de medio líquido MDFA amortiguado previamente, en matraces de 250 mL con triple indentación, incubándose a 28°C durante 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas, con agitación orbital de 250 rpm. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Al término del tiempo de cultivo, se determinó la concentración de antibióticos beta-lactámicos en el caldo de cultivo, el pH y la cantidad de biomasa. Para ello, se filtraron muestras de los tiempos de cultivo a través de un sistema improvisado de filtración auxiliado por centrifugación elaborado de la siguiente manera: se tomaron microtubos de 1.5 mL a los cuales se les realizó previamente una perforación en la base con una aguja caliente, se les colocó una capa de algodón compactado en el fondo, y se sobrepusieron sobre otros tubos de 1.5 mL sin perforar. Se filtró 1 mL de cada muestra durante 30 segundos a 5000 rpm. El filtrado se utilizó para medir inmediatamente el pH y la concentración de antibióticos beta-lactámicos. La biomasa se determinó por peso seco (24 horas a 60°C), habiendo previamente llevado a peso constante los mismos filtros en los que se colectó la biomasa.

La concentración de antibióticos beta-lactámicos se midió por bioensayo sin penicilinas, como ya se describió en el apartado 6.4.4.1.1. Los resultados se analizaron estadísticamente y se graficaron. El medio que mantuvo constante un pH ácido a lo largo de todo el cultivo y que, además, permitió una buena formación de biomasa, fue seleccionado para llevar a cabo el análisis de las cepas transformantes con el gen *pacC* mutado.

#### **6.5.5. Cultivo en medio líquido MDFA/MES pH 5.0 con las cepas transformantes**

Se preparó inóculo primario de cada una de las cepas transformantes, incluyendo la cepa parental. Pasado el tiempo de crecimiento, se recogió el contenido de los matraces en tubos de 15 mL estériles previamente pesados y se centrifugaron 8 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se decantó y los tubos con el micelio se pesaron para obtener después, por diferencia del peso del tubo, el peso húmedo del micelio de cada transformante a analizar. Posteriormente, se les agregó medio MDFA/MES (100 mM, pH 5.0), ajustando todas las muestras a la misma densidad, en este caso fue de 700 mg de micelio húmedo/mL.

Se tomaron 5 mL del inóculo primario ajustado a la misma densidad, se agregaron a 45 mL de medio líquido MDFA amortiguado a pH 5.0 con MES 100 mM, en matraces de 250 mL con triple indentación, y se incubaron a 28°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas, con agitación orbital de 250 rpm. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Al término del tiempo de cultivo, se determinó la concentración de antibióticos beta-lactámicos presentes en el caldo de cultivo, el pH y la cantidad de biomasa, de la misma forma en que se describió para la sección 6.5.4. Los resultados se analizaron estadísticamente y se graficaron.

#### **6.5.6. Optimización de la concentración de MES para amortiguar el medio complejo MCFA**

Las cepas transformantes seleccionadas a partir del cultivo en medio líquido definido se analizaron posteriormente en un segundo cultivo líquido, pero utilizando el medio complejo convencional de producción MCFA. Para ello fue necesario determinar previamente la concentración de amortiguador MES a utilizar. Con este objeto, se preparó un cultivo líquido con *A. chrysogenum*, cepa silvestre, en medio MCFA amortiguado con MES a pH 5.0, probando las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M. Para ello, se preparó inóculo primario de *A. chrysogenum* cepa silvestre como se detalló en la sección 6.4.2. Pasado el tiempo de crecimiento se tomaron 5 mL de inóculo primario y se añadieron a 45 mL de medio MCFA amortiguado con MES en las diferentes concentraciones de prueba, contenidos en matraces de 250 mL con triple indentación. También se incluyó en el experimento el medio MCFA sin amortiguar. Las unidades experimentales se incubaron durante 7 días a 28°C y 250 rpm y se tomaron muestras cada 24 horas. El experimento se realizó por duplicado.

Al término del tiempo de cultivo, se determinó la concentración de antibióticos beta-lactámicos, el pH y la cantidad de biomasa, de la misma forma en que se describió para la sección 6.5.4. Los resultados se analizaron estadísticamente y se graficaron.

#### **6.5.7. Cultivo en medio líquido MCFA/MES pH 5.0 con las cepas transformantes**

Una vez optimizado el medio complejo de cultivo MCFA con la concentración adecuada de MES, se utilizó para un análisis posterior de las transformantes que mostraron una mayor producción significativa de antibióticos beta-lactámicos en el medio definido MDFA/MES. La forma de realizar el cultivo, así como las condiciones de cultivo y la determinación de las variables respuesta, fueron las mismas que las descritas para el análisis de las transformantes en medio líquido definido MDFA/MES, la cual se detalla en la sección 6.5.5.

## 6.6. Inactivación del factor de transcripción PacC en *A. chrysogenum*

Para la inactivación del factor de transcripción PacC en *A. chrysogenum* se siguieron dos estrategias diferentes: mediante interrupción del gen *pacC* en la zona de unión al ADN o por silenciamiento del gen mediante ARN interferente dirigido también al sitio de unión al ADN.

### 6.6.1. Interrupción del gen *pacC* de *A. chrysogenum*

Se diseñó una estrategia para la construcción de un plásmido de disrupción del gen *pacC* persiguiendo conseguir la mutación mediante recombinación doble, que consiste en la sustitución del gen, o fragmento de interés, por un marcador de selección que ayude posteriormente a identificar la mutación. En este caso se utilizó el cassette de resistencia a higromicina, proveniente del plásmido pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987) para eliminar la región de interés del gen *pacC*. La estrategia de interrupción se ilustra en la figura 7.

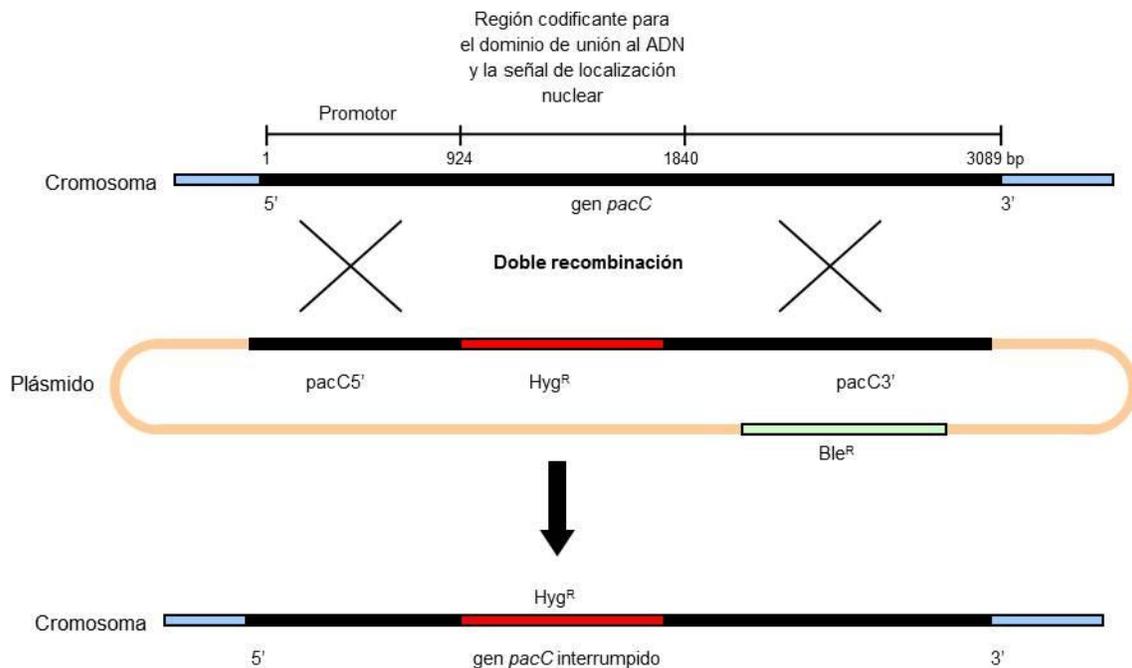


Fig. 7. Estrategia para interrumpir el gen *pacC* de *A. chrysogenum*.

### 6.6.1.1. Diseño de cebadores para la interrupción del gen *pacC*

Se diseñaron cebadores para amplificar por PCR los extremos del gen *pacC*, en la zona de interés para su interrupción, la cual abarcó desde el dominio de unión al ADN hasta la señal de localización nuclear en el factor de transcripción.

El amplificado de la región 5' se denominó *pacC5'* y abarcó desde el nucleótido número uno, correspondiente con el inicio de la región promotora del gen, hasta el nucleótido número 923, poco antes de la región codificante para el primer dedo de zinc. Además se le incluyó un sitio de corte para la enzima de restricción *HindIII* en el extremo 5' y un sitio de corte para la enzima de restricción *XbaI* en el extremo 3'. El amplificado de la región 3' se denominó *pacC3'* y se diseñó desde del nucleótido número 1840, ubicado poco después de la región codificante para la señal de localización nuclear, hasta el nucleótido 3009, casi al final del terminador del gen. También se le incluyó un sitio de corte para la enzima de restricción *XbaI* en el extremo 5' y un sitio de corte para la enzima de restricción *KpnI* en el extremo 3'. Ambos cebadores se diseñaron a partir de la secuencia original del gen *pacC* de *A. chrysogenum* con número de acceso GenBank AJ251521.1.

Por otra parte, se diseñaron cebadores para amplificar por PCR el cassette de resistencia a higromicina proveniente del vector pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987), con sitios de corte para la enzima de restricción *XbaI* en ambos extremos. Las secuencias de los cebadores diseñados para la interrupción del gen *pacC* se enlistan en la tabla 10.

Tabla 10. Cebadores diseñados para la interrupción del gen *pacC* de *A. chrysogenum*.

Cebador	Secuencia 5'-3'
PacC5' F	GGTAAGCTT <u>GAGATGGTGTCTACCGTTC</u>
PacC5' R	AACTCTAGAGATGGCAGCAGCCGAAG
Hgm2 F	GGCTCTAGATAATAATTCCTTGTATCTCT
Hgm2 R	GGT <u>CTAGAA</u> AAGAAGGATTACCTCTAAAC
PacC3' F	AACTCTAGAGAGCAGCACTACGTGCCG
PacC3' R	GACGGTACCATTTCCTCTCATACGGAGG

### 6.6.1.2. Reacciones de PCR para la amplificación de los productos *pacC5'*, *pacC3'* y *Hgm2*

Se utilizó ADN total de *A. chrysoenum* como molde para los productos de amplificación *pacC5'* y *pacC3'*, y una dilución 1:50 de una megapreparación de ADN plasmídico del vector pAN7.1, obtenida como se describe en el apartado 6.6.1.3.1.3, para el producto *Hgm2*. En los tres casos, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Finnzymes®).

Se realizaron experimentos previos para optimizar las reacciones de PCR con los dos diferentes amortiguadores provistos con la enzima (5X HF buffer y 5X GC buffer) y también se probó un gradiente de temperatura de hibridación desde 60 a 70°C. Posteriormente se probó un gradiente de concentración de Mg<sup>+2</sup> desde 1.5 mM hasta 3.0 mM. Las condiciones de reacción y de operación del termociclador se muestran en las tablas 11 y 12, respectivamente. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 0.7 % (p/v).

Tabla 11. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR para la interrupción del gen *pacC*.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	Variable
Amortiguador (5X) HF o GC	1X	10
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 mM (provista en el amortiguador)	Variable
Mezcla de dNTP (10 mM)	200 µM	1
Cebador F (20 µM)	0.5 µM	1.25
Cebador R (20 µM)	0.5 µM	1.25
ADN molde (≈25 ng/µL)	50-500 ng (Genómico) 1 pg - 10 ng (Plásmido, ADNc)	5
Phusion (2 U/µL)	1 U	0.5
<b>Volumen de reacción</b>		<b>50</b>

Tabla 12. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de PCR para la interrupción del gen *pacC*.

CICLOS	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	98°C	30''
	Desnaturalización	98°C	15''
30		pacC5'	
	Hibridación	Hgm2 60-70°C	15''
		pacC3'	
1	Polimerización	72°C	4'
	Polimerización	72°C	5'

### 6.6.1.3. Construcción del vector para la interrupción del gen *pacC* p $\Delta$ pacC

Se utilizó como base el plásmido pULC43 $\Delta$ XbaI (Sierra, 2005), para lo cual fue necesario eliminar primero el sitio de restricción *XbaI* presente en el sitio múltiple de clonación. Este sitio se eliminó al digerir el plásmido con la enzima *XbaI* y rellenar los extremos protuberantes que resultan de la digestión con la enzima Klenow, para posteriormente recircularizar el plásmido con la enzima T4 ligasa. El vector resultante se denominó pC43 $\Delta\Delta$ XbaI.

El plásmido pC43 $\Delta\Delta$ XbaI se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*. Cada digestión se realizó por separado y se purificó posteriormente con ayuda del kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR clean-Up System (Promega<sup>®</sup>). Posteriormente se ligaron a él los productos pacC5' y pacC3' previamente digeridos y purificados. El plásmido intermediario que resultó fue digerido después con la enzima de restricción *XbaI* y luego fue tratado con fosfatasa alcalina. Finalmente se realizó la ligación de este plásmido con el producto de PCR Hgm2 previamente digerido con la enzima *XbaI* y purificado. La construcción del vector p $\Delta$ pacC para la interrupción del gen *pacC* de *A. chrysogenum* se ilustra en la figura 8.

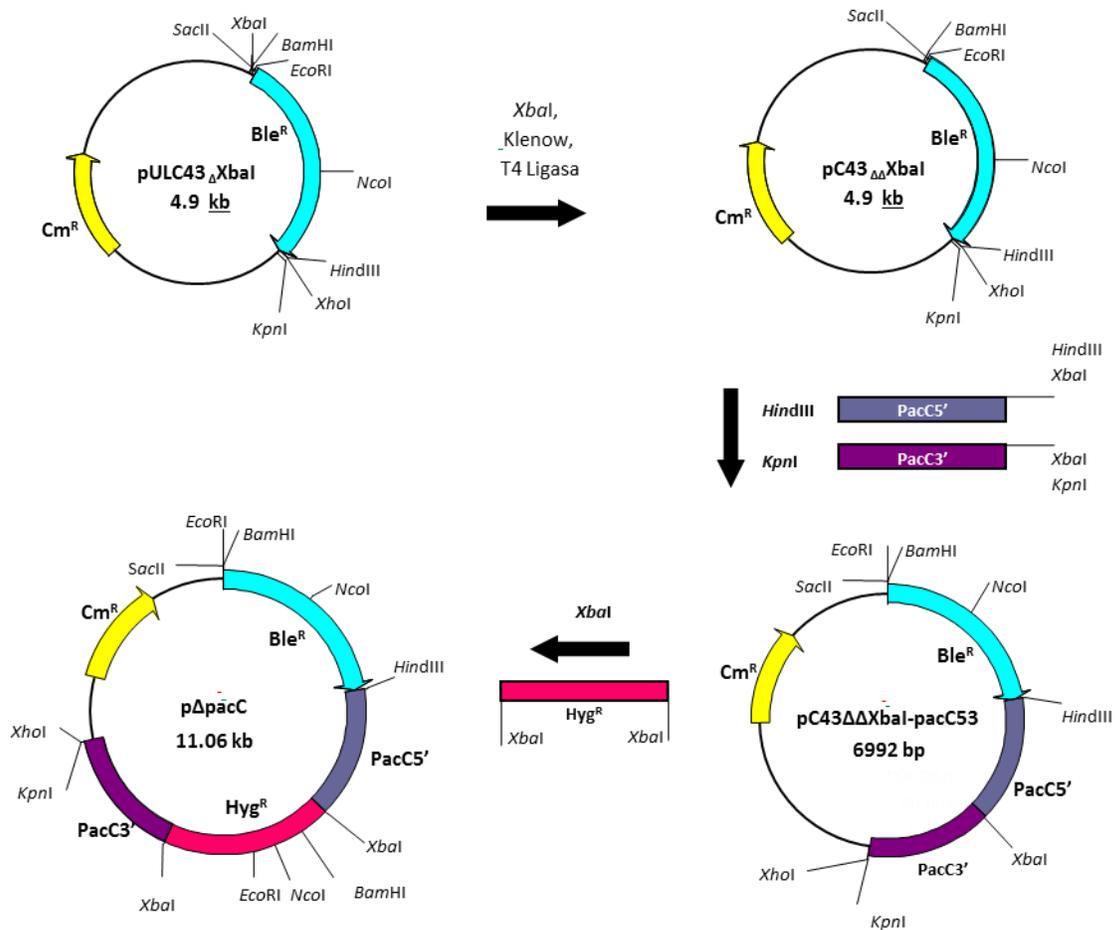


Fig. 8. Construcción del plásmido pΔpacC.

### 6.6.1.3.1. Obtención de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó a gran escala cuando se requirieron de grandes cantidades de plásmido. Por ejemplo, en los casos en que fue necesario hacer varias reacciones enzimáticas consecutivas para la construcción de algún vector y por lo tanto hubo que partir de cantidades suficientes de plásmido molde. También en los casos en que fue necesario almacenar algún plásmido molde o recién construido. La técnica de extracción de ADN plasmídico a gran escala se denomina megaprep y se detalla en el apartado 6.6.1.3.1.3.

Alternativamente, se realizó la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala cuando no se requirieron grandes cantidades de plásmido extraído: por ejemplo, en los casos en que se analizó rápidamente la presencia de algún plásmido en colonias de *E. coli*, o cuando se requería de la verificación de los sitios de restricción en algún vector. La técnica de extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se denomina miniprep y se describe en el apartado 6.6.1.3.1.4.

Estas técnicas también fueron útiles cuando fue necesaria la amplificación de algún plásmido, es decir, que se contaba solamente con una pequeña cantidad de plásmido y éste se introdujo en células de *E. coli* para su replicación *in vivo* a gran escala. También se ocupó la extracción de ADN plasmídico, sobre todo a pequeña escala, cuando se hicieron reacciones de ligación durante la construcción de los vectores descritos, y fue necesario introducirlos en *E. coli* para su posterior análisis.

#### **6.6.1.3.1.1. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* y transformación por electroporación.**

La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo a lo descrito por Sambrook & Russell (2001), de la siguiente manera. A partir de una placa de medio LB con colonias aisladas de *E. coli* DH5 $\alpha$  (o XL1-Blue), se inoculó una colonia en 50 mL de medio LB contenidos en un matraz de 250 mL, incubándose a 37°C y 250 rpm durante 12-14 horas. Después se tomó una alícuota de 3 mL del cultivo obtenido para inocular 125 mL de medio LB fresco (en un matraz de 500 mL). Posteriormente, se incubó a 37°C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó 0.4 unidades de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda.

En seguida se colocó el cultivo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente las células se recogieron por centrifugación a 4°C y 2500 rpm (1000  $\times$  *g*) durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante para resuspender el precipitado en 60 mL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril y fría (< 4°C). Nuevamente se recogieron las células bajo las mismas condiciones de centrifugación y se desechó el sobrenadante. Las células se

resuspendieron en 16 mL de glicerol al 10% (v/v), estéril y frío. Se centrifugó de nuevo, para luego resuspender el precipitado en 6 mL de glicerol al 10% (v/v) y volver a centrifugar. Las células se resuspendieron en 600  $\mu$ L de medio GYT frío y se centrifugó nuevamente, desechando el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado obtenido en 500  $\mu$ L de medio GYT frío, se homogeneizó suavemente y se repartió en alícuotas de 40  $\mu$ L. Las alícuotas de células electrocompetentes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

El método utilizado para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* por electroporación fue el descrito por Zhou *et al.* (1995). Para ello, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes (40  $\mu$ L) en un baño de hielo y se mezcló con 1  $\mu$ L de plásmido o con 5  $\mu$ L de mezcla de ligación (véase más adelante). Se mezcló suavemente con la pipeta y se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm previamente enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se le aplicó un voltaje de 2500 mV/cm (20  $\mu$ F de capacitancia y 200  $\Omega$  de resistencia) durante aproximadamente 5 milisegundos, en un equipo Electroporator 2510 (Eppendorf®). Lo más rápidamente posible se añadió 1 mL de medio LB y se mezcló por inversión para posteriormente incubarse la mezcla en un microtubo de 1.5 mL a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembró por extensión una alícuota de la mezcla de transformación en una placa de agar LB suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o cloranfenicol (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), según fuera la necesidad.

#### **6.6.1.3.1.2. Preparación de células ultracompetentes de *E. coli* y transformación por choque térmico.**

Alternativamente a la transformación de células de *E. coli* por electroporación, también se siguió el método de transformación de células ultracompetentes de *E. coli* por choque térmico descrito por Inoue *et al.* (1990) y Hengen (1996). Para esto, se seleccionaron de 10 a 12 colonias de buen tamaño, provenientes de una placa de agar LB sembrada con *E. coli* DH5 $\alpha$  (o Xl1-Blue) e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12-16 horas, y con ellas se inocularon 250 mL de medio SOB contenidos en un matraz de 2 L. Alternativamente, se

inoculó con 2.5 mL de un precultivo de una noche en medio líquido LB o SOB. Posteriormente, se dejaron crecer a 18°C con agitación orbital a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó entre 0.6 y 0.9 unidades de densidad óptica a 260 nm de longitud de onda. Pasado el tiempo de incubación, se enfrió el matraz en hielo durante 10 minutos y después se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm (2500 x *g*) y 4°C durante 10 minutos. Las células se resuspendieron suavemente en 80 mL de solución TB previamente enfriada en hielo y se dejaron reposar en un baño de hielo durante 10 minutos. Después, se centrifugaron nuevamente a 5000 rpm y 4°C durante otros 10 minutos. Las células se resuspendieron cuidadosamente en 20 mL de solución TB, se les agregó 1.4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril y se mezcló muy suavemente. Se dejaron reposar en un baño de hielo durante 10 minutos y finalmente se repartieron en alícuotas de 50 µL, en tubos previamente enfriados, almacenándose de inmediato a -70°C.

Para la transformación por choque térmico, se descongeló una alícuota de células ultracompetentes y se colocó en un baño de hielo. Se le agregó 1 µL de ADN plasmídico ó 5-10 µL de mezcla de ligación. Se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicó un pulso de 42°C durante 2 minutos e inmediatamente se colocaron las células en hielo durante otros 2 minutos. De inmediato, se les agregó 0.8 mL de medio líquido SOC o LB y se incubaron a 37°C durante una hora con agitación vigorosa. Finalmente, se extendieron desde 20 µL en placas de agar LB suplementado con el respectivo antibiótico de selección y se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche.

#### **6.6.1.3.1.3. Extracción de ADN plasmídico a gran escala: megaprep**

Este método fue descrito por Holmes & Quigley (1981), con modificaciones de Fernández (1997). Para ello se seleccionó una colonia portadora del plásmido de interés y se inoculó en 100 mL de medio líquido TB, suplementado con el respectivo antibiótico de su marcador de selección (100 µg/mL de ampicilina ó 25 µg/mL de cloranfenicol). Se incubaron a 37°C con agitación constante de 250 rpm durante 12 a 16 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en 6 mL de STET<sup>17</sup> y se le agregaron 360 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL en H<sub>2</sub>O). Se mezcló suavemente durante 30 segundos, luego se repartió en alícuotas de 350 µL. Inmediatamente después, las alícuotas se calentaron durante 45 segundos en un baño con agua en ebullición. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos y posteriormente se retiraron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico de cada alícuota se precipitó con 40 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, mezclándose por inversión y manteniéndose en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado de cada alícuota se lavó con 500 µL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el ADN plasmídico se dejó secar a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 50 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se juntaron todas las alícuotas en un mismo volumen, se limpiaron por fenolización y se trataron con ARNasa, de la misma manera en que se describió en las secciones 6.4.5.6.1, 6.4.5.6.2 y 6.4.5.6.3.

#### **6.6.1.3.1.4. Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala: miniprep**

El procedimiento a seguir fue el descrito por Holmes & Quigley en 1981. Es parecido al descrito en la sección anterior, pero en este caso se obtuvo ADN plasmídico a pequeña escala, lo que fue muy útil cuando se requirieron hacer múltiples análisis de restricción en el menor tiempo posible. Para ello se seleccionaron al azar colonias transformantes de interés y se inocularon, con ayuda de un palillo estéril, en 1 mL de medio TB suplementado con el antibiótico de selección del plásmido, habiéndolas resembrado e identificado previamente en una placa de medio LB con el mismo antibiótico. Se incubaron a 37°C con agitación constante de 200 rpm durante 12 a 16 horas. Cuando el plásmido por amplificar fue de tipo astringente (de bajo número de copias), la extracción

---

<sup>17</sup> **STET:** EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Tritón X-100 al 0.5 (v/v).

se realizó a partir de 10 mL de cultivo, con el doble de la concentración usual de antibiótico.

Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células de cada muestra por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en 350  $\mu$ L de STET y se le agregaron 10  $\mu$ L de la solución de lisozima (10 mg/mL en H<sub>2</sub>O), se mezcló suavemente durante 30 segundos y se calentó durante 45 segundos en un baño con agua en ebullición. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se retiraron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm; se desechó el sobrenadante y el ADN plasmídico se dejó secar a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 30  $\mu$ L de TE o H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se requirió de 1 a 5  $\mu$ L de cada minipreparación para realizar los ensayos de restricción pertinentes.

#### **6.6.1.3.2. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción**

Se llevaron a cabo reacciones de digestión con endonucleasas de restricción para hacer los cortes necesarios en los plásmidos y en los productos de PCR durante la construcción de los vectores. En algunas ocasiones también fueron necesarios análisis de restricción para verificar las construcciones plasmídicas.

Con cada endonucleasa de restricción utilizada se siguieron las especificaciones descritas por su proveedor, considerando que cada enzima de restricción tiene sus condiciones óptimas de temperatura, concentración de sales y pH. El volumen utilizado de las enzimas nunca superó 1/10 del volumen total de la reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones en que se presentan. En todo momento se intentó trabajar con ADN de la mejor calidad posible para evitar alterar las

condiciones de la reacción (Fernández, 1997). Las condiciones generales para cada digestión de ADN con una enzima de restricción se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Mezcla de reacción: Digestión de ADN con enzimas de restricción.

REACTIVO	Concentración final	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}^{\text{estéril}}$	-----	
<b>Amortiguador (10X)</b>	1X	Variable
<b>ADN</b>	n $\mu\text{g}$	
<b>Enzima de restricción (10 U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	2n U	
<b>Volumen de reacción</b>	----	20-30 $\mu\text{l}$

Las reacciones se incubaron a 37°C en baño maría de 1 a 3 horas. Posteriormente, se limpiaron las reacciones mediante una extracción con fenol-CIA y otra con CIA, resuspendiéndose en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril, o con ayuda del kit Wizard® SV Gel and PCR clean-Up System (Promega®). En el caso de las digestiones realizadas a las minipreparaciones para su análisis de restricción, fue necesario incluir 1  $\mu\text{L}$  de ARNasa (10 mg/mL) en la mezcla de reacción. Además, con fines de economizar tiempo en el análisis de minipreparaciones, la incubación se sustituyó por calentamiento en microondas durante 4 ciclos de 10 segundos a potencia máxima, separados por intervalos de 2 minutos de reposo a temperatura ambiente. Los resultados las digestiones de ADN se visualizaron en geles de agarosa (0.7%-1%, p/v).

#### 6.6.1.3.3. Rellenado de extremos protuberantes con la enzima Klenow

Este procedimiento se utilizó cuando fue necesario generar extremos romos en cadenas de ADN con extremos protuberantes que resultan de algunas digestiones con endonucleasas de restricción. Por ejemplo, el vector pULC43 $\Delta$ Xba fue digerido con la enzima *Xba*I y fue necesario rellenar sus extremos protuberantes para que se perdiera este sitio de restricción con la posterior recircularización del plásmido. Para esto, se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega®), que consiste de una

sola cadena polipeptídica que mantiene las actividades 5' → 3' polimerasa y 3' → 5' exonucleasa de la enzima completa, pero carece de la actividad 5' → 3' exonucleasa, por lo que se puede utilizar *in vitro* para rellenar extremos 5' protuberantes, cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de desoxirribonucleótidos, o para eliminar los extremos protuberantes si se utiliza en ausencia de estos últimos (Anderson *et al.*, 1980). Las condiciones para el tratamiento de ADN con la enzima Klenow se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Mezcla de reacción: Rellenado de extremos protuberantes de ADN con la enzima Klenow.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (μL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	4
Amortiguador (10X)	1X	2
ADN	1-4 μg	12
dNTP 10 mM	40 μM	0.5
BSA <sub>ac</sub> (10 mg/mL)	20 μg/mL	0.5
Klenow (5 U/mL)	1 U/μg de ADN	1
<b>Volumen de reacción</b>		<b>20</b>

Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se inactivó la enzima a 75°C durante otros 10 minutos. La mezcla de reacción se purificó con ayuda del kit Wizard® SV Gel and PCR clean-Up System (Promega®). Para verificar que la actividad del fragmento Klenow se llevó a cabo satisfactoriamente, se recircularizó el vector tratado con esta enzima utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T4 y se transformaron con él células de *E. coli*. Posteriormente, se obtuvieron minipreparaciones de ADN plasmídico de colonias transformantes aleatorias y se les realizaron ensayos de digestión con la enzima *Xba*I. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

#### 6.6.1.3.4. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Este procedimiento se llevó a cabo cuando fue necesaria la desfosforilación del vector para evitar su recircularización durante las reacciones de ligación y, con esto,

reducir el fondo de falsos positivos que consumen tiempo y reactivos en el análisis de transformantes de *E. coli*. Generalmente se requiere desfosforilar el vector cuando, después de la digestión con endonucleasas de restricción y justo antes de la ligación con los insertos de interés, éste presenta extremos romos o compatibles. Para esto, se utilizó la enzima recombinante FastAP® thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific®), la cual cataliza la hidrólisis de los grupos 5' fosfato del vector digerido y, por lo tanto, evita su recircularización, debido a que la ADN ligasa requiere obligatoriamente de un extremo 5' fosforilado para la formación del enlace fosfodiéster (Sambrook & Russell, 2001). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Mezcla de reacción: Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	16
Amortiguador (10X)	1X	2
ADN 5' fosforilado (1 µg/µL)	1 µg	1
FastAP (1 U/µL)	1/µg ADN	1
Volumen de reacción		20

La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la reacción calentándola a 75°C durante 5 minutos. No fue necesaria la purificación posterior de la reacción, antes de realizar la ligación correspondiente. Para comprobar que se llevó a cabo la desfosforilación del vector con la fosfatasa alcalina, se hizo una recircularización del mismo con la ADN ligasa del bacteriófago T4 y se transformaron células de *E. coli*.

