

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Incremento en la dosis génica (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) en
Penicillium chrysogenum para elevar la producción de penicilina
G en fermentación sólida y líquida

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M en C. Carolina Campos Muñiz

Director: Javier Barrios González

Julio 2009

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

Este trabajo además contó con el apoyo de CONACYT, con el proyecto “Desarrollo de estrategias moleculares para el mejoramiento genético de *P. chrysogenum*” con número 3143-B

México D.F. a 21 de Julio del 2009

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

**Incremento en la dosis génica (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) en *Penicillium
chrysogenum* para elevar la producción de penicilina G en fermentación sólida
y líquida**

que presentó

Carolina Campos Muñiz

Comité Tutorial

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesora: Dra. Adriana Garay Arroyo

Jurado

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino _____

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez _____

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro _____

Vocal: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura _____

DEDICATORIA

**A Carolina y Héctor Alberto
Que son la esencia de mi vida**

**A Héctor
Por compartir parte de mi vida**

A una persona maravillosa: Mi Madre

**A Adrián, Gerardo, Charito, Cristina,
José Manuel, Rosa Alma y a Vicky,
Con quien he compartidos momentos inolvidables.**

**A mis grandes amigos: Miriam,
Nallely, Viridiana, Consuelo, Ariel.**

A dos grandes hombres: Juan y Raúl con cariño

A mis sobrinos, que son los jóvenes del mañana

AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por ser una casa abierta al
tiempo.**

Ya que no encuentro una forma de agradecerles, quiero que sientan que el objetivo logrado también es parte de ustedes.

Al Dr. Javier Barrios González

De manera especial gracias, por su permanente disposición, desinteresada ayuda y sus valiosos aportes para la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino

En este espacio especial deseo agradecerle la grandeza de ser humano y científico, por su asesoría y estímulo no solo a mí sino a todos los estudiantes que hemos aprendido de Usted.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro

Por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un momento preciso.

Al Dr. Armando Mejía Álvarez

Por la revisión de este trabajo, y por todo el apoyo al interior de su laboratorio.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Por su generosidad y aportación a la revisión de este trabajo, aunado a sus valiosas críticas.

A la Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

Por tu calidez y apoyo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de nuestros experimentos.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la producción de penicilina por sobreexpresión de genes de la ruta de la biosíntesis de penicilina en cepas de *Penicillium chrysogenum* de baja (Wisconsin 54-1255) y de alta (P2-32) producción. Se llevó a cabo la siguiente estrategia para elevar la producción: inicialmente, se

identificaron los genes responsables de la biosíntesis, en una biblioteca genómica de *P. chrysogenum* ligada a un cósmido (IztapaCos). El conjunto de los tres genes de biosíntesis de penicilina fueron detectados mediante sondas marcadas que corresponden a los extremos del grupo (genes *pcbAB* y *penDE*). Los genes fueron aislados de las colonias de *E. coli* que resultaron positivas, utilizando el método de lisis alcalina, y posteriormente se transformaron las cepas Wisconsin 54-1255, P2-32 y *npe10* (control) con el “cluster” o conjunto de genes. Las cepas transformadas fueron identificadas mediante resistencia a fleomicina, ya que el vector contiene un gen de resistencia para este antibiótico. Para una primera elección de las mejores transformantes se realizaron bioensayos en cilindros de agar, y fueron elegidas para los estudios en fermentación líquida y sólida las que produjeron mayor concentración de penicilina con respecto a la cepa parental. Considerando la producción basal de penicilina de las cepas controles, se obtuvieron los siguientes resultados: en la cepa P2-32 se presentó mayor producción en las transformantes en los dos tipos de fermentación, con un 158.38% en fermentación líquida y 92.92% en sólida, con respecto a la cepa Wisconsin en la que la producción en fermentación sólida fue del 67.3%. Los resultados mostraron que al incrementar el número de copias de los genes se incrementó la producción de penicilina.

Abstract

The present study focuses on the evaluation of penicillin production by low (Wisconsin 54-1255) and high (P2-32) yielding *Penicillium* strains, where genes from this antibiotic's biosynthetic-cluster were over-expressed. The following strategy to

increase the production was developed: The biosynthesis genes were identified in a *P. chrysogenum* genomic library linked to a cosmid (Iztapacos). The set of these three genes was detected by the use of radioactively-marked probes corresponding to the terminal sequences of the set (*pcbAB* and *penDE*). These genes were isolated from the *E. coli* colonies that resulted positive, using the alkaline lysis method. After the isolation, transformations of the Wisconsin 54-1255, P2-32 and *npe10* (control) *Penicillium* strains with the “cluster” or gene set were achieved. Transformant strains were identified through phleomycin resistant, since the vector contains a gene for this antibiotic resistance. Initial choice of best transformants was conducted by agar-cylinders bioassays, those strains showing higher penicillin yields in comparison to the parental strain were selected for further studies in liquid and solid-state fermentations. Considering the basal penicillin production of parental strains, the following results were observed: The strain P2-32 showed an improved production in both types of fermentation, achieving yields 158.38% and 92.92% higher in liquid and solid-state fermentation respectively, in comparison to the Wisconsin’s yields where an improvement of 67.3% in the solid-state fermentation was observed. These results showed that by increasing the number of gene copies penicillin production is also increase

ÍNDICE

1. Introducción	1 - 25
1.1 Reseña histórica sobre el descubrimiento de la penicilina	1 - 2
1.2 Metabolismo: metabolitos secundarios	2 - 3
1.3 Estructura, morfología y ciclo parasexual de <i>Penicillium chrysogenum</i>	3 - 5
1.4 Estructura de la penicilina	5 - 6
1.5 Antibióticos β -lactámicos	6
1.6 Fuentes de energía para la obtención de penicilina	6 - 7
1.7 Ruta biosintética de la penicilina	8 - 9
1.7.1 Precursores	8
1.7.2 Pasos iniciales en la formación de antibióticos β -lactámicos	8
1.7.2.1 Isopenicilina N sintetasa: cierre del anillo	8
1.7.2.2 Acil-transferasa: Incremento en la hidrofobicidad y actividad antimicrobial.	9
1.8 Genes y enzimas involucrados en la biosíntesis	9 - 12
1.8.1 El gen <i>pcbAB</i> codifica para la ACV sintetasa	10
1.8.2 El gen <i>pcbC</i> codifica para la isopenicilina N sintetasa (IPNS).	11
1.8.3 El gen <i>penDE</i> codifica para la isopenicilina N aciltransferasa.	11 - 12
1.9 Regulación molecular de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos	12 - 13
1.10 Programas de desarrollo de cepas y mejoramiento genético	13 - 19
1.10.1 Mutación y selección y rastreo	14 - 16

1.10.2 Recombinación	17
1.10.3 Caracterización de mutantes sobreproductoras	17
1.10.4 Técnicas de ingeniería genética: sobreexpresión de genes	17 - 19
1.11 Tecnología de la fermentación	19 - 22
1.11.1 Fermentación líquida y fermentación sólida	20
1.11.1.1 Fermentación líquida (FL)	20 - 21
1.11.2 Fermentación sólida (FS)	21 - 22
1.12 Mejoramiento de cepas en Fermentación Sólida (FS)	22 - 25
1.12.1 Ventajas de la FS	23
1.12.2 Desventajas de la FS	23 - 24
1.12.3 Beneficios Biológicos	24
1.12.4 Procesamiento	24
1.12.5 Consecuencias	25
1.12.6 Aplicaciones comunes	25
2. Justificación	26
3. Hipótesis y objetivos	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
4. Material y método	28 - 58
4.1. Microorganismos	28
4.1.1. Cepas bacterianas	28
4.1.2. Cepas fúngicas	28
4.2. Vectores	29
4.3. Conservación y almacenamiento de cepas	30

4.3.1 Cepas bacterianas	30
4.3.2 Hongos	30
4.4.1 Reactivos específicos para biología molecular	30 - 32
4.4.1.1 Ácidos nucleicos: Marcadores de tamaño para electroforesis de agarosa	30 - 31
4.4.2.2 Oligonucleótidos sintéticos	31
4.4.2.3 Antibióticos	31
4.4.2.4 Enzimas	32
4.4.2.5 Isótopos radiactivos	32
4.5 Medios de cultivo	32 - 34
4.5.1 Medios de cultivo para bacterias	32 - 33
4.5.2 Medio de esporulación para <i>Bacillus subtilis</i> .	33
4.5.3 Medios de cultivo para <i>Penicillium chrysogenum</i>	33 - 34
4.6. Crecimiento de microorganismos	35
4.6.1 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	35
4.6.2. Crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i>	35
4.6.3 Condiciones para la esporulación de <i>Penicillium chrysogenum</i>	35
4.7 Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> por el método de cloruro de rubidio	35 - 36
4.8 Diseño de cebadores	36 - 39
4.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	36 - 37
4.8.2 Clonación del fragmento de PCR en el plásmido pGEM	37 - 39
4.9 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	39 - 44
4.9.1 Extracción mediante el uso de QIAEX II	40

4.9.2 Extracción del cósmido	41
4.9.3 Obtenciones de plásmido a pequeña escala (minipreparaciones)	42
4.9.4. Obtención de ADN total de <i>Penicillium chrysogenum</i>	43
4.9.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	44
4.10 Preparación de las muestras para electroforesis	44 - 46
4.10.1 Eliminación de ARN y desproteización del ADN	45
4.10.2. Digestión y modificación del ADN	45
4.10.3. Titulación de la biblioteca genómica	46
4.11 Transferencia de colonias de bacterias y placas para rastreo de la biblioteca genómica en cósmido.	46 - 50
4.11.1. Transferencia de geles a membranas de nylon	47 - 49
4.11.2. Marcaje de las sondas.	49
4.11.3 Hibridación	50
4.11.4 Lavado y autorradiografía	50
4.12 Transformación de <i>Penicillium chrysogenum</i>	50 - 55
4.12.1 Crecimiento del micelio	51
4.12.2. Obtención de protoplastos	52
4.12.3 Transformación de los protoplastos	52 - 53
4.12.4 Extensión en placa	53
4.12.5 El proceso de selección de los transformantes de <i>Penicillium chrysogenum</i>	53 - 54
4.12.6 Crecimiento en cilindros de agar y cuantificación de la producción de penicilina por bioensayos.	54

4.12.7 Cuantificación por bioensayo	54 - 55
4.12.8 Producción de penicilina en medio líquido y sólido	55
4.13 Cosecha de esporas de <i>P. chrysogenum</i>	55
4.13.1. Condiciones para la producción de penicilina en FL	56
4.13.1.1 Obtención del inóculo	56
4.13.2 Extracción de las muestras en medio líquido	56
4.13.3 Condiciones para la producción de penicilina G en sistema de fermentación sólida	56 - 58
4.13.4 Pretratamiento del soporte sólido	56 - 57
4.13.5 Producción de penicilina en FS	57
4.13.6 Extracción de las muestras en FS	57 - 58
5. Resultados	59 - 73
5.1 Obtención de sondas de los extremos del grupo de genes para la biosíntesis de la penicilina	59 - 60
5.2 Rastreo de la biblioteca genómica con las sondas <i>pcbAB</i> y <i>penDE</i>	61
5.3 Aislamiento del ADN de las colonias de <i>E. coli</i> que dieron positivo para ambas sondas.	61 - 63
5.4 Transformación de cepas de <i>P. chrysogenum</i> : <i>npe10</i> , Wisconsin 54-1255 y P2-32.	63
5.5 Análisis cualitativo por cilindros de agar.	64
5.6 Evaluación de producción de penicilina de los transformantes obtenidos de las cepas de Wisconsin 54-1255 y P2-32 en fermentación líquida y sólida	64 - 73

5.6.1 Fermentación líquida en la transformante de la cepa Wisconsin 54-1255 (T-Wis-5)	65 - 66
5.6.2 Fermentación sólida en Wisconsin 54-1255	67 - 68
5.6.3 Fermentación líquida en la cepa P2-32 (T-P2-5)	69 - 70
5.6.4 Fermentación sólida P2-32	70 - 72
5.6.5 Análisis estadístico de la producción específica de penicilina.	72 - 73
6. Discusión	74 - 78
6.1 Biblioteca genómica e identificación del grupo de genes de la biosíntesis de penicilina	74 - 75
6.2 Fermentación líquida y sólida e implicaciones genéticas	75 - 77
6.3 Implicaciones metabólicas	77 - 78
7. Conclusiones	79
8. Perspectivas	80
9. Bibliografía	81 - 90
10. Apéndice	
11. Artículos publicados	

11.1 Campos Carolina., Cuadra Tania Ethel, Rodríguez Gabriela., Fernández, Francisco J. (2007). Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Rev. Latinoamericana Micorbiol.* 49: 88-98.

11.2 Campos, Carolina., Fernández, Francisco J., Sierra, Edgar., Fierro, Francisco, Garay, Adriana., Barrios-González, Javier (2008) Improvement of penicillin yields in solid-state and submerged fermentation of *Penicillium chrysogenum* by amplification of the penicillin biosynthetic gene cluster. *World J Microbiol Biotechnol* 24:3017-3022.

Carolina 20/10/09 05:33 PM
Formatted: Line spacing: 1.5 lines

Carolina 20/10/09 05:33 PM
Formatted: Line spacing: 1.5 lines

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reseña histórica sobre el descubrimiento de la penicilina.

El descubrimiento de la penicilina es una de las más importantes adquisiciones de la terapéutica moderna, teniendo su origen en una observación fortuita. En septiembre de 1928, Sir Alexander Fleming, trabajando en el hospital Saint Mary en Londres comprobó, durante una investigación bacteriológica de un cultivo de colonias de estafilococos, que uno de los cultivos había sido contaminado accidentalmente por un microorganismo procedente del ambiente, un hongo, que fue identificado posteriormente como *Penicillium notatum*. Su meticulosidad le llevó a observar el comportamiento del cultivo, comprobando que alrededor de la zona inicial de contaminación los estafilococos habían desaparecido. Fleming interpretó correctamente este fenómeno, atribuyéndole al efecto de una sustancia antibacteriana secretada por el hongo (Fleming, 1929).

Un segundo capítulo en la historia de la penicilina comenzó en 1938, ya que una vez aislado este compuesto, Howard Walter Florey y Ernest Chain comenzaron en 1940 una investigación sistemática de sustancias antibacterianas (Florey, 1945). Este suceso dio pie a que la penicilina fuera aplicada a los seres humanos, creando las condiciones requeridas para la producción a gran escala del antibiótico. La situación bélica hizo que se requirieran altas concentraciones de penicilina, algo que en Gran Bretaña no fue posible conseguir. En junio de 1941, Florey y Norman G. Heatley, se dirigieron a Estados Unidos de América (EUA), a buscar alternativas para la producción a gran escala.

El Laboratorio de Investigación Regional del Norte (NRRL) en Peoria, Illinois (Rowlands, 1991), se interesó en la producción a gran escala del antibiótico. Robert Coghill, ayudante de la división de fermentados en el NRRL, se encargó de la producción en cultivos líquidos y desarrolló nuevas cepas, que posteriormente fueron modificadas en la Universidad de Wisconsin (Elander, 1985).

El impacto que tuvo el descubrimiento de la penicilina a nivel clínico fue tan importante que en EUA, en julio de 1943, se decidió invitar a las compañías farmacéuticas para incrementar la producción. Los cultivos de *P. chrysogenum*, fueron realizados en condiciones asépticas, se llevaron a cabo al principio en superficie y posteriormente en forma sumergida (Elander y Espenshade, 1985). El médico australiano Florey y el bioquímico alemán Ernst Boris Chain iniciaron una investigación detallada y sistemática de los antibióticos naturales, estudios que también promovieron la producción y el empleo médico de la penicilina.

El desarrollo de la penicilina incrementó el interés en la investigación en hongos, tanto en la industria como en las universidades de todo el mundo. El desarrollo del proceso de fermentación dio lugar a avances generales claves a nivel industrial, marcando el comienzo de los procesos eficaces de fermentación fúngica sumergida. La edad de oro de la genética microbiana clásica implicó, asimismo, técnicas de mutación y selección para incrementar la producción (Davis, 1949).

1.2 Metabolismo: metabolitos secundarios

En cultivos de hongos filamentosos, Bullock y col. (1965) han descrito el comportamiento de los microorganismos desde el punto de vista del metabolismo. A la fase logarítmica se le denomina trofofase, obteniéndose como resultado del metabolismo compuestos esenciales para el crecimiento o catabolismo energético (metabolitos primarios). La idiofase sería, por su parte, la fase del cultivo en donde los compuestos sintetizados no juegan un papel definido en el crecimiento celular: esta etapa se corresponde normalmente con la fase estacionaria.

El metabolismo secundario es característico de bacterias y hongos filamentosos, sintetizándose durante el mismo una gran variedad de compuestos. Algunos presentan actividades antimicrobianas que han permitido a los microorganismos competir en los hábitat naturales (Demain, 1980).

Vining (1990) propuso una serie de características para identificar a los metabolitos secundarios:

- Estructuras químicas con actividad biológica.
- No son esenciales para el crecimiento y son producidos por diversos microorganismos.
- Son derivados de intermediarios primarios y compuestos de una única vía biosintética. Comúnmente esta vía es larga y energéticamente costosa. Las enzimas frecuentemente requieren de sustratos específicos que catalizan las reacciones.
- La formación de los metabolitos está organizada por grupos de genes con mecanismos de regulación especial, cuyo control está determinado por el tiempo y el nivel de expresión de genes. Este mecanismo de control es una relación entre la fisiología y la producción de sustancias del mismo organismo.

Extensas investigaciones acerca de la genética y bioquímica de los metabolitos secundarios han mostrado que las características anteriormente mencionadas son también aplicables al metabolismo de los antibióticos β -lactámicos de hongos filamentosos.

El control del inicio del metabolismo secundario se ha investigado sobre todo en la industria de la fermentación, demostrándose que los precursores de los metabolitos secundarios inducen a la formación de compuestos diversos (Komatsu y col., 1975).