#### 6.6.1.3.5. Reacciones de ligación con la ADN ligasa del bacteriófago T4

Para la recircularización de un plásmido (cuando fue requerido) y la clonación de productos de PCR previamente digeridos, también denominados insertos, en su respectivo vector previamente digerido, se utilizó la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Thermo

Scientific®), la cual cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosforilado y un extremo hidroxilo terminal, de dos cadenas de ADN yuxtapuestas (Rossi *et al.*, 1997). Las condiciones para las reacciones de ligación se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Mezcla de reacción: Ligación de fragmentos de ADN.

REACTIVO	Recircularización		Ligación de un inserto	
	Concentración recomendada	Volumen final (µL)	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	Variable	-----	Variable
Amortiguador (5X)	1X	10	1X	4
Vector	10-50 ng	variable	10 - 100 ng	Variable
Inserto	-----	-----	tasa molar 1:3	Variable
ADN ligasa T4 (5 U/µL)	5 U	1	5 U	1
Volumen de reacción		50		20

Se incubaron las reacciones a 22°C de 5 a 30 minutos, e inmediatamente se utilizaron hasta 10 µL de la mezcla de reacción para la transformación de *E. coli* (cuando se siguió el protocolo de choque térmico) o hasta 5 µL cuando fue por electroporación.

#### 6.6.1.4. Transformación de *A. chrysogenum* con los plásmidos pΔpacC y pULC43ΔXbaI

Se llevó a cabo la transformación de *A. chrysogenum* cepa silvestre con los vectores pΔpacC y pULC43ΔXbaI. Este último se utilizó como control de transformación que introduce solamente los componentes del plásmido. La transformación se realizó por la técnica de protoplastos descrita en la sección 6.5.1. Para el plásmido pΔpacC se utilizó higromicina en una concentración final de 30 µg/mL (determinada previamente en un ensayo de concentración mínima inhibitoria frente a protoplastos de *A. chrysogenum*), mientras que para el plásmido pULC43ΔXbaI se utilizó fleomicina a concentración final de 20 µg/mL. Las colonias transformantes del plásmido pΔpacC que crecieron en medio con higromicina fueron sembradas posteriormente en placas de medio TSA con 30 µg/mL de fleomicina con el objetivo de seleccionar cepas mutantes por doble recombinación. Las transformantes del plásmido pΔpacC que mostraron resistencia a higromicina pero

sensibilidad a fleomicina, así como las transformantes obtenidas con el plásmido pULC43 $\Delta$ XbaI, se sembraron en placas de medio TSA con el doble de la concentración de su respectivo antibiótico de selección.

#### 6.6.1.5. Análisis primario de transformantes p $\Delta$ pacC y pULC43 $\Delta$ XbaI por PCR a partir de colonia

El procedimiento seguido fue el mismo descrito en la sección 6.5.2. Como sonda para el análisis de las transformantes p $\Delta$ pacC se utilizaron los cebadores pacC5'F y pacC3'R mostrados en la tabla 10, con el propósito de verificar la amplificación del producto de PCR debida únicamente al *cassette* de interrupción pero no al gen *pacC* endógeno. Como sonda para el análisis de las transformantes pULC43 $\Delta$ XbaI se usaron cebadores diseñados para amplificar el gen *ble* de *Streptoalloitechus hindustanus*, utilizado como marcador resistencia a fleomicina y que está presente en este plásmido. Los cebadores para amplificar el gen *ble* se muestran en la tabla 17. Las condiciones de operación del termociclador se muestran en la tabla 18.

Tabla 17. Cebadores diseñados para amplificar el gen *ble* de *S. hindustanus*.

Cebador	Secuencia 5'-3'
<b>ble F</b>	ATGGCCAAGTTGACCAAGTGC
<b>ble R</b>	TCAGTCCTGCTCCTCGGC

Tabla 18. Condiciones de operación del termociclador: PCR (pacC5'-3' y *ble*) a partir de colonia de *A. chrysogenum*.

CICLOS	Proceso	Temperatura		Tiempo	
		pacC5'-3'	<i>ble</i>	pacC5'-3'	<i>ble</i>
<b>1</b>	Desnaturalización	98°C	98°C	30''	30''
<b>30</b>	Desnaturalización	98°C	98°C	15''	15''
	Hibridación	66.1°C	55°C	15''	15''
	Polimerización	72°C	72°C	4'	30''
<b>1</b>	Polimerización	72°C	72°C	5'	5'

### 6.6.2. Silenciamiento del gen *pacC* de *A. chrysogenum*

Se construyó un vector para silenciar el gen *pacC* de *A. chrysogenum* por transcripción convergente, utilizando ARN de interferencia generado por dos promotores encontrados y en sentido opuesto.

Para esto, se utilizó como base el plásmido pGpdPki-RNAi (Marcial-Quino, 2011), que contiene una cassette de resistencia a fleomicina como marcador de selección en hongos y lleva los promotores *Pgpd* de *A. nidulans* y *Ppki* de *A. niger* en sentido opuesto y enfrentados, separados por un único sitio de restricción *NcoI*. Este plásmido se utilizó para introducir un fragmento del gen *pacC* entre los dos promotores. La estrategia se ilustra en la figura 9.

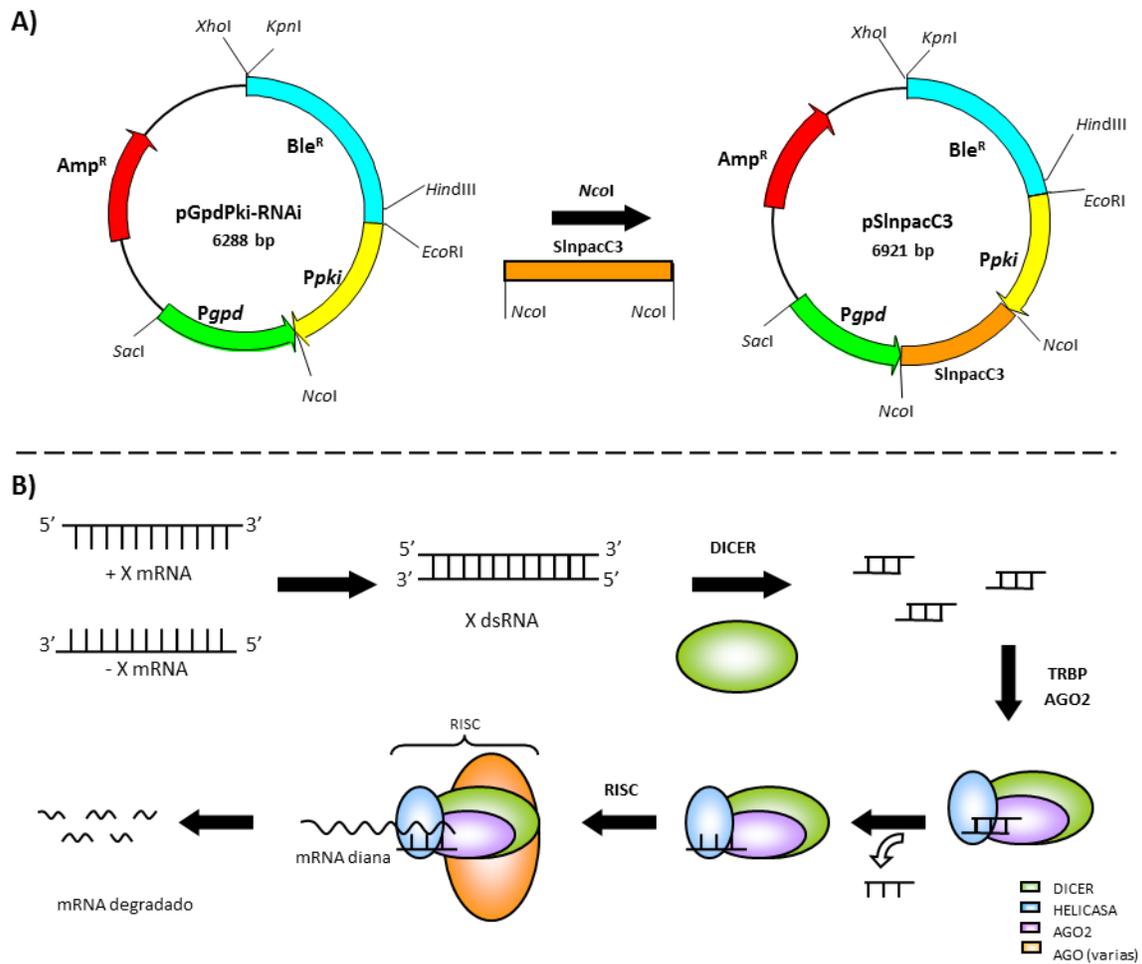


Fig. 9. A) Construcción del vector pSlnpacC3. B) Mecanismo de silenciamiento por transcripción convergente.

Los promotores en sentidos opuestos y encontrados entre sí, al flanquear un gen o una región de éste dentro del plásmido, dan lugar a la formación de mRNA's complementarios entre sí, los cuales hibridan para formar RNA de doble cadena (dsRNA). Posteriormente, el dsRNA es reconocido por la enzima Dicer, que lo rompe en fragmentos cortos de 19-23 ribonucleótidos, llamados siRNA. Luego se le une una helicasa, que relaja el siRNA, y la enzima AGO-2 (Argonauta), que rompe los fragmentos de siRNA liberando una de las hebras de RNA (llamada cadena pasajera) y mantiene otra de las hebras asociada al complejo, la cadena guía. Posteriormente se unen otras proteínas Argonauta y proteínas asociadas a Argonauta para formar el complejo activo RISC (RNA-induced silencing complex). Luego, la cadena guía dirige a RISC hacia el mRNA, en regiones complementarias, donde la proteína AGO-2 degrada el mRNA (Chang *et al.*, 2012; Dang *et al.*, 2011; Meister & Tuschl, 2004; Nakayashiki, 2005; Schumann *et al.*, 2010).

#### 6.6.2.1. Diseño de cebadores para el silenciamiento del gen *pacC*

Se seleccionó una región del gen *pacC* que abarca la región codificante para el dominio de unión al ADN en el factor de transcripción PacC, desde el nucleótido 888 hasta el nucleótido 1600 de la secuencia original del gen *pacC* de *A. chrysogenum* con número de acceso GenBank AJ251521.1. A ambos cebadores se les añadió un sitio de corte para la enzima de restricción *NcoI*. Las secuencias de los cebadores diseñados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Cebadores diseñados para silenciar el gen *pacC* de *A. chrysogenum*.

Cebador	Secuencia 5'-3'
SIn3' F	AATCCATGGCGAGCACCACGTCCACCACTTCG
SIn3' R	AGTCCATGGTGGAGGGCTGAGGCCATAGTAGG

### 6.6.2.2. Reacción de PCR para la amplificación del producto SlnpacC3

Se utilizó ADN total de *A. chrysogenum* como molde y la enzima recombinante pfuUltra II Fusion HS DNA polymerase® (Agilent Technologies®), la cual es una polimerasa termoestable de alta fidelidad y procesividad, muy eficiente para obtener productos de PCR que serán posteriormente clonados. El experimento se realizó probando un gradiente de temperatura de hibridación desde 60 a 68°C. Las condiciones de reacción y de operación del termociclador se muestran en las tablas 20 y 21, respectivamente.

Tabla 20. Mezcla de reacción: Reacciones de PCR para el silenciamiento del gen *pacC*.

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> estéril	-----	18.875
Amortiguador (10X)	1X	2.5
Mezcla de dNTP (10 mM)	250 µM	0.625
Cebador F (20 µM)	0.2 µM	0.25
Cebador R (20 µM)	0.2 µM	0.25
ADN molde (≈25 ng/µL)	100 ng (genómico)	2
pfuUltrail	3-5 ng (plásmido) 1 µL/50 µL RX	0.5
<b>Volumen de reacción</b>		<b>25</b>

Tabla 21. Condiciones de operación del termociclador: Reacciones de PCR para el silenciamiento del gen *pacC*.

CICLOS	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	95°C	2'
	Desnaturalización	95°C	20''
30	Hibridación	60-68°C	20''
	Polimerización	72°C	15''
1	Polimerización	72°C	3'

#### **6.6.2.3. Clonación del producto de PCR SlnpacC3 en el vector pGpdPki-RNAi**

Se digirió por separado el producto de PCR SlnpacC3 y el vector con la enzima de restricción *Nco*I, de la forma en que se describió en la sección 6.6.1.3.2. Posteriormente se desfosforiló el vector con fosfatasa alcalina. Después, se llevó a cabo la reacción de ligación entre el vector y el inserto SlnpacC3, utilizando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Estas dos últimas reacciones se describen en los apartados 6.6.1.3.4 y 6.6.1.3.5, respectivamente. El plásmido resultante se denominó pSlnpacC3.

#### **6.6.2.4. Transformación de *A. chrysogenum* con los vectores pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi**

El procedimiento para la transformación de *A. chrysogenum*, cepa silvestre fue el mismo descrito en la sección 6.5.1. El plásmido pGpdPki-RNAi fue utilizado como control de transformación para introducir solamente los componentes del vector. Para ambos plásmidos se usó bleomicina como marcador de selección, a una concentración final de 30 µg/mL.

#### **6.6.2.5. Análisis primario de transformantes Sln3 por PCR a partir de colonia**

El procedimiento a seguir fue el mismo descrito anteriormente en la sección 6.5.2. Como sonda para este análisis se utilizaron los mismos cebadores diseñados para amplificar el gen *ble* y que se muestran en la tabla 17. Las condiciones de operación del termociclador fueron las mismas indicadas en la tabla 18 para la amplificación del gen *ble*.

#### **6.6.2.6. Cultivo en medio líquido MDFA de las transformantes con el gen *pacC* silenciado**

Las cepas transformantes que dieron positivo para el análisis primario por PCR a partir de colonia se analizaron en posteriormente en cultivo líquido. Se utilizó el medio MDFA en dos condiciones de pH diferentes: 6.8 (medio original) y 5.0 (amortiguado con MES 100 mM). Se preparó inóculo primario de cada una de las cepas transformantes, incluyendo la cepa parental, una cepa control (plásmido pGpdPki-RNAi) y una cepa con el gen *pacC* constitutivamente activo (cepa P17). Se tomaron 10 mL del inóculo primario y se

agregaron a 100 mL de medio líquido MDFA contenido en matraces de 500 mL con triple indentación, y se incubaron a 28°C durante 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, con agitación orbital de 250 rpm. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Al término del tiempo de cultivo, se determinó la concentración de antibióticos beta-lactámicos presentes en el caldo de cultivo, el pH y la cantidad de biomasa, de la misma forma en que se describió para la sección 6.5.4. Los resultados se analizaron estadísticamente y se graficaron.

### **6.7. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos de cada uno de los cultivos se analizaron estadísticamente con ayuda del programa SPSS versión 15.0. Se realizaron análisis de varianza de una vía y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), para cada una de las variables respuesta. Las gráficas y los intervalos de confianza ( $\alpha = 0.05$ ) se obtuvieron con ayuda del programa Excel®.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* en sistemas de cultivo sólido y líquido

#### 7.1.1. Cultivo sólido de *A. chrysogenum* C10 en soporte impregnado

En la figura 10 se muestran los resultados de las cinéticas de producción de CPC, consumo de oxígeno (en relación a la formación de biomasa) y comportamiento del pH en el cultivo de *A. chrysogenum* cepa C10 en sistema sólido con bagazo de caña impregnado de medio complejo de producción MCFA 2.5X.

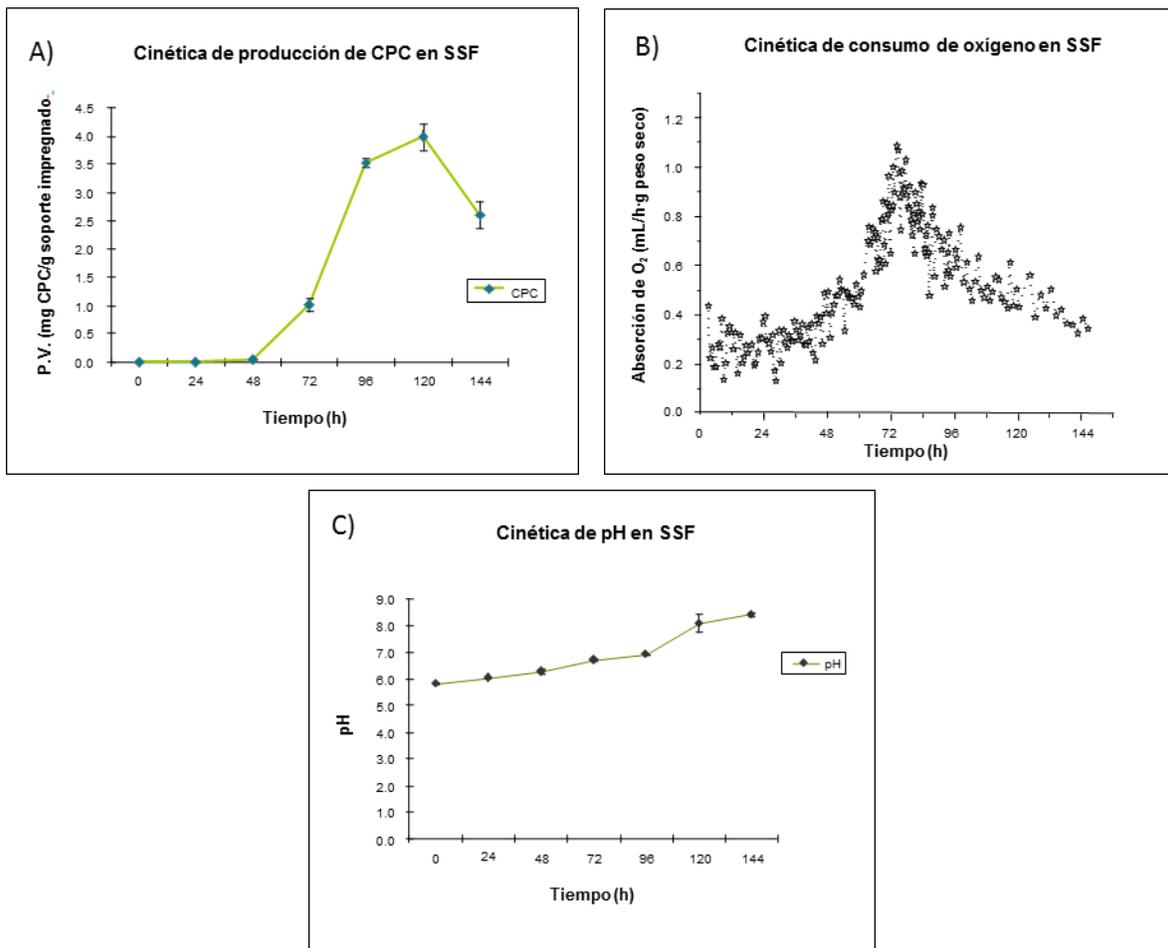


Fig. 10. Cinéticas de: A) producción de CPC, B) consumo de oxígeno, y C) pH, en cultivo sólido de *A. chrysogenum* C10 en soporte impregnado con medio MCFA 2.5X.

En la figura 10A, se observa que la producción de CPC inicia después de las 48 horas de cultivo, alcanzando la fase de producción rápida entre las 72 y 96 horas. Posteriormente, la velocidad de producción disminuye lentamente hacia las 120 horas, punto en el que se alcanza la producción máxima de CPC de  $3.99 \pm 0.13$  mg CPC/g soporte impregnado.

La estimación de la biomasa se realizó por respirometría en un trabajo anterior de nuestro grupo de trabajo y fue reportada por Cuadra (2010). La cuantificación de CPC y el comportamiento del pH a lo largo de la cultivo se realizaron como repetición del experimento reportado por el mismo autor, para darle continuidad en el análisis de expresión de los genes ya mencionados.

En la figura 10B se observa que el consumo de oxígeno asciende lentamente desde el inicio del cultivo hasta las 48 horas, acelerándose entre las 48 y 72 horas. Posteriormente, comienza a descender después de las 72 horas, marcando el término de la fase rápida de crecimiento (trofofase) y coincidiendo con el inicio de la producción rápida de CPC (idiofase).

El pH ascendió lentamente desde 5.8 hasta  $8.3 \pm 0.01$  (Fig. 10C), permitiendo observar el intervalo de pH que favoreció la producción de CPC, que fue entre  $6.26 \pm 0.14$  y  $8.06 \pm 0.27$ , en este sistema de cultivo. Intervalos de confianza del 95 %.

### **7.1.2. Cultivo en medio líquido complejo MCFA 2.5X**

En la figura 11 se muestran los resultados de las cinéticas de producción de CPC, formación de biomasa y comportamiento de pH en el cultivo sumergido de *A. chrysoenum* C10 en medio MCFA 2.5X.

En la figura 11A se observa que la producción de CPC comienza lentamente desde las 24 horas de cultivo y la fase rápida de producción ocurre entre las 72 y 120 horas, alcanzando una producción máxima de  $2.04 \pm 0.21$  mg/mL a las 120 horas. En la figura 11B se observa que la biomasa fue aumentando desde el inicio del cultivo hasta alcanzar un

máximo de  $33.24 \pm 4.60$  mg peso seco/mL a las 96 horas, para comenzar a descender posteriormente. El pH comenzó en 5.8 y ascendió lentamente hasta llegar a  $8.79 \pm 0.11$  al término del cultivo. La producción se observó entre los valores de pH de  $6.54 \pm 0.01$  y  $8.59 \pm 0.07$  (Fig. 11C). Intervalos de confianza del 95 %.

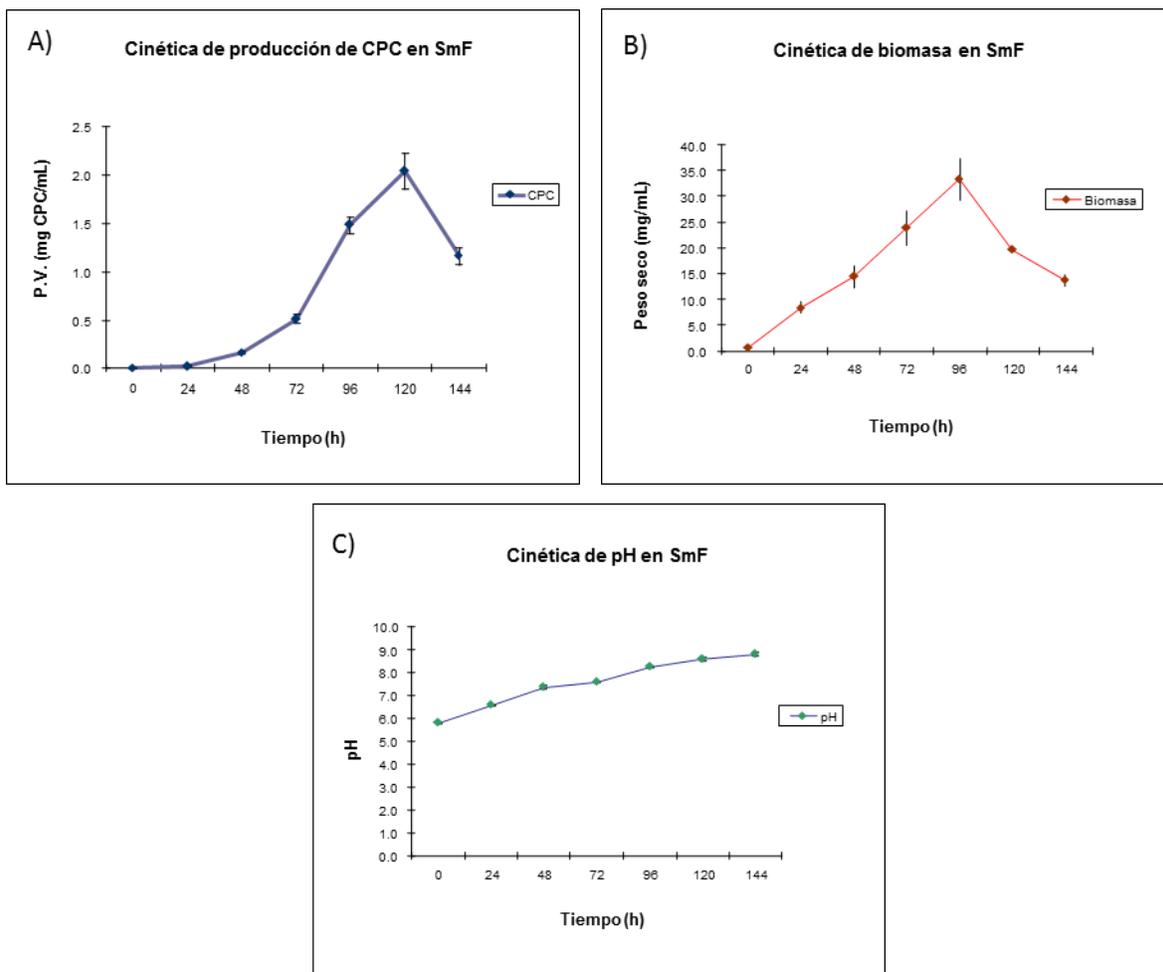


Fig. 11. Cinéticas de: A) producción de CPC, B) formación de biomasa, y C) pH, en cultivo líquido de *A. chrysoenum* C10 en medio MCFA 2.5X.

### 7.1.3. Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo

#### 7.1.3.1. Aislamiento de ARN total de *A. chrysogenum* para cada punto de los cultivos

En la figura 12 se muestra el resultado de la extracción de ARN total a partir de cada uno de los puntos de muestreo en los cultivos sólido y líquido, visualizado en un gel desnaturizante de agarosa al 1%. En cada uno de los pozos se cargó 1  $\mu$ L de ARN. Las bandas resultantes se aprecian aproximadamente con la misma intensidad. Sin embargo, para fines de mayor precisión en las reacciones subsecuentes, las muestras de ARN se cuantificaron y se diluyeron hasta obtener la misma concentración.

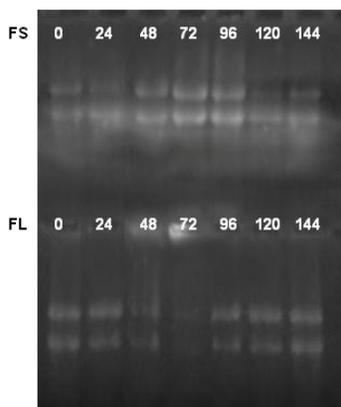


Fig. 12. ARN total de *A. chrysogenum* en cultivo sólido (arriba) y cultivo líquido (abajo) en los tiempos 0 a 144 horas. Gel de agarosa-formaldehído al 1%.

#### 7.1.3.2. Reacciones de PCR a partir de ADN genómico de *A. chrysogenum*

En la figura 13 se muestran los resultados de las reacciones de PCR a partir de ADN genómico de *A. chrysogenum*, con los juegos de cebadores diseñados para el análisis de expresión. Se observan las bandas correspondientes para los productos de PCR de los genes *cefD2*, *cefEF*, *cefT*, *18S*, *gpd*, y la región intrónica del gen *gpd*, con sus respectivos tamaños, considerando que los productos de PCR de los cebadores *cefEF* y *gpd* incluyen intrones en su estructura.

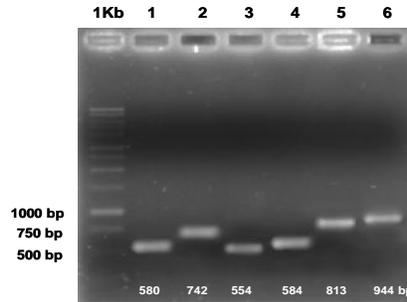


Fig. 13. Productos de PCR de los genes *cefD2* (1), *cefEF* (2), *cefT* (3), *18S* (4), *gpd* (5), y *gpd* región intrónica (6). Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific®)

### 7.1.3.3. Reacción de PCR a partir de ARN total como control negativo

Esta reacción de PCR se realizó para cada una de las muestras de ARN, posterior a su tratamiento con ADNasa, para verificar que las reacciones posteriores de RT-PCR no tuvieran interferencia de ADN genómico. La reacción se hizo con cebadores diseñados a partir de zonas intrónicas del gen *gpd* de *A. chrysogenum* (*gpd-int*). En la figura 14 se muestra el resultado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Solamente hubo amplificación de un producto de PCR para el control positivo, en el que se utilizó ADN genómico de *A. chrysogenum*. En el caso de las muestras de ARN no hubo productos de amplificación, lo que confirma la ausencia de ADN genómico en dichas muestras.

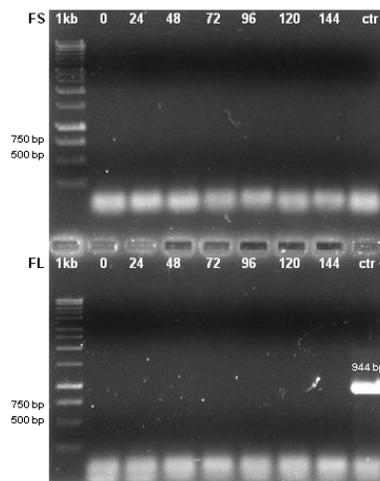


Fig. 14. Gel de agarosa al 1%, con las reacciones de PCR del gen *gpdA*, a partir de las muestras de ARN, con los cebadores diseñados en zonas intrónicas del gen.

#### 7.1.3.4. RT-PCR con gradiente de ciclos para los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT*

En la figura 15 se muestra el resultado de reacciones de RT-PCR para los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT*, utilizando un gradiente de 30 a 40 ciclos de desnaturalización-anillamiento-polimerización. Este experimento se realizó con el propósito de encontrar el número de ciclos en el que se apreciara mejor la diferencia en el nivel de expresión de estos genes (tomando como referencia la densitometría del producto de amplificación), pero sin correr el riesgo de hacer la observación en un momento en el que la cantidad de amplificadas esté saturando el sistema, debido al comportamiento sigmoide de sus respectivas curvas de amplificación. Se observa que con 30 ciclos apenas es visible la banda para el gen *cefD2*, mientras que para el gen *cefEF* ya está un poco más marcada. Con 33 ciclos ya se aprecia mejor la banda para el gen *cefD2* pero aún no es visible la señal del gen *cefT*. A los 36 y 40 ciclos ya son visibles las señales para los 3 genes, pero la señal de los dos últimos ya es muy intensa, por lo que se decidió hacer las posteriores reacciones de RT-PCR a 33 ciclos para los genes *cefD2* y *cefEF* y a 36 ciclos para el gen *cefT*.

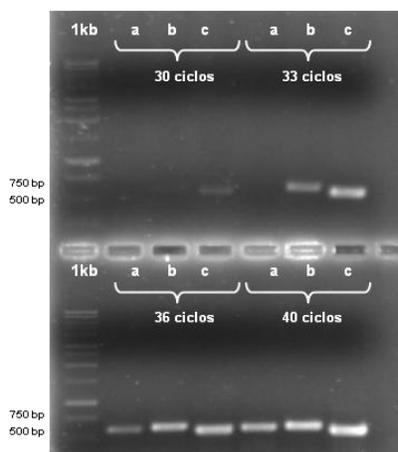


Fig. 15. Gel de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los genes a) *cefD2*, b) *cefEF* y c) *cefT*, en un gradiente de 30 a 40 ciclos. Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific®)

#### 7.1.3.5. RT-PCR de los controles externos *gpdA* y *18S*

En la figura 16 se muestra el resultado de las reacciones de RT-PCR para los genes *18S* y *gpdA* a partir de ARN de cada una de las muestras de los cultivos. Las reacciones se

hicieron con aproximadamente 25 ng de ARN molde para cada muestra. Estos resultados se utilizaron como controles externos en el análisis semicuantitativo de la expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT*. Se midió la densidad en píxeles de cada una de las bandas y se expresó en unidades de expresión relativa (ER) como se muestra en la sección 7.2.7, tomando como unidad de referencia las bandas con un volumen relativo cercano a 1.0 (de acuerdo al software Image Lab de BioRad®).

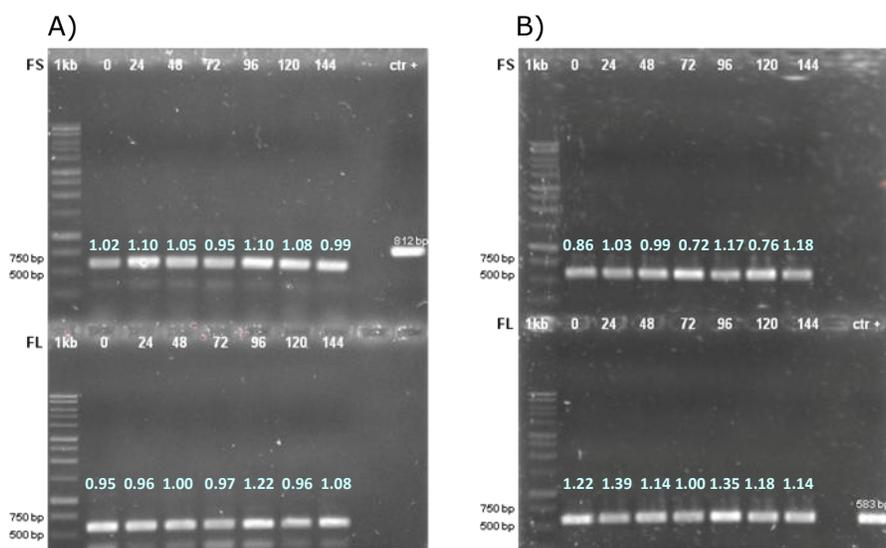


Fig. 16. Geles de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los controles externos A) *gpdA* y B) *18S*. Arriba: muestras de los tiempos 0-144 h del cultivo sólido. Abajo: cultivo líquido. Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific®). En azul se muestran las medias de la expresión relativa.

#### 7.1.5.6. RT-PCR de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT*

En la figura 17 se muestra el resultado de las reacciones de RT-PCR para los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* en cada una de las muestras de los cultivos sólido y líquido. Se midió la densidad en píxeles de cada una de las bandas y se expresó en términos de ER, normalizando este valor al dividirla entre el respectivo valor de ER de los controles externos, en cada muestra, como se observa en la siguiente sección.

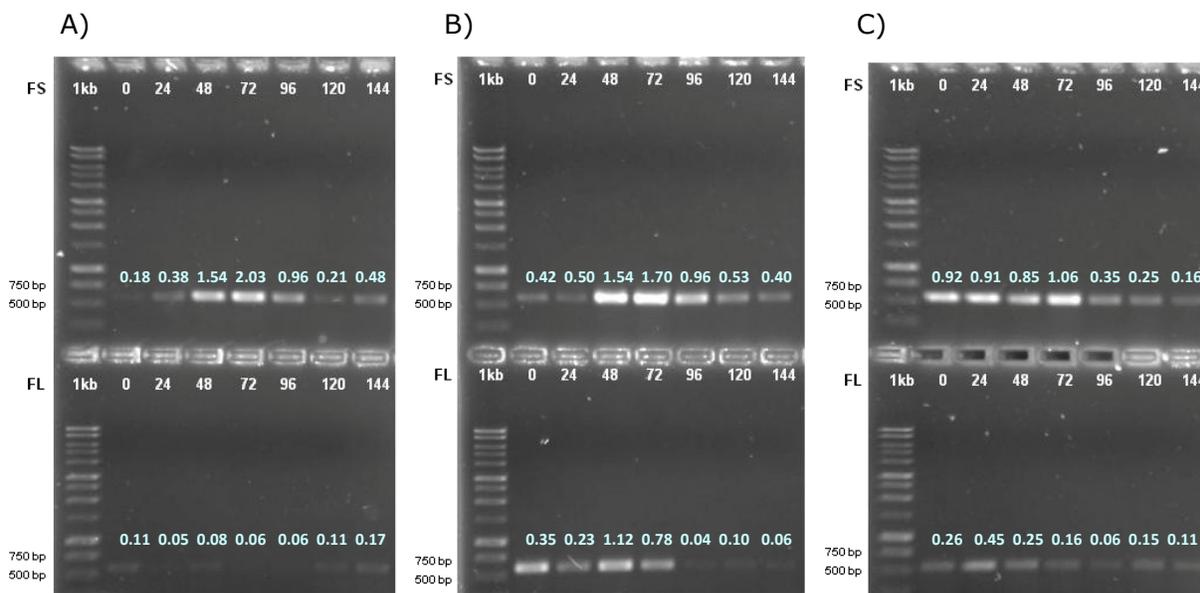


Fig. 17. Geles de agarosa al 1%, con los productos de RT-PCR de los genes A) *cefD2*, B) *cefEF* y C) *cefT*. Arriba: muestras de los tiempos 0-144 h del cultivo sólido. Abajo: cultivo líquido. Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific®). En azul se muestran las medias de la expresión relativa.

#### 7.1.5.7. Expresión relativa de los genes *cefD2*, *cefEF*, *cefT*, *18S* y *gpd*: análisis de expresión

En la figura 18 se muestran las gráficas de expresión relativa de los genes *18S* y *gpd* de *A. chrysogenum* en sistemas de cultivo sólido y líquido. En los dos sistemas de cultivo la expresión de los genes fue constante, ya que estadísticamente no hubo diferencia significativa entre el nivel de expresión relativa a lo largo del tiempo (Tukey:  $\alpha=0.01$ ). Tampoco hubo diferencias estadísticas entre el nivel de expresión de los genes *18S* y *gpd*, por lo que ambos genes pudieron ser utilizados indistintamente como controles externos en el análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* (Tukey:  $\alpha=0.01$ ). En el análisis posterior se consideró únicamente el gen *18S* como control externo.

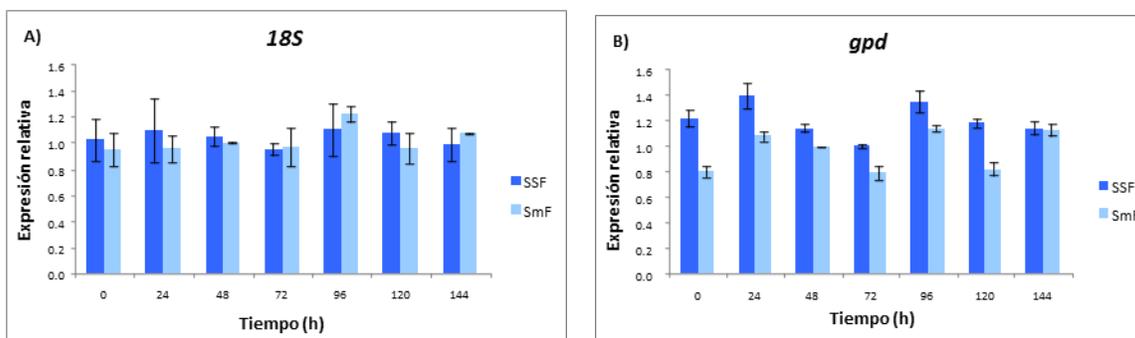


Fig. 18. Expresión relativa de los genes A) *18S* y B) *gpd* de *A. chrysogenum* en cultivo sólido (barras oscuras) y cultivo líquido (barras claras)

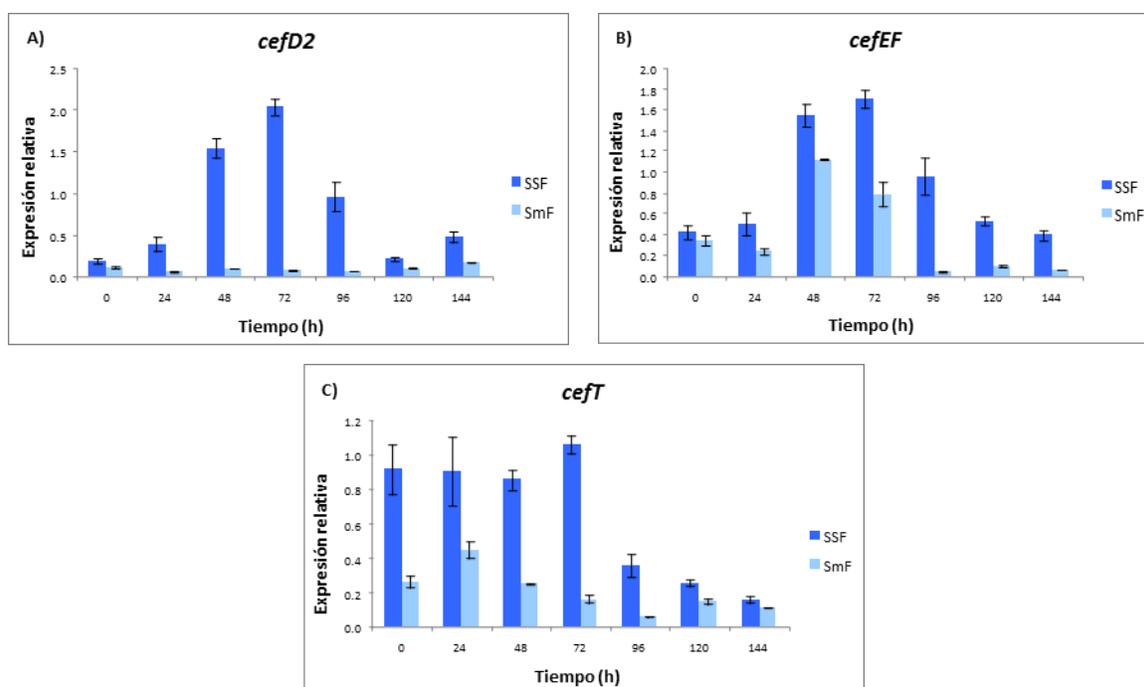


Fig. 19. Expresión relativa de los genes: a) *cefD2*, b) *cefEF*, y c) *cefT*; de *A. chrysogenum* en cultivo sólido (barras oscuras) y cultivo líquido (barras claras)

En la figura 19 se observa la expresión relativa de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum*, en sistemas de cultivo sólido y líquido. Se observa que la expresión de los tres genes fue diferente en ambos sistemas de cultivo. En el sistema de cultivo sólido, la ER del gen *cefD2* (Fig. 19A) ascendió lentamente desde el inicio de la cultivo alcanzando su máximo de expresión a las 72 horas con  $2.3 \pm 0.1$  unidades y descendió posteriormente

hacia el final del cultivo. Mientras, en cultivo líquido, la expresión de este gen apenas fue perceptible, con una ER máxima de 0.17 unidades a las 144 h, siendo hasta un 92.6% menor que la ER máxima alcanzada en SSF.

En el caso del gen *cefEF* (Fig. 19B), la ER en sistema sólido se comportó de manera similar descrita para el gen *cefD2*, aumentando lentamente desde el inicio de la cultivo para alcanzar su máximo de  $1.7 \pm 0.08$  unidades también a las 72 horas; posteriormente descendió hasta el final de la cultivo. En sistema líquido, la ER del gen *cefEF* fue significativamente menor que en el sistema sólido ( $\alpha = 0.01$ ), aunque en este caso el máximo de ER se alcanzó a las 48 horas con 1.12 unidades, 34.11 % menor que el máximo de ER alcanzado en el sistema sólido.

La ER del gen *cefT* (Fig. 19C), en sistema sólido, comenzó en niveles constantes hasta las 72 horas, posteriormente descendió drásticamente a las 96 horas para continuar disminuyendo lentamente hacia el final de la cultivo. El máximo de ER se alcanzó en este caso a las 72 horas con  $1.06 \pm 0.05$  unidades. En sistema líquido, el perfil de ER del gen *cefT* no tuvo similitud con el sistema sólido. Su máximo de ER se alcanzó a las 24 horas con  $0.45 \pm 0.05$  unidades, siendo 57.54% menor que el máximo alcanzado en sistema sólido. Luego descendió lentamente hacia el final del cultivo.

## **7.2. Activación constitutiva del factor de transcripción PacC en *A. chrysogenum***

### **7.2.1. Transformación de *A. chrysogenum* WT y C10 con los vectores pPpacC<sup>27</sup>, pSpacC<sup>27</sup> y pLXTtrpC**

Con la cepa silvestre de *A. chrysogenum* se obtuvieron 24 posibles transformantes con el vector pPpacC<sup>27</sup>, que introduce la mutación de activación del factor de transcripción PacC bajo el control del propio promotor del gen *pacC*, 24 colonias con el vector pSpacC<sup>27</sup>, que expresa la mutación bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpd* de *A. nidulans*, y 8 colonias con el vector pLXTtrpC como control, que introduce solamente los componentes del plásmido.

En el caso de la cepa C10 de *A. chrysogenum*, se obtuvieron 13 colonias con el vector pPpacC<sup>27</sup>, 5 con pSpacC<sup>27</sup> y 5 con pLXTtrpC.

### 7.2.2. Análisis primario de transformantes por PCR de colonia

En la figura 20 se muestra el resultado de las reacciones de PCR a partir de las colonias transformantes con el plásmido pPpacC<sup>27</sup>, cepa silvestre. En la parte de arriba se observan los productos de PCR correspondientes al terminador *TtrpC* que forma parte de los componentes del vector, indicando que solamente 11 de las cepas analizadas fueron verdaderas transformantes. En la parte de abajo se muestran los productos de PCR para el control positivo de la técnica de PCR de colonia, que consistió en la amplificación de un fragmento del gen *pacC*. Las transformantes positivas se designaron como cepas P seguido de un número.

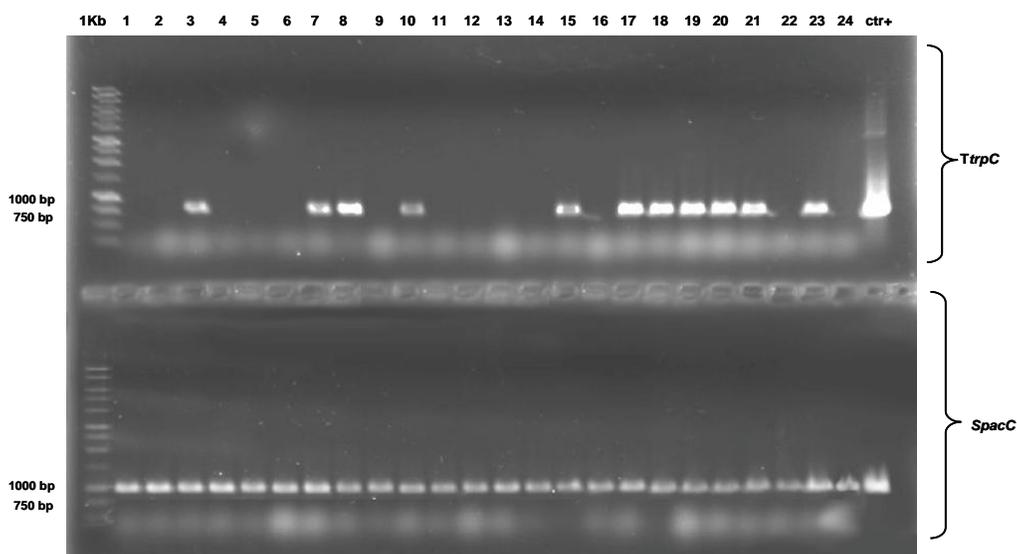


Fig. 20. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador *TtrpC* (arriba) y de un fragmento del gen *pacC* (abajo), de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pPpacC<sup>27</sup>.

Los resultados del análisis primario de transformantes, cepa silvestre, con el plásmido pSpacC<sup>27</sup> se muestran en la figura 21. Se observa que la mayoría de las cepas analizadas fueron verdaderas transformantes. Las transformantes con este plásmido que resultaron positivas se designaron cepas S seguido de un número.

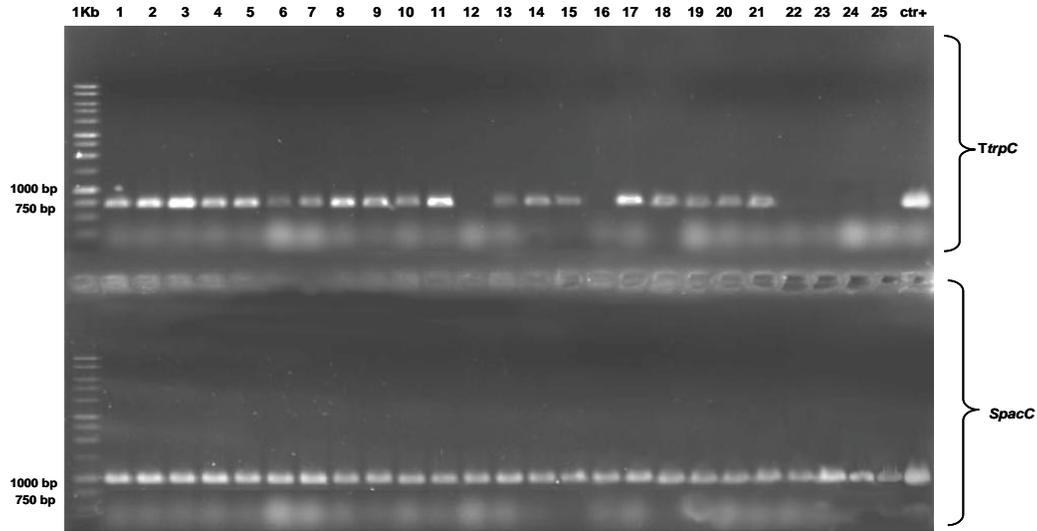


Fig. 21. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador *TtrpC* (arriba) y de un fragmento del gen *pacC* (abajo), de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pSpac<sup>27</sup>.

En la figura 22 se muestra el resultado del análisis primario para las cepas transformantes con el plásmido pLXTtrpC. La mayoría de las cepas analizadas también dieron positivo para la transformación con este plásmido. Estas transformantes se designaron cepas X seguido de un número.

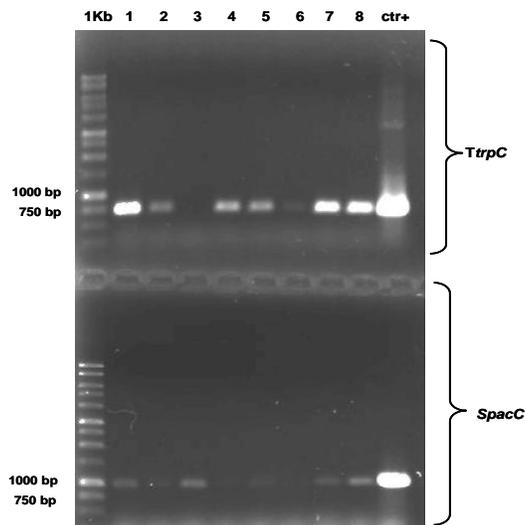


Fig. 22. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador *TtrpC* (arriba) y de un fragmento del gen *pacC* (abajo), de las transformantes de la cepa WT, obtenidas con el vector pLXTtrpC.

En la figura 23 se muestra el resultado del análisis primario de las transformantes, cepa C10, para los vectores pPpacC<sup>27</sup> y pLXTtrpC. Se comprobó la transformación para las trece cepas PC10, las cinco SC10 y las cinco cepas XC10 analizadas.

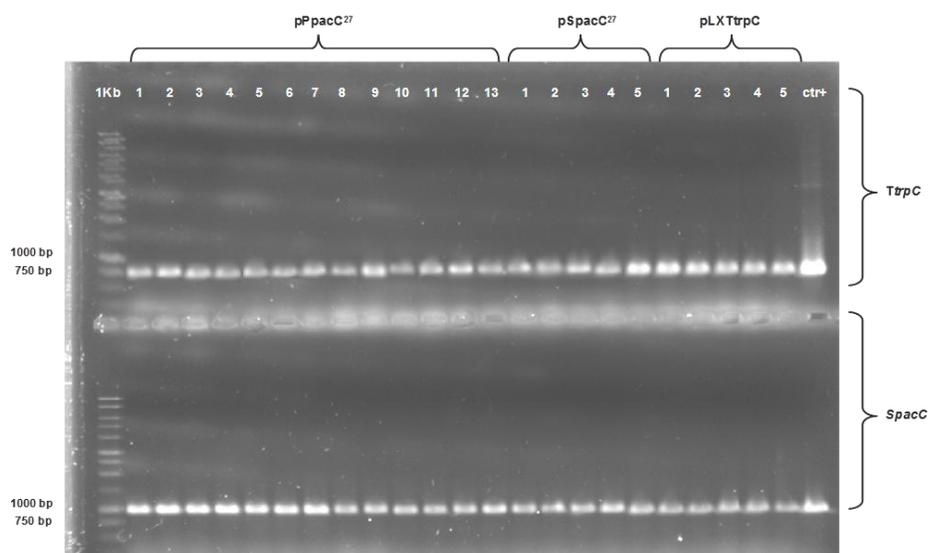


Fig. 23. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR del terminador *TtrpC* (arriba) y de un fragmento del gen *pacC* (abajo), de las transformantes de la cepa C10, obtenidas con los vectores pPpacC<sup>27</sup>, pSpacC<sup>27</sup> y pLXTtrpC.

### 7.2.3. Análisis secundario de transformantes por cultivo en sistema líquido

#### 7.2.3.1. Optimización de un medio definido de cultivo amortiguado a pH ácido

En la figura 24 se muestran los resultados del experimento de optimización de un medio definido de cultivo con diferentes amortiguadores de pH, de forma que se mantuvieran los valores de pH dentro de un intervalo ácido durante más tiempo y sin que se viera afectado el crecimiento de *A. chrysogenum* cepa silvestre.

Los amortiguadores que mantuvieron constante el pH a lo largo del cultivo fueron: acetatos 100 mM, pH 4.0 y 5.0; citratos 100 mM, pH 4.0 y MES 100 mM, pH 5.0 (Fig. 24A). El amortiguador de fosfatos que se incluye en la formulación original del medio MDFA, mantuvo constante el pH en 6.8 a lo largo del cultivo. Los amortiguadores de acetatos y

citratos con pH inicial de 6.0 no mantuvieron buen control del pH, alcanzando valores alcalinos superiores a 8.0, por lo que estos últimos quedaron descartados para experimentos posteriores. En la figura 24B se observa que los siguientes amortiguadores: acetatos, pH 4.0; acetatos, pH 5.0; y citratos, pH 4.0; tuvieron un efecto negativo en la formación de biomasa, por lo que también quedaron descartados para experimentos posteriores. El amortiguador que mantuvo constante el pH a lo largo del cultivo, dentro de un intervalo ácido, y que no tuvo efectos negativos en el crecimiento fue el MES, pH 5.0. Este amortiguador se seleccionó para realizar el análisis de las cepas transformantes en medio definido MDFA.

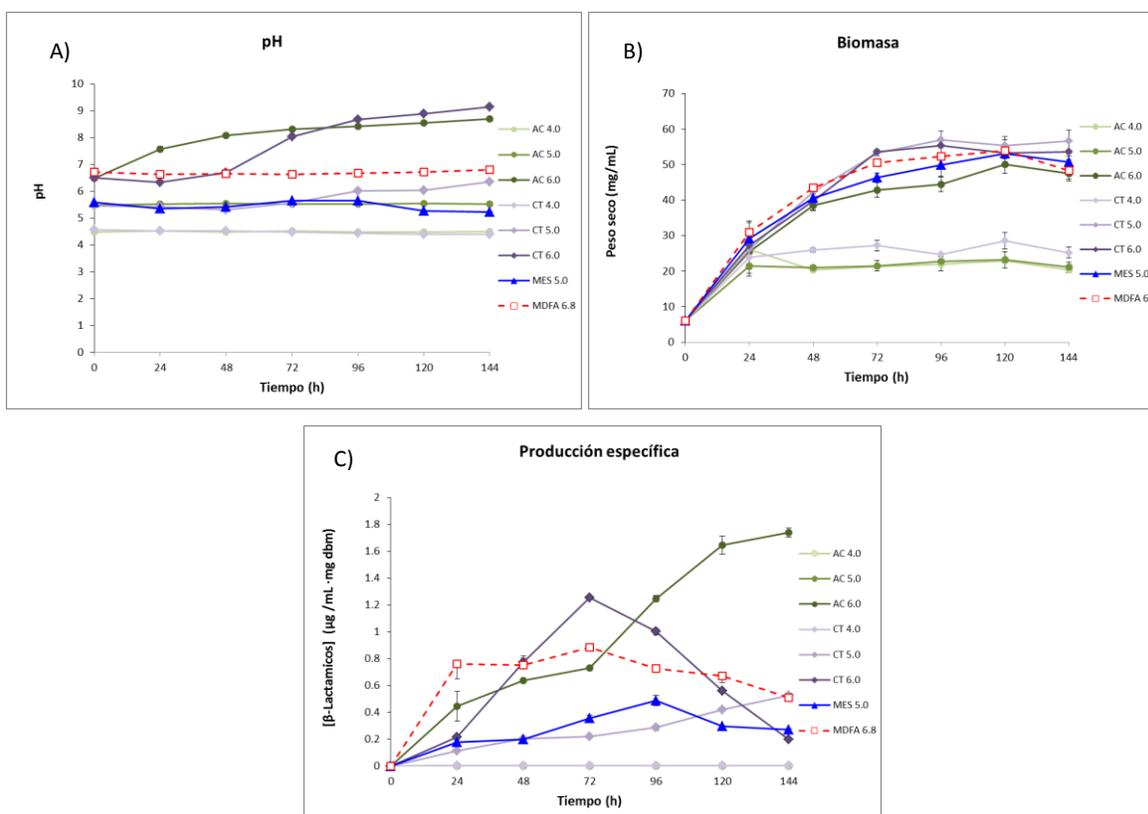


Fig. 24. Cinéticas de: A) pH, B) biomasa, C) producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA, utilizando diferentes amortiguadores y valores de pH. Cepa silvestre.

En la figura 24C se observa que los amortiguadores con pH inicial de 4.0 y 5.0 tuvieron un efecto negativo en la producción de antibióticos beta-lactámicos, en comparación con la producción máxima de  $44.68 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$  alcanzada a las 72 horas

con el medio MDFA original, que descendió posteriormente hasta el final del cultivo. Los amortiguadores de citratos y acetatos, pH 6.0, parecieron tener un efecto positivo en la producción. Con el amortiguador de citratos, pH 6.0, se alcanzó una producción de  $67.16 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$  a las 72 horas de cultivo, pero luego descendió drásticamente; y con el amortiguador de acetatos, pH 6.0, se alcanzaron hasta  $82.34 \pm 1.08 \mu\text{g/mL}$  a las 144 horas. Intervalos de confianza del 95%.

### 7.2.3.2. Análisis de transformantes en medio líquido MDFA/MES

Los resultados del cultivo líquido en medio definido MDFA/MES con las transformantes de la cepa silvestre se muestran en la figura 25. En el caso de las transformantes cepa silvestre, la mayoría de las cepas P tuvieron una mayor producción específica (PE) de antibióticos beta-lactámicos que la cepa silvestre y las cepas control. La transformante que alcanzó una mayor PE significativa ( $\alpha=0.01$ ) fue la cepa P17 con hasta 21.3 veces la PE alcanzada por la cepa parental.

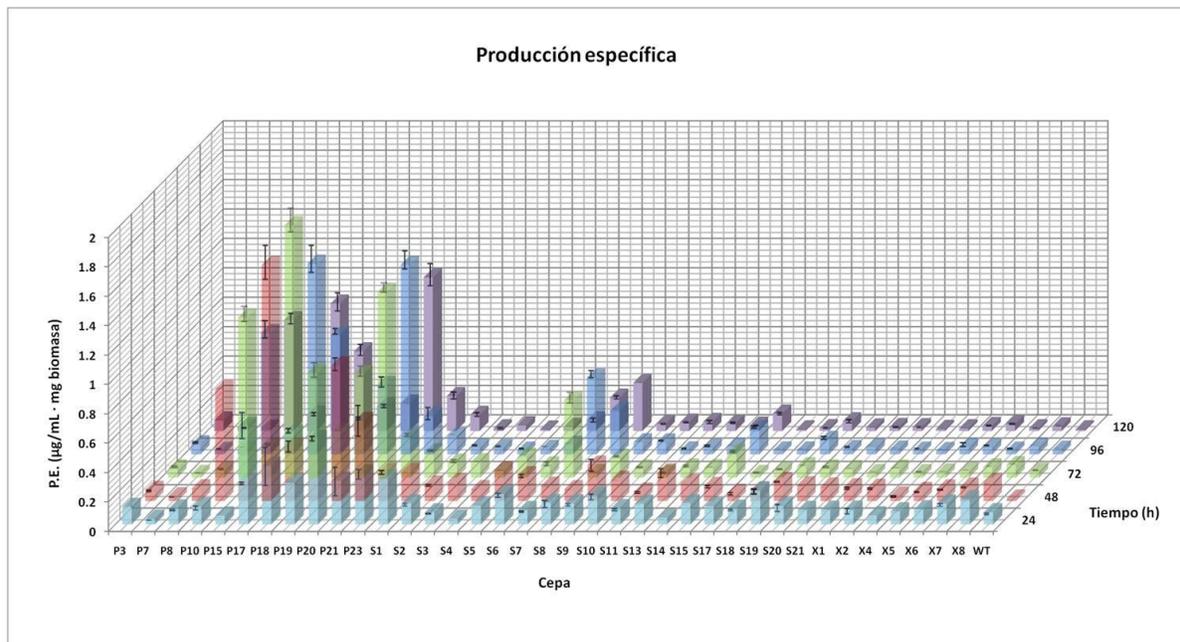


Fig. 25. Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA amortiguado con MES 100 mM, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa silvestre. La mayoría de las cepas P muestran una PE significativamente mayor que las cepas S, controles (X) y parental (WT). Sólo en las cepas S1, S7 y S8 se observó una PE estadísticamente mayor que en las cepas controles y parental.

Los datos obtenidos del cultivo en medio MDFA/MES para algunas transformantes que tuvieron una PE significativamente mayor que la cepa parental, además de una cepa control (X) se enlistan en la tabla 22.

Tabla 22. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa silvestre en medio MDFA/MES pH 5.0.