1.3 Estructura, morfología y ciclo parasexual de *Penicillium chrysogenum*

El hongo descubierto por Fleming fue caracterizado como *Penicillium notatum*, que se encuentra dentro de la clase de los deuteromicetos. Produce esporas asexuales, que se originan de una célula conidiogénica. El fialide esta constituido por células conidiógenas que se originan directamente del ápice de éste, en los niveles de las ramas (Wainwright, 1992).

1. INTRODUCCIÓN

Los conidios (esporas) de este género son aseptados, hialinos, pequeños; presentan varias formas, de globulada a cilíndrica, y su textura es de suave a rugosa. Las hifas miden generalmente de 0.5 - 1.0 mm de diámetro y se agregan formando el micelio (Deacon, 1984) (Figura 1.1). El micelio vegetativo normalmente se observa en cultivos de agar formando tapetes entretejidos; las conidiosporas crecen sumergidas, de manera perpendicular, o como una hifa aérea.

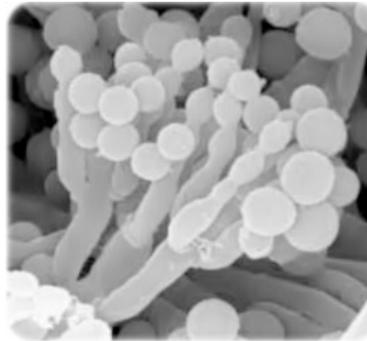


Figura 1.1 Conidióforo de *Penicillium chrysogenum*

La porción basal del septo es relativamente estrecha, de esta manera orienta la estructura hacia el ápice. Durante la germinación se produce un tubo germinativo que crece rápidamente a partir del extremo y que frecuentemente se ramifica, explorando el ambiente que le rodea, creciendo y alejándose de sus propios productos de desecho (quimiotropismo negativo) (Deacon, 1984).

Si una espора de *Penicillium* cae en un medio favorable, germina produciendo un micelio vegetativo del cual nacen los conidióforos, del que nacerán ramas y mótulas según la especie de que se trate y finalmente se formarán los esterigmas y los conidióforos, los cuales reiniciarán el ciclo asexual (Figura 1.2).

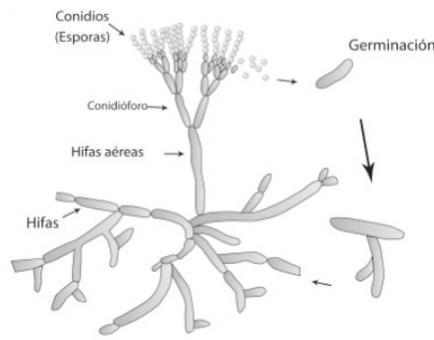


Figura 1.2 Ciclo biológico de *Penicillium chrysogenum*.

Hongos como *Penicillium chrysogenum* carecen de sexualidad, de forma que estas especies presentan un ciclo parasexual, mismo que ha proporcionado las bases para estudios genéticos y programas de mejoramiento genético. El ciclo se inicia con la fusión de hifas produciendo un heterocarionte, que en algunos casos es estable. El micelio se caracteriza por poseer dos tipos de núcleos distintos derivados de dos cepas haploides genéticamente diferentes.

1.4 Estructura de la penicilina

La penicilina fue cristalizada en 1943, y los estudios realizados mostraron que la penicilina G difería de la V (ésta última posee un grupo bencilo en lugar de un grupo 2-pentenilo). Esto es debido a que los microorganismos cultivados en medios suplementados con maíz macerado aportan un precursor de la cadena de fenilacetilo que aparece unido al grupo central.

La estructura de la penicilina comprende un grupo ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Batchelor y *col.*, 1959), formado por la fusión de un anillo de tiazolidina con otro β -lactámico (Figura 1.3) que sirve de protección. La posición 6-amino es una estructura que se deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico de los compuestos β -lactámicos. Este anillo puede tener una gran cantidad de sustituyentes acilo, que son los que definen las propiedades de cada tipo de antibiótico (Abraham y *col.*, 1949).

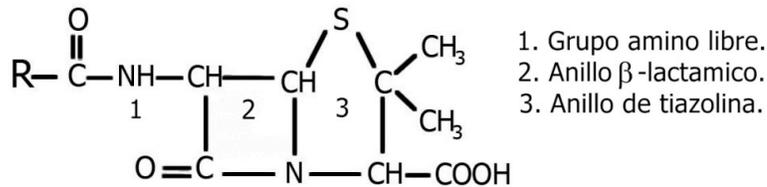


Figura 1.3 Estructura química de la penicilina

En ausencia de precursores de cadenas laterales en el medio de fermentación, se produce una mezcla de penicilinas naturales, aunque solo la bencilpenicilina (penicilina G) y la fenoximetil (penicilina V) son importantes terapéuticamente. El anillo β -lactámico es el responsable de la acción antibacteriana (Rowlands, 1991).

Aunque la penicilina G se produce de forma natural, se consigue mejor control con el proceso de fermentación, obteniéndose rendimientos mayores adicionando al medio como precursor el ácido fenilacético (Batchelor, 1959, Hersbach y col., 1984).

1.5 Antibióticos β -lactámicos

Uno de los grupos más importantes de antibióticos, tanto desde el punto de vista histórico como médico, es el de los antibióticos β -lactámicos (Aoki y Okuhara, 1980; Ingolia y Queener, 1989). Presentan una estructura característica: un anillo β -lactámico unido a un segundo anillo de cinco o seis carbonos. La presencia de un átomo de azufre en el segundo anillo proporciona características que diferencian a las penicilinas y cefalosporinas con respecto a otros β -lactámicos (Laich, 2002).

Los antibióticos β -lactámicos incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemos e inhibidores de la β -lactamasa, básicamente cualquier compuesto que contenga un anillo β -lactámico en su estructura molecular. Son ampliamente usados, como antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

1.6 Fuentes de energía para la obtención de penicilina.

P. chrysogenum requiere de carbono, nitrógeno (por ejemplo amonio, nitrato y nitrito), algunos aminoácidos, minerales, en ocasiones factores de crecimiento, agua y oxígeno para formar biomasa, y fuentes de energía para la

1. INTRODUCCIÓN

biosíntesis y el mantenimiento celular. La composición elemental de los medios de cultivo en la mayoría de los hongos es similar y, en consecuencia, puede utilizarse como punto de partida para diseñar un medio de fermentación óptimo. Los valores típicos de los elementos C, H, O, N y S son proporciones de 45, 7, 33, 10 y 2.5, respectivamente (Pateman y Kinghorn, 1976).

También son importantes los elementos traza como Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co, Mo y B y posiblemente otros metales. Algunos microorganismos crecen en medios que no contienen factores de crecimiento, mientras que otros necesitan medios complejos que contienen nutrientes específicos como aminoácidos (ej. L-histidina, L-glicina, L-isoleucina, L-lisina, L-leucina, L-metionina, y L-ornitina), vitaminas y nucleótidos. Aquellos que no requieren de estos suplementos tienen frecuentemente velocidades de crecimiento más elevadas en medios complejos (Nielsen, 1997).

Los factores de crecimiento específicos pueden añadirse al medio en forma de compuestos químicos puros (por ejemplo, biotina en fermentaciones para obtener ácido glutámico). Prácticamente en todas las fermentaciones industriales el carbono suministra la energía para el crecimiento, así como el carbono para la biosíntesis. Las concentraciones de elementos traza es crítica en algunas fermentaciones; para la producción de metabolitos secundarios es necesario que el contenido de fósforo inorgánico sea baja durante la fase de producción, interviniendo a veces el calcio en la precipitación del exceso de fosfato.

La concentración de elementos traza como hierro o zinc tiene efectos críticos en la producción de penicilina. En fermentaciones, se añaden precursores al medio que se incorporan directamente al producto, como el ácido fenilacético (principal precursor utilizado para la producción de bencilpenicilina por fermentación). Los requerimientos de minerales para el crecimiento de *P. chrysogenum* son S, P, K, Mg, Fe^{2+} , Zn y Mn^{2+} y Cu^{2+} (Nielsen, 1997).

1.7 Ruta biosintética de la penicilina.

1.7.1 Precursores

La ruta biosintética para la formación de penicilina ha sido estudiada por diversos autores, y los precursores de la estructura básica de todos los antibióticos β -lactámicos son los aminoácidos ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina, siendo las dos primeras reacciones enzimáticas compartidas para la síntesis de otros antibióticos (Luengo y Peñalva, 1993).

1.7.2 Pasos iniciales en la formación de antibióticos β -lactámicos.

La biosíntesis de la penicilina (Figura 1.4) inicia con la condensación no ribosomal de los tres aminoácidos precursores (ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina) para constituir el tripéptido α (L- α -aminoadipil)-L-cysteinil-D-valina (ACV). La síntesis de ACV se lleva a cabo en el citosol y está catalizada por la enzima ACV sintetasa (codificada por el gen *pcbAB*) (Martín y col., 2000). La enzima requiere de ATP para activar secuencialmente los tres aminoácidos para formar el aminoaciladenilato. La L-valina es epimerizada a la configuración de D-valina, y como consecuencia se unen los tres aminoácidos para formar el péptido L- δ (α -aminoadipyl)-L-cysteinil-D-valina. El péptido es liberado por una enzima que es una tioesterasa interna. La ACV sintetasa tiene tres dominios conservados de unos 1000 a.a. (Martín, 2000), cada uno de los cuales es el encargado de la activación de un aminoácido precursor.

1.7.2.1 Isopenicilina N sintetasa: cierre del anillo

La ciclación oxidativa del tripéptido para generar isopenicilina N (IPN) se lleva a cabo en el citosol y está catalizada por la enzima isopenicilina (IPN) sintasa (ciclasa), codificada por el gen *pcbC*. La dioxigenasa intermolecular requiere Fe^{2+} , oxígeno y ascorbato para su actividad. Esta enzima captura cuatro átomos de hidrógeno del tripéptido ACV, formando directamente una estructura bicíclica (anillo β -lactámico y tiazolidina) de isopenicilina N (Roach y col., 1995).

1.7.2.2 Acil-transferasa: Incremento en hidrofobicidad y actividad antimicrobial.

En esta última parte de la vía, *P. chrysogenum* tiene la capacidad de originar penicilinas de carácter hidrofóbico, con cadenas laterales largas procedentes de una gran variedad de ácidos carboxílicos presentes en el medio. La biosíntesis ocurre por sustitución de la cadena lateral de α -aminoadípilo de la isopenicilina N por un radical fenilacetilo procedente de CoA. Esta reacción es llevada a cabo por la acil-CoA: isopenicilina N aciltransferasa (Ramos y col., 1985; Carr y col., 1986).

Este último paso en la biosíntesis de penicilina está mediado por la acil-CoA:IPN aciltransferasa (Álvarez y col., 1987; Barredo y col., 1989; Martín y col., 1994; Tobin, 1993), que está codificada por el gen *penDE*. Consiste en la sustitución de la cadena lateral de L- α -aminoadípilo de la IPN por un grupo acilo hidrofóbico previamente activado en forma de acil-CoA por una acil-CoA ligasa específica (Martín y Liras, 1989). La formación del compuesto hidrofóbico penicilina se traduce en un marcado incremento en la actividad microbiana, en comparación con la isopenicilina N. Tanto la sustitución de la cadena lateral de la IPN como la activación del precursor acilo, se llevan a cabo en el interior de los peroxisomas (microcuerpos), en un ambiente ligeramente alcalino.

1.8 Genes y enzimas involucrados en la biosíntesis

El grupo de genes implicados en la síntesis de penicilina en *P. chrysogenum* se localizan en el cromosoma I, siendo el tamaño del genoma de 34.1 Mb (Fierro y col., 1993). Los 3 genes que codifican para las enzimas biosintéticas se encuentran organizados en un *cluster* génico (Fig. 1.4) localizado en una región de ADN de 17 kb (Díez y col., 1990; Smith y col., 1990) que sufre amplificación en tándem en las cepas de *P. chrysogenum* de alta producción (Fierro y col., 1995; Newbert y col., 1997).

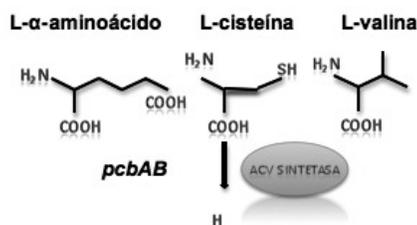


Figura. 1.4. Representación esquemática de la ruta de la biosíntesis de la penicilina. Primer paso regulado por la enzima ACV (*pcbAB*), el segundo paso por la isopenicilina N sintetasa (*pcbC*) y el tercero por la aciltransferasa (*penDE*).

1.8.1 El gen *pcbAB* codifica la ACV sintetasa

El gen *pcbAB* de *P. chrysogenum* codifica para a ACV sintetasa y fue clonado por complementación de dos mutantes, uno de los cuales es defectivo en actividad ACV sintetasa (Díez y col., 1990). Los estudios transcripcionales realizados con este gen llevaron a la observación de un transcrito de aproximadamente 11.5 kb, cuya secuencia codificante es de 11.376 pb. La enzima encargada de la formación del tripéptido (ACV sintetasa) requiere para su actividad, ATP y iones Mg^{2+} o Mn^{2+} . Tiene un peso molecular de 420 a 460 kDa (Banko y col., 1986 y 1987).

1.8.2 El gen *pcbC* codifica la isopenicilina N sintetasa (IPNS).

Este gen carece de intrones, se transcribe en un ARNm de 1.1 kb y codifica para un polipéptido de 37.9 kDa. Se encuentra localizado río arriba del gen *pcbAB*, aunque en sentido contrario, separados por una región intragénica de 1503 pb de longitud en la que se encuentran las regiones promotoras de los dos genes (Carr y col., 1986).

La isopenicilina N sintetasa tiene un peso molecular aproximado de 39 kDa, requiere de ditionitrito (DTT) para que se lleve a cabo su actividad, que es además estimulada por ascorbato e iones de Fe^{2+} . El gen *pcbC* carece de intrones, se transcribe un ARNm de 1.1 kpb y codifica para un polipéptido de 37.9 kDa, se encuentra localizado río arriba del gen *pcbAB*, sus regiones promotoras se localizan en una región intergénica de 1503 pb (Samsom y col., 1985).

1.8.3 El gen *penDE* codifica para la isopenicilina N aciltransferasa.

El gen que codifica para la isopenicilina N aciltransferasa es el *penDE* se

encuentra río abajo del gen *pcbC*. Se expresa en la misma dirección que éste y existe una región de 1.483 pb entre ambos, incluido el promotor de la transcripción. El gen *penDE* fue clonado por Barredo y col, (1989b) de la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78, utilizando una sonda obtenida a partir de la secuencia terminal de la subunidad de 29 kDa de la enzima purificada (Álvarez y col., 1993).

El gen se transcribe dando lugar a la aparición de un ARNm de 1.15 kb y una proteína de 357 aminoácidos con una masa molecular relativa de 39,9 kDa. (Montenegro, 1996). La aciltransferasa consiste en dos subunidades, una α -subunidad de 11 kDa y una β -subunidad de 29 kDa generadas por autoprosesamiento de la proteína de 40 kDa (Aplin y col., 1993a y Aplin y col; 1993b; Tobin y col., 1995).

Se ha demostrado que la actividad de la aciltransferasa se encuentra en el α - β -heterodímero (Álvarez y col. 1987; Tobin y col., 1993). Seis actividades catalíticas diferentes se le han asignado a la aciltransferasa: CoA:IPN, aciltransferasa (IAT), acil-CoA:6-APA aciltransferasa (AAT), IPN aminohidrolasa, penicilina transacetilasa penicilin aminohidrolasa y acil-CoA hidrolasa (Luengo, 1995; Álvarez y col., 1987 y 1993). *In vivo*, la aciltransferasa cataliza la remoción de la cadena de L-aminoadipilo de la isopenicilina N y su reemplazamiento por un ácido activado en forma de derivado de la CoA.

El gen *penDE* que codifica la Isopenicilina N aciltransferasa fue clonado por Barredo y col, (1989b) de la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78. La sonda nucleotídica se obtuvo a partir de la secuencia terminal de la subunidad de 29 kDa de la enzima purificada (Álvarez y col., 1987). Se encuentra río abajo del gen *pcbC* (Figura 1.5).

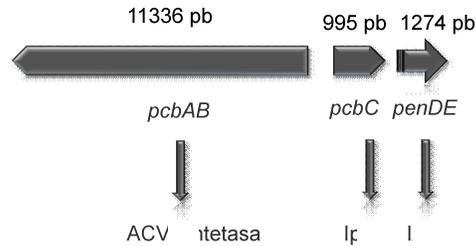


Figura 1.5 Esquema del cluster a la biosíntesis de penicilina

1.9 Regulación molecular de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos

La biosíntesis de penicilina está compartimentalizada en el interior celular, lo que significa que los procesos de transporte de las enzimas, precursores, intermediarios y productos se dan a través de los distintos compartimentos celulares. Esta organización subcelular de la biosíntesis de penicilina permite la separación espacial de los procesos, lo que indica que cada paso posee un entorno sujeto a diferentes procesos de regulación para conseguir óptimas condiciones (Müller y *col.*, 1992; Lendenfeld y *col.*, 1993).

Un análisis transcripcional del grupo de genes de la ruta de la biosíntesis de penicilina indicó que los genes *pcbC* y *pcbAB* son expresados desde una región del promotor bidireccional de 1013 pb. Los dos genes muestran un patrón similar de expresión y regulación temporal, lo que sugiere una expresión coordinada (Kosalková y *col.*, 2000).

En *P. chrysogenum* el pH alcalino regula de forma positiva los promotores de los tres genes de biosíntesis de penicilina. Se han reconocido siete sitios hipotéticos de unión a PacC (factor transcripcional encargado de la regulación por pH en la región intergénica *pcbC-pcbAB* (Tilburn y *col.*, 1995; Steidl y *col.*, 1999). También se han encontrado en dicha región seis sitios de unión de la proteína CreA responsables de la regulación catabólica por carbono; seis secuencias NRL involucradas en la represión por nitrógeno y seis cajas CCAAT, posibles sitios de unión de un regulador de amplio dominio AnCF (Steidl y *col.*, 1999).