Cepa	Tiempo de producción máxima (h)	P.E. ( $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg dbm}$ )	Aumento respecto a la cepa parental (No. de veces)
P17	72	$1.71 \pm 0.08$	21.3
P21	96	$1.29 \pm 0.06$	16.1
P10	72	$1.08 \pm 0.05$	13.5
P20	48	$0.92 \pm 0.04$	11.5
P18	96	$0.81 \pm 0.02$	10.1
S7	96	$0.52 \pm 0.17$	6.2
S8	120	0.32	4.0
X2	24	$0.1 \pm 0.016$	---
WT	24	$0.08 \pm 0.005$	---

En el caso de las cepas S, solamente dos de ellas tuvieron una mayor PE significativa que la cepa silvestre y las cepas control. La cepa S7 alcanzó una PE de  $0.52 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  a las 96 horas, mientras que la cepa S8 alcanzó una PE de  $0.32 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  a las 120 horas. Intervalos de confianza del 95%.

En la figura 26 se muestran los resultados del cultivo en medio definido MDFA/MES para las transformantes de la cepa C10. No hubo diferencias significativas ( $\alpha = 0.01$ ) en la PE de las cepas control y de la parental, ésta última alcanzó una PE máxima de  $12.71 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  de biomasa, muy similar a la observada en las transformantes (incluyendo las cepas control). En la tabla 23 se enlistan los datos de algunas de las transformantes de C10 analizadas.

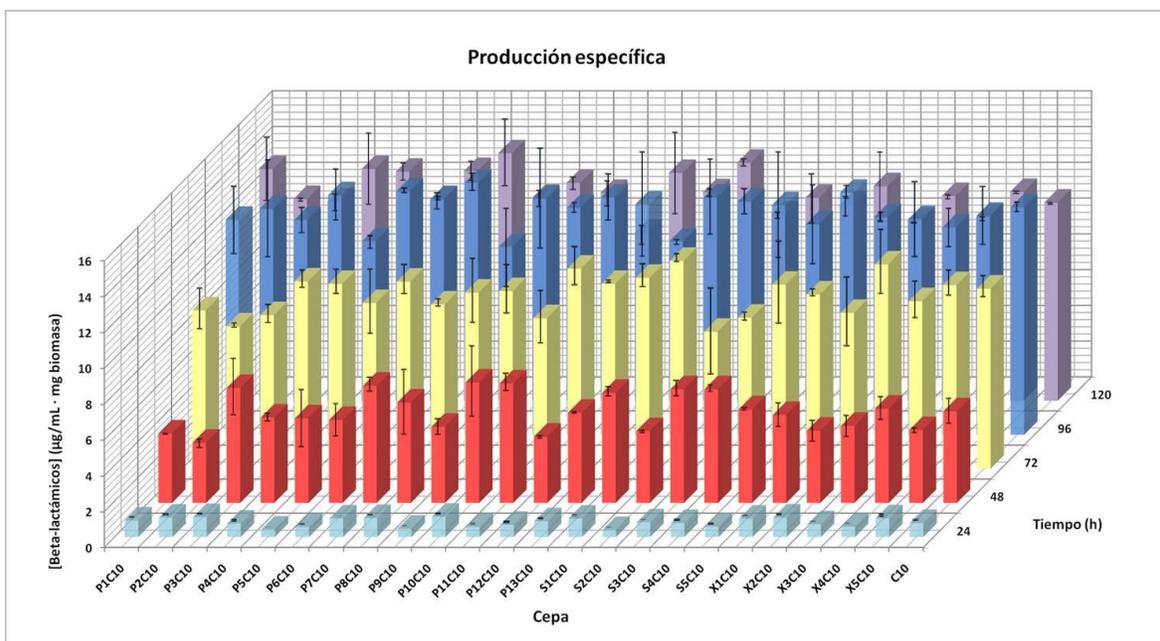


Fig. 26. Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MDFA amortiguado con MES 100 mM, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa C10. No se encontraron diferencias estadísticas entre las cepas analizadas.

Tabla 23. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa C10 en medio MDFA/MES pH 5.0.

Cepa	Tiempo de producción máxima (h)	Producción específica (µg/mL·mg dbm)
C10	96	12.71 ± 0.26
P1C10	96	12.01 ± 1.82
P2C10	96	12.62 ± 2.61
P3C10	96	11.99 ± 0.69
S1C10	120	11.65 ± 0.13
S2C10	120	13.29 ± 0.19
X3C10	96	12.05 ± 2.02

### 7.2.3.3. Optimización de la concentración de MES en medio complejo MCFA

En la figura 27 se muestra el resultado de la optimización de la concentración de amortiguador MES en el medio complejo de cultivo MCFA, utilizando la cepa silvestre de *A. chrysoenum*. Se observa que a medida que la concentración de amortiguador se

incrementa el pH se mantiene constante durante más tiempo. Las concentraciones  $\geq 0.3$  M mantienen el pH dentro del intervalo ácido de interés para el posterior análisis de las transformantes con el factor de transcripción activo. Las concentraciones  $\leq 0.2$  M no evitan la alcalinización del medio a medida que se desarrolla el cultivo (Fig. 27A).

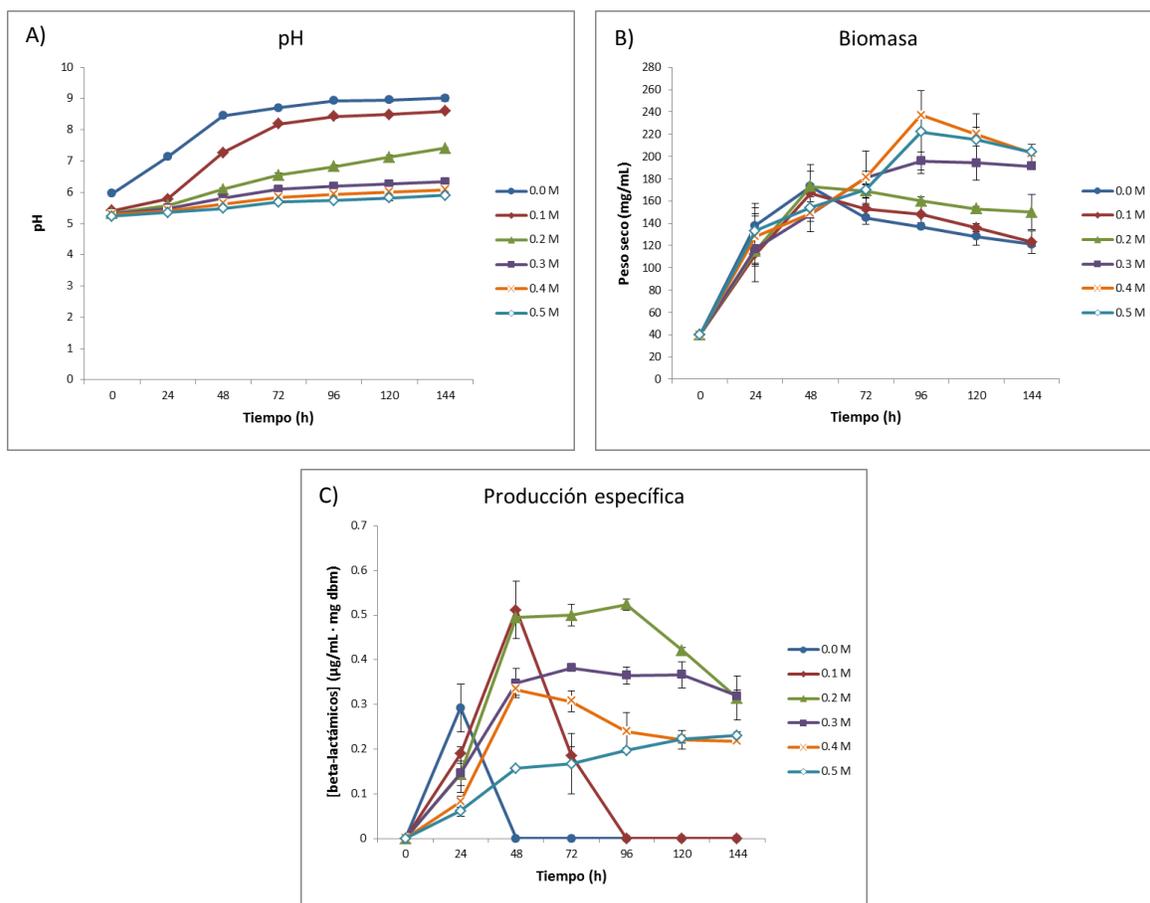


Fig. 27. Cinéticas de: A) pH, B) biomasa, C) producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio MCFa amortiguado con MES pH 5.0, concentraciones de 0 a 0.5 M.

Por otro lado, se observa también (Fig. 27B) que a medida que se incrementa la concentración de MES el crecimiento se ve favorecido, con lo que se descartaría un posible efecto negativo de las altas concentraciones de MES sobre el crecimiento de *A. chrysoenum*. En la figura 27C se observa que en el medio sin amortiguar la producción específica de antibióticos beta-lactámicos se reduce drásticamente después de las 24 horas de cultivo. En el medio con MES 0.1 M, la PE también decae drásticamente a las 48

horas, mientras que las concentraciones  $\geq 0.2$  M permiten que la producción se mantenga durante más tiempo, sin decaer rápidamente. A medida que aumenta la concentración de MES, la producción específica parece mantenerse durante más tiempo, aunque también se ve afectado negativamente el máximo de producción alcanzado. La producción volumétrica se comportó de forma similar a la producción específica.

Dado que se pretendía encontrar la concentración de MES que mantuviera el pH del medio complejo dentro de valores ácidos durante más tiempo y que no tuviera efecto negativo sobre el crecimiento ni la producción de antibióticos beta-lactámicos, se decidió trabajar con la concentración de 0.3 M para los experimentos posteriores.

#### **7.2.3.4. Análisis de transformantes en medio líquido complejo MCFA/MES 0.3 M**

En la figura 28 se muestra el resultado del análisis de transformantes de la cepa silvestre en medio complejo MCFA amortiguado con MES 0.3 M, pH 5.0. Se observa que en este medio de cultivo al menos tres de las transformantes analizadas tuvieron una mayor producción significativa ( $\alpha = 0.01$ ) que las cepas control y que la cepa silvestre, aún cuando ésta última se probó en el medio de cultivo MCFA sin amortiguar, con un pH inicial de 6.8, que son las condiciones convencionales de cultivo de *A. chrysoenum*.

La cepa que alcanzó una mayor PE significativa, en comparación con la cepa parental, fue la transformante P17, con una PE máxima de  $0.85 \pm 0.082$   $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  de biomasa a las 72 horas. En contraste, la cepa silvestre alcanzó escasamente una PE de  $0.076 \pm 0.008$   $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  de biomasa en el medio amortiguado con MES 0.3 M, mientras que en el medio sin amortiguar alcanzó los  $0.22 \pm 0.058$   $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$  de biomasa. La PE obtenida por la cepa P17 representa un incremento de hasta 12.4 veces la observada para la cepa parental en las mismas condiciones de cultivo, y de 3.8 veces la alcanzada por la cepa silvestre usando el medio MCFA en las condiciones convencionales de producción (sin amortiguar). La producción de las cepas S, en este medio de cultivo, no fue significativamente diferente a la alcanzada por la cepa silvestre y las cepas control. Los datos de algunas de las

transformantes de la cepa silvestre analizadas en este medio de cultivo se enlistan en la tabla 24. Intervalos de confianza del 95%.

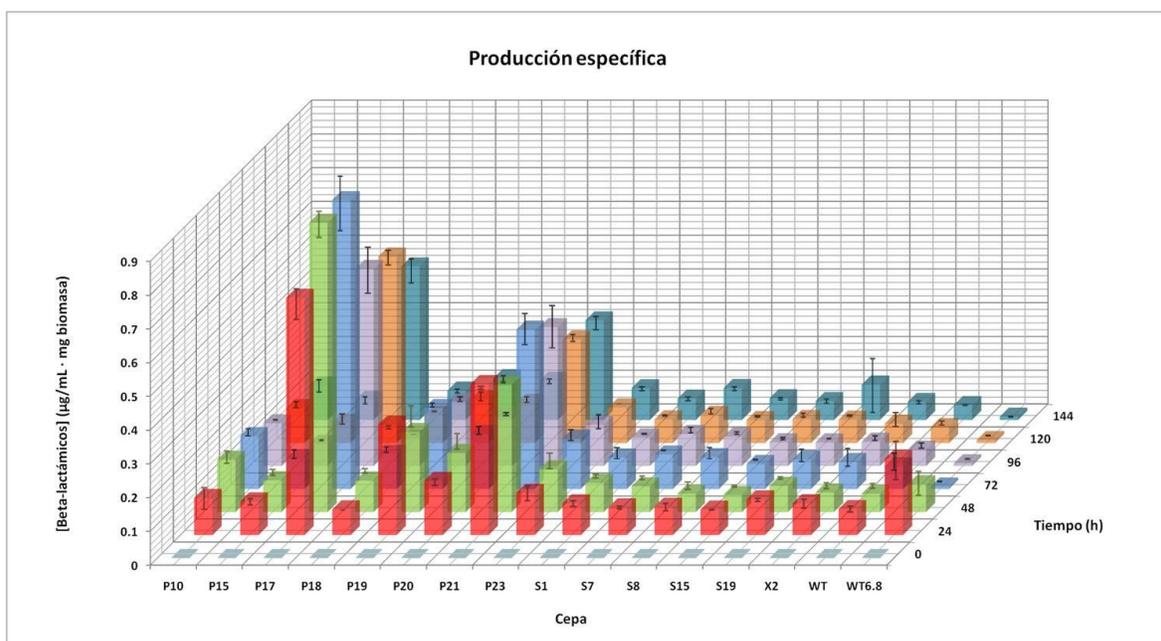


Fig. 28. Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio líquido MCFA amortiguado con MES 0.3 M, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa silvestre. La mayoría de las cepas P muestran una PE significativamente mayor que las cepas S, la cepa control y la cepa parental. No se encontraron diferencias estadísticas de las cepas S con respecto a la cepa control y cepa parental.

Tabla 24. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa silvestre en medio MCFA/MES.

Cepa	Tiempo de producción máxima (h)	Producción específica (µg/mL·mg dbm)	Aumento respecto a la cepa parental (No. de veces)	Aumento respecto a la cepa parental en MCFA pH 6.8 (No. de veces)
P17	72	0.85 ± 0.08	12.4	3.8
P21	72	0.47 ± 0.04	6.7	2.1
P19	24	0.32 ± 0.004	4.5	1.4
S7	96	0.095 ± 0.008	----	----
S8	72	0.09 ± 0.016	----	----
X2	24	0.09 ± 0.013	----	----
WT	24	0.07 ± 0.008	----	----
WT (6.8)	24	0.22 ± 0.05	3.4	----

En la figura 29 se muestra el resultado del análisis de transformantes de la cepa C10 en el mismo medio de cultivo. En la tabla 25 se enlistan algunos datos de este cultivo.

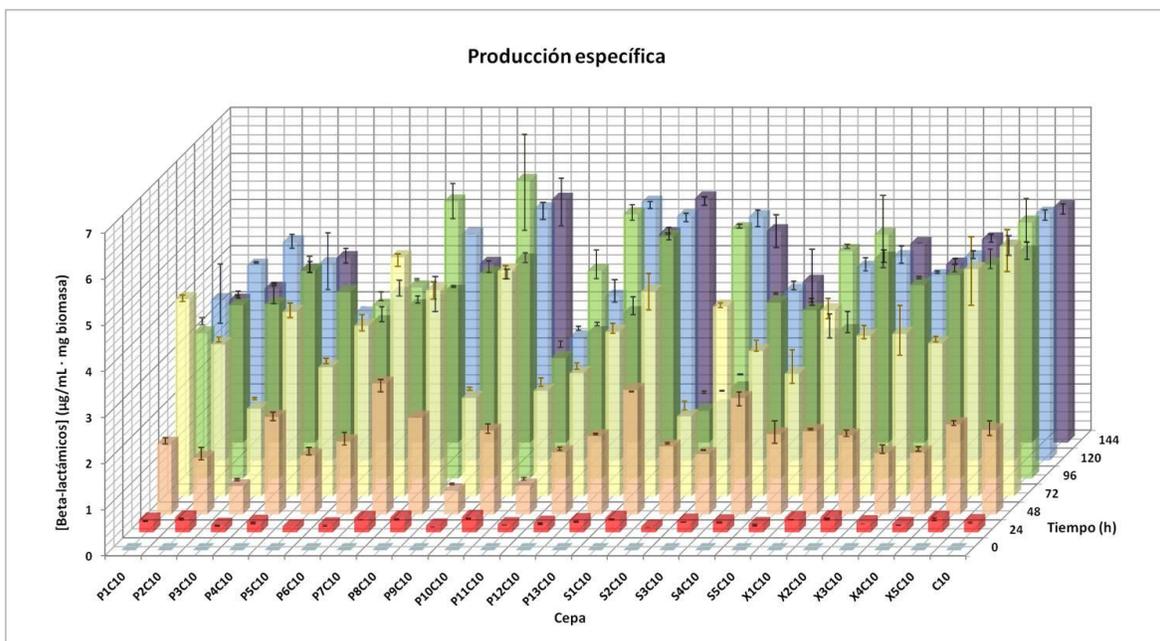


Fig. 29. Cinéticas de producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en medio líquido MCFA amortiguado con MES 0.3 M, pH 5.0: Análisis de transformantes de la cepa C10. No se aprecian aumentos significativos en la PE de las cepas transformantes con respecto a las cepas controles y parental.

Tabla 25. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes de la cepa C10 en medio MCFA/MES. Intervalos de confianza del 95%.

Cepa	Tiempo de producción máxima (h)	Producción específica (µg/mL · mg dbm)
P1C10	72	4.28 ± 0.07
P2C10	120	4.22 ± 0.02
P3C10	120	4.72 ± 0.16
P11C10	120	2.67 ± 0.04
S1C10	120	5.29 ± 0.1
S2C10	72	1.73 ± 0.4
S3C10	96	5.40 ± 0.04
X1C10	96	4.93 ± 0.04
C10	96	5.55 ± 0.51

En el caso de las transformantes de la cepa C10, no hubo cepas que superaran significativamente ( $\alpha = 0.01$ ) la PE alcanzada por la cepa C10, que fue de  $5.55 \pm 0.51$   $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{mg}$ . Por el contrario, se observó un efecto negativo de la mutación sobre la PE de algunas de las transformantes C10, como ocurrió en el caso de las cepas S2C10, S4C10, S5C10 y P11C10, que tuvieron una PE máxima por debajo de la alcanzada por las cepas control.

### 7.3. Inactivación del factor de transcripción PacC de *A. chrysogenum*

#### 7.3.1. Construcción del vector de interrupción del gen *pacC*

##### 7.3.1.1. Amplificación de los productos de PCR *pacC5'*, *pacC3'* y Hgm2

En la figura 30 se muestra el resultado de la amplificación con gradiente de temperatura de hibridación (60, 65 y 70°C) de los productos de PCR *pacC5'* y *pacC3'* (obtenidos a partir de ADN genómico de *A. chrysogenum*) y Hgm2 (obtenido a partir del vector pAN7.1). Para el producto *pacC5'* se observan bandas inespecíficas con las tres temperaturas de hibridación probadas. En el caso del producto *pacC3'*, se observa que con 70°C de temperatura de hibridación disminuyen los productos inespecíficos. Para el producto Hgm2, a 70°C de hibridación ya no se observa amplificación.

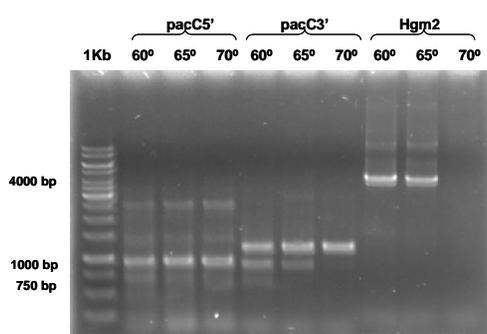


Fig. 30. Gel de agarosa al 0.8%, con los productos de PCR por gradiente de temperatura: *pacC5'*, *pacC3'* y Hgm2.

Los resultados del siguiente experimento de optimización para los productos de PCR *pacC5'* y Hgm2 se muestran en la figura 31. En este experimento se utilizaron los dos

diferentes amortiguadores que se incluyen en el kit de reactivos de la ADN polimerasa Phusion®, el amortiguador HF y el amortiguador GC. También se probó un gradiente de temperaturas de hibridación de 60-70°C. Se observa que al utilizar el amortiguador GC y 60°C de hibridación se consigue mejorar la resolución del producto de PCR pacC5'. En el caso del producto de PCR Hgm2, por el contrario, con el amortiguador GC no se consiguió reducir la presencia de productos inespecíficos. Además, a 66.1°C y 70°C ya no se consiguió amplificación.

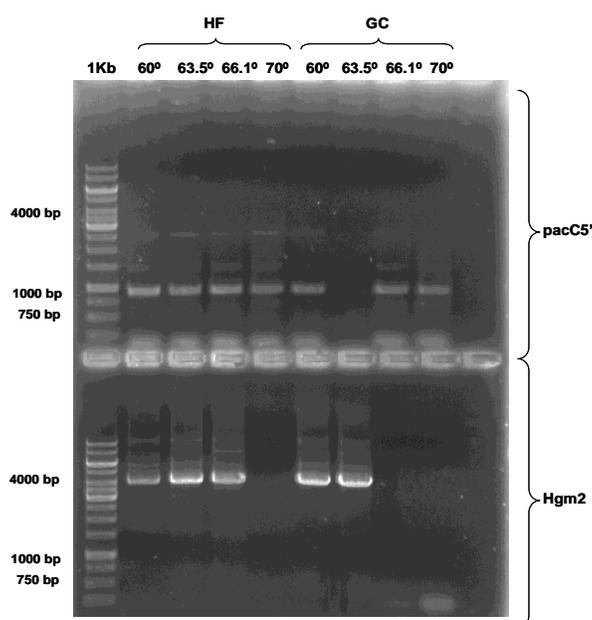


Fig. 31. Gel de agarosa al 0.8%, con los productos de PCR por gradiente de temperatura y amortiguadores HF y GC de los productos pacC5' y Hgm2.

En la figura 32 se muestran los resultados del siguiente paso de optimización de los productos pacC5' y Hgm2. En este caso se utilizó un gradiente de 1.5-3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>. Para ambos productos se utilizó el amortiguador GC y 60°C de hibridación. Se observa que en estas condiciones se consiguió optimizar el producto de PCR pacC5' al utilizar 2.625 mM de MgCl<sub>2</sub>. No se logró una mejor optimización del producto de PCR Hgm2, por lo que se reunieron las reacciones de PCR de todos sus experimentos y se purificó la banda correspondiente a su tamaño molecular, de 4072 bp.

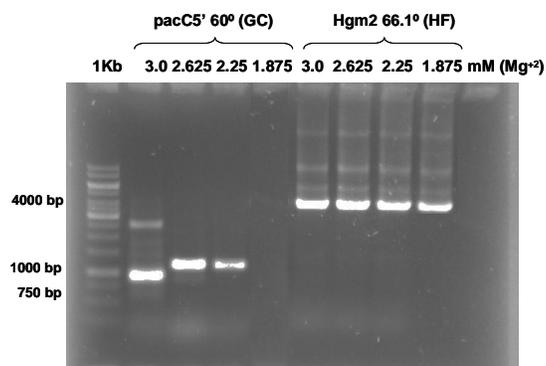


Fig. 32. Gel de agarosa al 0.8% con los productos de PCR por gradiente de  $MgCl_2$  de los productos *pacC5'* y *Hgm2*.

### 7.3.1.2. Construcción del vector *pC43 $\Delta\Delta$ XbaI*

Se eliminó el único sitio de corte para la enzima *XbaI* presente en el plásmido *pULC43 $\Delta$ XbaI*, para posteriormente clonar en el vector resultante los productos de PCR *pacC5'* y *pacC3'*. El plásmido *pULC43 $\Delta$ XbaI* se digirió con la enzima *XbaI* y posteriormente se rellenaron los extremos cohesivos resultantes con la enzima Klenow. El plásmido se recircularizó con una ligasa y se obtuvo como resultado el plásmido *pC43 $\Delta\Delta$ XbaI*. Su mapa de restricción se muestra en la figura 33A.

En la figura 33B se muestra el resultado de la digestión con la enzima *XbaI* a minipreparaciones de ADN plasmídico obtenidas de colonias transformantes de *E. coli* con el plásmido *pC43 $\Delta\Delta$ XbaI*. Se observa que, en todas las colonias analizadas, la enzima no cortó en sitio alguno, por lo que se confirmó la eliminación del sitio de restricción *XbaI* en el plásmido original.

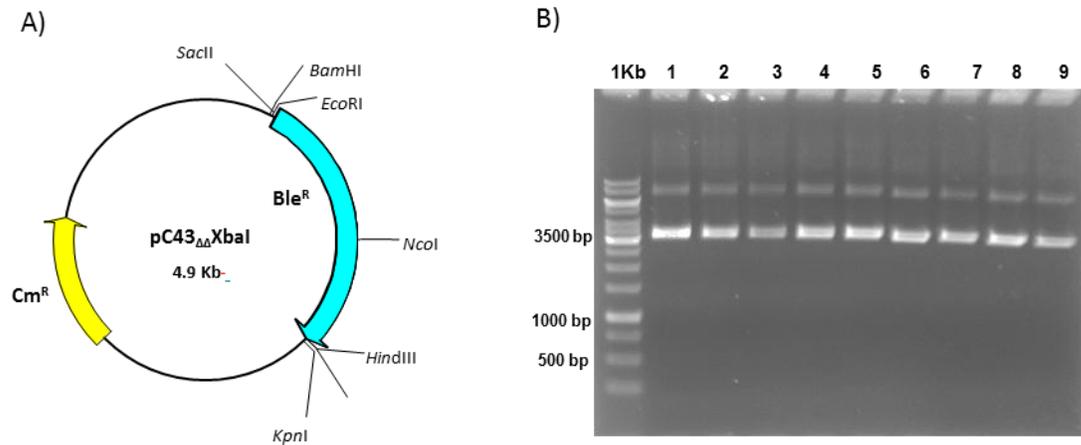


Fig. 33. A) Mapa de restricción del plásmido pC43 $\Delta\Delta$ XbaI. B) Minipreparaciones digeridas con *XbaI*, gel de agarosa al 1%.

### 7.3.1.3. Construcción del vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI-pacC53

Los productos de PCR *pacC5'* y *pacC3'* se digirieron con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, respectivamente, y se clonaron en el vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI previamente digerido con las mismas enzimas. Como resultado se obtuvo el plásmido intermedio pC43 $\Delta\Delta$ XbaI-pacC53. Su mapa de restricción se detalla en la figura 34A.

En la figura 34B se muestra el resultado de la digestión simultánea con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* a minipreparaciones de ADN plasmídico obtenidas de colonias transformantes de *E. coli* con la mezcla de ligación del vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI con los insertos *pacC5'* y *pacC3'*. Se observa que, con la digestión simultánea con *KpnI* y *HindIII*, solamente en las colonias 2, 4 y 5 se libera una banda de 2092 bp correspondiente a la suma de los insertos *pacC5'* y *pacC3'*. Para las colonias restantes solamente se observa una banda de alrededor de 4900 bp, indicando que, en estos casos, solamente se recircularizó el plásmido durante la ligación, sin llevarse a cabo la clonación de los insertos.

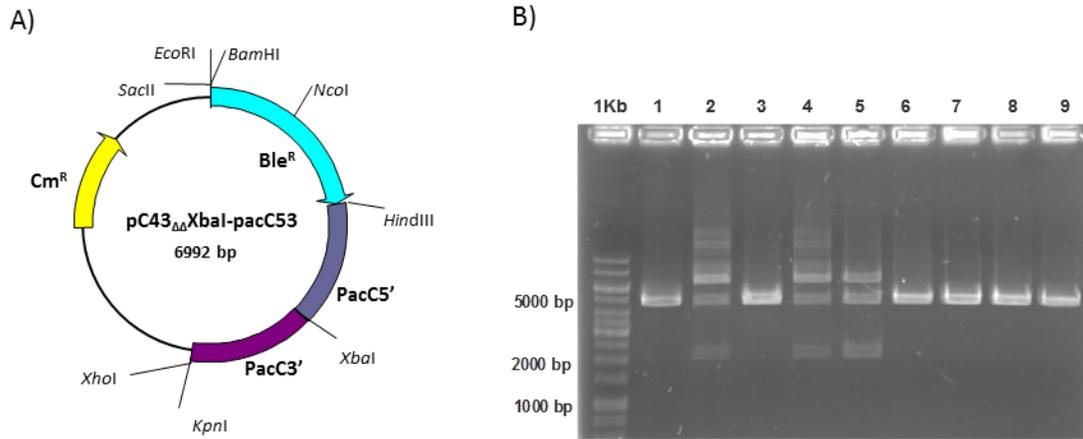


Fig. 34. A) Mapa de restricción del plásmido pC43 $\Delta\Delta$ XbaI-pacC53. B) Minipreps digeridas con *KpnI* y *HindIII*, gel de agarosa al 0.8%.

#### 7.3.1.4. Construcción del vector p $\Delta$ pacC

El vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI-pacC53 se digirió con la enzima *XbaI* y se desfosforiló. Luego, se integró en él el producto Hgm2 previamente digerido también con *XbaI*. Como resultado se obtuvo el plásmido p $\Delta$ pacC. Su mapa de restricción se detalla en la figura 35A. En la figura 35C se muestra el resultado de la digestión con la enzima *XbaI* a minipreparaciones obtenidas de transformantes con la mezcla de ligación de este plásmido. Se observa que en todas las colonias analizadas, se liberan unas bandas de 4072 bp y 6992 bp, correspondientes al marcador de resistencia a higromicina y al vector sin inserto, respectivamente. En la figura 35B, se muestra la digestión con las enzimas *HindIII*, *KpnI*, *HindIII* + *KpnI*, y *HindIII* + *KpnI* + *XbaI*, realizada a la minipreparación de la colonia 11. En el caso de la digestión con *HindIII* o *KpnI* se observa una banda de 11064 bp, que corresponde al tamaño total del vector p $\Delta$ pacC. La digestión simultánea con ambas enzimas liberó una banda de 4900 bp, que corresponde al vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI, y una banda de 6164 bp, que corresponde a la suma del cassette de resistencia a higromicina y los dos fragmentos pacC5' y pacC3'. La digestión con las tres enzimas liberó también las bandas correspondientes al vector pC43 $\Delta\Delta$ XbaI y al cassette de resistencia a higromicina, además de una banda de 923 bp y otra de 1169 bp que corresponden a los productos pacC5' y pacC3', respectivamente.

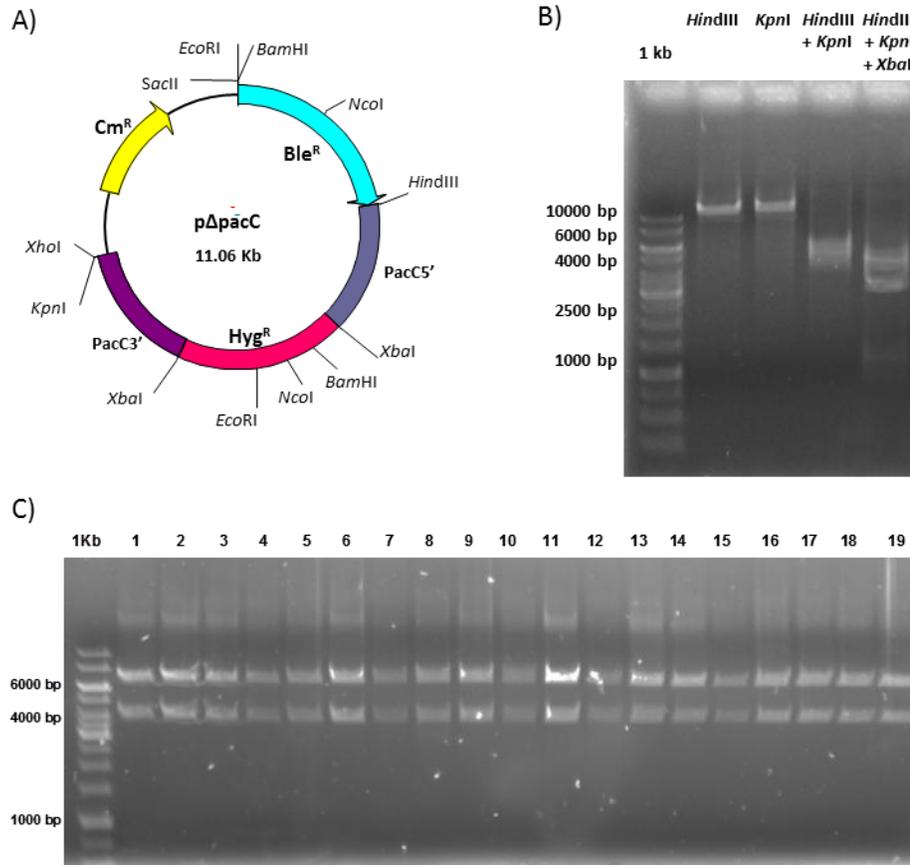


Fig. 35. A) Mapa de restricción del plásmido pΔpacC. B) Minipreparación 11 digerida con *HindIII*, *KpnI*, *HindIII* + *KpnI*, y *HindIII* + *KpnI* + *XbaI*. C) Minipreparaciones digeridas con *XbaI*. Geles de agarosa al 0.8 %.

### 7.3.2. Construcción del vector de silenciamiento del gen *pacC*

#### 7.3.2.1. Amplificación del producto de PCR Sln3

En la figura 36 se muestra el resultado de la amplificación con gradiente de temperatura de hibridación (60, 66.1 y 68°C) del producto de PCR Sln3, a partir de ADN genómico de *A. chrysogenum*. Se observa que a medida que aumenta la temperatura de hibridación se mejora la obtención de producto de PCR, desapareciendo los productos inespecíficos. En las tres temperaturas probadas se observa la banda correspondiente al producto Sln3 de 712 bp.

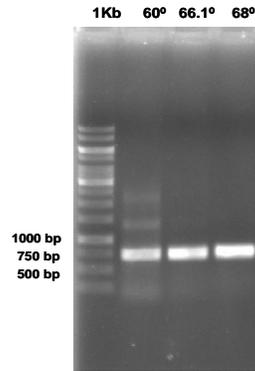


Fig. 36. Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR Sln3 obtenidos con gradiente de temperatura.

### 7.3.2.2. Construcción del vector pSlnpacC3

El plásmido pGpdPki-RNAi se digirió con la enzima *NcoI* y luego se desfosforiló. Posteriormente, se llevó a cabo la ligación con el producto Sln3 previamente digerido con *NcoI*. En la figura 37A se observa el resultado de la digestión con *NcoI* de minipreparaciones obtenidas de transformantes de *E. coli* con la mezcla de ligación anterior. Se observa que solamente para la colonia 4 es visible la banda de 6288 bp, correspondiente al vector, y la banda de 712 bp, correspondiente al inserto. Debido a que la cantidad de plásmido que se obtuvo en estas minipreparaciones fue muy baja, incluso partiendo de 10 mL de cultivo, se hizo un segundo análisis de estas transformantes por PCR, utilizando el ADN de las minipreparaciones como molde y las mismas condiciones para la amplificación del producto Sln3. El resultado de este experimento se muestra en la figura 37B. Para todas las colonias analizadas, incluyendo la colonia 4, se observa la amplificación del producto de 712 bp, lo que indica que posiblemente todas estas colonias contengan la construcción deseada. El mapa de restricción del vector resultante, denominado pSlnpacC3, se muestra en la figura 37C.

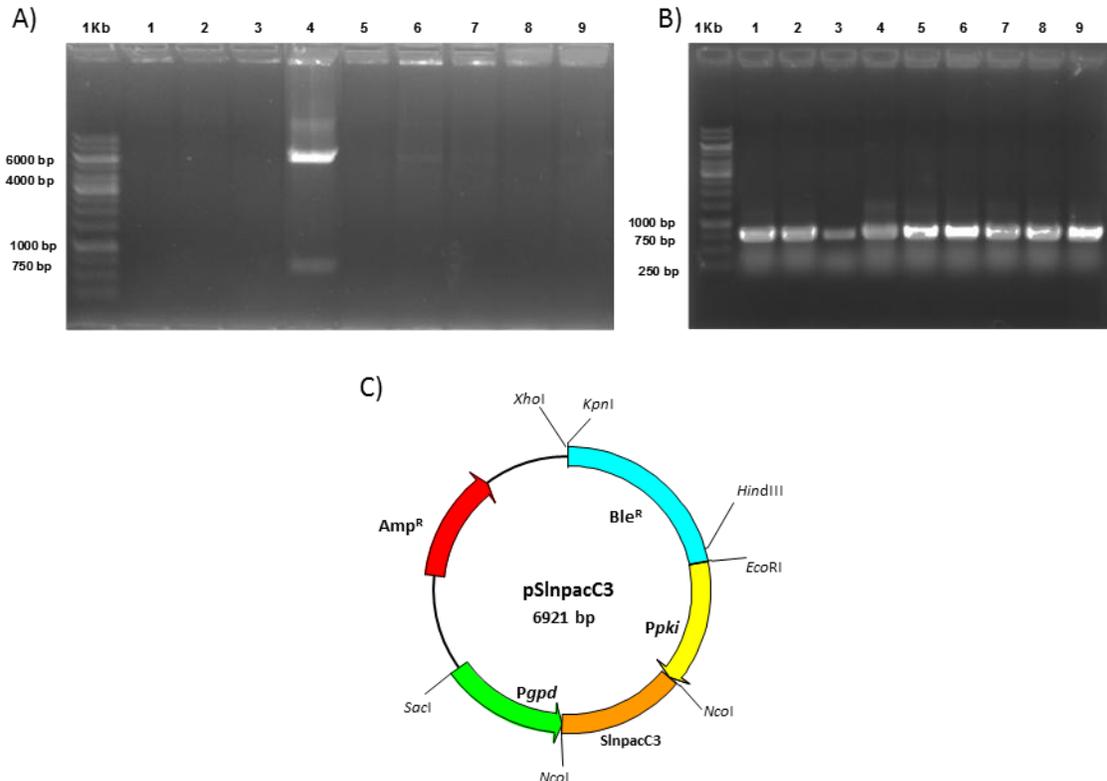


Fig. 37. A) Minipreps digeridas con *NcoI*. B) Amplificación por PCR del producto *Sln3* a partir de las minipreparaciones anteriores. C) Mapa de restricción del plásmido pSlnpacC3. Geles de agarosa al 1%.

### 7.3.3. Transformación de *A. chrysoenum* cepa silvestre con los vectores p $\Delta$ pacC y pULC43 $\Delta$ XbaI

Se obtuvieron 5 posibles transformantes con el plásmido p $\Delta$ pacC que presentaron buen crecimiento, además de múltiples colonias incipientes que fueron incapaces de crecer cuando fueron resembradas en placas de medio TSA, aún sin la necesidad de utilizar antibiótico (Fig. 38C). También se obtuvieron 18 cepas transformantes con el plásmido pULC43 $\Delta$ XbaI (denominadas cepas  $\Delta$ XbaI). De las cinco cepas con el plásmido p $\Delta$ pacC que tuvieron buen crecimiento y mostraron resistencia a higromicina, solamente tres de ellas presentaron sensibilidad a fleomicina cuando fueron resembradas en placas de medio TSA con este antibiótico (Fig. 38A y 38B), indicando la posibilidad de haber ocurrido un evento de doble recombinación que resultaría en la interrupción del gen *pacC* con el marcador de resistencia a higromicina. Sin embargo, cuando se realizó el análisis

primario de las transformantes por PCR a partir colonia, se encontró que en ninguna de estas transformantes se llevó a cabo la interrupción deseada (Fig. 39A). Esto último fue evidenciado con la amplificación del gen *pacC* endógeno y del cassette de disrupción en cada una de las transformantes analizadas. En la figura 39B se muestra la comprobación por PCR a partir de colonia de la integración del plásmido pULC43 $\Delta$ XbaI en tres de las transformantes obtenidas.

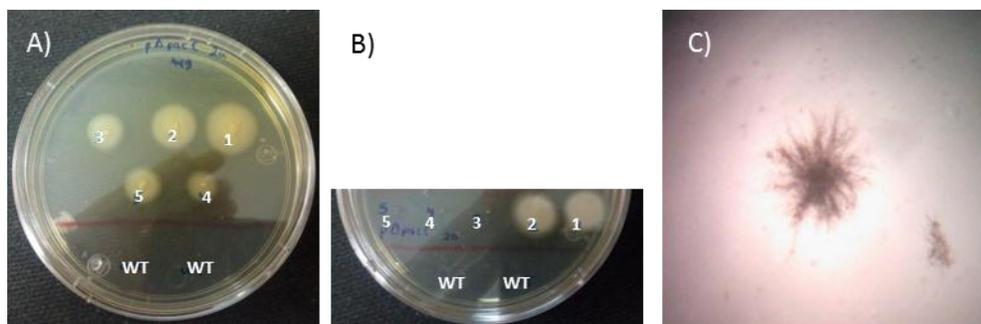


Fig. 38. A) Transformantes p $\Delta$ pacC en placa TSA con higromicina. B) Transformantes p $\Delta$ pacC en placa TSA con fleomicina. C) Observación al microscopio de una transformante p $\Delta$ pacC con crecimiento incipiente.

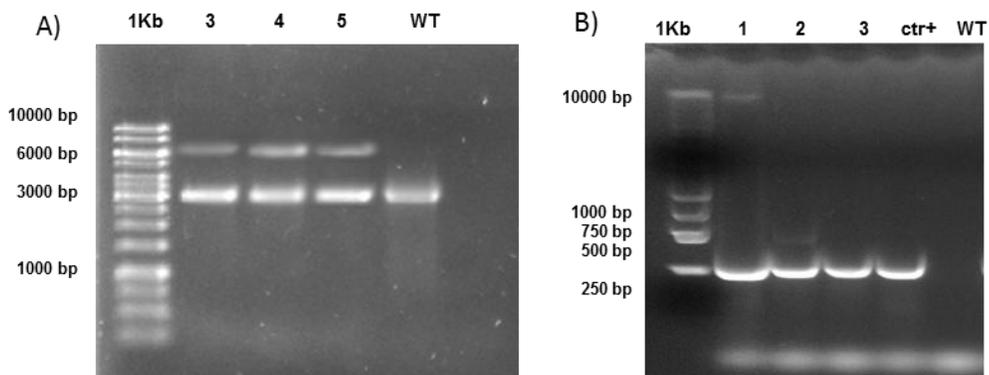


Fig. 39. A) PCR (*pacC*5'-3') a partir de colonia de las transformantes p $\Delta$ pacC. B) PCR (*ble*) a partir de colonia de tres transformantes pULC43 $\Delta$ XbaI. Geles de agarosa al 0.8 y 1.5%, respectivamente.

### 7.3.4. Transformación de *A. chrysoenum* cepa silvestre con los vectores pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi

Se obtuvieron 9 cepas transformantes con el plásmido pSlnpacC3 (denominadas cepas Sln) y 19 cepas transformantes con el plásmido pGpdPki-RNAi (denominadas cepas pRNAi). Las cepas Sln mostraron fenotipos diferentes de crecimiento cuando fueron resembradas en placas con medio TSA (Fig. 40). En la figura 41 se muestra la comprobación por PCR a partir de colonia de la integración de los plásmidos en las cepas transformantes.

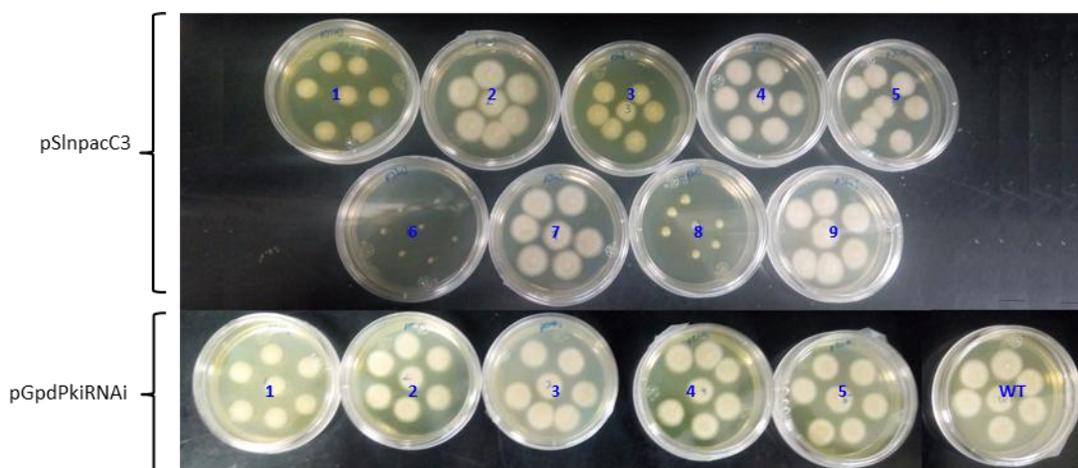


Fig. 40. Cepas transformantes con los plásmidos pSlnpacC3 y pGpdPki-RNAi.

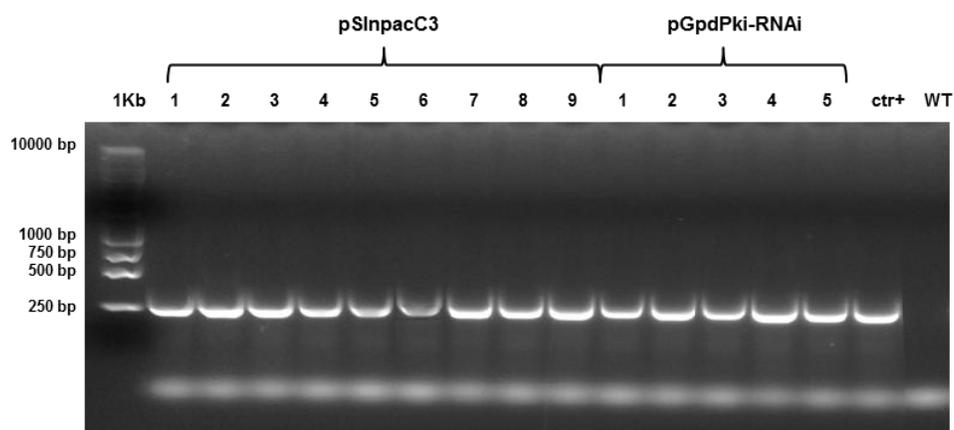


Fig. 41. PCR (*ble*) a partir de colonia las cepas transformantes pSlnpacC3 y de 5 colonias transformantes pGpdPki-RNAi. Gel de agarosa al 1.5%.

### 7.3.5. Análisis de transformantes en cultivo líquido

Para este análisis se seleccionaron solamente las cepas Sln 1, 2, 6 y 8, debido a que las otras cepas presentaban un fenotipo de crecimiento en placas con TSA parecido a alguna de las cepas seleccionadas. También se incluyó una de las cepas con el factor de transcripción PacC activo (cepa P17), una de las cepas control (pRNAi2) y la cepa silvestre (WT). Se probaron dos condiciones diferentes de pH (5.0 y 6.8), en medio líquido definido MDFA.

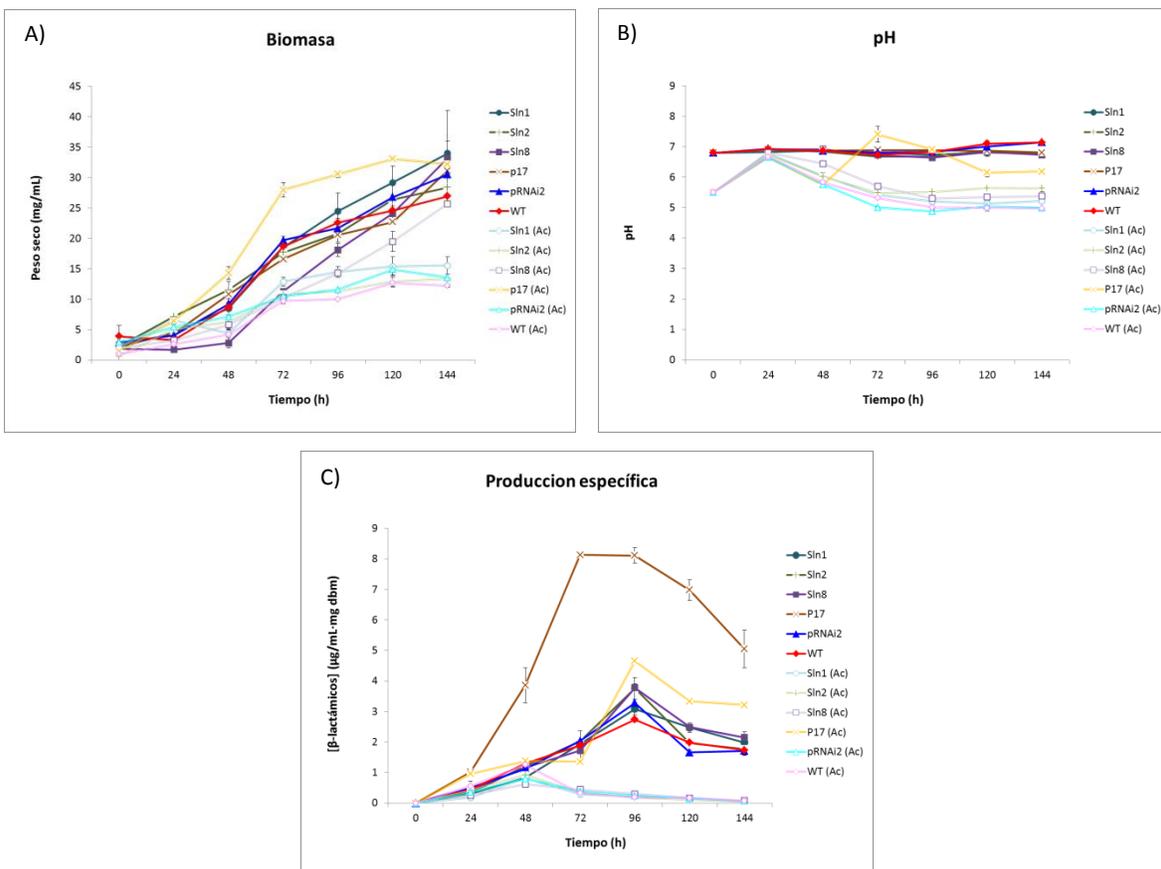


Fig. 42. Cinéticas de: A) producción específica de antibióticos beta-lactámicos, B) biomasa, C) pH, en medio líquido MDFA pH 6.8 y 5.0 (Ac).

Tabla 26. Producción específica de antibióticos beta-lactámicos de las transformantes Sln, P17, pRNAi2 y cepa silvestre en cultivo líquido MDFA.

Cepa	MDFA neutro		MDFA ácido	
	Tiempo de producción máxima (h)	Producción específica (µg/mL·mg dbm)	Tiempo de producción máxima (h)	Producción específica (µg/mL·mg dbm)
<b>P17</b>	72	8.12 ± 0.58	96	4.65 ± 0.03
<b>Sln8</b>	96	3.78 ± 0.13	48	0.62 ± 0.08
<b>Sln2</b>	96	3.78 ± 0.35	48	0.92 ± 0.12
<b>Sln1</b>	96	3.08 ± 0.19	48	0.82 ± 0.25
<b>pRNAi2</b>	96	3.28 ± 0.13	48	0.80 ± 0.01
<b>WT</b>	96	2.73 ± 0.07	48	1.25

En la figura 42 se muestra el resultado del análisis de las transformantes en cultivo líquido en medio MDFA. Se observa que la formación de biomasa de las cepas analizadas fue mejor en el medio de cultivo neutro, mientras que en el medio de cultivo ácido se observó una disminución del crecimiento para la mayoría de las cepas analizadas, con excepción de la cepas Sln8 y P17 que presentaron buen crecimiento en pH ácido (Fig. 42A). En la figura 42B se observa que el pH del medio en condiciones de pH neutro se mantuvo sin variaciones significativas (alrededor de 6.8 y 7.0) durante el tiempo de cultivo. En el caso del cultivo en condiciones de ácidas, el pH ascendió a las 24 horas alcanzando valores cercanos a 6.5 y descendió posteriormente para alcanzar valores entre 5.0 y 5.5 desde las 72 horas de cultivo. El comportamiento del pH en el medio de cultivo fue similar para la mayoría de las cepas analizadas en su respectivo pH de prueba, con excepción de la cepa P17, cuyo pH mostró un comportamiento diferente a partir de las 72 horas de cultivo. En la figura 42C se observa que la producción específica de antibióticos beta-lactámicos es mayor en el medio de cultivo neutro, en donde la mayoría de las cepas alcanza su producción máxima a las 96 horas y después comienza a descender lentamente, mientras que en medio ácido la mayoría de las cepas alcanza su producción máxima a las 48 horas y después desciende drásticamente. No se observó diferencia estadística ( $\alpha = 0.5$ ) entre la PE máxima de las cepas Sln (gen *pacC* silenciado) con respecto

a la cepa silvestre y la cepa control, en ambos medios de cultivo. En el caso de la cepa P17, la PE fue hasta 1.74 veces mayor en condiciones neutras que en condiciones ácidas. En ambos casos, la PE de la cepa P17 fue mayor que la de las cepas Sln, control y cepa silvestre, aproximadamente 2.47 veces mayor en medio neutro y 5.8 veces mayor en medio ácido. En la tabla 26 se muestran las PE máximas con su respectivo tiempo, para cada una de las cepas analizadas en ambos medios de cultivo. En la figura 43 se muestra el crecimiento de estas cepas en placas de medio TSA con diferentes valores de pH (5.0, 6.8 y 8.5). Se observan diferencias en el crecimiento entre cada una de las cepas con el gen *pacC* silenciado y de estas mismas con respecto a las cepas silvestre, control y P17. En la mayoría de los casos el crecimiento fue mejor en medio neutro.

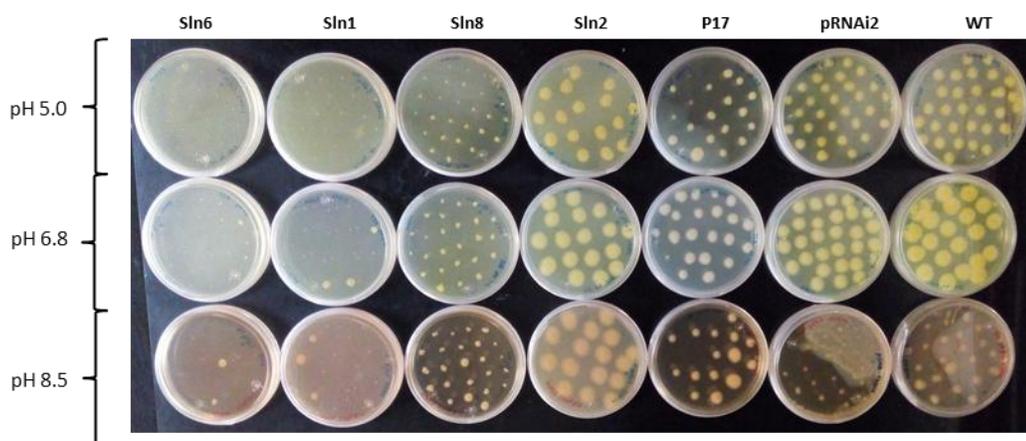


Fig. 43. Crecimiento de las transformantes Sln, P17, control y cepa silvestre en placas de medio TSA con diferentes valores de pH.

## 8. Discusión

### 8.1. Análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* en sistemas de cultivo sólido y líquido.

En hongos, la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de los antibióticos beta-lactámicos producidos por *A. chrysogenum*, generalmente se lleva a cabo durante la idiofase, después de que la fase de crecimiento exponencial o trofofase se ha detenido (Barrios-González *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2000). Lo anterior pudo observarse en los cultivos realizados en el presente trabajo, aunque se apreció de mejor manera en el cultivo sólido (Fig. 10), en donde se observa claramente que la producción rápida de CPC ocurrió en cuanto la tasa de crecimiento exponencial comenzó a disminuir. En el cultivo líquido (Fig. 11) no se observó este comportamiento, posiblemente debido a que la determinación del crecimiento se realizó cuantificando la biomasa por peso seco y ésta técnica podría involucrar restos celulares sin actividad metabólica. Por el contrario, la determinación de biomasa en el sistema sólido se realizó midiendo el consumo de oxígeno, lo que únicamente involucra a la biomasa que se encuentra metabólicamente activa (Cuadra, 2008).

Se ha observado que la producción de ciertos metabolitos secundarios de interés industrial se lleva a cabo mejor en sistemas de cultivo sólido, los cuales proveen de algunas ventajas como adaptación de la morfología micelial a los soportes sólidos, mejor transferencia de oxígeno y menores requerimientos energéticos, entre otras (Robinson *et al.*, 2001). Varios productos de alto valor agregado, como antibióticos, hipocolesterolémicos, alcaloides, factores vegetales de crecimiento, biopesticidas, aromas, enzimas, etc., se producen mejor en sistemas de cultivo sólido (Barrios-González & Mejía, 2008; Pandey *et al.*, 2000). La producción de CPC en el sistema de cultivo sólido fue significativamente superior en el presente trabajo a la obtenida en el sistema líquido. En sólido se alcanzaron hasta  $3.99 \pm 0.13$  mg/g de soporte impregnado, que equivalen a  $5.7 \pm 0.18$  mg/mL, mientras que en líquido se obtuvieron  $2.04 \pm 0.21$  mg/mL. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cuadra (2008). Además, existen otros

reportes que confirman que la producción de CPC por *A. chrysogenum* es superior en este sistema de cultivo (Adinarayana *et al.*, 2003; Cuadra, 2004; Jermini & Demain 1989; Wang *et al.*, 1984).

El pH se mantuvo casi constante en ambos sistemas, aumentando ligeramente hacia el final del cultivo. Estos cambios de pH se realizaron con mayor rapidez en el sistema líquido en comparación con el sistema sólido, alcanzándose en los dos casos valores alcalinos al final del cultivo ( $8.79 \pm 0.1$  y  $8.39 \pm 0.01$ , respectivamente). El intervalo de pH en el que se observó la producción de CPC en SSF se encontró entre  $6.26 \pm 0.14$  y  $8.06 \pm 0.27$ , entre las 48 y 120 horas del cultivo. En el caso de la SmF, la producción fue observable durante más tiempo, entre las 24 y las 48 horas, encontrándose el pH (de forma similar a la SSF) entre valores de  $6.54 \pm 0.01$  y  $8.59 \pm 0.07$ . Las observaciones anteriores acerca de producción de CPC, crecimiento y perfil de pH en sistemas de cultivo sólido y líquido, corroboraron las observaciones realizadas por Cuadra (2008).

Se ha especulado que en condiciones de cultivo sólido los microorganismos podrían producir enzimas especiales que son más eficientes en un medio con difusión limitada, o incluso que la estructura de sus membranas celulares podría variar, permitiéndole al organismo adaptarse a medios con condiciones diferentes de absorción de nutrientes y secreción de productos (Barrios-González & Mejía, 1996). En algunos casos se ha observado una relación entre la alta producción de metabolitos secundarios en SSF y una alta transcripción de genes biosintéticos o involucrados en los mecanismos de secreción (Barrios-González, 2012). Existen evidencias de que una baja disponibilidad de agua ( $A_w$ ), temperaturas altas o soportes que presentan mayor resistencia a la extensión del micelio, en un sistema sólido, tienen un efecto inductor sobre la expresión de algunos genes que codifican para enzimas extracelulares en *Aspergillus oryzae* (Ishida *et al.*, 1998). Otros estudios han aportado evidencias de que la expresión diferencial de algunos genes en cultivos sólidos y líquidos puede deberse a diferencias en la degradación y consumo de carbohidratos, e incluso a diferencias en los perfiles de pH (te Biesebeke *et al.*, 2005)

El análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* de *A. chrysogenum* en SSF y SmF reportado en el presente trabajo aporta evidencias de que el aumento en la producción de CPC en este sistema puede estar relacionado con la alta transcripción de dos de los genes biosintéticos (*cefD2* y *cefEF*), que codifican para enzimas limitantes de la ruta, y del gen *cefT*, involucrado en la exportación del metabolito (López-Calleja *et al.*, 2012). La expresión de estos tres genes fue significativamente mayor en SSF que en SmF (Fig. 19). Además, el patrón de expresión de cada gen evolucionó de forma diferente en ambos sistemas.

El gen *cefD2* codifica para una racemasa involucrada en la epimerización de la isopenicilina N a penicilina N en la biosíntesis de CPC, y su actividad es un paso limitante de la ruta (Ullán *et al.*, 2004). Su análisis mostró una expresión desde 2 hasta 10 veces mayor en SSF que en SmF. En el sistema sólido, su expresión se incrementó rápidamente de las 48 a las 72 y descendió brevemente a las 96 horas, traslapándose virtualmente con el inicio rápido de la producción de CPC y los valores de pH óptimos para que ésta ocurra. En el caso de la SmF, la expresión del gen y la producción de CPC parecieron comportarse de manera independiente.