Las cajas A y B forman un claro complejo proteína-ADN, que se mostró por cambios en la movilidad electroforética. Cuando se deletó la caja A decreció la actividad transcripcional del promotor en un 41%. Esta caja también contiene cuatro de los sitios CreA, cuya secuencia consenso es SYGGRG. La caja B contiene un sitio CreA, tres sitios hipotéticos PacC y está aparentemente rodeada por dos secuencias consenso NRE (Liras y Martín, 2006).

Las cepas de alta producción de penicilina de *P. chrysogenum* contienen entre 6 y 14 copias de los tres genes estructurales de la vía biosintética de la penicilina (*pcbAB-pcbC-penDE*), con una región amplificada de 56.8 kb. En esta región no existen genes esenciales para el crecimiento ya que las cepas que carecen de esta región son viables y fenotípicamente similares a las cepas parentales (*npe10*), con excepción de la falta de capacidad para sintetizar penicilina (Cantoral y col., 1993).

1.10 Programas de desarrollo de cepas y mejoramiento genético

Los hongos crecen a partir de una gran variedad de sustratos y sintetizan metabolitos en concentraciones bajas: Sin embargo, éstos pueden incrementarse obteniendo condiciones del cultivo. La productividad, de todas formas, se encuentra controlada por el propio genoma del organismo. Por ello, para aumentar la productividad potencial, el genoma debe modificarse, lo que puede lograrse mediante diversos métodos, que a continuación se describen.

1.10.1 Mutación, selección y rastreo

Una de las aplicaciones más sobresalientes de la mutación, selección y rastreo fue la producción a gran escala de penicilina, inicialmente en cultivos de superficie y más tarde a partir de cultivos sumergidos de *Penicillium* (Backus y

Stauffer, 1995). Los primeros ensayos se realizaron en la cepa original que aisló Fleming, *P. notatum* NRRL 124, clasificada como *P. notatum* Westling (Moyer y Coghill, 1946) con un rendimiento de 2 unidades internacionales 1-2 mg/l.

Posterior a este trabajo, en 1943 se aisló la cepa de *P. chrysogenum* NRRL-1951, que mostró ser adecuada para el cultivo sumergido. Con esta cepa se obtuvo un rendimiento de 120 UI/ml, lo que permitió abrir nuevos campos en la búsqueda de mejores cepas productoras. De esta cepa se obtuvo la mutante NRRL 1951.B25 que producía penicilina en una concentración mayor que la cepa original.

Después de varios años se aisló una nueva cepa la NRRL 832, que produjo un incremento mayor en cultivos de fermentación sumergida. Las investigaciones continuaron aislando nuevas cepas con altos títulos, como *P. chrysogenum* la que observó que las concentraciones de penicilina obtenidas fueron más altas que en *P. notatum* y que NRRL 832. La cepa, designada como NRRL 1951, produjo aún una mejor producción en cultivos sumergidos. De esta misma se encontraron subcepas mejores productoras (Raper y col., 1944; Backus y Stauffer, 1995).

La búsqueda de nuevas cepas fue realizada en la Universidad de Wisconsin, lo que permitió obtener una familia de cepas productoras con altos títulos de penicilina. Se obtuvo una mutante por rayos X denominada X-1612, que fue sometida a radiación UV y dio como resultado Wis Q-176, probablemente la mejor cepa productora reportada en la literatura. Otra cepa, extensivamente estudiada y empleada, es la Wisconsin 54-1255, derivada de la Wis Q-176 y que a su vez dio origen a la cepa Wisconsin A176, cuyo rendimiento era de 900 UI/ml.

Ya en compañías farmacéuticas se han aislado otras mutantes, capaces de producir 1000 veces más penicilina (Lein, 1986; Elander, 2003). En la figura 1.6 se muestra una compilación de varias fuentes (Backus y Stauffer 1995; Barredo y col., 1989a; Elander, 1983; Hynes y col., 1983) que representa el registro de los microorganismos productores de penicilina mejorados que han sido publicados. Esta relación, sin embargo, se encuentra incompleta, ya que las cepas con mayor

1. INTRODUCCIÓN

productividad son confidenciales y la información no es liberada por las compañías.

Las técnicas de mutación/selección se realizaron empleando rayos X, radiación UV de onda corta y mutágenos químicos, como metil-bis-(β -bis-cloroetil)amina, nitrosoguanidina, agentes alquilantes y nitritos, utilizados hasta los años setenta. Este programa es relativamente rápido y eficaz en la selección de las mejores cepas productoras de penicilina, sin embargo presenta desventajas derivadas de una mutación al azar de los organismos.

1. INTRODUCCIÓN

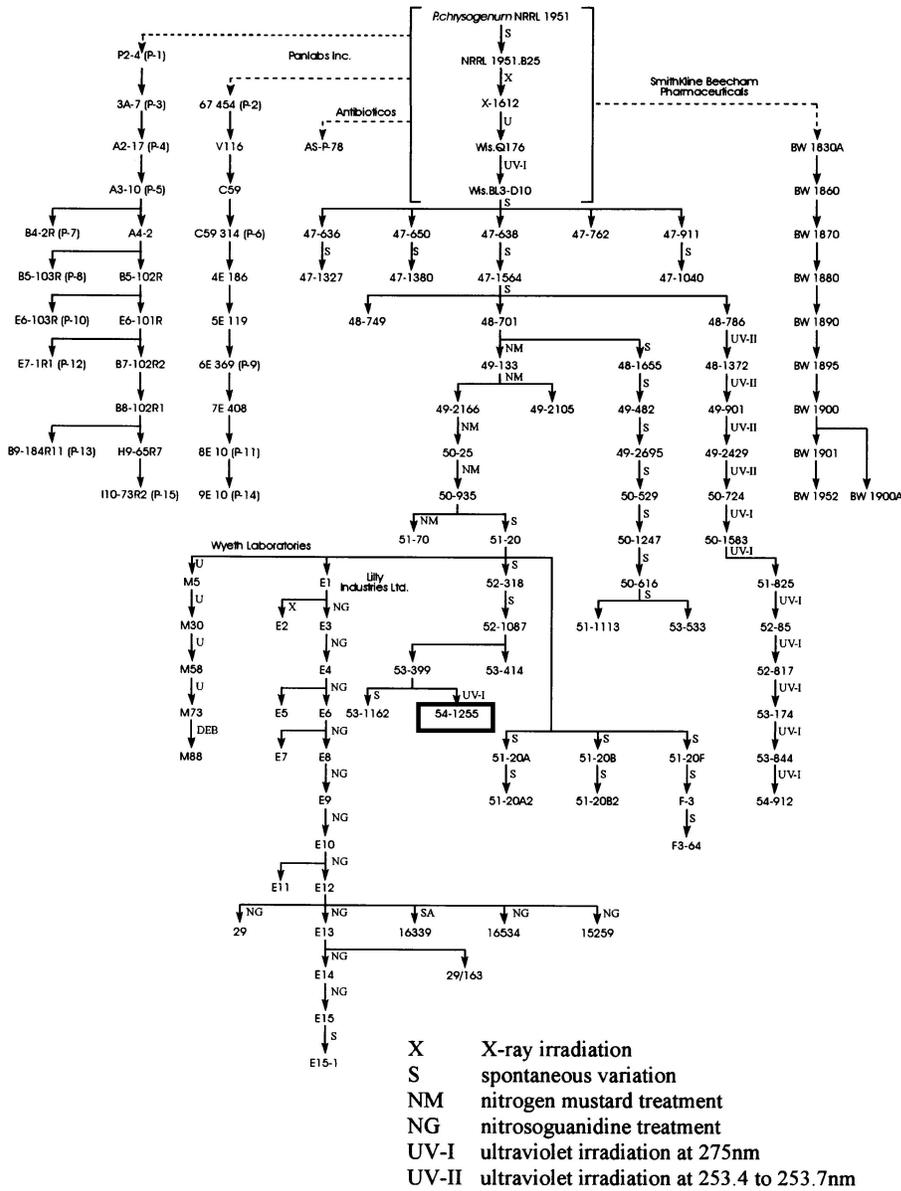


Figura 1.6 Linaje de cepas productoras de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (Backus y Stauffer, 1995., Barredo y col., 1989., Elander 1983; Lein 1986).

1.10.2 Recombinación

La recombinación se realiza *in vivo*, en los hongos asexuales como *P. chrysogenum* (MacDonald y Holt, 1976). El procedimiento de fusión de protoplastos ha mejorado las perspectivas para la combinación de caracteres que se encuentran en cepas productoras diferentes, este proceso se ha realizado en hongos filamentosos con el objetivo de incrementar la producción de lisina, entre otras. Chang y col., (1982) emplearon la fusión de protoplastos para combinar las propiedades adecuadas de dos cepas de *P. chrysogenum* productoras de penicilina G en una misma cepa. Lein (1986) describió el uso de la fusión de protoplastos para mejorar la producción de penicilina en los procedimientos aplicados por Panlabs Inc.

1.10.3 Caracterización de mutantes sobreproductoras

Los programas de clonación se concentraron en la caracterización de los tres genes responsables de la ruta de la biosíntesis de penicilina de *P. chrysogenum*. Los primeros estudios demostraron que al amplificar dos de los tres genes de la ruta de la biosíntesis, los niveles de producción de penicilina se elevaban. Este hecho estaría en concordancia con los estudios que han revelado que el número de copias de genes de penicilina de las cepas *P. chrysogenum* P-2 y AS-P-78 son de aproximadamente 9 y 6 respectivamente (Barredo, y col., 1989a; Fierro y col., 1995).

1.10.4 Técnicas de ingeniería genética: sobreexpresión de genes

Las cepas de hongos utilizadas frecuentemente para la producción industrial de metabolitos secundarios han sido modificadas en las últimas décadas por mutaciones y selección y recientemente con ingeniería genética. Con éstas se abrieron nuevas posibilidades para la mejora del rendimiento de producción de metabolitos, así como de otros productos de interés comercial. Estas técnicas se basan en analizar con detalle la secuencia de genes, utilizar la mutagénesis para

1. INTRODUCCIÓN

alterar sitios específicos, empalmar genes con promotores fuertes y sitios de unión a ribosomas, así como colocar en vectores genes multicopia, para aumentar la productividad por medio del aumento en la dosis de éstos.

Algunos estudios de hibridación del ADN total de cepas productoras de penicilina de baja, mediana y alta producción con sondas de los genes *pcbC*, *pcbAB* y *penDE* han mostrado que las cepas de mayor producción son aquellas que tienen integradas varias copias de los tres genes.

La cepa *P. notatum* (cepa aislada por Fleming) y la tipo silvestre *P. chrysogenum* NRRL 1951 contienen una sola copia de la región de 106.5 kb, flanqueada por una secuencia TTTACA/T (que parece ser una secuencia específica de recombinación). Algunas cepas de alta producción, como *P. chrysogenum* E1 contienen más copias repetidas de una región de 56.8 kb. Esta secuencia contiene genes de la biosíntesis de la penicilina y está unida a la misma secuencia TTTACA/T.

Conociendo la secuencia de los genes involucrados en la biosíntesis de penicilina (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) (Díez y col., 1990), diversos autores han realizado estudios en lo que se refiere a la sobreexpresión de éstos con diversas combinaciones.

Barredo (1990) insertó el gen *pcbC* en la cepa Wisconsin 54-1255. En este estudio no hubo un incremento notable en la producción de penicilina G, sin embargo si se incrementó ligeramente la biosíntesis entre las 30 y 80 h en fermentación líquida. Este autor argumentó que los resultados obtenidos se deben a que posiblemente la actividad de la isopenicilina N sintetasa no constituye un cuello de botella para que se de un incremento en la producción del antibiótico y que el aumento en la actividad enzimática no es suficiente para favorecer la biosíntesis de este compuesto.

Por otro lado, Veenstra y col (1991), mostraron que en 26 transformantes de la misma cepa modificada con un fragmento de ADN que contenía los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*, se observó un incremento, en comparación con los resultados obtenidos en los transformantes en los que se había integrado solamente el plásmido sin inserto. Los dos transformantes de mayor producción alcanzaban un incremento del 40% de penicilina V con respecto a la producción de las transformantes utilizados como control. La amplificación homogénea de los dos genes (y por lo tanto su expresión conjunta) parecería ser necesaria para conseguir una mejora en la producción de penicilina, al menos en la cepa utilizada.

En experimentos realizados en *Aspergillus nidulans*, al insertar el gen *pcbAB* la producción de penicilina se incrementó hasta 30 veces con respecto a las cepas originales (Kennedy y Turner, 1996). Por otro lado, al insertar el último gen de la ruta (*penDE*) de *P. chrysogenum* (Fernández, 1997) y *A. nidulans* (Fernández-Cañón Peñalva, 1995, Montenegro, 1996) por sí sólo no se obtuvo incremento en la producción de penicilina.

En un trabajo posterior, realizado en la cepa Wisconsin 54-1255 de baja producción de penicilina, la suposición del incremento conjunto y coordinado de los genes se confirmó, al introducir el "cluster" completo para la biosíntesis de penicilina (genes *pcbAB-pcbC-penDE*) (Theilgaard y col., 2001). Las transformantes que se obtuvieron mostraron incrementos desde 44 hasta 198% respecto de la cepa sin transformar.

1.11 Tecnología de la fermentación

La producción industrial de los antibióticos β -lactámicos utilizando hongos filamentosos es el resultado de años de esfuerzo de mejora mediante mutagénesis e ingeniería genética. Muchos de los productos bioquímicos producidos por hongos implican el crecimiento de especies seleccionadas de alta producción en un medio líquido.

1.11.1 Fermentación líquida y fermentación sólida

1.11.1.1 Fermentación líquida (FL)

La penicilina es generalmente producida en la industria por fermentación líquida, en presencia de nutrientes. Este sistema ha sido implementado para la producción industrial, en la que se utiliza un inóculo de esporas con una concentración de 10^8 - 10^9 esporas por litro para grandes tanques, con capacidad de 20 mil a 115 mil litros. El cultivo original de hongos filamentosos se desarrolla normalmente a partir de esporas liofilizadas. Las etapas del proceso son las siguientes:

1. Fermentación
2. Separación del micelio
3. Purificación con solventes y obtención de la sal sódica de la penicilina
4. Ensayos de control.

En las fermentaciones, los parámetros que son controlados son: composición del medio, pH, temperatura, agitación y aireación. Los procesos de fermentación para la producción de penicilina están regulados por fuentes de carbono y generalmente se suplementan con lactosa. Antiguamente el caldo de cultivo para la fermentación sumergida se obtenía de macerados de maíz, a los que se añadía de 2 a 3% de lactosa, además de compuestos inorgánicos, hidrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, nitrógeno y elementos traza como hierro, cobre y zinc. La adición al medio de cultivo de estos compuestos favorece el crecimiento del organismo. Es importante tener un control de pH, que va de 4.5 a 5 en el medio de cultivo, así como de la temperatura (23 a 25 °C) requerida para el crecimiento y producción (Pandey y col., 2000).

Durante el cultivo, es importante mantener un suministro de aire estéril, que permite el crecimiento sin contaminación de *P. chrysogenum*, así como una agitación constante, que facilita su distribución uniforme y la separación del micelio, para que sea liberado el antibiótico (Nielsen y Krabben, 1995).

Las condiciones ambientales influyen en el crecimiento microbiano, y el entorno del microorganismo depende del modo de operación, del diseño del fermentador y de la composición del medio de cultivo. Debe mantenerse en estado puro, para facilitar el proceso fermentativo, en condiciones físicas y químicas óptimas. El medio utilizado en la fermentación debe tener todos los nutrientes que el microorganismo requiera para su crecimiento así, como las sustancias que se necesiten para soportar la síntesis del producto.

1.11.1.2 Fermentación sólida (FS)

La FS indica que el cultivo, ya sea aerobio o anaerobio, de microorganismos se realiza en una matriz sólida y porosa (artificial o natural). Esta matriz está constituida por un sustrato húmedo capaz de absorber los nutrientes sin que estos se pierdan, sirviendo además de soporte y anclaje de los microorganismos. Los soportes más comúnmente utilizados son los productos de agricultura como arroz, salvado de trigo, bagazo de caña, harina de yuca y cáscara de remolacha, entre otros (Barrios-González y *col.*, 2003).

En estos cultivos se deben controlar una serie de parámetros fisicoquímicos: el inóculo, la humedad, actividad del agua, la aireación o el flujo de oxígeno, la temperatura y el pH, considerando además el tipo de microorganismo (Raimbault, 1998). Los parámetros que se controlan en la FS se describen a continuación:

a) Contenido de humedad y actividad del agua: El agua es un componente primordial para los microorganismos, y en FS tiene un papel de vehículo para las enzimas y nutrientes ya que difunden a través de la matriz sólida. Por eso, este parámetro parece ser crítico para este tipo de fermentación. Desde el tiempo 0 se deben controlar las condiciones para generar un ambiente adecuado para la fase de producción (idíofase) más que para la fase de rápido crecimiento. En FS el contenido inicial de humedad depende de la naturaleza del sustrato, principalmente de la capacidad de retención de agua. En algunos estudios la humedad idónea es de 70-80% (Pandey y *col.*, 2000).

Para el crecimiento óptimo de los microorganismos en sustrato sólido se requiere de 0.99 % de agua es indispensable en la síntesis de enzimas, así como en el aumento en la biomasa. La FS ocurre con poca o nula presencia de agua, por que los organismos pueden adaptarse a este sustrato.

b) Aireación y cambio del metabolismo: Los organismos que son utilizados comúnmente para la producción de metabolitos secundarios son aerobios. Por tal motivo, la aireación es importante para el crecimiento, y con el control de esta se permite el abastecimiento de oxígeno en el cultivo, la regulación de la humedad y la temperatura y la eliminación de compuestos volátiles (Rao y *col.*, 2005).

c) Temperatura: En este tipo de cultivos el metabolismo se incrementa, provocando un aumento de calor en el medio de cultivo que debe controlarse, ya que puede inhibir el crecimiento de los microorganismos. Para disminuir y regular tanto la humedad como la temperatura se utiliza la aireación.

d) pH: Los hongos filamentosos crecen en medios ácidos y pueden tolerar cambios importantes de pH. Sin embargo, se han diseñado estrategias para llevar un control de este parámetro, como mezclas de sulfato de amonio y de urea en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno y para el control de pH (Mudgett, 1986).

1.12 Mejoramiento de cepas en Fermentación Sólida (FS)

La fermentación sólida (FS) es un sistema de cultivo microbiano antiguo que está siendo transformado para nuevos propósitos en Microbiología, Bioquímica e Ingeniería Bioquímica. Los procesos convencionales (fermentación líquida), sin embargo, son utilizados preferentemente, debido al gran éxito comercial de las instalaciones a gran escala en muchos campos de la biotecnología (Hahn-Hägerdal, 1986).

La FS contiene niveles de humedad baja. En contraste con la fermentación sumergida donde el agua ocupa alrededor de 95 al 96 %, la FS sólo tiene entre un 40 y un 70 % de contenido de agua en el sustrato (Barrios-González y Mejía, 1996).

Para la producción óptima de metabolitos es importante añadir precursores, nutrientes y fuentes de energía, así como minerales, para incrementar la producción de metabolitos. Por otro lado, los sustratos naturales y algunos soportes inertes requieren algún tipo de tratamiento para hacer sus componentes químicos más accesibles y provocar que el micelio se adhiera y penetre en el sustrato, además de mejorar la capacidad de retención de agua (Balakrishnan y Pandey, 1996; Robinson y col., 2001).

1.12.1 Ventajas de la FS

Las ventajas tecnológicas del FS se mencionan a continuación:

- La baja humedad del sustrato permite una contaminación mínima.
- El proceso de fermentación sumergida sufre frecuentemente contaminación.
- Se puede realizar en pequeños volúmenes de sustrato, disminuyendo el costo operacional de los reactores.
- Es energéticamente más económico.
- Mayores niveles de conversión de materias primas, resultado de período de crecimiento controlado.
- El producto de la fermentación es relativamente fácil de recobrar.

1.12.2 Desventajas de la FS

- El medio es heterogéneo, puede ser que no sea mezclado correctamente.
- Los parámetros como la temperatura, pH y el oxígeno disuelto necesitan un control preciso.
- La agitación o mezcla continua del medio es necesaria para cumplir con los

parámetros de control.

- La agitación continua del medio daña regularmente el micelio para su crecimiento, dando como resultado un pobre crecimiento de organismos (Hölker y col., 2004).
- Menores niveles de productividad debido al tiempo de calentamiento, esterilización, enfriamiento, vaciado y limpieza del reactor.
- Aumenta el uso de instrumentos debido a la esterilización.
- Costo mayor debido a la preparación de varios medios de cultivo para la inoculación.

1.12.3 Beneficios biológicos

- Baja demanda de agua
- Alta concentración de producto final
- Represión por catabolito mínima o insignificante
- Utilización del sustrato sólido
- Bajas demandas de esterilización
- Soporte sólido de microorganismos
- Simulación del ambiente natural
- Cultivo mixto de microorganismos

1.12.4 Procesamiento

- Alto volumen de productividad
- Baja demanda de energía de calentamiento
- Aireación fácil
- Utilización de fuentes de carbono alternativas
- No hay necesidad de químicos antiespumantes

1.12.5 Consecuencias

- Mínimo gasto de agua
- Bajan los costos
- Fermentación en presencia de glucosa
- Alta concentración de sustratos de crecimiento
- Cultivos mixtos de microorganismos de fermentación
- Mejor funcionamiento del microorganismo cultivado
- Menores volúmenes de fermentadores
- Fuentes abundantes y baratas de carbón
- Ninguna pérdida de microorganismos durante la fermentación
- Problemas que se solucionarán
- Creación de gradientes de humedad
- Creación de gradientes de sustrato
- Creación de gradientes de temperatura
- Construcción de gradientes de oxígeno en escala larga

1.12.6 Aplicaciones comunes

- Productos que deben de ser producidos con un mínimo riesgo de contaminación u organismos que sufren alguna mutación.
- Operaciones en las que son producidas sólo cantidades pequeñas.
- Procesos en los que se puedan formar varios productos usando sólo un reactor.

2. JUSTIFICACIÓN

La importancia del mejoramiento de cepas en la industria de los microorganismos ha sido entre otras elevar la producción de diversos metabolitos de interés biológico y comercial. En este estudio se insertaron genes de la ruta de biosíntesis de la penicilina en *P. chrysogenum*, con la premisa de incrementar la producción de penicilina.

Se ha reportado que tras la incorporación de copias adicionales del *cluster* de penicilina la producción de transformantes evaluada en fermentación líquida se ve aumentada. Sin embargo, un sistema de fermentación sobre sustrato sólido podría ser ventajoso en cuanto a la capacidad del organismo de incrementar la producción del antibiótico. Dada la fisiología de *P. chrysogenum*, el sustrato sólido podría además acortar el tiempo de producción del compuesto y un menor requerimiento energético. Las desventajas radicarían en la mayor complejidad para escalar el proceso y en las dificultades para el monitoreo y control de parámetros en el proceso.

7. CONCLUSIONES

Al incrementar el número de copias de los genes de la biosíntesis de penicilina en una cepa de alta y una de baja producción de *Penicillium chrysogenum* se incrementará la producción de penicilina en ambas cepas, tanto en fermentación líquida como en sólida.

Objetivo general

Aumentar el número de copias de los genes *pcbAB-pcbC-penDE* de la vía de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*, como estrategia para incrementar la producción de penicilina en fermentación líquida y sólida.

Objetivos particulares

1. Identificar en una biblioteca genómica derivada del cósmido IztapaCos el grupo de genes que codifican para la biosíntesis de penicilina, mediante las sondas del gen *pcbAB* y *penDE*.
2. Insertar copias de los genes en el genoma de *P. chrysogenum* y realizar una evaluación en cilindros de agar.
3. Evaluar y cuantificar la producción de penicilina G en medios sólido y líquido.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Microorganismos

4.1.1. Cepas bacterianas

***Bacillus subtilis* ATCC 6633.** Esta cepa es sensible a la acción de los antibióticos β -lactámicos y fue utilizada para la valoración de la penicilina G mediante bioensayo (Lode y col., 1974).

***Escherichia coli* DH5 α .** Esta cepa se utilizó para los experimentos de transformación ya que tiene alta eficiencia desde (5×10^8 transformantes por microgramo de ADN). En el gen Z del operón *lac* posee una delección, misma que nos permitió seleccionar los transformantes que poseían un plásmido capaz de originar la α complementación de dicha mutación (Hanahan, 1983).

4.1.2. Cepas fúngicas

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089),** cepa de baja producción de penicilina (alrededor de 600 μ g de penicilina) (Cantoral y col., 1993).

***Penicillium chrysogenum* P2-32,** cepa de alta producción de penicilina (1-2 mg/mL) obtenida por mutación a partir de la cepa derivada de *P. chrysogenum* AS-P-78 (Barrios-González y col., 1993). Posee diez copias adicionales de los genes biosintéticos de penicilina.

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *npe10*,** cepa utilizada como control, en los experimentos de transformación, obtenida de *P. chrysogenum* 54-1255 originada por mutagénesis con nitrosoguanidina, se encuentra un fragmento de ADN eliminado, incluyendo el grupo de genes de la biosíntesis de penicilina (Cantoral y col., 1993).

4.2 Vectores

Figura 4.2.1 pULJL33 (Barredo, 1990). Plásmido de 8 kb derivado del pBluescript KS⁺, a este se le insertó un fragmento de ADN que contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* con sus regiones promotoras.

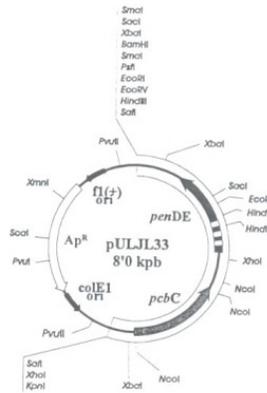


Figura 4.2.2 Plásmido pGEM (Kobs, 1996). Vector utilizado para clonar la sonda del extremo del gen *pcbAB*. Las sondas fueron diseñadas delimitando la secuencia del gen reportado por Díez, y *col.*, (1990).

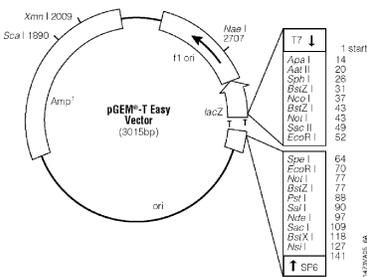
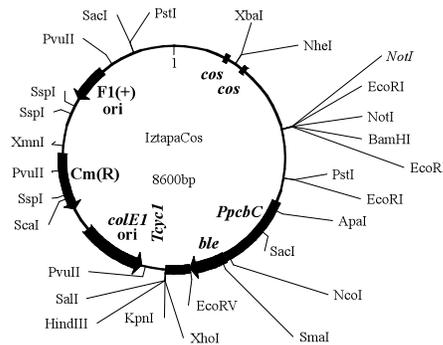


Figura 4.2.3 Cósmido IztapaCos (Sierra, 2005). Vector de 8.7 kb. Contiene una región de resistencia al antibiótico fleomicina compuesta por la región de resistencia *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*, el promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* y la región terminadora de la transcripción del gen *cys1* de *Saccharomyces cerevisiae*, derivada del plásmido pULC43 y que constituye el mecanismo de selección para hongos.

El promotor del gen *pcbC* presente en este módulo de expresión fue modificado por mutagénesis dirigida para favorecer los procesos de construcción del nuevo cósmido. El plásmido pULC43 aportó el

marcador de selección para *E. coli* (resistencia para cloranfenicol). Las secuencias *cos* y el policonector, se obtuvieron a partir del cósmido SuperCos.



4.3 Conservación y almacenamiento de cepas.

4.3.1 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas se conservaron a 4 °C en cajas de Petri selladas con Parafilm®, cuando se necesitaron para tiempos cortos (como máximo un mes). Para conservarlas por períodos más largos se congelaron a -20 °C, en glicerol a una concentración final de 20% (v/v) o se liofilizaron.

4.3.2 Hongos

Las esporas de *P. chrysogenum* se conservaron en glicerol a una concentración final de 40% (v/v), congeladas a -20 °C. Para mantenerlas por períodos más largos fueron liofilizadas.

4.4.1. Reactivos específicos para biología molecular.

4.4.1.1 Ácidos nucleicos: Marcadores de tamaño para electroforesis de agarosa.

El ADN del bacteriófago λ fue utilizado como marcador de tamaños, sin digerir o digerido con las endonucleasas *HindIII*, *PstI*, *KpnI* y *EcoRI*. La electroforesis en geles de agarosa se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa SeaKen LE (FMC, Ref. 50004) en concentraciones de entre el 0.3 al 2% (p/v). La concentración de agarosa utilizada dependió del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 4.1 y Figura 4.1).

	Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmentos
Tabla 4.1 Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles, para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN.	0.3 %	5.0 – 60 kb
	0.5 %	1.0 – 30 kb
	0.7 %	0.8 – 12 kb
	1.0 %	0.5 – 10 kb
	1.2 %	0.4 – 7 kb
	1.5 %	0.2 – 3 kb
	2.0 %	0.05 – 2 kb

Figura 4.1 Marcadores de tamaño usados y longitud (pb) de los fragmentos de ADN generados por la digestión de las enzimas de restricción: Bandas de ADN digerido con diferentes enzimas:

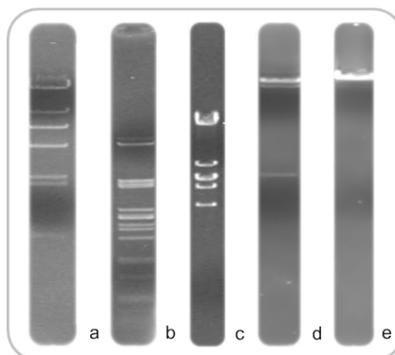
a) ADN del fago λ digerido con *Hind*III (λ /*Hind*III): 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 y 125 pb

b) ADN del fago λ digerido con *Pst*I (λ /*Pst*I): 11.509, 5.080, 4.505, 2.840, 2.577, 2.454, 2.443, 2.140, 1.980, 1.700, 805,516, 467,448, 339, 265, 247 y 210 pb.

c) ADN del fago λ digerido con *Eco*RI (λ /*Eco*RI): 21.226, 7.421, 5.804, 5.643, 4.878, 3.530 pb.

d) ADN del fago λ digerido con *Kpn*I (λ /*Kpn*I): 18.560, 17.050, 1,510 pb.

e) Fago λ sin digerir



4.4.2.2 Oligonucleótidos sintéticos

Los cebadores para obtener la sonda 5' distal se construyeron de acuerdo a la secuencia en el *pcbAB*; TGACAGACTATGTGGGTCTAGACT y GGAAATTCTCGCAATGGAATGTCGC, de acuerdo a lo reportado para el gen en la base de datos del National Center for Biotechnology (NCBI) con número 894.

4.4.2.3. Antibióticos

La penicilina G, fue utilizada para la elaborar la curva de calibración para conocer la concentración de penicilina producida por las cepas. **La ampicilina**, se adquirió en forma de preparado farmacéutico, y fue el antibiótico utilizado para las pruebas de resistencia de los vectores plasmídicos. **El cloranfenicol** fue adquirido en la compañía Sigma Chemical Co., y se utilizó para las pruebas de resistencia de *E. coli*. **La fleomicina** fue adquirida en la empresa Cayla, y fue utilizado para la selección de transformantes de *P. chrysogenum*.

4.4.2.4. Enzimas

Las enzimas: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I y *Sau*3AI se adquirieron de Gibco BRL, New England Biolabs Inc., Amersham Internacional, Promega Biotec y Boehringer Mannheim. ARNasa A, y ADN ligasa del fago T4 fueron adquiridos a Boehringer Mannheim. Fragmento Klenow fue adquirido a Perkin-Elmer. Las enzimas líticas se adquirieron a la compañía Sigma Chemical Co.

4.4.2.5 Isótopos radiactivos

Se utilizó [α -³²P]dCTP (>3.000 Ci/mmol; 10 mCi/mL; 370 MBq/mL) para el marcaje por desplazamiento de mella de fragmentos de ADN de doble cadena. Fue adquirido en Amersham Internacional.

4.5 Medios de cultivo

4.5.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). Medio de cultivo para *E. coli*.

Bacto-triptona	10 g	Para la utilización como medio sólido (LA) se añaden 20 g de agar por litro.
NaCL	10 g	
Extracto de levadura	5 g	
Aforar a 1000 mL con agua destilada se ajustar a pH=7.5 con NaOH		1. Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 120 °C.
		2. Se deja enfriar aproximadamente a 45 °C y se suplementa con ampicilina o cloranfenicol 100 µg/mL (stock 200 mg/mL), dependiendo del gen de resistencia.

Medio TB (Sambrook y Russell 2001). Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli*, para la obtención de ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24 g	1. Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 120 °C.
Bacto-triptona	12 g	
glicerol	4 mL	2. Después de la esterilización se añaden 100 mL de una solución estéril de KH ₂ HPO ₄ 170 mM y K ₂ HPO ₄ 720 mM.
Aforar a 900 mL pH=7.5		

4. MATERIAL Y MÉTODO

TSA (Sambrook y Russell 2001) Medio para el crecimiento de bacterias y para la valoración de antibióticos por bioensayo.

Peptona de caseína	16 g	Se ajusta el pH a 7.0 y se afora a 1 L de agua destilada. Para su uso como medio sólido se añaden 20 g por litro y cuando se utiliza para la realización de bioensayos se añade 10 g de agar por litro. Se esteriliza en autoclave durante 20 min.
NaCl	6 g	
Peptona de soja	3 g	
Glucosa	2.5 g	
K ₂ HPO ₄	2.5 gr	

4.5.2 Medio de esporulación para *Bacillus subtilis*.

Peptona de caseína	8 g	Se ajusta el pH a 7.2 y se afora con agua destilada a 1 L. Se esteriliza en autoclave durante 20 min.
Extracto de carne	3 g	
MnCl ₂	10 ⁻⁵ M	

4.5.3. Medios de cultivo para *Penicillium chrysogenum*.

MFCP (Somerson y col., 1961). Medio complejo de fermentación.

Lactosa	55 g	Se ajusta el pH a 6.8 y se completa con agua destilada hasta 1 L. Se distribuyen en matraces de 500 mL con volúmenes de 100 mL de medio y se esterilizó en autoclave. Cuando se utiliza como medio sólido se añaden 25 g de agar/L.
Sólidos de maceración de maíz	35 g	
CaCO ₃	10 g	
KH ₂ PO ₄	7 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g	
Fenilacetato potásico al 40% (p/v)	10 mL	

Fenilato potásico al 40% (p/v): Se preparó de la siguiente manera:

Ácido fenilacético	20 g	Se lleva a 50 mL de agua destilada
KOH al 40%	25 mL	
pH resultante	8.0 – 8.2	

MCIP (Somerson y col., 1961). Medio complejo de inóculo de *P. chrysogenum*

Sacarosa	20 g	Se ajusta a pH 5.7 con NaOH se afora a 1 L. Se distribuye en matraces de 500 mL con un volumen de 100 mL de medio y se esteriliza en autoclave.
Sólidos de maceración de maíz	20 g	
Extracto de levadura	10 g	
CaCO ₃	5 g	

Medio Czapek. Medio de esporulación y mantenimiento

Sacarosa	30 g	Se afora agua destilada hasta 1 L y agar al 2.5% (p/v). Cuando se usa este método para la regeneración de protoplastos de <i>P. chrysogenum</i> se añade sorbitol a una concentración de 1 M, KCl a 0.7 M como estabilizadores osmóticos. Se esteriliza en autoclave durante 20 min. El medio con sorbitol se usa en transformaciones en las que se integró el gen de resistencia a fleomicina, debido a la interferencia de las altas concentraciones de sales con el patrón de sensibilidad del hongo receptor a la fleomicina. Para el resto de transformaciones se usa el medio con KCl como estabilizador osmótico.
NaNO ₃	2 g	
K ₂ HPO ₄	0.5 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g	

Medio PM1 (López-Nieto y *col.*, 1985). Medio de esporulación y mantenimiento.