El gen *cefEF* codifica para una proteína expandasa/hidroxilasa que cataliza la transformación de penicilina a cefalosporina mediante la inserción de un átomo de carbono en el núcleo de la penicilina (Valegård *et al.*, 2004); después, esta misma enzima cataliza la hidroxilación del anillo resultante (Samson *et al.*, 1987). Se ha observado que estas reacciones son pasos limitantes en la ruta de biosíntesis de CPC, contribuyendo a la acumulación de penicilina N (Ullán *et al.*, 2004). Sus actividades catalíticas requieren de  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{O}_2$  (Dotzlafl & Yeh, 1987). Su análisis de expresión demostró que, en ambos cultivos, los transcritos se incrementan gradualmente hasta alcanzar su más alto nivel a las 48 horas en el caso de SSF, y a las 72 horas en SmF. Este resultado correlaciona el inicio rápido de la producción de CPC con el máximo de expresión del gen *cefEF* en cada sistema. El nivel de expresión de este gen fue significativamente mayor en SSF que en SmF,

posiblemente indicando un efecto positivo de la disponibilidad de oxígeno sobre la transcripción de este gen en SSF.

En un trabajo previo se encontró una mayor cantidad de intermediarios de la ruta de biosíntesis de CPC en SmF, mientras que en SSF la presencia de intermediarios fue menor (Cuadra, 2008). Esto sugiere una mejor transformación de intermediarios en SSF, que podría estar relacionada con la mayor expresión de los genes *cefD2* y *cefEF* en este sistema (López-Calleja *et al.*, 2012).

El gen *cefT* codifica para una proteína perteneciente a la superfamilia de facilitadores principales (MFS), transportadora de antibióticos. Su análisis demostró un alto nivel de expresión, al menos seis veces más alto en SSF que en SmF. En ambos cultivos, los niveles de expresión fueron más altos al inicio del cultivo y más bajos hacia el final de éste. En SSF, la transcripción de *cefT* fue constante desde el inicio hasta las 72 horas, después comenzó a disminuir rápidamente. En SmF, el nivel más alto de transcripción de este gen fue a las 24 horas, después disminuyó lentamente. Estos resultados indican una actividad incrementada de exportación en SSF. Sin embargo, de acuerdo con Ullán *et al.* (2002b), el transportador CefT también podría estar actuando como un sensor, ya que su alto nivel de expresión en SSF indicaría la existencia de señales extracelulares que estimulan más la síntesis de CPC en SSF. En cualquier forma, los datos obtenidos sobre la expresión de estos genes pueden ser de gran utilidad para entender las bases moleculares de la fisiología en cultivos sólidos o líquidos en la producción de CPC por *A. chrysogenum*.

Al realizar el análisis de expresión se utilizaron como controles externos los genes *gpd* y *18S* de *A. chrysogenum*. La expresión de ambos se mantuvo constante a lo largo del cultivo, ya que estadísticamente no hubo diferencia entre el nivel de expresión de estos genes en cada tiempo, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.01$ ). Sin embargo, se decidió utilizar solamente el gen *18S* debido a que la prueba de Fisher, como segunda prueba estadística, demostró que la expresión del gen *gpd* no fue constante. Por lo tanto, el presente estudio proporciona evidencia de que el gen *18S* puede ser utilizado con

seguridad para este tipo de análisis de expresión en *A. chrysogenum*; incluso el gen *gpd* podría ser utilizado de la misma forma, dependiendo de las exigencias estadísticas que se contemplen. Estudios previos han descartado el uso del gen *actA*, que codifica para la  $\gamma$ -actina en *A. chrysogenum*, debido a que su expresión tampoco es constante (Cuadra, 2010). Otros estudios también descartan los genes de actina como controles de expresión genética y apoyan el uso del gen *18S*, aunque en algunos casos, la expresión de este gen resulta ser demasiado alta y termina saturando los experimentos (Huggett *et al.*, 2005; Radonić *et al.*, 2004; Selvey *et al.*, 2001).

## **8.2. Activación constitutiva del factor de transcripción PacC de *A. chrysogenum***

Los hongos están expuestos a una gran variedad de fluctuaciones en las condiciones ambientales, y la adaptación a estos cambios es crucial para su supervivencia. Son capaces de detectar y de adaptarse a un amplio intervalo de pH ambiental, lo que les permite superar con rapidez los cambios (Cornet & Gaillardin, 2014). La respuesta a los cambios en los niveles de pH ocurre mediante la activación del factor de transcripción PacC, que conduce a la expresión de genes que codifican para permeasas, fosfatasas, o enzimas de rutas biosintéticas cuyos productos deben funcionar en las fronteras extracelulares, como antibióticos, factores de virulencia, etc. (Peñalva *et al.*, 2008).

La activación del factor de transcripción PacC es necesaria para que éste lleve a cabo su función. Después de su traducción, PacC adopta una conformación cerrada que se mantiene estable mediante la interacción del dominio C, localizado cerca del extremo C-terminal (entre los aminoácidos 529 y 678), con los dominios A y B localizados corriente arriba (Espeso *et al.*, 2000). Cuando la señal de cambio de pH neutro a alcalino es recibida, la cascada de señalización por pH a través de la ruta Pal comienza, desembocando en el rompimiento de PacC mediante la proteasa PalB que elimina alrededor de 180 aminoácidos del extremo C-terminal (Rodríguez-Galán *et al.*, 2009). Este rompimiento deja libre el acceso a una región donde se lleva a cabo una segunda proteólisis catalizada por el proteosoma, que elimina otros 245 aminoácidos del extremo C-terminal, dejando intactos

el dominio de unión al ADN y la señal de localización nuclear, lo que da lugar a la forma activa de PacC (Hervás-Aguilar *et al.*, 2007).

Se ha observado en *A. nidulans* que las mutaciones que truncan el factor de transcripción PacC entre 250 y 586 aminoácidos del extremo C-terminal mimetizan los efectos de un crecimiento a pH alcalino generando, por ejemplo, niveles elevados de fosfatasa alcalina, niveles reducidos de fosfatasa ácida, aumento en la producción de penicilina, reducción de la conidiación en medios con pH inferior a 7.0, etc. Estas mutaciones eliminan o truncan el dominio de interacción C y. por consiguiente, desorganizan la conformación cerrada de PacC, permitiendo el acceso de la proteasa procesante a su péptido blanco en cualquier condición de pH (Espeso *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se introdujo una mutación de tipo mimetismo alcalino en la cepa silvestre y en la cepa C10 de *A. chrysogenum* para ver su efecto sobre la mutación de antibióticos beta-lactámicos, truncando el gen *pacC* hasta el par de bases número 971, lo que hipotéticamente coincide con el sitio del segundo rompimiento proteolítico en la proteína madura (alrededor del aminoácido Ser<sup>255</sup>). La mutación se introdujo bajo el propio control del gen *pacC* y bajo el control del promotor del gen *gpd* de *A. nidulans*, que ha sido ampliamente usado para la sobreexpresión de genes en hongos por tratarse de un promotor fuerte y de expresión constitutiva (Punt *et al.*, 1991 y 1992).

En el caso de la cepa silvestre, se obtuvieron 11 transformantes P, con el plásmido pPpacC<sup>27</sup>, que expresa la mutación bajo el control del promotor del gen *pacC* y 19 cepas S, con el plásmido pSpacC<sup>27</sup>, que utiliza el promotor P*gpd*. Para la cepa C10 se obtuvieron 13 cepas PC10 y 5 cepas SC10. El análisis primario de las transformantes se realizó por la técnica de PCR a partir de colonia para detectar componentes de los plásmidos introducidos, debido a que se ha observado la persistencia de falsos positivos en la transformación que crecen en medio con el antibiótico de resistencia aún después de las resiembras en medio con el doble de la concentración del mismo (López-Calleja, 2010). Lo anterior puede deberse a la baja termoestabilidad de los antibióticos utilizados, por lo que posiblemente comiencen a inactivarse en las placas de cultivo a la temperatura de

incubación, permitiendo el crecimiento de falsas transformantes. Por lo tanto, la técnica estandarizada de PCR a partir de colonia, reportada en el presente trabajo, resulta ser un método rápido y eficiente para seleccionar transformantes verdaderas, además de verificar, al mismo tiempo, la integración de los vectores en el genoma de *A. chrysogenum*.

El análisis secundario de las cepas transformantes se realizó mediante cultivos líquidos, primero en un medio definido y después en un medio complejo. Fue necesaria la optimización previa de los medios de cultivo para mantener el cultivo dentro de un intervalo de pH ácido, debido a observaciones previas en las que el medio convencional de producción de CPC para *A. chrysogenum* se alcaliniza rápidamente a las 24 ó 48 horas de cultivo, superando valores de pH de 8.0. Estos valores resultan inconvenientes para la producción de antibióticos beta-lactámicos, ya que se ha observado una marcada disminución de ésta cuando el pH supera ese límite (López-Calleja, 2010), posiblemente debido a hidrólisis química de los antibióticos beta-lactámicos o a alguna actividad acetilhidrolasa alcalina (Velasco *et al.*, 2001). Además, fue necesario realizar la observación de los efectos de la mutación de mimetismo alcalino en los medios de cultivo amortiguados a pH ácido. De esta manera, se aseguró que los efectos observados se debiesen a la mutación introducida, sin incluir los efectos del factor de transcripción PacC endógeno.

Los medios de cultivo se amortiguaron con MES 0.1 M, para el caso del medio definido de cultivo MDFA, y 0.3 M para el medio complejo de cultivo. En el medio MDFA/MES se observó que la mutación expresada bajo el control del promotor del gen *pacC* favoreció la producción de antibióticos beta-lactámicos en la mayoría de las cepas P, alcanzando una producción específica (caso de la cepa P17) de hasta 21.3 veces la observada para la cepa silvestre en el mismo medio de cultivo. Sin embargo, solamente dos de las cepas S analizadas tuvieron una producción específica estadísticamente superior a la de la cepa silvestre, la mayor de estas de apenas 6.2 veces la de la cepa silvestre.

Algo similar ocurrió en el cultivo en medio complejo de las transformantes de la cepa silvestre, en el que al menos tres de las cepas P tuvieron una producción específica

estadísticamente superior a la de la cepa silvestre. La cepa P17 tuvo una PE hasta 12.4 veces mayor que la alcanzada por la cepa silvestre en este mismo medio de cultivo, y hasta 3.8 veces mayor que la producción específica alcanzada por la cepa silvestre utilizando el medio convencional de cultivo si amortiguar. No hubo mejoras significativas de las cepas S en comparación con la cepa silvestre y las cepas control. Estos datos confirman que la mutación de mimetismo alcalino introducida en la cepa silvestre de *A. chrysogenum*, bajo el control del promotor *PpacC*, fue una buena estrategia para mejorar genéticamente la producción de CPC, al menos en la cepa silvestre.

En el caso de las transformantes de la cepa C10 en medio definido MDFA/MES, no se observaron diferencias significativas en la producción de antibióticos beta-lactámicos en comparación con la cepa parental. En el medio complejo tampoco se observaron incrementos estadísticos de la producción específica en comparación con la cepa parental y las cepas control. Por el contrario, en el caso de algunas transformantes incluso se observó un efecto negativo en la producción de antibióticos beta-lactámicos. Esto último posiblemente pudo ser debido más a la integración ectópica de los componentes del vector en algunas regiones reguladoras que a la propia mutación introducida. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el uso del promotor del gen *pacC* y el promotor *Pgpd*. Aunque se esperaban resultados similares a los observados en las transformantes de la cepa silvestre, no hubo mejoras en la producción de antibióticos beta-lactámicos para las transformantes de la cepa C10, lo que sugiere que posiblemente en esta cepa de alta producción de CPC ya se encuentre desregulada la señalización por pH, como resultado de las mutaciones azarosas provocadas por las técnicas de genética clásica que se utilizaron para su obtención (Demain, 1983).

Al inicio del presente trabajo, también se pensó que la mejor estrategia de mejoramiento sería expresar la mutación de mimetismo alcalino bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpd* de *A. nidulans*, por tratarse el promotor del gen *pacC* de un promotor regulado. Sin embargo, los resultados obtenidos en el trabajo experimental demostraron que la expresión bajo el control del propio promotor del gen *pacC* permitió niveles de producción significativamente mejores. Esto podría explicarse si

el promotor del gen *gpd* de *A. nidulans* se encontrara bajo regulación por pH ambiental, o bien, si el mismo factor de transcripción PacC funcionara a su vez como un activador, regulando positivamente la transcripción de su propio gen. Como ya se comentó previamente, se han encontrado en el promotor del gen *pacC* regiones consenso de unión del mismo factor de transcripción PacC (Schmitt *et al.*, 2001).

Muchos otros estudios se han realizado sobre la activación e inactivación del factor de transcripción PacC en otros hongos y el principal modelo de estudio ha sido *A. nidulans*. Sin embargo, sus principales objetivos se han enfocado hacia el entendimiento de la señalización por el pH. Además, la mayoría de las mutaciones en este microorganismo se han conseguido por mutagénesis con radiación UV o por mutagénesis química. Todas las mutaciones de mimetismo alcalino (*pacC<sup>l</sup>*) en *A. nidulans* produjeron fenotipos muy similares, con altos niveles de fosfatasa alcalina, bajos o nulos niveles de fosfatasa ácida, crecimiento pobre a pH ácido, etc. Mientras, las mutaciones de mimetismo ácido (por ejemplo, la eliminación del gen *pacC* (*pacC<sup>-</sup>*) o aquellas que interrumpen la proteína PacC en la señal de localización nuclear o en el dominio de unión al ADN (*pacC<sup>-t</sup>*)) muestran el fenotipo contrario: incremento en los niveles de fosfatasa ácida, disminución de fosfatasa alcalina, crecimiento pobre a pH alcalino, etc. (Caddick *et al.*, 1986; Espeso *et al.*, 2000; Mingot *et al.*, 1999; Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995). Otros estudios del factor de transcripción PacC en hongos se han enfocado en su patogenicidad y virulencia, o en la producción de toxinas. En *A. nidulans* se observó que la activación constitutiva de PacC produce un marcado incremento en la mortalidad de ratones neutropénicos causado por una extensiva invasión del hongo, lo que se explica por el aumento en la secreción de factores de virulencia. Por el contrario, la inactivación de PacC atenuó la virulencia y disminuyó su proliferación *in vivo* (Bignell *et al.*, 2005). También en *A. nidulans*, la activación constitutiva de PacC condujo a la reducción de hasta 10 veces la acumulación de esterigmatocistina y aflatoxinas, las cuales se producen preferentemente en condiciones ácidas (Keller *et al.*, 1997). Por el contrario, la eliminación del gen *pacC* en *A. nidulans* produce colonias de lento crecimiento, baja conidiación y anormalidad morfológica extrema (Tilburn *et al.*, 1995). En *Trichoderma virens*, la activación de PacC

aumentó el nivel de competencia del hongo frente a otros fitopatógenos, mientras que la inactivación provocó el efecto contrario (Trushina *et al.*, 2013).

El presente trabajo es el primero que enfoca el estudio del factor de transcripción PacC con aplicaciones biotecnológicas hacia el mejoramiento genético de la producción de un metabolito secundario de interés industrial utilizando el hongo filamentoso *A. chrysogenum*. Los resultados aquí presentados demuestran la viabilidad de la estrategia seguida para mejorar mediante ingeniería genética la producción de antibióticos beta-lactámicos por este hongo filamentoso.

### **8.3. Inactivación del factor de transcripción PacC de *A. chrysogenum***

A pesar de la estrategia diseñada para la interrupción del gen *pacC* de *A. chrysogenum* y de varios intentos de transformación, aún no ha sido posible la obtención de cepas transformantes con esta mutación. En las placas de transformación, después de varios días de crecimiento, se observaron múltiples colonias incipientes con pobre crecimiento y morfología irregular que fueron incapaces de propagarse aún después de ser resembradas en placas de medio TSA sin antibiótico (Fig 38C). También se obtuvieron cinco transformantes de buen crecimiento en placas con higromicina (lo cual apuntaba la posibilidad de haber obtenido la mutación deseada, de acuerdo a la estrategia metodológica mostrada en la figura 7). Después de haber resembrado estas cinco colonias en placas de medio TSA con fleomicina, como segundo marcador de resistencia, se observó que solamente tres de estas fueron sensibles a fleomicina (Fig. 38B). Lo anterior confirmaría la integración de la mutación mediante un evento de doble recombinación, sustituyendo parte del gen *pacC* endógeno por el *cassette* de resistencia a higromicina y eliminándose posteriormente el resto del plásmido (incluyendo el segundo marcador de resistencia). En el caso de las dos transformantes resistentes tanto a higromicina como a fleomicina, podría esperarse que la integración hubiese ocurrido ectópicamente mediante un evento de recombinación simple, integrando el *cassette* de disrupción junto con el resto del plásmido. Sin embargo, cuando se analizaron las tres transformantes resistentes a higromicina pero sensibles a fleomicina, buscando amplificar por PCR el *cassette* de

disrupción, con tamaño aproximado de 7000 bp (utilizando cebadores diseñados para amplificar el gen *pacC*) se observó también la amplificación de un producto de aproximadamente 3000 bp correspondiente al gen *pacC* endógeno en las tres transformantes, descartando la interrupción deseada del gen *pacC* (Fig. 39A). En este caso pudo haber ocurrido un evento de recombinación simple que permitió la integración ectópica del *cassette* de interrupción pero no la del *cassette* de resistencia a fleomicina. Con base en estas observaciones, se podría suponer que la interrupción del gen *pacC* en *A. chrysogenum* resulta letal para el microorganismo, dada la imposibilidad de obtener transformantes de buen crecimiento y con la interrupción comprobada del gen *pacC*.

En otros estudios realizados con *A. nidulans*, *A. niger*, y *T. virens* ya ha sido reportado previamente que las mutantes con el gen *pacC* inactivo tienden a presentar un crecimiento lento, poca conidiación y morfología anormal (Tilburn *et al.*, 1995; Trushina *et al.*, 2013; van de Hombergh *et al.*, 1996). Aunque no fue posible observar este mismo efecto por la interrupción del gen *pacC* en la cepa silvestre de *A. chrysogenum*, sí pudo observarse un efecto similar en algunas de las mutantes con el gen *pacC* silenciado. En la figura 40 se observa que las cepas Sln6, Sln8, Sln1 y Sln3, presentan, en orden de menor a mayor, un crecimiento pobre, al compararlas con las demás cepas Sln y la cepa silvestre. Lo anterior apoyaría la hipótesis de que la inactivación del gen *pacC* resulta letal para *A. chrysogenum* suponiendo que el grado de silenciamiento del gen fue mayor en las cepas con crecimiento más pobre.

También, como efecto del silenciamiento del gen *pacC* en *A. chrysogenum* se esperaba observar una disminución en la producción de antibióticos beta-lactámicos, ya que al disminuir la disponibilidad del factor de transcripción PacC, se vería afectada la expresión de los genes biosintéticos que regula. Sin embargo, la producción específica de antibióticos beta-lactámicos en las cepas con el gen *pacC* silenciado no fue estadísticamente diferente a la observada en la cepa silvestre y cepa control, tanto en medio de cultivo a pH neutro como a pH ácido, aún para el caso de la cepa Sln8 que, a excepción de la cepa Sln6, presentaba el crecimiento más pobre en las placas de medio

TSA. La cepa Sln6 no pudo ser analizada en cultivo líquido debido a su escaso crecimiento para la preparación del preinóculo. Otra observación interesante fue que las cepas analizadas no mostraron un crecimiento estadísticamente diferente en cultivo líquido a pH neutro, aunque si se observaron diferencias claras cuando crecieron en placas con medio TSA a diferentes valores de pH (Fig. 43). En el caso del cultivo líquido a pH ácido (5.0), el crecimiento de la mayoría de las cepas se vio afectado, a excepción de la cepa Sln8 y la cepa P17, esta última con el gen *pacC* constitutivamente activo. Lo anterior conduce a la suposición de que el silenciamiento del gen *pacC* afecta el crecimiento fúngico más en cultivo sólido que en cultivo líquido. En el caso de la cepa Sln8, mostró un fenotipo más marcado de mimetismo ácido en medio líquido, ya que su crecimiento no se vio tan afectado a pH 5.0 como ocurrió con las demás cepas Sln, la cepa silvestre y la cepa control.

Por otro lado, la PE de antibióticos beta-lactámicos no se vio afectada por el silenciamiento del gen *pacC* pero sí se vio favorecida por su activación constitutiva, como ya se había discutido en la sección 8.2. Lo anterior hace suponer que el efecto de la activación del gen *pacC* es más fuerte sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos que su inactivación, pero esta última tiene un efecto más drástico sobre el crecimiento en medio sólido a medida que aumenta el grado de silenciamiento, llegando a ser letal en el caso de la inactivación total. Esto podría explicarse debido a que en el caso de la activación constitutiva del factor de transcripción, esta retroalimenta positivamente la expresión del gen mediante los sitios de unión consenso al propio factor de transcripción en sus regiones promotoras (Schmitt et al., 2001), aún en condiciones ácidas, mientras que en el caso del silenciamiento, la reducida expresión del factor de transcripción podría ser suficiente para regular positivamente la expresión de los genes biosintéticos en respuesta al pH. Además, la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos en *A. chrysogenum* no solamente se encuentra regulada por el factor de transcripción PacC, sino por otros factores como: la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la disponibilidad de oxígeno y los reguladores transcripcionales CPC1, AcFKH1 y AcVEA (Dreyer et al., 2007; Hilgendorf et al., 1987; Jekosch & Kück, 2000a; Jekosch & Kück, 2000b; Martín & Demain, 2002; Ozcengiz & Demain, 2013; Schmitt et al., 2004a, Schmitt et al., 2004b; Shen et al., 1986).

Por lo anterior, se puede deducir que mientras los demás factores reguladores de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos desempeñen normalmente su función y los niveles celulares de PacC sean suficientes, aunque el gen *pacC* se encuentre silenciado, la producción de antibióticos beta-lactámicos no resulta seriamente afectada.

Finalmente, en el cultivo líquido en condiciones ácidas la PE de antibióticos beta-lactámicos fue menor tanto para las cepas SIn como para la cepa control y la cepa silvestre debido a que sigue siendo necesaria la activación del factor de transcripción PacC a través de la cascada de señalización por pH. Contrariamente, la PE de antibióticos beta-lactámicos en este medio de cultivo por la cepa P17 fue significativamente mayor a la de las demás cepas, incluyendo la cepa silvestre y control, lo que sugiere que efectivamente presenta el factor de transcripción PacC constitutivamente activo independiente de la cascada de señalización por pH. Además, en el cultivo en MDFA a pH 6.8, la PE de esta cepa fue aproximadamente 3 veces mayor a la observada en la cepa silvestre, reafirmando la viabilidad de la mutación de mimetismo alcalino como estrategia para mejorar genéticamente la producción de antibióticos beta-lactámicos en la cepa silvestre de *A. chrysogenum*.

## 9. CONCLUSIONES

1. El análisis de expresión de los genes *cefD2*, *cefEF* y *cefT* en la cepa C10 de *Acremonium chrysogenum*, demostró una mayor expresión significativa de estos genes en sistema sólido en comparación con el sistema líquido, sugiriendo que las diferencias en la producción de CPC entre ambos sistemas están dadas por cambios físicos y fisiológicos que involucran cambios en los niveles de transcripción de los genes biosintéticos.
2. La activación constitutiva del factor de transcripción PacC en la cepa silvestre de *A. chrysogenum* produjo un aumento significativo, con respecto a la cepa parental, de hasta 21.3 veces la producción específica de antibióticos beta-lactámicos, en MDFA y de 12.4 veces en MCFA, ambos medios amortiguados a pH ácido. La mutación funcionó mejor cuando se expresó bajo el control del propio promotor del gen *pacC*, en comparación con el promotor *Pgpd* utilizado comúnmente por varios autores para la sobreexpresión de genes en hongos.
3. La activación constitutiva del factor de transcripción PacC en la cepa C10 de *A. chrysogenum* no produjo diferencias estadísticas en la producción de antibióticos beta-lactámicos con respecto a la cepa parental, indicando una posible desregulación de la señalización por pH en esta cepa ya mejorada genéticamente por mutagénesis clásica.
4. La inactivación por interrupción del gen *pacC* parece resultar letal para el crecimiento de la cepa silvestre de *A. chrysogenum*.
5. La inactivación por silenciamiento del gen *pacC* afecta negativamente el crecimiento de *A. chrysogenum* cepa silvestre en placas de medio TSA pero no en cultivo líquido. La producción específica de antibióticos beta-lactámicos no resulta afectada por el silenciamiento del gen *pacC*.

## 10. REFERENCIAS

- Abraham E P, Newton GGF. 1961. **The structure of cephalosporin C.** *Biochem. J.* **79**:377-393.
- Abraham EP, Newton GGF, Hale CW. 1954. **Purification and some properties of cephalosporin N, a new penicillin.** *Biochem J.* **58**:94-102.
- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V, Jhansi Lakshmi P. 2003. **Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation of *Acremonium chrysogenum*.** *Process Biochem.* **39**(2):171-177.
- Adrio JL, Demain AL. 2006. **Genetic improvement of processes yielding microbial products.** *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:187-214.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1977. **Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*.** *Arch. Microbiol.* **115**:169-173.
- Anderson S, Gait MJ, Mayol L, Young IG. 1980. **A short primer for sequencing DNA cloned in the single-stranded phage vector M13mp2.** *Nucl. Acid. Res.* **8**:1731-1743.
- Arst HN Jr, Bignell E, Tilburn J. 1994. **Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*.** *Mol. Gen. Genet.* **245**:787-790.
- Barrios-González J. 2012. **Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications.** *Process Biochem.* **47**:175-185.
- Barrios-González J, Mejía A. 1996. **Production of secondary metabolites by solid state fermentation.** En: *Biotechnology Annual Review. Volumen 2.* ed. El-Gewely MR. pp. 85-121 Amsterdam, Holanda.
- Barrios-González J, Mejía A. 2008. **Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites.** En: *Current developments in solid-state fermentation.* pp. 302-336. Springer New York. U.S.A.
- Barrios-González J, Tomasini A, Viniegra-González G, López L. 1988. **Penicillin production by solid state fermentation.** *Biotechnol. Lett.* **10**:793-798.
- Barrios-González J, Fernández FJ, Tomasini A, Mejía A. 2005. **Secondary metabolites production by solid-state fermentation.** *Malaysian J. Biotechnol.* **1**:1-6.
- Bhargav S, Panda BP, Ali M, Javed S. 2008. **Solid-state fermentation: an overview.** *Chem. Biochem. Eng. Q.* **22**(1):49-70.
- Bignell E, Negrete-Urtasun S, Calcagno AM, Haynes K, Arst HN Jr., Rogers T. 2005. **The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence.** *Mol. Microbiol.* **55**(4):1072-1084.
- Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. 1985. **Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin.** *Am. J. Med.* **78**:3-21.
- Blatzer M, Gsaller, Abt B, Schrettl M, Specht T, Haas H. 2014. **An endogenous promoter for conditional gene expression in *Acremonium chrysogenum*: the xylan and xylose inducible promoter *xyl1*(P.).** *J. Biotechnol.* **169**:82-86.
- Bloemendal S, Löper D, Terfehr D, Kopke K, Kluge J, Teichert I, Kück U. 2014. **Tools for advanced and targeted genetic manipulation of the  $\beta$ -lactam antibiotic producer *Acremonium chrysogenum*.** *J. Biotechnol.* **169**:51-62.
- Brakhage A. 1998. **Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:547-585.
- Brotzu G. 1948. **Ricerca su di un nuovo antibiotico.** *Lav. Ist. d'Igiene Cagliari* **1948**:1-11.
- Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN Jr. 1986. **Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*.** *Mol. Gen. Genet.* **203**:346-353.
- Caddick MX, Peters D, Platt A. 1994. **Nitrogen regulation in fungi.** *Antonie van Leeuwenhoek* **65**:169-177.
- Calcagno-Pizarelli AM, Negrete-Urtasun S, Denison SH, Rudnicka JD, Bussink H, Múnera-Huertas T, Stanton L, Hervás-Aguilar A, Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2007. **Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalH assists plasma membrane localization of PalH.** *Eukaryot. Cell* **6**:2365-2375.
- Caltrider PG, Niss HF. 1966. **Role of methionine in cephalosporin synthesis.** *Appl. Microbiol.* **14**:746-753.

- Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F, Martín JF. 2014. **Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*.** *App. Microbiol. Biotechnol.* **98**:7113-7124.
- Chang SS, Zhang Z, Liu Y. 2012. **RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions.** *Annu. Rev. Microbiol.* **66**:305-323.
- Cornet M, Gaillardin C. 2014. **pH signalling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies.** *Eukaryot. Cell.* **13(3)**:342-352.
- Crawford L, Stepan AM, McAda PC, Rambosek JA, Conder MJ, Vinci VA, Reeves CD. 1995. **Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity.** *Bio/Technology.* **13**:58-62.
- Cuadra T. 2004. **Producción de cefalosporina C por cultivo en medio sólido de *Acremonium chrysogenum* C10.** Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- Cuadra T. 2008. **Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*.** Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Cuadra T, Fernández FJ, Tomasini A, Barrios-González. 2008. **Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10.** *Letts. Appl. Microbiol.* **46**:216-20.
- Dang Y, Yang Q, Xue Z, Liu Y. 2011. **RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications.** *Eukaryot. Cell* **10(9)**:1148-1155.
- Demain AL. 1983. **Strain exchange between industry and academy.** *ASM News* **49**:431
- DeModena JA, Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Fachini RA, Galazzo JL, Hughes DE, Martín JF. 1993. **The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin.** *Bio/Technology.* **11**:926-929.
- Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, Goel A, Espeso EA, Peñalva MA, Arst HN Jr. 1998. **Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous.** *Mol. Microbiol.* **30**:259-264.
- Díez B, Mellado E, Rodríguez M, Fouces R, Barredo JL. 1997. **Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics.** *Biotechnol. Bioeng.* **55**:216-226.
- Díez E, Álvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2002. **Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps.** *EMBO J.* **6**:1350-1359.
- Domínguez M, Mejía A, Barrios-González J. 2000. **Respiration studies of penicillin solid-state fermentation.** *J. Biosc. Bioeng.* **89**:409-413.
- Domínguez-Santos R, Martín JF, Kosalková K, Prieto C, Ullán RV, García-Estrada C. 2012. **The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of  $\beta$ -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*.** *Fungal Genet. Biol.* **49**:866-881.
- Donowitz GR, Mandell GL. 1988. **Beta-lactam antibiotics.** *N. Engl. J. Med.* **318**:490-500.
- Dotzlaw JE, Yeh W-K. 1987. **Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*.** *J Bacteriol.* **169**:1611-1618.
- Drew SW, Demain AL. 1975. **Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of *Cephalosporium acremonium*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**:5-10.
- Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U. 2007. **A homologue of the *Aspergillus velvet* gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*.** *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3412-3422.
- El-Sabbagh N, Harvey LM, McNeil B. 2008. **Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures.** *Enzyme Microb. Tech.* **42**:315-324.
- Elander RP. 2003 **Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**:385-392.
- Espeso EA, Arst HN Jr. 2000. **On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene.** *Mol. Cell. Biol.* **20**:3355-3363.