Bacto-peptona	5 g	Se ajustó el pH a 5.5 con H ₃ PO ₄ y se aforó a 1 L y agar al 2% (p/v). Se esterilizó en autoclave.
Lactosa	5 g	
NaCl	4 g	
Sólidos de maceración de maíz	1 g	
KH ₂ PO ₄	60 mg	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3 mg	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 mg	

Medio PMY (Modificado a partir de Anné, 1977). Medio de crecimiento y esporulación.

Glucosa	40 g	Se ajusta el pH a 6.0 y se añade agua destilada hasta 1 L. Se esteriliza en autoclave.
NaNO ₃	3 g	
Extracto de levadura	2 g	
KCl	0.5 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g	

Medio PW. Medio de esporulación y mantenimiento

Medio PM1	500 mL	Se añade agar al 2% (p/v).
Medio Czapek – KCl 0.7 M	500 mL	

4.6 Crecimiento de microorganismos.

4.6 1 Crecimiento de *Escherichia coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizaron los medios LA y LB suplementados con los antibióticos ampicilina o cloranfenicol, según se requirió para cada experimento.

4.6 2 Crecimiento de *Penicillium chrysogenum*

Las cepas de *P. chrysogenum* fueron incubadas en matraces de 250 mL con 40 mL de medio PW para esporulación, para usarlas en experimentos de extracción de ADN y producción de penicilina en medio líquido.

4.6.3 Condiciones para la esporulación de *Penicillium chrysogenum*

Para la obtención de esporas, tanto de cepas parentales como transformantes de *P. chrysogenum*, fueron sembradas en césped en medio PW, se incubaron a 25 °C durante 10-15 días. Estas células se emplearon para los estudios de producción de penicilina en cilindros de agar y en los sistemas de fermentación líquida y sólida.

4.7 Obtención de células competentes de *E. coli* por el método de cloruro de rubidio.

La cepa *E. coli* DH5 α , fue utilizada como receptora de mezclas de ligación, ésta proporciona una eficiencia de transformación de hasta 5×10^8 transformantes por μg de ADN (Hanahan, 1983 y 1985). Se obtuvieron de la siguiente manera: Se sembró una placa de medio SOB sólido con la cepa de *E. coli* incubándose a 37 °C durante 14 h.

1. Se preinoculó con una colonia aislada un tubo con 1 mL de medio SOB. Se incubó a 37 °C con agitación de 200 rpm durante 2 h.

2. Se inoculó con 250 μ L del preinóculo de 100 mL de medio SOB, en un matraz de 500 mL. Se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4-0.5 (aproximadamente a las 5 h), a 600 nm, manteniéndose posteriormente el matraz a 4 °C durante 20 min.
3. Las células se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C.
4. Las células se resuspendieron con suavidad en $\frac{1}{3}$ del volumen inicial de solución RF1¹, la suspensión se mantuvo durante 20 min en hielo.
5. Se centrifugaron las células a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C.
6. Se resuspendieron las células en $\frac{1}{12.5}$ del volumen inicial de solución RF2² y la suspensión se mantuvo en hielo durante 20 min. Finalmente se repartió la suspensión en alícuotas de 220 μ L.
7. Las células competentes, así preparadas, se pueden usar inmediatamente o bien se pueden conservar a -70° C, previa congelación en nitrógeno líquido.

4.8 Diseño de cebadores

4.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La sonda fue diseñada buscando la secuencia correspondiente al gen *pcbAB*, fue alineada utilizando el programa CLUSTAL (paquete informático DNASTAR) para elegir las secuencias conservadas.

Se amplificó por PCR (Saiki y *col.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987), método que se basa en el proceso de replicación del ADN y en el que se obtiene en cada ciclo un duplicado de las moléculas preexistentes. Para la amplificación de la secuencia diseñada se requiere de la cadena molde, extraído de *P. chrysogenum* (Ver apartado de extracción de ADN).

¹RF1. Acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (p/v) MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M. Se esteriliza por filtración con un filtro estéril de 0.22 μ m. Se utiliza agua Milli Q (millipore) para preparar las soluciones y los medios de cultivo.

²RF2 CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15%(p/v), MOPS 10 mM, pH 7.0 y RbCl 10 mM. Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH.

4. MATERIAL Y MÉTODO

Este método se basa en la repetición de tres pasos, bajo determinadas condiciones de temperatura.

1. Desnaturalización de las cadenas del ADN molde, mediante la incubación a temperatura de 94 °C durante un min.
2. Hibridación de los cebadores. En este trabajo fueron sondas diseñadas para ACV.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un baño de agua con hielo y se mezcló con vortex, se centrifugó y se colocó en el termociclador Eppendorf Mastercycler, de acuerdo a:

H ₂ Od estéril	48.5 µL
Amortiguador 10x para la Taq polimerasa (5 U/µL)	10 µL
Mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10 mM) cada uno	16 µL
Cebador 1 (20 µM)	5 µL
ADN molde	10 µL
AmpliTa TM ADN polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL
Cebador 2 (20 µM)	5 µL
ADN molde (100 ng)	5 µL

4.8.2 Clonación del fragmento de PCR en el plásmido pGEM

Para la obtención de una concentración suficiente del fragmento obtenido del PCR, este se clonó en el plásmido pGEM. Los fragmentos obtenidos por PCR contienen sitios de corte *Nco*I, al igual que el plásmido que tiene sitios de reconocimiento y corte para esta enzima.

ADN plásmidico	1 µL	Volumen final de reacción 10 µL
DNA del fragmento de PCR	5 µL	La mezcla se incubó a 15 °C durante 12 h y la ligación se verificó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Se transformó en células competentes de <i>E. coli</i> .
Amortiguador para ADN ligasa T4 10x	1 µL	
H ₂ Od	2 µL	
ADN ligasa	2 µL	

4. MATERIAL Y MÉTODO

1. Se utilizó la enzima en un décimo del volumen final de la mezcla de reacción.

2. En tubos Eppendorf nuevos y estériles de 1.5 mL se mezclaron por separado:

MEZCLA DE REACCIÓN		Realizada la mezcla se incubó a 37 °C durante 3 h. Pasado este tiempo se verificó la digestión en un gel de agarosa al 0.7% (v/v), respectivamente. Posteriormente se realizó la unión del fragmento con el plásmido, usando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4.
ADN del fragmento (100 µg disuelto en 50 µL de agua.	15 µL	
Amortiguador para <i>EcoRI</i> 10x	2 µL	
H ₂ O	1 µL	
Plásmido pGEM (500 µg disueltos en 80 µL)	10 µL	
<i>EcoRI</i> (10 U/µL)	2 µL	

La mezcla se incubó a 15 °C durante 12 h y la ligación se verificó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Se transformó en células competentes de *E. coli*. Se sembraron en medio LA en presencia de ampicilina para la selección de colonias de bacterias que presenten el plásmido integrado.

En el caso del plásmido pUJLU33 se siguió la misma metodología con la diferencia que las colonias que presentan el plásmido se seleccionaron de la siguiente manera:

Las células fueron sembradas en medio LA suplementado con ampicilina, e IPTG³ (500 µg/mL) y X-gal⁴ (80 µg/mL). Al insertarse un fragmento de ADN extraño en el plásmido se inactiva el fenómeno de la α -complementación de la β -galactosidasa de la bacteria. De esta forma, las bacterias que contienen un plásmido con inserto no poseen coloración azul en presencia de los compuestos mencionados.

³IPTG: Se disuelven 2 g of IPTG in 8 ml of dH₂O, se ajusta el volumen a 10 mL con dH₂O y se filtra en una membrana estéril de 0.22 µm de tamaño de poro. Se hacen alícuotas y se mantiene a -20 °C.

⁴X-gal: Se disuelven 100 mg de X-gal en 5 mL de dimetilformamida, en un tubo estéril de polipropileno. Se conservan alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf envueltos en papel aluminio para prevenir el daño por la luz y se almacenan a -20 °C.

Las colonias blancas fueron seleccionadas y se obtuvo el DNA plasmídico en pequeñas concentraciones (minipreparaciones) fue analizado éste en un gel de agarosa para verificar que estuviera incluido en las colonias seleccionadas y que cumpliera con los requisitos del tamaño deseado.

Las colonias que resultaron transformantes fueron incubadas para amplificar el plásmido ligado con el fragmento de interés, se sembraron en medio LB en presencia de ampicilina y se realizó el protocolo de aislamiento con el sistema de purificación Wizard® Plus SV minipreps ADN purification system (Promega). En el caso del plásmido pGEM se secuenció en el Instituto de Fisiología de la UNAM con un secuenciador automático (ABI-Prism 3100 Avant).

4.9 Transformación de *E. coli* DH5 α

La transformación de *E. coli* fue realizada por el método de Hanahan (1983 y 1985), como se describe a continuación:

1. Se prepararon las placas con medio LA suplementado con ampicilina, a una concentración de 100 mg/mL para cada transformación.
2. Se descongelaron las células competentes en un baño de hielo y agua durante 5 min y se mezclaron con 3 μ L de ADN plasmídico y 100 μ L de la suspensión de bacterias descongeladas, manteniéndose en hielo durante 20 min. La mezcla se sometió a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42 °C durante 45 seg, enseguida se colocó en un baño de agua fría por 3 min.
4. Posterior a éste se añadieron a esta suspensión 500 μ L del medio LB con antibiótico y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm durante 1 h con el fin de que las células que incorporaron el plásmido expresaran la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

Se sembró por extensión una alícuota de 300 μ L en placas de LA más el antibiótico.

4.9.1 Extracción mediante el uso de QIAEX II

La sonda clonada se purificó mediante el sistema QIAEX II: El protocolo fue el siguiente:

1. Una vez que se realizó la electroforesis y la tinción del gel se cortó el trozo de agarosa donde está el ADN de interés (500 pb), se depositó en un tubo Eppendorf de peso conocido y se pesó el conjunto tubo-agarosa.
2. Se agregaron al tubo 3 volúmenes del amortiguador QX1 y 2 volúmenes de agua destilada estéril por volumen de gel (se consideraron 100 mg de peso de gel equivalentes a 100 μ L de volumen).
3. Posteriormente se añadieron 10 μ L de acetato sódico 3 M, a pH 5.0. Se resuspendió la resina Quiaex II, con un vortex durante 30 seg. Al tubo con el trozo de agarosa y el amortiguador QX1 se le añadieron 10 μ L de esta suspensión.
4. Se inocuo a 50 °C durante 10 min en el termomixer con agitación constante.
5. A continuación se centrifugó la muestra durante 30 seg. a 14 000 rpm y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. El precipitado se lavó con 500 μ L del amortiguador QXI para eliminar los contaminantes de agarosa restantes.
6. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 seg, y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 μ L del amortiguador PE. Se precipitó por centrifugación y se lavó. Finalmente se dejó secar, se eliminó el sobrenadante con una pipeta, durante 10-15 min. o hasta que adquirió un color blanquecino.
7. El ADN se eluyó con 20 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8.5 o H₂O_d estéril y se incubó, después de mezclar en un agitador a 50 °C durante 5 min.
8. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 seg. y se recogió el sobrenadante en un tubo limpio y estéril que contiene el ADN de interés. Se puede lograr un 25% adicional de eficiencia de extracción si se repite desde el paso número 7.

4.9.2 Extracción del cósmido

Este procedimiento fue empleado para realizar extracciones del IztapaCos (Sambrook y Russell, 2001).

1. Se inoculó un matraz con 100 mL de medio TB suplementado con cloranfenicol con células de *E. coli* portadoras del cósmido. El cultivo se incubó a 37 °C de 12 a 16 h con una agitación de 250 rpm.
2. Se centrifugaron las células a 5000 rpm (2350 x g) durante 5 min en un rotor Beckman F0650, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3 mL de solución GTE⁵ con una concentración de lisozima de 10 mg/mL. Se mezcló bien y se mantuvo durante 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 6 mL de la solución NS⁶, la cual se preparó al momento de la extracción. Se mezcló suavemente (la agitación vigorosa rompería el ADN genómico, lo que se traduciría en una contaminación del ADN plasmídico con ADN genómico) y se mantuvo en hielo durante 10 min.
3. Se agregaron 4.5 mL de una solución, previamente enfriada a 4 °C, de acetato potásico⁷. Se mezcló fuertemente y se mantuvo a 4 °C durante 10 min.
4. Se centrifugó a 15,000 rpm (21,100 x g) a 4 °C en un rotor Beckman F0650 durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a través de un filtro Nyltal de 25 µm de diámetro de poro estéril. Se recogió el filtrado en un tubo, el ADN plasmídico se precipitó añadiendo 0.6 volúmenes de isopropanol y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min.
5. Por último, se centrifugó a 8,000 rpm (6,000 x g) en un rotor F0650 a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v). Se secó el precipitado y se resuspendió el ADN en

⁵ GTE: EDTA 10 mM pH 8 ajustado con NaOH, glucosa 50 mM y Tris-HCl 125 mM pH a 8.

⁶ Solución NS. NaOH 0.2 N y SDS al 1% (p/v)

⁷ Acetato potásico para lisis alcalina: Se mezclan 60 mL de acetato potásico, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua destilada. La solución resultante tiene un valor de pH de 4.8.

200 µL de solución TE⁸.

4.9.3 Obtenciones de plásmido a pequeña escala (minipreparaciones)

Se siguió el método descrito por Holmes y Quigley (1981) y modificado por Fernández (1997). Ya obtenido el ADN se realizó la comprobación de identidad por medio de un análisis electroforético.

1. Las colonias obtenidas de las placas de las transformaciones se tomaron con un palillo estéril y se inocularon en tubos Eppendorf estériles, con 1 mL de medio TB (al que se le añadió el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido). Se realizó una réplica de este inóculo en una placa, marcada por la base, con el fin de tener las colonias identificadas y aislarlas.

2. Se incubó el tubo a 37 °C con agitación de 200 rpm durante 14-18 h, con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria. Las placas se incubaron en las mismas condiciones, pero sin agitación, después se conservaron a 4 °C.

3. Pasado este tiempo se recogieron las células del tubo mediante centrifugación a 5000 rpm durante 3 min. Se desechó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se resuspendió en 350 µL de STET⁹, se añadieron 10 µL de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua, ésta se agregó en la tapa del tubo, para asegurar una mezcla homogénea en todos los tubos.

4. Se tapó el tubo y se mezcló durante 40 seg, la mezcla se hirvió durante 60 seg. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min, eliminándose con la ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó al añadir 40 µL de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

5. Posteriormente el ADN plasmídico se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, se tiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70% (v/v). Se repitió el paso de centrifugación. Se tiró el alcohol y se evaporó el exceso. El

⁸ TE. EDTA 1mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0

⁹ STET. EDTA 50 mM pH 8.0, sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y tritón X-100 al 0.5% (v/v)

precipitado se resuspendió en 30 μL de TE^{10} , 2 μL de esta solución fueron suficientes para llevar a cabo cada uno de los ensayos de digestión con endonucleasas de restricción.

4.9.4 Obtención de ADN total de *Penicillium chrysogenum*

1. Se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio PMY, con esporas procedentes de una placa de medio PW. Se incubó a 25 °C y 200 r.p.m durante 48 h.
2. El micelio se recogió a través de un filtro de nylon Nyltal estéril de 30 μm de diámetro de poro. El micelio retenido se lavó con 100 mL de NaCl al 0.9 % (p/v), con el objeto de eliminar los componentes del medio de cultivo y posteriormente con 100 mL de amortiguador A¹¹. Se recogió el micelio, se secó con papel de filtro, se congeló y se liofilizó.
3. Se pulverizó un gramo de micelio en un mortero y se distribuyó el polvo obtenido en varios tubos Eppendorf de 1.5 mL (sin superar los 350 μL de volumen por tubo, aproximadamente 75 mg de micelio pulverizado).
4. A continuación se añadieron 350 μL de amortiguador de rotura I¹², se homogenizó muy bien y se añadieron 350 μL de CIA.¹³ Se mezcló bien, pero con suavidad, y se incubó a 50 °C durante 20 min, con agitación suave a los 10 min.
5. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, se recuperó la fase acuosa superior. La mezcla se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con 350 μL de fenol¹⁴-CIA¹⁵ hasta que se obtuvo una interfase limpia (de 6 ó 7 extracciones). Se realizó una nueva extracción con un volumen de CIA (350 μL) y se precipitó el ADN a 4 °C durante 2-4 h con 0.7

¹⁰ TE. EDTA a 1 mM pH 8 y Tris-HCl a 10mM pH 8.

¹¹ Amortiguador A. EDTA 100mM pH 8.0, NaCl 150mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0

¹² Amortiguador de rotura I. EDTA 100 mM pH 8.0, SDS al 1% (p/v), Tris-HCl 0.2 M

¹³ CIA. Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con 1 vol. de alcohol isoamílico.

¹⁴ Fenol neutro: Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica (que es la que se utiliza en la técnica de fenolización).El fenol así preparado se conserva a 4 °C en un recipiente ámbar, manteniéndose durante al menos un mes.

¹⁵ Fenol-CIA. Se prepara mezclando 24 vol. de cloroformo con un vol. de alcohol isoamílico.

volúmenes de isopropanol (245 µL). Se centrifugó a 4 °C y 14 000 rpm durante 20 min., se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol al 70% (v/v). El precipitado se secó y se resuspendió en 20 µL de TE¹⁶.

4.9.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para este estudio, se siguió el método descrito por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa en concentraciones de 0.7% (p/v) disuelta por calentamiento en horno de microondas en amortiguador TAE¹⁷, preparando el volumen necesario dependiendo de la cámara utilizada. La concentración de agarosa utilizada depende del rango del tamaño de los fragmentos de ADN a separar^(Tabla 4.4). Antes de agregar la agarosa a la cámara de electroforesis, se dejó enfriar unos 10 min.

4.10 Preparación de las muestras para electroforesis

1. Las muestras de ADN se mezclaron con un décimo del volumen final de amortiguador de carga¹⁸ concentrado (2 µL).
2. Se calentaron durante 10 min. a 65 °C, se enfriaron posteriormente en un baño de hielo y agua durante 3 min.
3. El ADN se cargó en el gel y la electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 90 voltios con duración de 2 h para geles grandes y 1 hora para geles pequeños.
4. La tinción del ADN se realizó sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 0.5 µg/mL, durante 15 min. (el EtBr se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización, al iluminarse el gel con luz ultravioleta). Los geles se observaron en el sistema GelDoc (BioRad), y las imágenes en pantalla se

¹⁶ TE. EDTA a 1 mM pH 8 y Tris-HCl a 10mM pH 8.

¹⁷ TAE 50x. 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8, 242 g de Tris base y agua destilada aforando a un litro.

¹⁸ Amortiguador de carga 6x. Azul de bromofenol al 25% (p/v), sacarosa al 40% (p/v), xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esterilizó en una olla de presión durante 20 min. Se conservó a 4 °C para evitar el crecimiento de microorganismos.

guardaron en un programa de computación.

4.10.1 Eliminación de ARN y desprotección del ADN

1. El ADN obtenido se trata con RNasa¹⁹ a una concentración final de 10 mg/mL, incubándose a 37 °C durante 90 min. Se usan guantes durante todo el proceso.
2. Una vez transcurrido este tiempo se añadió un volumen de fenol neutro, mezclándose por inversión suave y centrifugándose a temperatura ambiente a 14 000 rpm durante 5 min.
3. La mezcla fue invertida aproximadamente 20 veces.
4. Se recogió la fase acuosa superior y se homogeneizó con un volumen de fenol-CIA, centrifugándose en las mismas condiciones que en el paso 2. Se repitió este paso hasta obtener una interfase limpia. Normalmente no son necesarias más de dos extracciones en este paso.
5. Para finalizar se hizo un último tratamiento con volumen de CIA y se precipitó a una temperatura de -20 °C con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.

4.10.2 Digestión y modificación del ADN

Las enzimas de restricción fueron usadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores de cada una de ellas; ya que cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento, temperatura, concentración de sales y pH (estas dos últimas características las proporciona el amortiguador de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 el volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas.

¹⁹RNAasa. Se disuelve la RNAasa, a una concentración de 10 mg/mL, en una solución con NaCl 15 mM y amortiguador Tris HCl 10 mM pH 7.5, la mezcla se hierve durante 15 min. y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se reparte en alícuotas y se conservó a -20 °C.

4.10.3 Titulación de la biblioteca genómica

1. La biblioteca genómica se descongeló en frío.
2. Se sembraron en placas de medio LB-cloranfenicol (50 µg/mL): 1:10², 1:10⁴ y 1:10⁶. Con una asa estéril. Se incubaron toda la noche a 37 °C. Se determinaron las unidades de colonias formadas por mililitro (cfu/mL).
3. Las placas se guardaron a 4° C toda la noche y se usan para el rastreo de la biblioteca genómica.

4.11 Transferencia de colonias de bacterias y placas para rastreo de la biblioteca genómica en cósmido.

1. Se sembraron aproximadamente 3000 cfu. en medio LB suplementado con cloranfenicol. Se incubaron a 37 °C toda la noche (aprox. de 7-10 h).
2. Se colocó una membrana de nylon de 150 mm previamente mojada con medio LB suplementado con cloranfenicol, sobre las placas de *E. coli* y se realizó una réplica de las membranas de la siguiente manera:
3. Se colocó una pieza estéril de papel Whatman de 3 mm sobre la superficie de un vidrio.
4. Al quitar la membrana de la placa de agar, se volteó con cuidado de tal manera que las colonias quedaran hacia arriba y la membrana colocada sobre el papel Whatman de 3 mm.
5. Se unió otra membrana nueva, previamente remojada con medio LB, sobre la membrana madre y se cubrió con otro papel Whatman de 3 mm. Se acomodaron las membranas.
6. Ambas membranas se marcaron con una aguja para reconocer posteriormente el sitio de la hibridación.
7. Se separaron la membrana madre y la réplica y se colocaron cara arriba cada una sobre la placa de medio LB agar que contenía cloranfenicol.
8. Se incubaron ambas membranas la madre y la réplica durante un periodo

de 4 h a 37 °C.

9. Las cajas de colonias se sellaron con Parafilm y se mantuvieron a 4 °C.
10. Cada una de las membranas se hibridaron con sondas correspondientes a los extremos del gen que codifica para la biosíntesis de la penicilina.
11. Se colocaron las membranas con las colonias cara arriba por 2 min en la superficie de un papel Whatman de 3 mm remojado con solución desnaturalizante.
12. Posteriormente se pasaron a otro papel Whatman de 3 mm remojados previamente con 1 M de Tris-HCl pH 7.6 por 2 min.
13. Las membranas se colocaron en un tercer papel Whatman de 3 mm previamente remojado con 1 M de Tris-HCl pH 7.6 y 1.5 M de NaCl por 2 min.
14. Se removieron los desechos bacterianos con movimientos suaves con la mano (usando guantes).
15. Se enjuagaron las membranas con 1 M de Tris-HCl pH 7.6 y 1.5 M de NaCl. Finalmente se secaron las manchas con toallas de papel.
16. El ADN se fijo a las membranas usando un Stratalinker UV crosslinker (120,000 µJ de energía). Posteriormente se secó en un horno a 80 ° C de 1.5-2 h.

4.11.1 Transferencia de geles a membranas de nylon

1. Una vez realizada la electroforesis se tiñó el gel con EtBr y se fotografió (Ver el apartado Electroforesis de ADN en geles de agarosa).
2. A continuación se trató el gel con una solución de HCl 0.25 N durante 15 min., manteniéndose con una agitación moderada. Transcurrido este tiempo se lavó el gel varias veces con agua destilada.
3. Se sumergió el gel en solución desnaturalizante y se mantuvo durante 30 min con agitación moderada. Se lavó nuevamente con agua destilada y se sumergió el gel en solución neutralizante durante 30 min. con agitación. Se lavó con agua destilada para eliminar los restos de solución neutralizante y se preparó el material necesario para la transferencia.
4. Se colocó una pila de papel filtro con las mismas dimensiones que el gel y

4. MATERIAL Y MÉTODO

de 5 cm de grosor sobre una bandeja limpia y sobre él se dispusieron dos láminas de papel Whatman de 3 mm del mismo tamaño que el gel, previamente humedecidas en el amortiguador de transferencia.

5. A continuación se colocó el gel, tratado con las distintas soluciones, sobre las dos láminas de papel Whatman de 3 mm y sobre él se dispuso el filtro de nylon (Hybond N, Amersham) de un cm. mayor en anchura y longitud que el gel. Los filtros se humedecen antes de ser colocados sobre el gel, sumergiéndolos en agua destilada y después en el amortiguador de transferencia.

6. Sobre el filtro se colocaron dos láminas de papel Whatman 3 mm, humedecidas en el amortiguador de transferencia, de las mismas dimensiones que el gel y sobre ellas una nueva pila de papel filtro de 10 cm. de grosor. En la parte superior del sistema de transferencia se colocó un objeto de unos 500 g de peso.

7. Se añadió el amortiguador de transferencia a la bandeja hasta que alcanzó casi el límite superior de la pila de papel filtro depositado en la parte inferior del conjunto y se mantuvo en reposo durante un mínimo de 12 h. Es muy importante que durante todo el proceso eliminemos las posibles burbujas que se pueden formar al superponer las distintas capas de papel, el gel y el filtro ya que interfieren en la transferencia.

8. Transcurrido este tiempo se marcó el sitio de los pocillos en la membrana y esta se lavó con cuidado en una solución de SSC 5x.

9. Posteriormente se dejó secar la membrana y se fijó covalentemente el ADN mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker 2400, Stratagene), durante 5 min.

Una variante de esta técnica permite que la transferencia del ADN presente en un gel a dos membranas distintas. Para ello el gel procedente del paso 3 se sumerge durante una hora en amortiguador SSC 20x. A continuación se procede a la elaboración del sistema de transferencia normal, siguiendo los pasos 4 y 5 del proceso recién descrito. Una vez depositado el gel sobre la membrana de nylon se dispone sobre él una nueva membrana de nylon y sobre ésta dos láminas de papel Whatman de 3 mm humedecidas en amortiguador de transferencia. A

continuación se dispone una nueva pila de papel de filtro y sobre él se coloca un objeto de unos 500 g de peso. El conjunto formado se mantiene en reposo durante un mínimo de 12 h. En este caso no se añade amortiguador de transferencia a la bandeja y el ADN es arrastrado a los filtros al difundirse el amortiguador en el que está empapado el gel hacia la pila de papel de filtro situado en el extremo del sistema de transferencia. Como resultado del proceso se obtienen dos filtros (imágenes especulares entre sí) que son procesados de la manera habitual.

4.11.2 Marcaje de las sondas.

Tradicionalmente las sondas de ADN radioactivo se preparaban por el método de desplazamiento de mella (nick translation), mediante el cual la ADN polimerasa sintetizaba una cadena radiactiva a partir de mellas generadas por la ADNasa. El método Feinberg y Vogelstein (1983) "marcaje de oligos" ha sustituido al desplazamiento de mella, ya que resulta en una incorporación de nucleótidos radioactivos en la sonda mucho más eficiente. Este método se basa en la utilización de una mezcla al azar de hexanucleótidos que actúan como sondas ("primers") para la acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa. El procedimiento se menciona a continuación:

1. Se diluyeron 50 ng (se pueden utilizar entre 40-80 ng) de ADN con agua a un volumen final de 15 μ l.
2. Se calentó 10 min a 95 °C para desnaturalizar (se pueden utilizar fragmentos purificados por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión sin eliminar la misma).
3. Se colocó en un baño de hielo y se añadieron 5 μ l del OLBx5, 2.5 μ l, α -³²P (dCTP) 20 μ Ci y 1 μ L de Klenow (2 U/ μ L). Se incubó durante 4 h (4-6 h) a temperatura ambiente. Se incubó 5 min en hielo y se centrifugó 10 min.
4. Se adicionó la sonda, un volumen de 45 μ l, al tubo de marcaje.
5. Con cuidado se mezcló con 5 μ l de ³²P y se incubó a 37 °C por 30 min. Por último se añadieron 175 μ l de NaOH.

4.11.3 Hibridación

1. Las membranas se colocaron en un tubo agregándole 10 mL de PSE a una temperatura de 65 °C (para sondas homologas) por 10 min.
2. Posterior a esto se agregaron 175 µL de NaOH 0.1 M se colocó en un horno durante 10 min con movimientos giratorios, se agregó 50 µL de la sonda marcada a una temperatura de 65 °C durante 24 horas.

4.11.4 Lavados y autorradiografía

1. Se realizó un primer lavado con 500 mL en SSC x 2 suplementado con 0.1% de SDS (La cantidad requerida para el lavado debe calentarse a 65 °C con antelación) realizando 4 incubaciones cada 15 min. a temperatura ambiente para eliminar los restos de líquido de hibridación.
2. Se expone la membrana envuelta con Kleen-pack (para que no se adhiera a la película) frente a un film Hyperfilm-MO (Amersham) en un estuche con pantallas intensificadoras (DuPont) a -70°C, durante una hora.
3. Pasado ese tiempo la película se reveló con una solución provista por Kodak (revelador, detenedor y fijador).

4.12 Transformación de *Penicillium chrysogenum*

Esta se llevó a cabo por el método propuesto por Cantoral y *col* (1983). Se transformaron cepas parentales de *Penicillium chrysogenum* de nula, alta y baja producción de penicilina, con el vector IztapaCos utilizado como control y el vector con los genes involucrados en la biosíntesis de la penicilina.

Como marcador de selección se empleó la fleomicina, un antibiótico que pertenece al grupo de los metalo-glicopeptídicos, de la familia de la bleomicina y que es de amplio espectro. El antibiótico es producido por una cepa mutante de

Streptomyces verticillus y es activo sobre la mayor parte de levaduras y hongos, tóxico para células vegetales y animales en concentraciones que van desde 0.1 a 50 $\mu\text{L/mL}$. Actúa a nivel de ADN, originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario. La resistencia se produce por inactivación o bloqueo físico de la fleomicina por parte de una proteína codificada por el gen *ble*, gen de resistencia a bleomicina-fleomicina. El gen *ble* de *S. hindustanus* posee las siguientes características principales:

- a) Tiene 375 pb, comienza en un sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *NcoI*.
- b) Un único sitio para la enzima *SmaI*, que es muy útil en el proceso de construcción de los plásmidos que se utilizan en la transformación.
- c) Los niveles de resistencia al antibiótico están directamente relacionados con el nivel de expresión del gen *ble*. Este nivel viene determinado por la fuerza del promotor bajo el que se expresa y el número de copias integradas en el genoma del transformante.

El gen *ble* esta integrado en el “modulo de resistencia a fleomicina”, compuesto por el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*, el gen *ble* de *S. hindustanus* y el terminador del gen *cycl* de levaduras (0.3 kb).

4.12.1 Crecimiento del micelio

1. Se inoculó un matraz con 100 mL de medio PMY con esporas procedentes de la cepa a transformar. Se incubaron a 25 °C durante 48 h Wisconsin 54-1255, 60 h P2-32 y 54 h *npe10*, con agitación de 200 rpm.
2. Se recuperó el micelio a través de un filtro de nylon Nyltal estéril de 30 μm de diámetro de poro y se lavó el filtro con 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v). El micelio se secó al aplicarle presión, sobre el papel filtro Watman.

4.12.2 Obtención de los protoplastos

1. Se pesó y resuspendió 1 gramo de micelio en 10 mL de amortiguador TPP²⁰ y se mezcló en un matraz de 250 mL con otros 10 mL de amortiguador TPP que llevan disueltos 25 mg (la concentración final es de 1.25 mg/mL) de una mezcla de enzimas líticas.
2. La suspensión se incubó a 25 °C, entre 3 y 5 h dependiendo de la cepa con una agitación suave de 125 rpm. Cada hora se controló la liberación de los protoplastos observándolos al microscopio.
3. La suspensión anterior se filtró a través de una malla de nylon Nyltal estéril de 30 mm de diámetro de poro, el filtrado resultante se centrifugó durante 3 min. a 2500 rpm y se lavaron los protoplastos sedimentados con 10 mL de amortiguador KCM²¹. Se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente y se repitió el lavado dos veces más.
4. Los protoplastos precipitados se resuspendieron en KCM a una concentración final de aproximadamente 1×10^8 protoplastos/mL, se añadió casi 5 veces el volumen del precipitado de KCM. Finalmente se agregó 1/10 del volumen total del amortiguador PCM²². Se mantuvo la suspensión en un baño de hielo hasta el momento en que se realizó la mezcla de transformación.

4.12.3 Transformación de los protoplastos

1. En un tubo estéril se depositaron 10 µL de la suspensión de protoplastos de 1 a 10 µL de ADN (el cósmido y el cósmido con los genes por separado) cuya concentración fue de 1 a 10 µg, esta fue mezclada suavemente para evitar el rompimiento de los protoplastos

²⁰ Amortiguador TTP. KCl 0.7 M y amortiguador de fosfato potásico 50 mM pH a 5.8

²¹ Amortiguador KCM. CaCl₂ 50 mM, KCl 0.7 y MES 10 mM pH a 5.8

²² Amortiguador PCM. CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH a 5.8 y PEG 8000 al 50 % (p/v)

2. Se mezcló con la pipeta, evitando la formación de burbujas, y se mantuvo en un baño de hielo y agua durante 20 min.
3. Se añadieron 500 μ L de amortiguador PCM, se mezcló sin formar burbujas y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min.
4. Con el fin de diluir el polietilenglicol contenido en el amortiguador PCM, se agregaron 600 μ L de KCM, se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente. Los anteriores pasos deben llevarse a cabo respetando los tiempos especificados.

4.12.4 Extensión en placa

Se preparó la base de las placas de transformación en cajas de Petri de 60 mm de diámetro extendiendo 5 mL de medio Czapek/sorbitol suplementado con fleomicina a una concentración final de 30 μ g/mL (15 μ L). Una vez que el medio solidificó, se extendió sobre él la transformación, en forma de cobertera. Esta se preparó en un tubo estéril de 1mL, de la forma siguiente:

- 300 μ l de la mezcla de transformación
- 15 μ L de fleomicina, (de una solución inicial de 10 mg/mL en H₂O)
- 5 mL de medio Czapek/sorbitol fundido a 48 °C.

Por último, se dejó solidificar y las placas se incubaron a 25 °C durante 5 a 10 días, dependiendo de la cepa.

Se realizó un control negativo de protoplastos sin transformar, tanto en condiciones de regeneración de protoplastos (sin fleomicina), como en condiciones de selección de transformantes. Estos controles confirmaron la viabilidad de los protoplastos y ayudaron a detectar una posible contaminación con otro microorganismo.

4.12.5 Proceso de selección de transformantes de *Penicillium chrysogenum*

Después de obtener los transformantes de las cepas de *P. chrysogenum* corroborando su identidad, se resembraron por picadura, cada uno en placas con medio Czapek más fleomicina. Los que nuevamente presentaron la capacidad de

crecer en este medio con el antibiótico, se sembraron en placas con concentraciones crecientes de fleomicina, seleccionándose aquellos que presentaron alta resistencia. Finalmente, estos transformantes se analizaron en cuanto a su capacidad para producir penicilina, primero mediante bioensayo por el método de cilindros de agar. Estos procesos de selección semicuantitativos se realizaron con el propósito de obtener transformantes con mayor número de copias de los genes estudiados, por lo tanto, mejorados en su capacidad para producir penicilina. Estos transformantes se emplearon posteriormente en estudios de producción de penicilina en sistemas de fermentación.

4.12.6 Fermentación en cilindros de agar y cuantificación de la producción de penicilina por bioensayos.

Se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se preparó medio MCFP con 2% de agar en una caja de Petri de 90 mm, ya sólido se obtuvieron cilindros de 8 mm de diámetro con un sacabocados.
2. Fueron colocados en una caja estéril, por triplicado, se inocularon en el centro tomando con un palillo una espora de otra caja proveniente de las cepas parentales y transformantes de *P. chrysogenum* (tomadas de cultivos sembrados recientemente en medio PW.)
3. Se incubaron a 25 °C durante 72 a 96 h, dependiendo de las cepas de *P. chrysogenum*.