- ❑ Espeso EA, Peñalva MA. 1992. **Carbon catabolite repression can account for temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans***. *Mol. Microbiol.* **6**:1457-1465.
- ❑ Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1993. **pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene**. *EMBO J.* **12**:3947-3956.
- ❑ Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1997. **Specific DNA Recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC**. *J. Mol. Biol.* **274**:466-480.
- ❑ Espeso EA, Roncal T, Díez E, Rainbow L, Bignell E, Álvaro J, Suárez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2000. **On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction**. *EMBO J.* **19**:719-728.
- ❑ Fernández FJ. 1997. **Caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de penicilina**. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España.
- ❑ Fernández-Martínez J, Brown CV, Díez E, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA, Espeso EA. 2003. **Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC**. *J. Mol. Biol.* **334**:667-684.
- ❑ Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutierrez S, Fernández FJ, Martín JF. 1995. **The penicillin biosynthetic gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:6200-6204.
- ❑ Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm HM, Woloshuk CP. 2003. **PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides***. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(9):5222-5227.
- ❑ Fleming A. 1929. **On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza***. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**:226-236.
- ❑ Florey HM, Abraham EP, Newton GGF, Burton HS, Kelly BK, Hale CW y Miller GA. 1956. **Improvements relating to the production of an antibiotic substance by a *Cephalosporium* species**. *Brit. Patent.* 745208.
- ❑ Gams W. 1971. **Cephalosporin-artige schimmelpilze (Hiphomycetes)**. Fischer G. (ed.), Stuttgart, Alemania. pp. 1-262.
- ❑ García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. 2007. **The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development**. *Res. Microbiol.* **158**:437-446.
- ❑ Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT. 1996. **Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications**. *Mycol.* **88**:369-383.
- ❑ Gsaller F, Blatzer M, Abt B, Schrettl M, Lindner H, Haas H. 2013. **The first promoter for conditional gene expression in *Acremonium chrysogenum*: iron starvation-inducible *mir1*(P)**. *J. Biotechnol.* **163**:77-80.
- ❑ Gutiérrez S. 1994. **Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C**. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España.
- ❑ Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E, Martín JF. 1991. **Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding  $\alpha$ -aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin-biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains**. *J. Bacteriol.* **173**:2354-2365.
- ❑ Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Martín JF. 1992. **The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase**. *J. Bacteriol.* **174**:3056-3064.
- ❑ Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF. 1997. **Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:606-614.
- ❑ Haas H, Marzluf GA. 1995. **Nre, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum* binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters**. *Curr. Genet.* **28**:177-183.
- ❑ Hamad B. 2009. **The antibiotics market**. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**(9):675-676.
- ❑ Hengen PN. 1996. **Preparing ultra-competent *Escherichia coli***. *Trends in Biochem. Sci.* **21**(2):75-76.

- Hanahan D. 1983. **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Herranz S, Rodríguez JM, Bussink H, Sánchez-Ferrero JC, Arst HN Jr, Peñalva MA, Vincent O. 2005. **Arrestin-related proteins mediate pH signalling in fungi.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:12141-12146.
- Hersbach GJM, van der Beck CP, van Dijk PWM. 1984. **The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation.** En: *Biotechnology of Industrial Antibiotics.* ed. Vandamme EJ. pp. 45-140. New York, U.S.A.
- Hervás-Aguilar A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2007. **Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC.** *J. Biol. Chem.* **282**:34735-34747.
- Hilgendorf P, Heiser V, Diekmann H, Thoma M. 1987. **Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:247-251.
- Hodgkin DC, Maslen EN. 1961. **The X-ray structure of cephalosporin C.** *Biochem. J.* **79**:393-402.
- Hoff BE, Schmitt K, Kück U. 2005. **CPCR1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*.** *Mol. Microbiol.* **56**:1220-1233.
- Holker U, Hofer M, Lenz J. 2004. **Biotechnological advantages of laboratory scale solid state fermentation with fungi.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**:175-186.
- Holmes DS, Quigley M. 1981. **A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids.** *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. **Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations.** *Genes Immun.* **6**:279-284.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. **High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *Gene.* **96**:23-28.
- Ishida H, Hata Y, Ichikawa E, Kawato A, Suginami K, Imayasu S. 1998. **Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glab*), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*.** *J. Ferment. Bioeng.* **86**:301-307.
- Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Ueda Y, Kohsaka M, Imanaka H. 1991. **Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*.** *Biotechnol.* **9**:188-191.
- Jekosch K, Kück U. 2000a. **Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum*  $\beta$ -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:556-563.
- Jekosch K, Kück U. 2000b. **Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production.** *Curr. Genet.* **37**:388-395.
- Jermini MFG, Demain AL. 1989. **Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*.** *Experientia* **45**:1061-1065.
- Jürgens M, Seidel G, Schügerl K. 2002. **Production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* in semisynthetic medium.** *Process Biochem.* **38(2)**:263-272.
- Kato N, Brooks W, Calvo AM. 2003. **The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development.** *Eukaryot. Cell* **2**:1178-1186.
- Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GB. 1997. **pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.*** *Phytopathol.* **87(6)**:643-648.
- Kennel YM, Demain AL. 1978. **Effect of carbon sources on  $\beta$ -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*.** *Exp. Mycol.* **2**:234-238.
- Knihinicki RD, Day RO, Williams KM. 1991. **Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal antiinflammatory drugs--II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters.** *Biochem Pharmacol.* **42(10)**:1905-1911.
- Kosalková K, Marcos AT, Martín JF. 2001. **A moderate amplification of the *mecB* gene encoding cystathionine-gamma-lyase stimulates cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**:252-258.

- ❑ Kota KP, Sridhar P. 1999. **Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production.** *Process Biochem.* **34**:325-328.
- ❑ Kozma J, Karaffa L. 1996. **Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*.** *J. Biotechnol.* **48**:59-66.
- ❑ Lefkowitz RJ, Shenoy SK. 2005 **Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins.** *Science.* **308**:512-517.
- ❑ LePage GA, Campbell E. 1946. **Preparation of streptomycin.** *J. Biol. Chem.* **162**:163-171.
- ❑ Liu Y, Gong G, Zhu C, Zhu B, Hu Y. 2010a. **Environmentally safe production of 7-ACA by recombinant *Acremonium chrysogenum*.** *Curr. Microbiol.* **61(6)**:609-614.
- ❑ Liu Y, Gong G, Xie L, Yuan N, Zhu Ch, Zhu B, Hu Y. 2010b. **Improvement of cephalosporin C production by recombinant DNA integration in *Acremonium chrysogenum*.** *Mol. Biotechnol.* **44**:101-109.
- ❑ Long LK, Wang Y, Yang Y, Xu X, Liu G. 2013. **A septation related gene *AcsepH* in *Acremonium chrysogenum* is involved in the cellular differentiation and cephalosporin production.** *Fungal Genet. Biol.* **50**:11-20.
- ❑ López-Calleja AC. 2010. **Efecto de una mutación de mimetismo alcalino en el factor de transcripción PacC de *Acremonium chrysogenum* sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos.** Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- ❑ López-Calleja AC, Cuadra T, Barrios-González J, Fierro F, Fernández FJ. 2012. **Solid-state and submerged fermentations show different gene expression profiles in cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*.** *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**:126-134.
- ❑ Lotfy WA. 2007. **The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*: optimization of process parameters through statistical experimental designs.** *Biores. Technol.* **98**:3491-3498.
- ❑ Lübbe C, Jensen SE, Demain AL. 1984. **Prevention of phosphate inhibition of cephalosporin synthetases by ferrous ion.** *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:75-79.
- ❑ MacCabe AP, van den Hombergh JPTW, Tilburn J, Arst HN, Visser J. 1996. **Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger pacC* gene, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH.** *Mol. Gen. Genet.* **250**:367-374.
- ❑ Marín M, Gudiol F. 2003. **Antibióticos beta-lactámicos.** *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21(1)**:42-55.
- ❑ Marcial-Quino J. 2011. **Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa.** Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- ❑ Marshall RT. 1993. **Standard methods for the examination of dairy products.** 16<sup>a</sup> ed. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A.
- ❑ Martín JF, Demain AL. 2002. **Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*.** *Trends Biotech.* **20**:502-507.
- ❑ Marzluf GA. 1997. **Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:17-32.
- ❑ Mathison L, Soliday C, Stepan T, Aldrich T, Rambosek J. 1993. **Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase.** *Curr. Genet.* **23**:33-41.
- ❑ Matsuda A, Sugiura H, Matsuyama K, Matsumoto H, Ichikawa S, Komatsu K-I. 1992. **Molecular cloning of acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase cDNA from *Acremonium chrysogenum*: sequence and expression of catalytic activity in yeast.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**:995-1001.
- ❑ Matsumura S, Suzuki M. 1986. **Feedback regulation of acetohidroxy acid sntyhase in *Cephalosporium* mutant M8650 and a high cephalosporin-producing mutant.** *Agric. Biol. Chem.* **50**:505-507.
- ❑ Mediavilla A, García-Lobo JM. 2005. **Antibióticos beta-lactámicos.** En: Flórez J. *Farmacología Humana*, 4<sup>a</sup> ed, Ed. Masson. Barcelona, España. pp. 1105-1127.
- ❑ Mehta RJ, Speth JL, Nash CH. 1979. **Lysine stimulation of cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium acremonium*.** *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**:177-182.
- ❑ Meister G, Tuschl T. 2004. **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.** *Nature* **431(7006)**:343-349.

- ❑ Menne S, Walz M, Kück U. 1994. **Expression studies with the bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region from *Acremonium chrysogenum* using reporter gene fusions.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:57-66.
- ❑ Mienda BS, Idi A, Umar A. 2011. **Microbiological features of solid state fermentation and its applications -an overview.** *Res. Biotechnol.* **2(6)**:21-26.
- ❑ Miller J. 1972. **Experiments in molecular genetics.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 352-355.
- ❑ Mingot J, Tilburn J, Díez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Caddick MX, Espeso EA, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1999. **Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed.** *Mol. Cell Biol.* **19**:1390-1400.
- ❑ Minuth W, Tudzynski P, Esser K. 1982. **Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*.** *Curr. Genet.* **5**:227-231.
- ❑ Monti D, Carrea G, Riva S, Baldaro E, Frare G. 2000. **Characterization of an industrial biocatalyst: immobilized glutaryl-7-ACA acylase.** *Biotechnol. Bioeng.* **70**:239-244.
- ❑ Moore S. 1981. **Pancreatic DNase.** En: *The Enzymes*, 3a ed. Boyer PD (ed.). Vol. 14, Academic Press, New York. pp. 281-296.
- ❑ Nakayashiki H. 2005. **RNA silencing in fungi: mechanisms and applications.** *FEBS Lett.* **579(26)**:5950-5957.
- ❑ Nash C H, Huber FM. 1971. **Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*.** *Appl. Microbiol.* **22**:6-10.
- ❑ Negrete-Urtasun S, Reiter W, Díez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Peñalva MA, Arst HN Jr. 1999. **Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization.** *Mol. Microbiol.* **33**:994-1003.
- ❑ Newton GGF, Abraham EP. 1956. **Isolation of cephalosporin C, a penicillin like antibiotic containing D- $\alpha$ -aminoadipic acid.** *Biochem. J.* **62**:651-658.
- ❑ Nijland JG, Kovalchuk A, van den Verg M, Bovenberg RAL, Driessen AJM. 2008. **Expression of the transporter encoded by the *ceft* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*.** *Fungal Gen. Biol.* **45**:1415-1421.
- ❑ Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1995. **Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxyterminal moiety.** *Genes Dev.* **9**:1622-1632.
- ❑ Ozcengiz G, Demain AL. 2013. **Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation.** *Biotechnol. Adv.* **31**:287-311.
- ❑ Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. 2000. **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products.** *Process Biochem.* **35(10)**:1153-1169.
- ❑ Peñalva MA, Arst HN Jr. 2002. **Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:426-446.
- ❑ Peñalva MA, Arst HN Jr. 2004. **Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts.** *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:425-451.
- ❑ Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. 2008. **Ambient pH gene regulation in fungi: making connections.** *Trends Microbiol.* **16(6)**:291-300.
- ❑ Pöggeler S, Hoff B, Kück U. 2008. **Asexual cephalosporin C producer *Acremonium chrysogenum* carries a functional mating type locus.** *Appl. Environ. Microbiol.* **74(19)**:6006-6016.
- ❑ Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA. 1987. **Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*.** *Gene* **56(1)**:117-124.
- ❑ Punt PJ, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. 1991. **Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene.** *J. Biotechnol.* **17**:19-34.
- ❑ Punt PJ, Kramer C, Kuyvenhoven A, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. 1992. **An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene.** *Gene* **120**:67-73.

- ❑ Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, Chapman JL, Kaster KR. 1985. **A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium***. Microbiology. D. Schlessinger (ed.). Am. Soc. for Microbiology. p.p. 468-472.
- ❑ Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**:856-862.
- ❑ Reading C, Cole M. 1977. **Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus***. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:852-857.
- ❑ Renno DV, Saunders G, Bull T, Holt G. 1992. **Transcript analysis of penicillin genes from *Penicillium chrysogenum***. *Curr. Genet.* **21**:49-54.
- ❑ Revilla G, Ramos FR, López-Nieto MJ, Alvarez E, Martín JF. 1986. **Glucose represses formation of D-(L- $\alpha$ -aminoadipyl)-L-cysteiny-L-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum***. *J. Bacteriol.* **168**:947-952.
- ❑ Robinson T, Singh D, Nigam P. 2001. **Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55(3)**:284-289.
- ❑ Rodríguez-Galán O, Galindo A, Hervás-Aguilar A, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2009. **Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III**. *J. Biol. Chem.* **284**:4404-4412.
- ❑ Rossi R, Montecucco A, Ciarrocchi G, Biamonti G. 1997. **Functional characterization of the T4 DNA Ligase: a new insight into the mechanism of action**. *Nucl. Acid. Res.* **25**:2106-2113.
- ❑ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1985) **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science.* **239**:487-491.
- ❑ Sambrook J, Russell DW. 2001. **Molecular cloning. a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- ❑ Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, van Frank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW, Ingolia TD. 1985. **Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium***. *Nature.* **318**:191-194.
- ❑ Samson SM, Dotzlar JE, Slisz ML, Becker GW, van Frank RM, Veal LE, Yeh WK, Miller JR, Queener SW, Ingolia TD. 1987. **Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis**. *Bio/Technology.* **5**:1207-1216.
- ❑ Sánchez S, Paniagua L, Mateos RC, Lara F, Mora J. 1981. **Nitrogen regulation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum***. En: Vezina C, Singh K (eds.), *Advances in Biotechnology*, vol. III. Pergamon Press, Toronto, Canadá. pp 147-154.
- ❑ Sawada Y, Konomi T, Solomon NA, Demain AL. 1980. **Increase in activity of  $\beta$ -lactam synthetases after growth of *Cephalosporium acremonium* with methionine or norleucine**. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**:281-284.
- ❑ Schmitt EK, Kempken R, Kück U. 2001. **Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC**. *Mol. Genet. Genom.* **265**:508-518.
- ❑ Schmitt EK, Hoff B, Kück U. 2004a. **Regulation of cephalosporin biosynthesis**. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **88**:1-43.
- ❑ Schmitt EK, Hoff B, Kück U. 2004b. **AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with the RFX transcription factor CPC1 in the cephalosporin C-producing fungus *Acremonium chrysogenum***. *Gene* **342**:269-281.
- ❑ Schumann U, Ayliffe M, Kazan K, Wang MB. 2010. **RNA silencing in fungi**. *Front. Biol.* **5(6)**:478-494.
- ❑ Seidel G, Tollnick C, Beyer M, Fahimi Y, Schügerl K. 2002a. **Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part. I. Application of complex media**. *Process Biochem.* **38(2)**:229-239.
- ❑ Seidel G, Tollnick C, Beyer M, Schügerl K. 2002b. **Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part II. Cultivation in diluted and enriched cultivation media**. *Process Biochem.* **38(2)**:241-248.
- ❑ Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR. 2001.  **$\beta$ -actin-an unsuitable internal control for RT-PCR**. *Mol. Cell Probes* **15**:307-311.

- Shah AJJ, Tilburn MW, Adlard MW, Arst HN Jr. 1991. **pH regulation in penicillin production in *Aspergillus nidulans***. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:209-12.
- Shen Y-Q, Heim J, Solomon NA, Wolfe S, Demain AL. 1984. **Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources**. *J. Antibiot.* **37**(5):503-511.
- Shen Y-Q, Wolfe S, Demain AL. 1986. **Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C**. *Bio/Technology.* **4**:61-64.
- Sierra E. 2005. **Construcción de un cósmido para la clonación y expresión de genes fúngicos**. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Skatrud PL, Queener SW. 1989. **An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium***. *Gene* **79**:331-338.
- Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. 1987. **Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium***. *Curr. Genet.* **12**:337-348.
- Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL, Queener SW. 1989. **Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium***. *Bio/Technology* **7**:477-485.
- Smith DJ, Burnham MKR, Bull JH, Hodgson JE, Ward JM, Browne P, Brown J, Barton B, Earl AJ, Turner G. 1990.  **$\beta$ -Lactam antibiotic biosynthesis genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes**. *EMBO J.* **9**:741-747.
- Specht CA, DiRusso C, Novotny CP, Ullrich RC. 1982. **A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi**. *Anal. Biochem.* **119**:158-163.
- Stapley EO, Jackson M, Hernandez S, Zimmerman SB, Currie SA, Mochales S, Mata JM, Woodruff HB, Hendlin D. 1972. **Cephamecins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. n.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**:122-131.
- Suárez T, Peñalva MA. 1996. **Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster**. *Mol. Microbiol.* **20**:529-540.
- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Arocha RY, Guarro J, Scot JA. 2011. ***Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium***. *Stud. Mycol.* **68**:139-62.
- te Biesebeke R, van Biezen N, de Vos WM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ. 2005. **Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:75-82.
- Teijeira R, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF. 2009. **The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production**. *Biochem. J.* **418**:113-124.
- Teijeira F, Ullán RV, Fernández-Aguado M, Martín JF. 2011. **CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum***. *Metab. Eng.* **13**(5):532-543.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst HN. 1995. **The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH**. *EMBO J.* **14**:779-790.
- Tipper DJ. 1985. **Mode of action of beta-lactam antibiotics**. *Pharmacol. Ther.* **27**:1-35.
- Tollnick C, Seidel G, Beyer M, Schugerl, K. 2004. **Investigations of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum***. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **86**:1-45.
- Trushina N, Levin M, Mukherjee PK, Horwitz BA. 2013. **PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens***. *BMC Genom.* **14**:138-159.
- Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S, Martín JF. 2002a. **A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum***. *J. Biol. Chem.* **277**, 46216-46225.
- Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Martín JF. 2002b. **The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production**. *Mol. Gen. Genom.* **267**:673-683.

- Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L, Martín JF. 2004. **Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis.** *Mol. Gen. Genom.* **272**:562-570.
- Ullán R.V, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ, Martín JF. 2007. **Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes.** *Chem. Biol.* **14**:329-339.
- Ullán RV, Teijeira F, Martín JF. 2008. **Expression of the *Acremonium chrysogenum* *cefT* gene in *Penicillium chrysogenum* indicates that it encodes a hydrophilic beta-lactam transporter.** *Curr. Genet.* **54**:153-161.
- Ullán RV, Teijeira F, Guerra SM, Vaca I, Martín JF. 2010. **Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C.** *Biochem. J.* **432**:227-236.
- Valegård K, Terwisscha van Scheltinga AC, Dubus A, Ranghino G, Öster LM, Hajdu J, Andersson I. 2004. **The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:95-101.
- van den Hombergh JP, MacCabe AP, van de Vondervoort PJ, Visser J. 1996. **Regulation of acid phosphatases in an *Aspergillus niger* *pacC* disruption strain.** *Mol. Gen. Genet.* **251**:542-550.
- Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C, Martín JF. 1994. **Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*.** *J. Bacteriol.* **176**:985-991.
- Velasco J, Adrio JL, Moreno MA, Díez B, Soler G, Barredo JL. 2000. **Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*.** *Nat. Biotechnol.* **18**:857-861.
- Velasco J, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F, Campoy S., Martín JF. 2001. **Cloning and characterization of the gene *cahB* encoding a cephalosporin C acetylhydrolase from *Acremonium chrysogenum*.** *Appl. Microbiol Biotechnol.* **57**:360-356.
- Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2003. **YPXL/I is a protein interaction motif recognised by *Aspergillus* PalA and its human homologue AIP1/Alix.** *Mol. Cell. Biol.* **23**:1647-1655.
- Xu H, Andi B, Qian B, West AH, Cook PF. 2006. **The  $\alpha$ -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi.** *Cell Biochem. Biophys.* **46**:43-64.
- Wang HH, Chiou JY, Hong CY, Tsen WC. 1984. **Cephalosporin C production by solid state fermentation with rice grains** (Artículo en chino). *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* **17(1)**:55-69.
- Wang H, Pan Y, Hu P, Zhu Y, Li J, Jiang x, Liu G. 2014. **The autophagy-related gene *Acatg1* is involved in conidiation and cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*.** *Fungal Genet. Biol.* **69**:65-74.
- Weil J, Miramonti J, Ladisch MR. 1995. **Cephalosporin-C-mode of action and biosynthetic-pathway.** *Enzyme Microb. Technol.* **17**:85-87.
- Zhang JY, Banko G, Wolfe S, Demain AL. 1987. **Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*.** *J. Ind. Microbiol.* **2**:251-255.
- Zhang J, Wolfe S, Demain AL. 1988. **Phosphate repressible and inhibitable  $\beta$ -lactam synthetases in *Cephalosporium acremonium* strain C-10.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:242-247.
- Zhou MY, Clark SE, Gómez-Sánchez CE. 1995. **Universal cloning method by TA strategy.** *Biotechniques* **19**:34-35
- Zhou W, Holzhauer-Rieger K, Dors M, Schiigerl K. 1992. **Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*.** *J. Biotechnol.* **23**:315-329.

---

## Solid-State and Submerged Fermentations Show Different Gene Expression Profiles in Cephalosporin C Production by *Acremonium chrysogenum*

A.C. López-Calleja T. Cuadra J. Barrios-González F. Fierro F.J. Fernández

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., Mexico

---

### Key Words

*Acremonium chrysogenum* · Cephalosporin C · Gene expression · Solid-state fermentation · Submerged fermentation

---

### Abstract

Despite the importance of *Acremonium chrysogenum* as the only cephalosporin C (CPC) producer, there is still a limited understanding about the molecular mechanisms regulating antibiotic biosynthesis in this fungus. Based on the previously described relationship between environmental pH and antibiotic production in numerous filamentous fungi, we studied the expression of genes related to CPC production in *A. chrysogenum*. We report for the first time similarities and differences, characterizing CPC production by *A. chrysogenum* under a variable pH environment, in submerged and solid-state fermentation. This characterization is supported by measurements of parameters, like CPC production, pH, growth, and expression levels of several genes involved, directly or indirectly, in CPC production. Interesting differences in intermediate (Pen N) and certain biosynthetic gene expression levels were observed. Our results point out some relationships between physiological features and gene expression that open important improvement perspectives for both culture systems.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

### Introduction

In contrast to the genetic improvement observed in *Penicillium chrysogenum* for penicillin production [Fierro et al., 1995; Newbert et al., 1997], no reports are available establishing an increment in the gene dose of cephalosporin C (CPC) biosynthetic genes in *Acremonium chrysogenum* strains recognized as high antibiotic producers. However, several works have shown that transcription levels of these genes are higher in mid or high CPC producers than those of wild strains [Jekosch and Kück, 2000; Schmitt et al., 2001; Velasco et al., 1994; Walz and Kück, 1993]. These results suggest that changes should have occurred preferably at the regulatory level of structural genes transcription [Schmitt et al., 2004].

The pH plays an important role in determining the transcription levels of many fungal genes whose final products work outside the cell (or on the cell boundaries), and there is evidence that those encoding  $\beta$ -lactam antibiotics are among the genes regulated by environmental pH [Schmitt et al., 2001; Suárez and Peñalva, 1996].

A.C. López-Calleja and T. Cuadra contributed equally to this work.

---

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2012 S. Karger AG, Basel  
1464-1801/12/0222-0126\$38.00/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/mmb](http://www.karger.com/mmb)

F.J. Fernández  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Apdo Postal 55-535, Col. Vicentina  
09340 México, DF (Mexico)  
Tel. +52 55 5804 6453, E-Mail [fjfp@xanum.uam.mx](mailto:fjfp@xanum.uam.mx)

Schmitt et al. [2001] analyzed the transcription levels of *pcbC* (for isopenicillin N-synthase) and *cefEF* (for deacetoxy-CPC synthase) genes in cultures grown in different buffered media (pH 5–8), by using two different *Acromonium* strains. The *pcbC* gene was expressed at appreciable levels only above pH 5 in strain 14553 (wild type), whereas the transcripts of *cefEF* were not detectable by northern hybridization even at pH 8. In contrast, strain A3/2 (medium level producer derived from 14553) expressed both genes at high levels throughout pH values from 5.8 to 8.3. This phenomenon suggests a correlation between the genetic improvement of strains and a possible deregulation of the transcription factor PACC (environmental pH-related transcription factor).

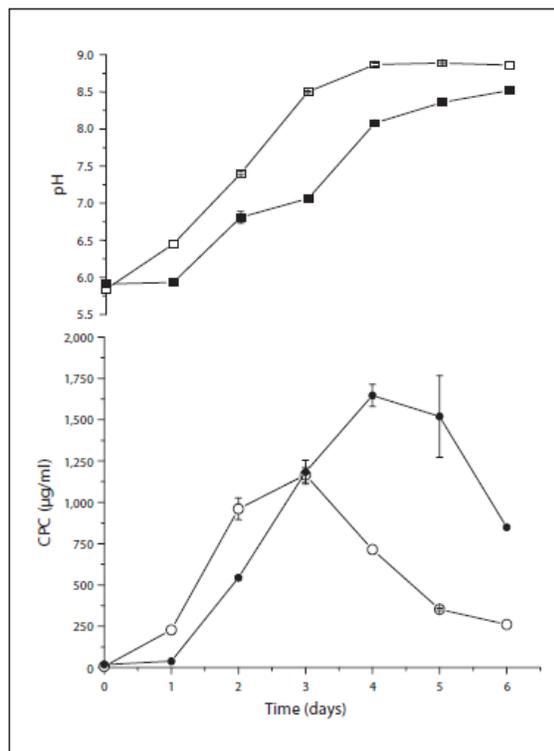
Our studies of *A. chrysogenum* C10 cultures in solid-state fermentation (SSF) on inert support impregnated with liquid medium indicated the need of keeping the pH within a narrow range to improve CPC production [Cuadra et al., 2008]. It has been also speculated that, in SSF, microorganisms produce special enzymes that are more efficient under limited diffusion media, or even that the structure of membranes varies allowing cells to adapt to a medium with different nutrient-uptake and product-secretion conditions [Barrios-González and Mejía, 1996]. All these differences would somehow encourage the production of an exportable metabolite, such as CPC in this culture system.

Given the observed relationship between environmental pH and CPC production in SSF, together with the lack of information about the relationship of these parameters in submerged fermentation (SmF), we considered it important to study not only the physiological but also some molecular characteristics of CPC biosynthesis in these culture systems.

## Results

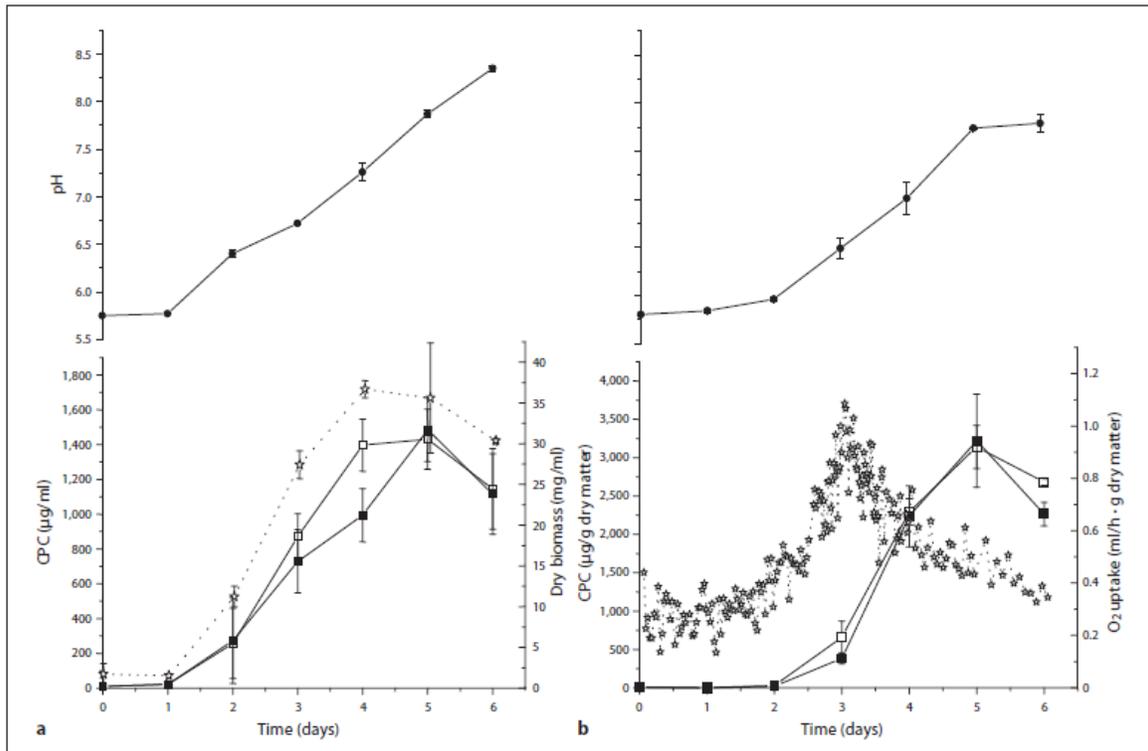
We have already stated that parameters helping to keep pH in adequate values for CPC production in SSF, such as initial pH, buffering system, and nutrient concentration, could greatly increase the production time and CPC yields in this fermentation technique [Cuadra et al., 2008]. On the other hand, and as previously mentioned, information is scarce referring to the importance of pH control in SmF.

Before conducting a comparison between CPC production in SSF and SmF, preliminary experiments were performed to find homologous conditions for both systems. It has been reported that a concentrated medium



**Fig. 1.** Production (○) and pH (□) curves of *A. chrysogenum* in SmF under two nutrient levels condition. Empty symbols normal concentration, filled symbols 2.5-fold concentrated medium.

adequate for SSF, such as 2.5× media formulation for submerged culture, is not convenient for secondary metabolites production in SmF [Baños et al., 2009; Barrios-González and Tomasini, 1996; Barrios-González et al., 1988]. In order to confirm if this statement applies to *A. chrysogenum* cultures, a SmF using 2.5× production medium (PM) was compared with a SmF with 1× PM (the reported concentration for SmF). As seen in figure 1, a higher production level was obtained in the culture with the 2.5× medium (1,646 vs. 1,165 µg/ml). Although this was unexpected, the explanation relies both on growth and pH kinetics. The concentrated culture showed a better control of pH, reaching a value of 8 by day 4 (peak production), whereas in the 1× culture this parameter reached a value of 8.5 by day 3 (peak production). These differences in production might also be related to higher buffer and nutrient content concentrations.