4.12.7 Cuantificación por bioensayo

1. En cajas de acrílico de 30 x 30 cm² previamente esterilizadas con UV se agregaron 200 mL de medio TSA, inoculado con 100 µl de *B. subtilis* a 50 °C
2. El cultivo de *B. subtilis* se prepara de la siguiente manera: se inocula un matraz de 250 mL, 100 mL de medio ME con una colonia de bacilos aislada previamente en agar nutritivo, el inóculo se incubó a 30 °C durante 16-18 h. con agitación de 200 rpm. Cuando se obtiene la suspensión se determina la

densidad óptica a 340 nm cuya densidad debe ser 1.0.

3. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.
4. Una vez solidificado, se depositaron sobre el medio cada uno de los cilindros de agar con el crecimiento, en la misma caja se realizaron pozos en los que se depositó 70 µl de una solución de penicilina a concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µg/mL.
5. Las placas se mantuvieron durante 1 h a 4 °C para permitir la difusión del antibiótico y posteriormente se incubaron a 30 °C durante 16-18 h para la formación de los halos de inhibición.
6. Al cabo de este tiempo, se midió el diámetro de los halos en cada pozo. (La producción de penicilina está determinada por el tamaño del halo generado).
7. Se realizó un análisis estadístico (promedio y desviación estándar) del tamaño de los halos y de la producción de penicilina. Con base en estos resultados se seleccionaron los transformantes, que presentaron un aumento en la producción de penicilina en comparación con las cepas parentales.

4.12.8 Producción de penicilina en medio líquido y sólido

Una vez seleccionadas los mejores transformantes de las cepas, se analizó la producción de penicilina en sistemas de fermentación líquida y sólida.

La fermentación en medio líquido se llevó a cabo de la siguiente manera:

4.13 Cosecha de esporas de *P. chrysogenum*

1. La obtención de esporas, de cepas parentales y transformantes de *P. chrysogenum*, se sembraron por extensión en placa en medio PW y se incubaron a 25 °C durante 10-15 días o hasta el momento en que aparecieron las esporas en forma de césped.
2. Las esporas se recogieron en H₂O_d estéril con Tween 80 al 0.1%, con perlas de vidrio, cuidando de no desprender micelio.
3. La suspensión se homogeneizó, se filtró a través de una gasa estéril y se realizó el conteo de esporas utilizando la cámara Neubauer.

4.13.1 Condiciones para la producción de penicilina en FL

4.13.1.1 Obtención del inóculo

1. En un matraz de 500 mL se colocaron 50 mL del medio MCIP añadiendo una concentración de esporas de 1×10^6 estas se incubaron durante 36 h a 25 °C con agitación de 250 rpm.
2. Trascurrido este tiempo se colocó en matraces de 250 mL 45 mL de medio MCFP con 5 mL del cultivo anterior.
3. Se incubaron durante 144 h a 25 °C con agitación de 200 rpm., se tomaron tres muestras cada 24 h.

4.13.2 Extracción de las muestras en medio líquido

1. Después de cada 24 h se filtró el contenido de los matraces y se tomó 1 mL de la muestra, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min de éste se guardaron 200 μ L si fuera necesario hacer una repetición y se utilizaron 70 μ L para cuantificar la producción de penicilina.
2. El micelio formado durante el cultivo se lavó con NaCl 0.9% se secó para cuantificar la producción de biomasa por peso seco.

4.13.3 Condiciones para la producción de penicilina G en sistema de fermentación sólida

La fermentación sólida no requiere de inóculo, pero si requiere de una serie de condiciones que a continuación se detallan:

4.13.4 Pretratamiento del soporte sólido

1. El bagazo de caña de azúcar se tamizó en mallas de número entre 30 y 50,

utilizando únicamente las partículas retenidas entre estas mallas, el tamaño de las partículas fue de entre 0.297 y 0.59 mm).

2. Para el tratamiento del bagazo, se mezcló éste con el 50% del agua del total que se iba a utilizar en el medio de producción y se llevó a 3 libras/pulgada² de presión en autoclave a 101 °C durante 30 min.
3. Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento, se esterilizó a 15 libras/pulgada² de presión en autoclave a 121 °C, durante 15 min.
4. Para llevar a cabo el proceso de pretratamiento y esterilización, la mezcla del bagazo y agua se colocó en vasos de precipitados tapados y sellados perfectamente con aluminio para impedir la pérdida o ganancia de agua, de lo contrario la humedad final del medio se vería afectada.
5. Al bagazo de caña tratado se le adicionó la cantidad de medio MCFP 2x inoculado con 2×10^6 esporas por mL provenientes de medio PW, mezclando homogéneamente. Este medio de cultivo sólido comenzó con humedad de 70% y un 30% de sólidos, que se emplearon como soporte para llevar a cabo la producción de penicilina en un medio sólido.

4.13.5 Producción de penicilina en FS

1. La mezcla anterior fue empacada en columnas de vidrio, por duplicado, con 12 g del bagazo con medio y esporas a una densidad de empaque de 0.26 g/mL.
2. Las columnas empacadas se sumergieron dentro de una pecera con agua a una temperatura controlada de 25 °C, y con un flujo de aire húmedo de 2.4 L/h durante 144 h. En un humidificador conectado en la parte inferior de cada columna, el aire se hizo burbujear en agua antes de pasar por cada una de ellas.

4.13.6 Extracción de las muestras en FS

1. Se desempacaron cuatro columnas dos parentales y dos transformantes cada 24 h se pesaron y se añadieron 72 mL de amortiguador de fosfatos a pH

de 5.

2. Posteriormente, se mezcló perfectamente y se ajustó el pH entre 5 y 5.15, con ácido fosfórico diluido (se midió el volumen utilizado para considerarlo en los cálculos). Esta mezcla se centrifugó a 2700 rpm durante 20 min., y un volumen de 5 mL del sobrenadante se separó y se colocó en un tubo estéril, 70 μ l de este sobrenadante son suficientes para realizar los bioensayos correspondientes.

3. El precipitado formado se lavó primero con 50 mL de una solución de HCl al 5% y después con 50 mL de NaCl al 0.9%, para eliminar restos de carbonato de calcio. El precipitado limpio se llevó a peso constante, para cuantificar biomasa y porcentaje de humedad.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de sondas de los extremos del grupo de genes para la biosíntesis de la penicilina

Los resultados obtenidos se describen y presentan a continuación en forma de figuras y tablas, los experimentos iniciales que se realizaron, fueron para identificar el *cluster* por hibridación mediante sondas de los extremos, que corresponden a los genes *pcbAB* y *penDE* (Figura 5.1) de la vía de la biosíntesis de penicilina, marcadas por *nick translation* con dATP fresco (α -³²P).

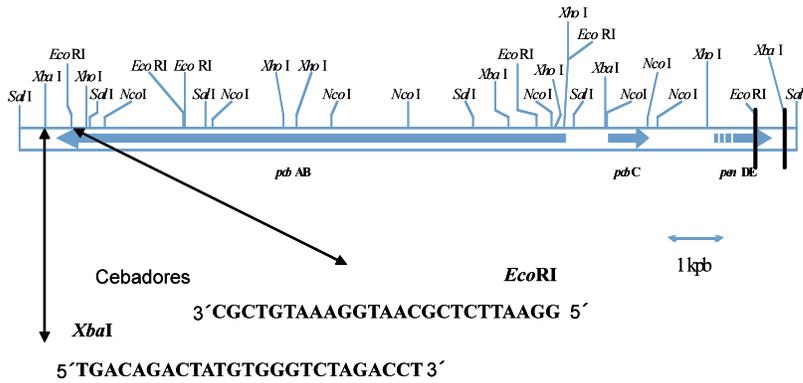


Figura. 5.1. Cluster de la biosíntesis de penicilina señalando con barras los extremos de las sondas utilizadas para su detección.

Las sondas fueron obtenidas de la siguiente manera: La sonda del extremo 3' del gen *pcbAB* fue obtenida por PCR usando los cebadores descritos en la sección de Material y Método. El fragmento amplificado se obtuvo utilizando como molde ADN de *Penicillium chrysogenum* (Figura 5.2).

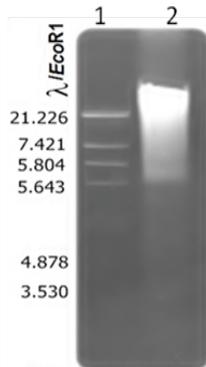


Figura. 5.2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, en el carril 2 se muestra ADN total de *Penicillium chrysogenum*

5. RESULTADOS

El producto de PCR obtenido fue clonado en el plásmido pGEM, y secuenciado. La secuencia fue analizada con el programa BLAST, obteniéndose 100% de similitud con el gen *acvA* de la enzima ACV sintetasa de *P. chrysogenum* observando un tamaño de 500 pb. En la figura 5.3 y 5.4 se observan las sondas indicando su tamaño de cada una de ellas.

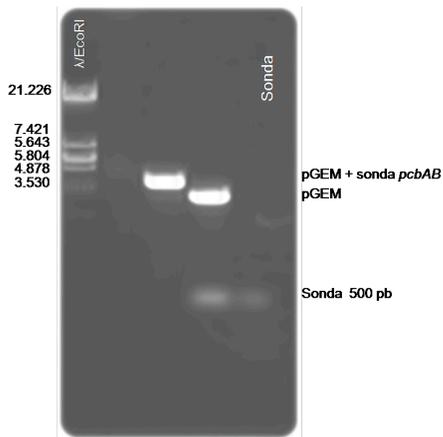


Figura 5.3. Gel de agarosa al 0.7 % en el tercer carril se muestra el plásmido pGEM, en el cuarto el plásmido con el fragmento ligado que fue obtenido por PCR, en el quinto carril la sonda liberada con la enzima *EcoRI*.

Por otro lado la sonda del extremo del gen *penDE* fue obtenida del plásmido pUJL33, y fue liberada mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. La sonda se purificó por extracción del gel (Figura 5.4).

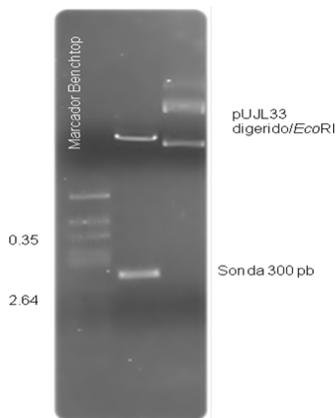


Figura 5.4. Electroforesis en gel de agarosa 0.7 % en el segundo carril se muestra el plásmido pUJL33 y la sonda liberada con la enzima *EcoRI*; en el tercer carril el plásmido sin digerir.

5.2. Rastreo de la biblioteca genómica con las sondas *pcbAB* y *penDE*

Posterior a la obtención de las sondas se sembró la biblioteca genómica en varias cajas de cultivo en medio LA suplementado con cloranfenicol. Sobre las colonias de *E. coli* se colocaron en cada una de las cajas una membrana de nylon y sobre de las mismas, otra más, de esta forma se obtuvo el duplicado de las colonias. Una membrana par fue utilizada para ser hibridada con la sonda de *pcbAB* (localizado corriente arriba en el genoma de *P. chrysogenum*) y la otra con la sonda de *penDE* (localizado corriente abajo) previamente marcadas radiactivamente con ^{32}P (Figura 5.5) para la localización del *cluster*.

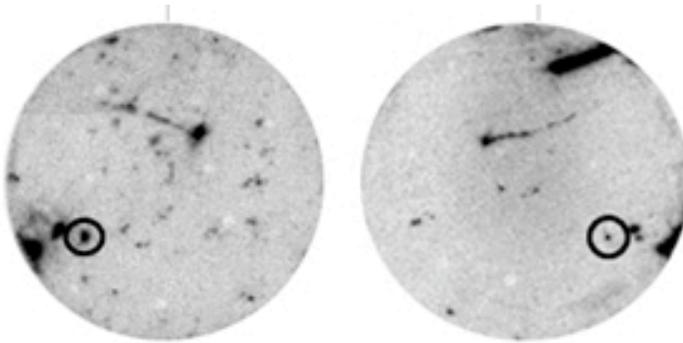


Figura 5.5. Hibridación de las membranas. En la membrana izquierda se muestra la señal marcada con un círculo que es positiva para la sonda *pcbAB* y en la membrana derecha para *penDE*.

5.3. Aislamiento del ADN de las colonias de *E. coli* que dieron positivo para ambas sondas

Se aislaron las colonias de *E. coli* de las cajas de cultivo que dieron positivo en las membranas para ambas sondas, de estas se extrajeron los vectores con los *clusters* (Figura 5.6). Fueron obtenidos 13 transformantes analizados en geles de agarosa.

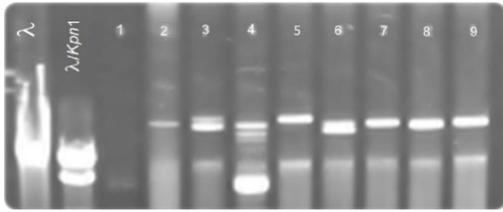


Figura 5.6 Electroforesis en gel de agarosa mostrando en los dos primeros carriles los marcadores de tamaño y en los subsiguientes el IztapaCos con el *cluster* de biosíntesis de la penicilina. Colonias que dieron positivas por ambas sondas (*penDE* y *pcbAB*).

Para la selección del *cluster* para la transformación de *P. chrysogenum* se llevo a cabo por análisis de cada uno de ellos. En la figura 5.7 se muestra en el gel de agarosa los clones obtenidos con señal positiva para ambas sondas, se realizó considerando los sitios de restricción que presenta el *cluster* teórico, identificando en el mismo gel, el tamaño de IztapaCos (8.7 kb). Fue elegido el clon que mejor se ajustó al patrón de bandas esperado de acuerdo con el mapa de restricción de los genes de la biosíntesis de penicilina.

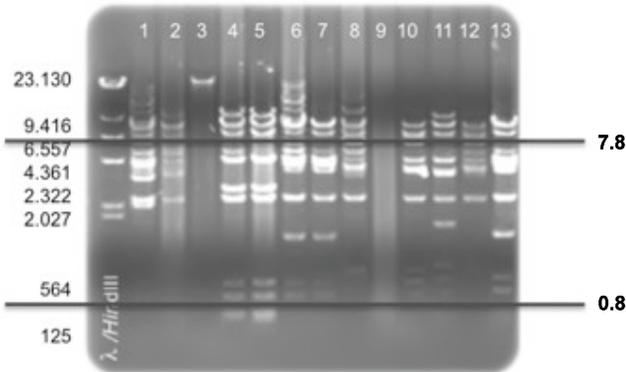


Figura 5.7 Electroforesis para el análisis de restricción del IztapaCos con el *cluster*, los clones fueron digerido con *EcoRI*. En el carril número uno se ha colocado el marcador de tamaño λ HindIII y los carriles 1-12 los clones.

Cada uno de los clones muestra diferente patrón de bandas, lo que nos indica que cada inserto unido al IztapaCos tiene secuencias diferentes en los extremos del *cluster*. El clon elegido fue el que corresponde al carril número 5. Los clones del gel de la figura 5.7 se marcaron nuevamente para verificar la señal positiva para ambas sondas, éstas se muestran en la figura 5.8.

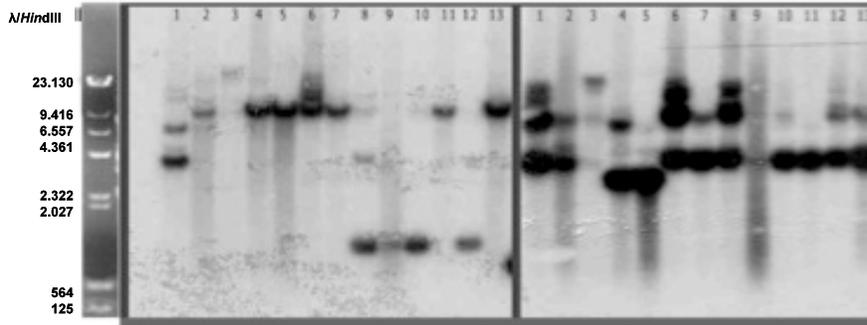


Figura 5.8. Southern Blot de los clones ligados al cósmido obtenidos de la biblioteca genómica que dieron señales positivas (digeridas con *EcoRI*). La película del lado izquierdo corresponde a la membrana hibridada con la sonda *pcbAB* y la película del lado derecho hibridada con la sonda *penDE*.

5.4 Transformación de cepas de *P. chrysogenum*: *npe10*, Wisconsin 54-1255 y P2-32

El clon (IztapaCos-5) elegido se utilizó para los experimentos de transformación, se sembraron las cepas *npe10*, Wisconsin 54-1255 y P2-32, en medio de esporulación y posteriormente las esporas obtenidas se sembraron en medio líquido ya crecido el micelio fue tratado con enzimas líticas en diferentes tiempos para la generación de protoplastos y subsecuente transformación. Para *npe10* y P2-32 la exposición a la enzima fue de 3 h y para Wisconsin 54-1255, 3.5 h. Después de este tiempo, se llevó a cabo la transformación con IztapaCos-5 en presencia de fleomicina.

Los transformantes obtenidos se resembraron en concentraciones crecientes de fleomicina (40, 50, 60, 70 y 80 µg/ml) ya que es una forma indirecta de calcular la presencia adicional de copias extras mediante la resistencia a este antibiótico ya que el genoma de *P. chrysogenum* ha adquirido el gen de resistencia *ble*. La máxima concentración tolerada por las cepas fue de 60 µg/ml.

5.5 Análisis cualitativo por cilindros de agar

Las transformantes obtenidos de las cepas *npe10*, Wisconsin 54-1255 y P2-32 que crecieron a una concentración de 60 µg/ml de fleomicina fueron incubadas en medio de producción para realizar el bioensayo, por el método de cilindros de agar, los valores obtenidos se muestran en la Tabla I.

Cepa	<i>npe10</i>	Wisconsin 54-1255	P2-32
Promedio [pen]µg/mL	25.220	47.339	150.897
	20.675	39.006	93.585
	10.625	36.200	88.985
	8.175	62.815	
	7.743	26.997	
	4.765		
Parental	0.000	0.185	3.010

Tabla I. Concentración de penicilina producida por las cepas transformantes en cilindros de agar.

Los valores obtenidos muestran que la cepa *npe10* transformada con *IztapaCos-cluster-5* restablece la capacidad de biosíntesis de penicilina, y los transformantes de Wisconsin 54-1255 producen menor concentración de penicilina con respecto a P2-32, al mismo tiempo ambas cepas producen mayor concentración que su parental, valores esperados por el número de copias contenidas en el genoma de cada una de las cepas.

5.6 Evaluación de producción de penicilina de los transformantes obtenidos de la cepa Wisconsin 54-1255 en fermentación líquida y sólida.

De acuerdo con la tabla I se eligieron los mejores transformantes para evaluar la producción de penicilina en fermentación líquida y sólida. Los transformantes seleccionados de Wisconsin 54-1255 corresponden a una producción de 47.339 y P2-32 a 150.897. Los valores obtenidos en las fermentaciones se muestran a continuación para las cepas: parental, control y transformantes, los parámetros evaluados fueron: pH, biomasa y producción de

penicilina. La evaluación de las cepas se llevó a cabo por triplicado en dos fermentaciones.

5.6.1 Fermentación líquida en la transformante de la cepa Wisconsin 54-1255 (T-Wis-5)

En la Figura 5.9 se muestra la cinética de pH de la cepa Wisconsin 54-1255: parental, control y T-Wis-5. El pH fue óptimo para su crecimiento así como para la producción de penicilina. Este parámetro permanece constante en las tres cepas durante el curso del cultivo, los valores fueron de 6.5 a 7.4, sin diferencia significativa para entre las cepas.

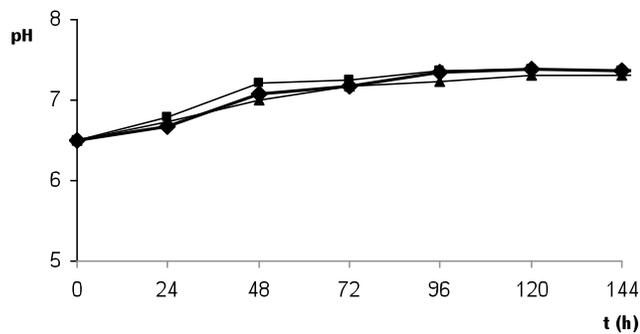


Figura 5.9. Cinética de pH de *P. chrysogenum* de la cepa Wisconsin 54-1255 en fermentación líquida. Indicados como parental (◆), control con vector (■) y T-Wis-5 (▲). Llevada a cabo a 25 °C y 250 rpm durante 144 h, en matraces de 250 mL en medio Somerson por triplicado.

En la figura 5.10 se muestra el incremento en la biomasa que fue medido con el fin de determinar el crecimiento y relacionarlo con la producción de penicilina. Observamos en las primeras horas un aumento gradual hasta las 72 horas, posteriormente una disminución sin diferencia significativa para las tres cepas.

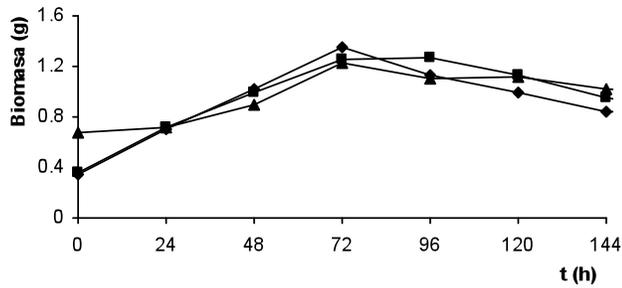


Figura 5.10. Cinética de crecimiento de la cepa Wisconsin 54-1255 en fermentación líquida. Indicando la parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-Wis-5 (▲) T-Wis-5. Llevada a cabo a 25 °C y 250 rpm durante 144 h, en matraces de 250 mL en medio Somerson por triplicado.

En la figura 5.11 se muestra la producción específica de penicilina en las tres cepas en la que se observa la máxima producción a las 144 horas, sin embargo en la cepa Wisconsin 54-1255 (T-Wis-5) a las 144 h la producción es mayor con respecto a la cepa parental y control de manera significativa (Tabla II).

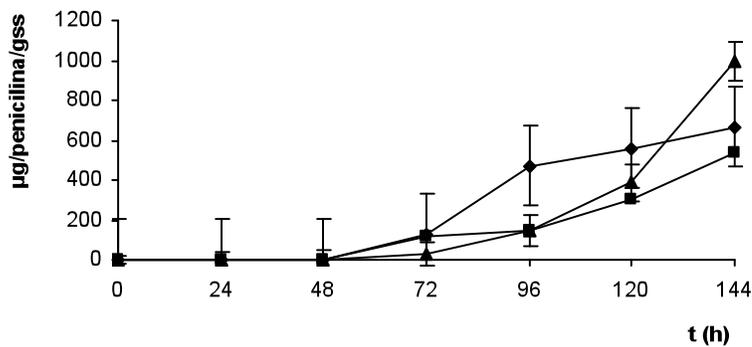


Figura 5.11. Cinética de producción específica de la cepa Wisconsin 54-1255. Indicando la parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-Wis-5 (▲). Llevada a cabo a 25 °C, y 250 rpm durante 144 h, en matraces de 250 mL en medio de Somerson por triplicado. Los resultados se expresaron en µg de penicilina producida por biomasa, calculada por peso seco.

5.6.2 Fermentación sólida en Wisconsin 54-1255

La producción de penicilina en FS (parental, control y transformantes) se llevó a cabo en bagazo de caña, de forma que el micelio invade este sustrato, con la característica de una cantidad limitada de agua libre. Al igual que en la FL el pH es un factor fisicoquímico importante para la producción de penicilina en la figura se muestran los valores de pH que no incrementa de forma significativa para el crecimiento de la cepa 5.12.

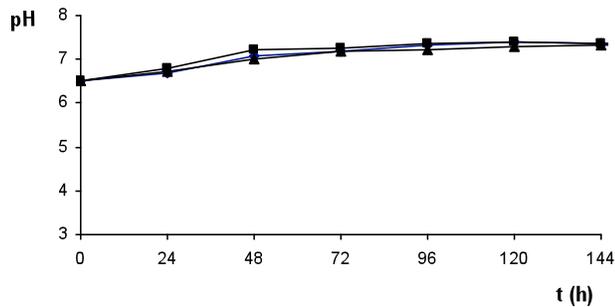


Figura 5.12. Cinética de pH de *P. chrysogenum* de la cepa Wisconsin 54-1255. Mostrando la cepa la parental (♦), el control con el cósmido (■) y transformante T-Wis-5 (▲). Se llevó a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h.

En la figura 5.13 se muestra el crecimiento en biomasa producida por la cepa transformada Wisconsin 54-1255, control y parental. En la gráfica se observa que la velocidad de crecimiento es constante para las tres cepas no mostrando una diferencia significativa.

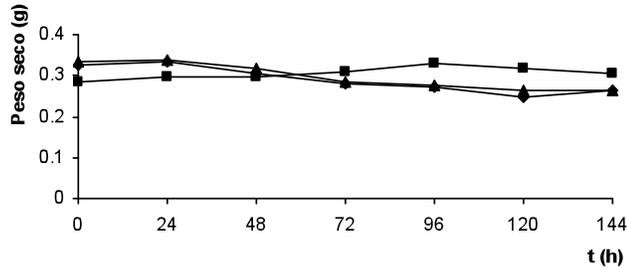


Figura 5.13. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* de la cepa Wisconsin 54-1255 en FS. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-Wis-5 (▲). Se llevó a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h.

La producción de penicilina en FS (parental, control y transformante) se muestra en la figura 5.14. En la gráfica se observa una producción de penicilina mayor en la cepa transformada (T-Wis-5) en comparación con la cepa parental y la transformante estadísticamente significativa mostrada en la tabla II.

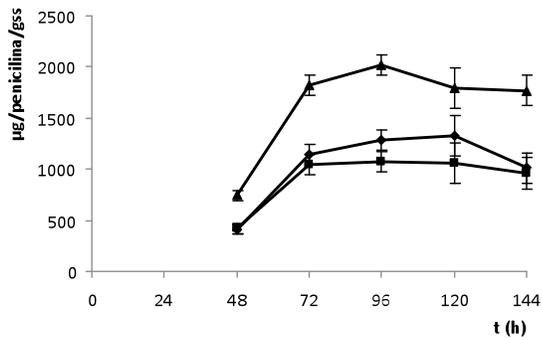


Figura 5.14. Cinética de producción específica de penicilina en FS de la cepa Wisconsin 54-1255. En la que se muestra con símbolos la cepa parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-Wis-5 (▲). Se llevó a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h. Los resultados se expresan como µg de penicilina producida sobre mg de peso seco.

5.6.3 Fermentación líquida en la cepa P2-32 (T-P2-5)

La siguiente figura (5.15) se muestra la cinética de pH, en la cepa transformada P2-32 (T-P2-5), al igual que en la fermentación anterior se ha controlado este parámetro durante todo el cultivo, el pH fue de 6.2-7.0.

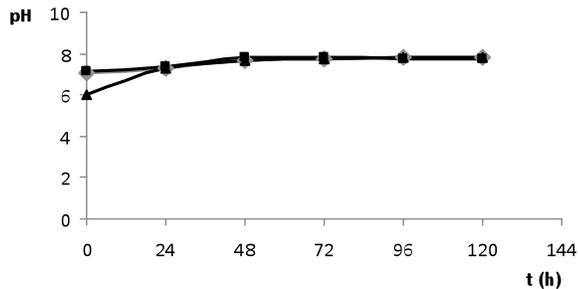


Figura 5.15. Cinética de pH de *P. chrysogenum* de la cepa P2-32. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-P2-5 (▲). Llevada a cabo a 25 °C y 250 rpm durante 144 h, en matraces de 250 mL en medio Somerson por triplicado.

En la figura 5.16 se ha graficado durante el cultivo el crecimiento en el que se muestra de manera gradual sin observarse una diferencia significativa en las cepas estudiadas.

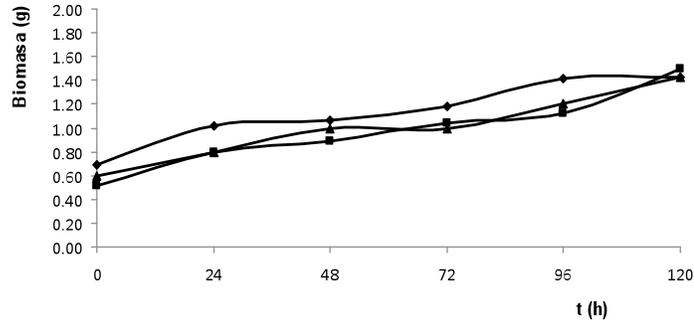


Figura 5.16. Cinética de crecimiento de *P. chrysogenum* de la cepa P2-32 en FL. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (▲) y transformante T-P2-5 (■). Llevada a cabo a 25 °C y 250 rpm durante 144 h, en matraces de 250 mL en medio Somerson por triplicado.

En la 5.17 se muestra la cinética de producción específica de penicilina en la cepa T-P2-5, parental y control durante el curso de cultivo se observa que va incrementando la concentración de antibiótico en la cepa T-P2-5 observando al final del cultivo un incremento mayor en comparación con las cepas control observando una diferencia significativa (Tabla II).

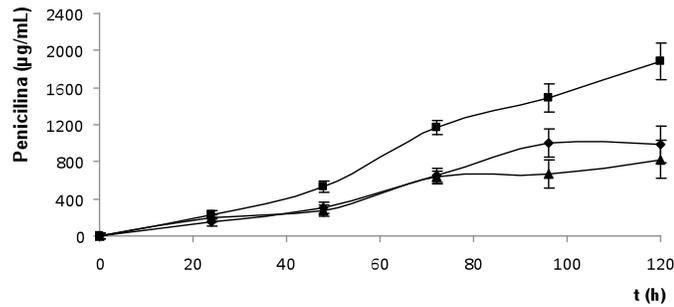


Figura 5.17. Cinética de producción específica de penicilina, en la cepa P2-32 en FL. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (▲) y transformante (■). Se llevó a cabo a 25 °C y 250 r.p.m. durante 5 días en matraces de 250 ml en medio Somerson, los resultados se expresan en µg de penicilina mL.

5.6.4 Fermentación sólida P2-32

En la figura 5.18 se muestra la cinética de pH durante el cultivo de la cepa T-P2-5. Observando que permanece ligeramente constante durante el curso de la fermentación sin mostrar cambios importantes en los que afecte el crecimiento de las cepas.

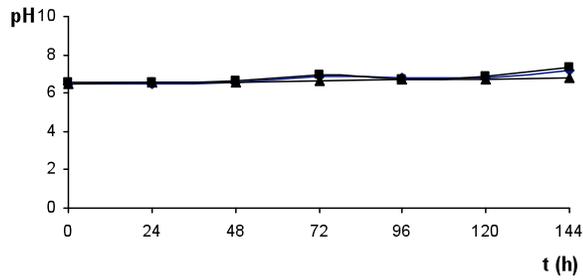


Figura 5.18 Cinética de pH de *P. chrysogenum* de la cepa P2-32 en FS. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-P2-5 (▲). Se realizó en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h.

En la figura 5.19 se muestra el crecimiento medido en biomasa producida por la cepa transformada P2-32 (T-P2-5) en la gráfica se observa que la velocidad de crecimiento es constante para las tres cepas no mostrando una diferencia significativa.

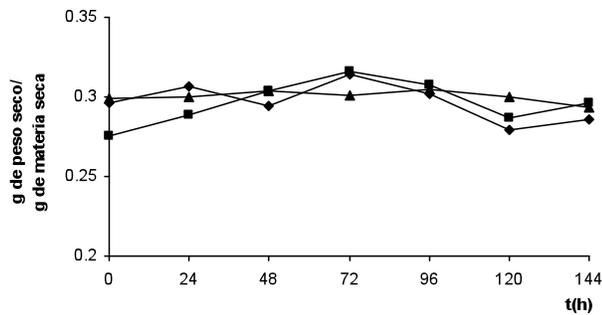


Figura 5.19 Cinética de producción específica de penicilina en FS. Indicando la cepa parental (■), el control con vector (◆) y transformante T-P2-5 (▲). Se llevó a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h.

La producción de penicilina en FS en la cepa P2-32 (T-P2-5) parental, control y transformante se muestra en la figura 5.20 realizada bajo las mismas condiciones que de la fermentación sólida, en la gráfica se observa una

producción mayor en la cepa transformada (T-P2-5) en comparación con la cepa parental mostrando una diferencia estadísticamente significativa (Tabla II).

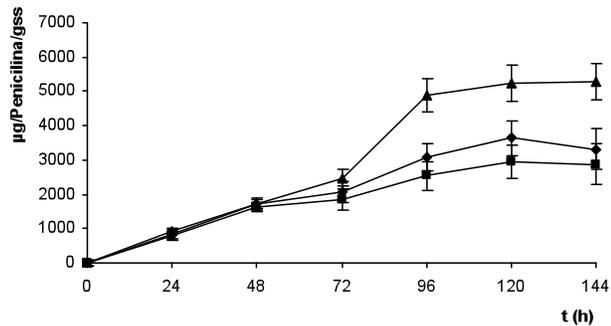


Figura 5.20. Cinética de producción específica de T-P2-5 de penicilina, en FS. Indicando la cepa parental (◆), el control con vector (■) y transformante T-P2-5 (▲) Se llevó a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 144 h. Los resultados se expresan como µg de penicilina producida sobre mg de peso seco.

5.6.5 Análisis estadístico de la producción específica de penicilina.

En la tabla II se muestran los valores obtenidos de producción específica de penicilina en fermentación sólida y líquida para las cepas Wisconsin 54-1255 (T-Wis-5) y P2-32 (T-P2-5), observándose el incremento en la producción en ambas cepas en FL y FS. Estos valores fueron tratados estadísticamente con la T de student para evaluar su significancia estadística.

En la misma tabla se muestra que en fermentación líquida se obtuvo un incremento de producción de $28 \pm 10.9\%$ en Wisconsin, encontrando una diferencia significativa de $P < 0.05$. En la misma cepa en fermentación sólida un incremento de 67 ± 6.24 . En la cepa P2-32 en fermentación líquida encontramos un incremento de 158 ± 23.1 con una diferencia significativa de $p < 0.005$. Y en fermentación sólida de la misma cepa 158 ± 23.1 con una diferencia $P < 0.001$.

5. RESULTADOS

Cepa	Fermentación	Producción de penicilina ($\mu\text{g}/\text{mL}$ o μ/gdc)	Incremento en la producción (%)
Wis 54-1255	FL		28 \pm 10.9
	Parental	808 \pm 136 ^a	
	T-Wis-5	1036 \pm 143 ^b	
	FS		67 \pm 6.24
	Parental	1203 \pm 137 ^c	
	T-Wis-5	2022 \pm 121 ^d	
P2-32	FL		158 \pm 23.1
	Parental	996 \pm 106 ^e	
	T-P2-5	2574 \pm 126 ^f	
	FS		93 \pm 8.3
	Parental	2674 \pm 667 ^g	
	T-P2-5	5159 \pm 90 ^h	

Carolina 15/7/09 03:50 PM

Formatted Table

Tabla II. Incremento en la producción de penicilina de las cepas transformantes Wis 54.1255 y P2-32, comparadas con la cepa parental en fermentación sólida y fermentación líquida.

Los valores mostrados son el promedio de 6 repeticiones de cada experimento. Los valores muestran las diferencias entre b,d,f y h son significativamente mayores que a,c,e y g respectivamente (obtenidos por la prueba de T de student, $P < 0.05$ y <0.005 , <0.001 y <0.001 que corresponden a gdc).

6. DISCUSIÓN

6.1 Biblioteca genómica e identificación del grupo de genes de la biosíntesis de penicilina.

La biblioteca genómica fue construida en un vector diseñado para este trabajo llamado IztapaCos (Sierra, 2005); este contiene un gen de resistencia a fleomicina (*ble*) que permite la transformación directa a hongos. El primer objetivo de este trabajo fue obtener sondas de los extremos de