**Fig. 2.** pH (●), growth (☆ with dotted line), and CPC production (□) curves in (a) SmF and (b) SSF by *A. chrysogenum*. CPC was measured by bioassay without penicillinase (empty symbols) and with penicillinase (filled symbols).

#### Physiological Differences between SSF and SmF over CPC Production

To investigate whether the pH behavior and effect on CPC production are particular of SSF physiology or is similar in SmF, cultures of *A. chrysogenum* in both systems were carried out using 2.5× PM, with an initial pH of 5.8 in both systems. Results showed a similar increase in pH during progression of both cultures (fig. 2), reaching alkaline values in both cases (SmF >8.25, SSF ≈8.0). This allowed for the study of the culture parameters in a wide pH range (5.7–8.3), covering acid, neutral, and alkaline conditions.

As seen in figure 2, the stage of fast CPC production took place at a pH range of 5.77–7.9 in SmF, and in a range of 6.0–7.75 in SSF. These ranges indicated that CPC production by *A. chrysogenum* is limited at pH values <5.8 and >7.8 in both culture systems. Maximal productions

in SSF were 3,221 µg/g dry mycelium at day 5, whereas in SmF it was 1,400 µg/ml, also at day 5. It is noteworthy that total antibiotic concentration, consisting mainly of CPC + penicillin N (a cephalosporin intermediate) was much higher than CPC concentration at day 4 in SmF, while both concentrations reached the same value by day 5. This was not seen in SSF, indicating a better conversion from penicillin N to CPC in the solid system. Besides, SSF showed a better specific production in relation with SmF ( $51.4 \pm 2.0$  vs.  $28.2 \pm 3.9$  µg CPC/mg dry mycelium; see table 1).

In order to find out the specific production at 96 and 120 h in both cultures, biomass was estimated by glucosamine measurements. SmF glucosamine measurements showed that 1 g of dry mycelium contains approximately 31.9 mg of glucosamine. Specific production yields (table 1) showed a higher specific production in both culture

types at 120 h than at 96 h, but with higher variation between these times in SmF.

Growth (together with a slow antibiotic production rate) started at 24 h in SmF and at 48 h in SSF (see O<sub>2</sub> uptake kinetics; fig. 2), when the pH reached 5.8 in SmF and almost 6.0 in SSF. It is unclear if this 1-day delay was due to a higher sensitivity to acidic pH of the solid culture, or an adaptation period to the solid environment (seed inoculum came from a liquid culture). Moisture kinetics (data not shown) confirmed respirometry data, since moisture content increased from the 2nd to the 5th day of culture (69–73%).

An important observation was that in SSF fast CPC biosynthesis started at 72 h, when O<sub>2</sub> uptake rate (or respiration) decreased sharply, which indicated a sudden decrease in growth rate. That is, the antibiotic production started when metabolic activity (growth) was limited. This could not be observed in SmF; presumably because growth was measured by biomass dry weight, so slower cell duplication could be masked by reserves accumulation.

#### Differential Gene Profiling between SSF and SmF for CPC Production

Physiological results obtained in the previous section were complemented with expression studies of some genes from *A. chrysogenum*, whose sequences and functions are already reported. *cefD2*, *cefEF*, and *cefT* were selected to attain an overview of the differences between the studied culture systems in two limiting steps of CPC biosynthesis (*cefD2* and *cefEF*) and CPC transportation activity (*cefT*). *18S* and *gpd* genes were considered as potential constitutive expression markers, since their expression profiles along the fermentation were kept constant. No difference between both markers was found (data not shown), and the *18S* gene was used as the external control for *cefD2*, *cefEF*, and *cefT* RT-PCR semi-quantitative expression analysis.

#### *cefD2* Gene Expression

This gene encodes a protein showing high similarity to acyl-CoA racemases, and its activity is involved in the epimerization of isopenicillin N to penicillin N in the CPC biosynthesis pathway [Ullán et al., 2004]. Results of expression analysis showed a higher expression of *cefD2* in SSF than in SmF (fig. 3). The transcription of this gene in SSF seems to rise at 48 h to a high level and to decrease at 96 h, whereas in SmF transcription seems to start at a very low level, decreasing briefly towards 72 h, and rising back at the end of fermentation, remaining almost con-

**Table 1.** SmF- and SSF-specific CPC productions at 96 and 120 h (units are both µg CPC/mg dry mycelium)

Time, h	SmF	SSF
96 <sup>1</sup>	28.2 ± 3.9	51.4 ± 2.0
120	45.8 ± 6.8	53.9 ± 9.7

<sup>1</sup> At 96 h, specific production in SmF is significantly different from SSF according to Student's t test,  $p < 0.02$ .

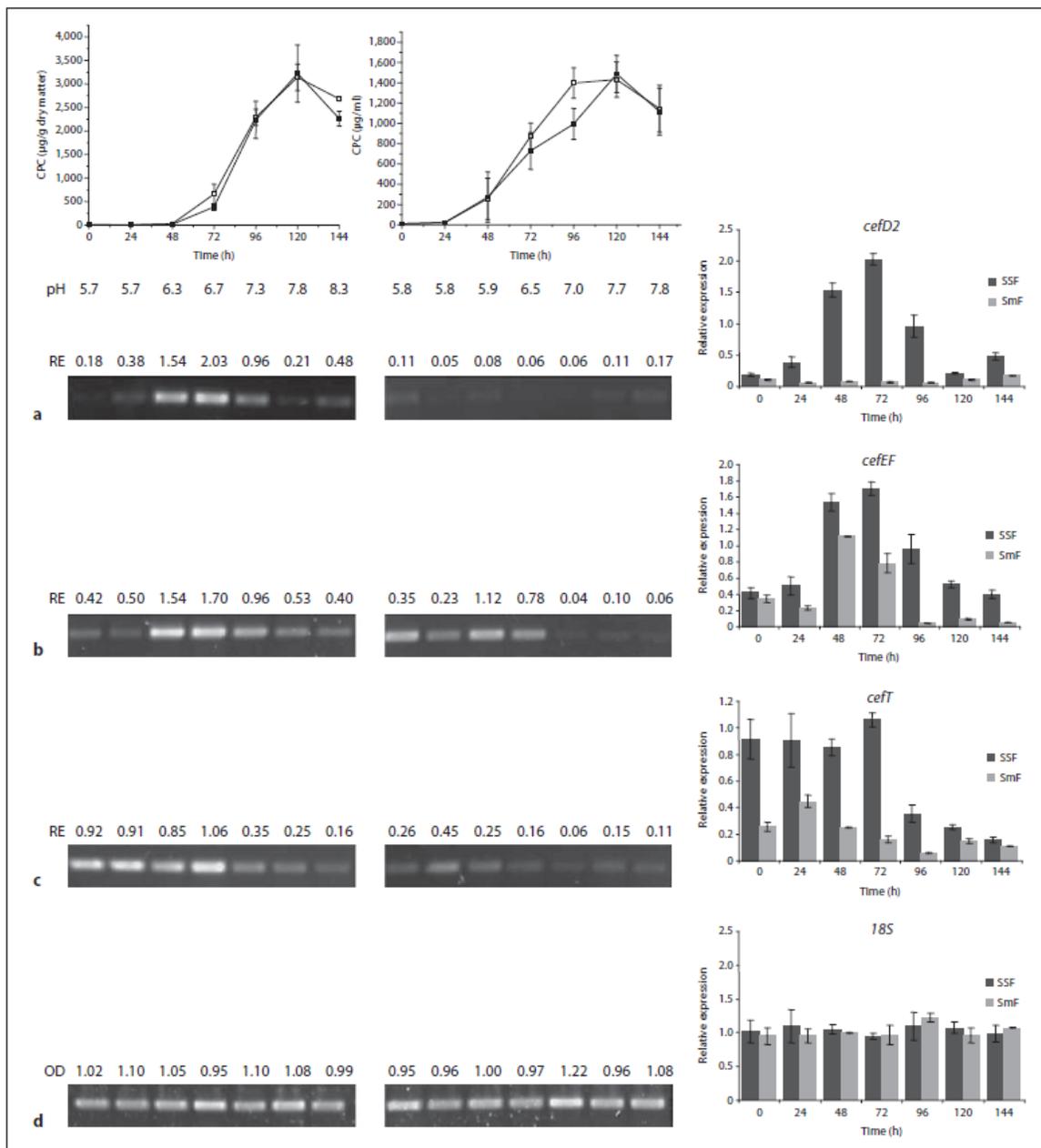
stant. The expression of this gene virtually overlapped with the fast CPC production onset in SSF culture at 48 h (fig. 3), and at the pH value suitable for the production mentioned above. In SmF, the CPC production profile was independent from *cefD2* gene expression. Differences in the expression of this gene between SSF and SmF were significant, being at least 2-fold higher in the case of SSF. These differences correlate very well with the larger amount of CPC intermediaries found in SmF.

#### *cefEF* Gene Expression

The *cefEF* gene encodes an expandase/hydroxylase protein which catalyzes the transformation of penicillin to cephalosporin via the insertion of a carbon atom in the nucleus of penicillin [Valegård et al., 2004]. Subsequently, this enzyme catalyzes a reaction of hydroxylation of the ring [Samson et al., 1987]. Expression analysis results showed, in both cultures, that *cefEF* transcripts were increasing gradually to achieve their highest level at 48 h for SSF and 72 h for SmF (fig. 3). The fast CPC production onset correlates well with the peak of *cefEF* transcript level in each culture. Thus, transcription decreased faster in SmF than in SSF. In general, high transcription levels of this gene were observed in both solid and liquid culture.

#### *cefT* Gene Expression

Results show a high expression of *cefT* in both SSF and SmF transcripts (fig. 3). In both cultures, the levels of *cefT* transcripts were higher at the onset of the fermentation and lower towards the end. In SSF, the *cefT* transcript level seemed constant from 0 to 72 h, then began to decrease rapidly. In SmF, the highest level of *cefT* transcript was at 24 h, although its decrease was slower. *cefT* transcription differences between both systems were significant, being up to 6-fold higher in SSF than in SmF. These results indicate an increased export activity of the fungus in SSF as compared with SmF.



**Fig. 3.** Expression of (a) *cefD2*, (b) *cefEF*, (c) *cefT*, and (d) *18S* genes in SSF vs. SmF cultures. Left: CPC production curves of the mentioned cultures, indicating the corresponding times of samples (left SSF, right SmF), pH, and the relative expression (RE) of genes. Right: densitometry analysis of RT-PCR products: SSF dark bars, SmF clear bars. To normalize the results, the optical density of

each transcript was divided by the optical density of the *18S* ribosomal RNA (external standard). Transcription levels are given in relative units, values showing the same relative volume of cDNA (obtained from Image Lab Software) for each gene were designated as the unit.

## Discussion

Given the evidence found, the pH is an important parameter when CPC biosynthesis is studied, since we observed that the production of this antibiotic only takes place in a defined pH range. The feasibility of establishing a 2.5× phosphate-buffered concentrated SmF medium allowed us to perform a precise comparison between CPC production physiology in SSF and SmF. The comparative experiment SmF versus SSF in 2.5× PM showed that antibiotic synthesis occurred at fairly the same pH range (6.4–7.8) observed earlier for the SmF [Cuadra et al., 2008]. These facts show that, even in different culture systems, pH measurements are comparable. More importantly, it shows that the same correlation between medium pH and CPC production exists in both culture systems.

Some other important features observed in the SmF versus SSF comparison were that *A. chrysogenum* growth and CPC production were slower in SSF than in SmF when the solid-state culture was at pH values <6.4, but these same activities were faster in SSF at a higher pH. Larger amounts of penicillin N were observed only in SmF at the time of maximum CPC production rate, suggesting a better transformation of intermediates in SSF that helps to overcome the limiting step from penicillin N to deacetoxy-CPC, or the previous one from isopenicillin N to penicillin N [Rodríguez-Sáiz et al., 2004; Skatrud and Queener, 1989; Ullán et al., 2004; Zhou et al., 1992].

Even though production of CPC in SmF seems to be growth-linked (fig. 2), respirometry measurements in SSF indicated that the production of CPC in this system does not start until the end of the fast O<sub>2</sub> uptake, which is an important feature that had been observed already in respirometric studies on penicillin production in SSF [Dominguez et al., 2000]. This indicates that respirometry is a very efficient method to determine the onset of secondary metabolism.

Since hybridization probes with the  $\gamma$ -actin *actA* gene of *A. chrysogenum* showed differential expression along fermentation times in a previous work (data not shown), and actin genes are unsuitable controls for semiquantitative RT-PCR or quantitative real-time PCR in other experiments [Huggett et al., 2005; Radonić et al., 2004; Selvey et al., 2001], we chose the *18S* and *gpd* genes as external standards because of their potential as constitutive expression markers. There was no significant difference between the expression profiles of both genes. However, we only considered the *18S* to normalize the results of *cefD2*, *cefEF*, and *cefT* relative expression, although the *gpd* gene could be used with fairly the same results.

There are few studies about gene expression in SSF [Barrios-González et al., 2008; te Biesebeke et al., 2005], and some of the data presented correspond to very early and short fermentation periods (<48 h in te Biesebeke et al. [2005]). Our work is the first to study secondary metabolites produced in SSF using sugarcane bagasse as impregnated support, which resulted in some deficiencies in the quality of the extracted RNA, especially in later times of the culture. Similar to the observation by Barrios-González et al. [2008], a high proportion of carbohydrates and pigments are extracted together with RNA at late culture times (96–144 h), which dictated the need of extra purification steps in comparison to SmF samples.

The physiological effect of a liquid environment on filamentous fungal growth and product formation has been extensively studied in SmF [Duménil and Sanglier, 1989; Smith and Berry, 1976]. The little available information of solid-state environment on these parameters [Barrios-González et al., 2008; te Biesebeke et al., 2005] indicates differences in gene expression that produces so different solid-medium physiological features that can enable microorganisms to produce enzymes with very different characteristics from those recognized in SmF [Acuña-Argüelles et al., 1995; Alazard and Raimbault, 1981]. Our study on the CPC biosynthesis-related genes expression in the SmF versus SSF showed the existence of higher expression levels of the genes encoding for epimerase, expandase/hydroxylase and metabolites exporting activities in SSF, probably explaining the increased CPC production in this system [Adinarayana et al., 2003].

The *A. chrysogenum cefD2* gene encodes the isopenicillin N-CoA epimerase protein, whose activity is similar to the epimerase activity systems involved in degradation of unusual fatty acids or other toxic metabolites in eukaryotic cells [Knihinicki et al., 1991; Schmitz et al., 1995; Shieh and Chen, 1993]. Ullán et al. [2004] reported that the reaction in which this enzyme is involved is a limiting step in CPC production in SmF. This limitation was also observed in our SmF versus SSF experiment, where the *cefD2* gene showed from 2- to over 10-fold higher expression in SSF than in SmF, concurring with a better intermediate transformation in the CPC biosynthesis pathway during the culture (fig. 3).

Likewise, the reactions catalyzed by the product of the *cefEF* gene are limiting steps in the production of CPC, contributing to the accumulation of penicillin N [Skatrud and Queener, 1989] and its catalytic activities require  $\alpha$ -ketoglutarate, Fe<sup>2+</sup> and O<sub>2</sub> [Dotzlaw and Yeh, 1987]. Therefore, in accordance with previous hypotheses about the advantages of SSF, relying on oxygen sup-

ply, significant differences were found in the transcript levels of the *cefEF* gene (encoding for an oxygen-limited biosynthetic step) between liquid and solid cultures. In the present work, transcription of the *cefEF* gene was higher in SSF than in SmF, indicating a positive effect of the oxygen availability upon the transcription of this gene in solid culture. In addition, *cefEF* transcription correlated well with the O<sub>2</sub> uptake profile, in the case of solid culture. However, it is also possible for SSF to promote CPC biosynthesis at the expandase/hydroxylase enzymatic activity level, by contributing to a better conversion of the intermediary during CPC biosynthesis in this culture type. No relationship between pH kinetics and expression profile was found. However, expression analysis of the *cefEF* gene yielded very similar results to those reported by Schmitt et al. [2001] with an improved strain, which showed a similar pattern of *cefEF* transcript throughout the culture time.

*cefT* has been described as the gene that encodes a protein within the family of membrane proteins, MFS (major facilitator superfamily), a multidrug efflux pump. This membrane transporter confers resistance to isovaleric and phenylacetic acids [Ullán et al., 2002]. It has been mentioned earlier that the differences between submerged and solid-state cultures include physical conditions that necessarily involve differences in the transcriptional regulation of genes involved in metabolic processes [Akao et al., 2002; Te Biesebeke et al., 2005; Barrios-Gonzalez, 2012, and references therein]; our study is the first evidence that confirms this hypothesis by pointing out the superiority of SSF on the expression of a gene related to the export of substances from the cell. Moreover, if we consider the possibility suggested by Ullán et al. [2002] that this gene could encode a sensor, this gene expression in SSF could indicate the existence of extracellular signals that stimulate the synthesis of CPC in this system and not in SmF.

Data obtained in this work will be useful to understand the molecular basis of the physiology when producing CPC in any of the studied culture systems, providing a focus on target genes to perform a specific genetic improvement of *A. chrysogenum*.

## Experimental Procedures

### Microorganisms

*A. chrysogenum* C10 (ATCC 48272) was used for CPC production. *Escherichia coli* ESS 2231, a  $\beta$ -lactam-sensitive strain, was used for routine CPC bioassays.

### Inoculum Preparation

*A. chrysogenum* was grown in LPE medium [LePage and Campbell, 1946] at 28°C. After 7 days, the whole content of six Petri dishes was transferred to 100 ml of modified seed medium [Adinarayana et al., 2003] in a 500-ml flask. The composition of modified seed medium was (g/l): dextrose 10, corn steep solids 5, soluble starch 15, yeast extract 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, CaCO<sub>3</sub> 1, pH 7.0. *A. chrysogenum* was incubated in this medium on a rotary shaker at 200 rpm and 25°C for 38 h.

### Fermentation Conditions

The PM used in SmF was a modification of the one used by Caltrider and Niss [1966]. The same seed medium was used for SSF. The composition of the PM was (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.13 (notice that 0.075 M phosphate buffer becomes 0.1875 M in 2.5-fold medium), corn steep solids 5, sugarcane molasses 30, meat extract 30. Final pH was 5.8.

### SmF

2.5× PM was seeded with the inoculum at 10% (10 v/v). The cultures were incubated in triple-baffled 500-ml flasks containing 90 ml of PM, at 250 rpm and 25°C. Three independent flasks were analyzed for each sample point.

### SSF

Sugar cane bagasse was used as support for SSF. The bagasse was pretreated as previously described [Barrios-González et al., 1988], and impregnated to 70% initial moisture content with 2.5× concentrated PM with the inoculum. The inoculum prepared as previously described consisted of 0.1% mycelium (dry weight mycelium/wet weight support). Solid inoculated medium (12 g) was placed into a 16-cm long and 2.2-cm diameter glass column, at a packing density of 0.26 g/ml. Columns were incubated under non-aseptic conditions, as described previously [Barrios-González et al., 1988] at 25°C with a wet air flow rate of 0.45 l/h·g dry matter. Three independent columns were analyzed for each sample point. This process is performed under non-sterile conditions; however, due to the solid medium environment and to the heavy inoculum, it proceeds as a pure culture [Raimbault and Alazard, 1980].

### Analytical Methods

#### SmF

Samples were filtered to separate the biomass. The filtrate was used to measure pH, total sugars, and CPC concentration. In order to quantify growth in SmF, the biomass in the filter was washed with 50 ml of sterile saline solution and dried at 60°C to constant weight.

#### SSF

The solid culture of each column was homogenized by mixing thoroughly. One gram of solid culture from each column was suspended in 6 ml of potassium phosphate buffer (pH 5.5, 0.01 M) and the mixture shaken and centrifuged at 2,700 rpm. The filtrate was used to quantify total sugars and CPC. Growth in SSF was measured indirectly by oxygen uptake and carbon dioxide production using a gas chromatograph as described before [Dominguez et al., 2000]. Growth in SSF was also measured indirectly by glucosamine determination in SmF and SSF, as described previously [Tomaselli et al., 2001], conversion of glucosamine into dry biomass was made to establish the ratio of microgram glucosamine/milligram dry mycelium.

**Table 2.** Oligonucleotides used in this work for RT-PCR analysis

Gene	Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')	Location	Source sequence
18S	18Sf	TGGTGATTCATGATAACTTCTCG	18S (pos 189–211)	U43971.1
	18Sr	CCACACGTCCTATTTTATTATTCC	18S (pos 749–772)	
<i>gpd</i>	<i>gpdf</i>	CGTCGAGGTCGTTGCTGTC	<i>gpd</i> (pos 845–863)	E03375.1
	<i>gpd</i> r	CGTTGAGGTCGGGGATGA	<i>gpd</i> (pos 1640–1657)	
<i>cefD2</i>	<i>cefD2</i> f	TCCCGCCGGCCAACATCCTC	<i>cefD2</i> (pos 888–906)	AJ507632
	<i>cefD2</i> r	GTCCGCCCGTCCAATCACC	<i>cefD2</i> (pos 1447–1466)	
<i>cefEF</i>	<i>cefEF</i> f	CTGCCCGGCCTCTGCTGATG	<i>cefEF</i> (pos 2274–2293)	AJ404737
	<i>cefEF</i> r	CCGTACGGGGCCAAGTTTCCTC	<i>cefEF</i> (pos 2994–3015)	
<i>cefT</i>	<i>cefT</i> f	GCCTTCTCCGCGCCGATGACT	<i>cefT</i> (pos 1116–1136)	AJ487683
	<i>cefT</i> r	CAGCACGCCGAGACACGACAC	<i>cefT</i> (pos 1648–1669)	
<i>gpd</i> (intronic)	<i>gpd-intf</i>	CATTACCCCTCCATAACCTCTG	<i>gpd</i> (pos 907–928)	E03375.1
	<i>gpd-intr</i>	CGTTGTTAGTTGTTTCGTTCTGC	<i>gpd</i> (pos 1829–1851)	

For moisture determination (SSF), 2 g of the solid culture was weighed and dried at 60°C until constant weight, and moisture percent was determined according to the following calculation: sample wet weight – sample dry weight/sample wet weight × 100.

The pH was determined from the supernatant obtained after the addition of 10 ml of distilled water to 1 g of the solid culture and 10-min agitation (SSF), or on the filtrate of SmF samples, using a pHmeter (Orion 410a; Orion Research Inc., Beverly, Mass., USA).

After acid hydrolysis of the samples (SmF filtrates, and SSF extracts), total sugars were quantified, following the procedure described previously [Miller, 1959].

CPC production was determined by bioassay using *E. coli* ESS 2231 as the test strain on plates with penicillinase (obtained from *Bacillus cereus*) as described previously [Gutiérrez et al., 1997].

#### Isolation of *A. chrysogenum* Genomic DNA and RNA.

##### Semiquantitative RT-PCR Expression Analysis

DNA from *A. chrysogenum* was extracted as previously described [Gutiérrez et al., 1991] for PCR amplification assays. Total RNA was obtained by using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) and following the manufacturer's instructions. For SSF, two previous centrifugation steps were required to obtain a clean sample. RNA purification of 144-hour samples was particularly difficult, since the mycelium accumulated pigments and there was carbohydrate copurification, hence, an extra phenol extraction step was needed. Integrity of RNA was checked in formaldehyde-agarose gels and quantified in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Hudson, N.H., USA). RNA samples were diluted and subsequently treated with DNase I (Promega, Madison, Wisc., USA).

RT-PCR reactions were performed for analysis of genes *18S*, *gpd*, *cefD2*, *cefEF*, and *cefT* by using the primers included in table 2. Reactions were carried out in accordance with the manufacturer's instructions for using the Q solution protocol of the OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA) using 50–100 pg of *A. chrysogenum* C10 RNA. The following conditions were

used: 30 min at 50°C, 15 min at 95°C, 31 cycles for *cefT* gene or 36 for the rest (previous experiments were tested) consisting of 1 min at 94°C, 45 s at 68°C (for *cefD2*, *cefEF* and *cefT* genes) or 65°C (for *18S* and *gpd*) and 1 min at 72°C, followed by one cycle of 8 min at 72°C. An additional RT-PCR reaction was performed as negative control for DNA genomic presence using primers designed from a region comprising intronic sequences of the *gpd* gene (see table 2). Ribosomal 18S RNA gene (*18S*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gpd*) were used as external standards for semiquantitative RT-PCR analysis.

The RT-PCR products were loaded onto 1% agarose gels and electrophoresed at 90 V during 60 min. Gels were stained during 20 min in 1% ethidium bromide and photo-documented using a Gel Doc EZ imaging system (BioRad Inc., Hercules, Calif., USA). Relative expression was measured using the Image Lab Software (BioRad Inc.) and the resulting values for *cefD2*, *cefEF*, and *cefT* genes were normalized with those obtained for the *18S* or *gpd* genes as external controls.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from CONACYT (Projects 36801-B, 54662, and 82647). T. Cuadra acknowledges the scholarships received from FANTEL (BEA101-PE-078) and Mexican Government SRE.

#### References

- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G, Favela-Torres E: Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43:808–814.

- ▶ Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V, Jhansi Lakshmi P: Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid-state fermentation of *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochem* 2003;39:171–177.
- ▶ Akao T, Gomi K, Goto K, Okazaki N, Akita O: Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr Genet* 2002;41:275–281.
- ▶ Alazard D, Raimbault M: Comparative study of amyolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1981;12:113–117.
- ▶ Baños JG, Tomasini A, Szakács G, Barrios-González J: High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng* 2009;108:105–110.
- ▶ Barrios-González J: Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem* 2012;47:175–185.
- ▶ Barrios-González J, Baños JG, Covarrubias AA, Garay-Arroyo A: Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;79:179–186.
- ▶ Barrios-González J, Mejía A: Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnol Annu Rev* 1996;2:85–121.
- ▶ Barrios-González J, Tomasini A: Production of aflatoxins in solid-state fermentation. *J Sci Ind Res* 1996;55:424–430.
- ▶ Barrios-González J, Tomasini A, Vinięgra-González G, López L: Penicillin production by solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 1988;10:793–798.
- ▶ Caltrider PG, Niss HF: Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl Microbiol* 1966;14:746–753.
- ▶ Cuadra T, Fernández FJ, Tomasini A, Barrios-González J: Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production on solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Lett Appl Microbiol* 2008;46:216–220.
- ▶ Domínguez M, Mejía A, Barrios-González J: Respiration studies of penicillin solid-state fermentation. *J Biosci Bioeng* 2000;89:409–413.
- ▶ Dotzlaf JE, Yeh W-K: Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *J Bacteriol* 1987;169:1611–1618.
- Duménil G, Sanglier JJ: Physiologie de la production d'antibiotiques; in Larpent JP, Sanglier JJ (eds): *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris, Masson, 1989, pp 195–217.
- ▶ Fierro F, Barredo JL, Diez B, Fernández FJ, Martín JF: The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6200–6204.
- ▶ Gutiérrez S, Diez B, Álvarez E, Barredo JL, Martín JF: Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N-acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol Gen Genet* 1991;225:56–64.
- ▶ Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Diez B, Barredo JL, Martín JF: Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:606–614.
- ▶ Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279–284.
- ▶ Jekosch K, Kück U: Glucose-dependent transcriptional expression of the *creI* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. *Curr Genet* 2000;37:388–395.
- ▶ Knihinicki RD, Day RO, Williams KM: Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1905–1911.
- ▶ LePage GA, Campbell E: Preparation of streptomycin. *J Biol Chem* 1946;162:163–171.
- ▶ Miller GL: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt Chem* 1959;31:426–429.
- ▶ Newbert RW, Barton B, Greaves P, Harper J, Turner G: Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19:18–27.
- ▶ Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;303:856–862.
- ▶ Raimbault M, Alazard D: Culture method to study fungal growth in solid-state fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1980;9:199–209.
- ▶ Rodríguez-Sáiz M, Lembo M, Bertetti L, Muraca R, Velasco J, Malcangi A, de la Fuente J, Barredo JL: Strain improvement for cephalosporin production by *Acremonium chrysogenum* using geneticin as a suitable transformation marker. *FEMS Microbiol Lett* 2004;235:43–49.
- ▶ Samson SM, Dotlaf JE, Slisz ML, Becker GW, van Frank RM, Veal LE, Yeh W, Miller JR, Queener SW, Ingolia TD: Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Biotechnology* 1987;5:1207–1214.
- ▶ Schmitt EK, Hoff B, Kück U: Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004;88:1–43.
- ▶ Schmitt EK, Kempken R, Kück U: Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol Genet Genomics* 2001;265:508–518.
- ▶ Schmitz W, Albers C, Fingerhut R, Conzelmann E: Purification and characterization of an  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem* 1995;231:815–822.
- ▶ Selvey S, Thompson EW, Matthaai K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR:  $\beta$ -Actin – an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2001;15:307–311.
- ▶ Shieh WR, Chen CS: Purification and characterization of a novel 2-arylpropionyl-CoA epimerases from rat liver cytosol and mitochondria. *J Biol Chem* 1993;268:3487–3493.
- ▶ Skatrud PL, Queener SW: An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene* 1989;79:331.
- Smith JE, Berry DJ: *An Introduction to Biochemistry of Fungal Development*. New York, Academic Press, 1976.
- ▶ Suárez T, Peñalva MA: Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol Microbiol* 1996;20:529–540.
- ▶ Te Biesebeke R, van Biezen N, de Vos WM, van den Holden CA, Punt PJ: Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:75–82.
- ▶ Tomaselli SC, Vergoignan C, Feron G, Durand A: Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid-state cultivation conditions. *Biochem Eng J* 2001;7:1–5.
- ▶ Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L, Martín JF: Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis. *Mol Genet Genomics* 2004;272:562–570.
- ▶ Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S, Martín JF: A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J Biol Chem* 2002;277:46216–46225.
- ▶ Valegård K, Terwisscha van Scheltinga AC, Dubus A, Ranghino G, Oster LM, Hajdu J, Andersson I: The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:95–101.
- ▶ Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C, Martín JF: Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC* and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J Bacteriol* 1994;176:985–991.
- ▶ Walz M, Kück U: Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Curr Genet* 1993;24:421–427.
- ▶ Zhou W, Holzhauer-Rieger K, Dors M, Schügerl K: Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C. *Enzyme Microb Technol* 1992;10:848–854.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00145

Matrícula: 208381745

EFFECTO DE LA REGULACION POR pH Y LA EXPRESION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION PacC SOBRE LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS EN *Acremonium chrysogenum*

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 9 del mes de diciembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ  
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO  
DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL



ALBERTO CRISTIAN LOPEZ CALLEJA  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ALBERTO CRISTIAN LOPEZ CALLEJA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

VOCAL

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

SECRETARIO

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL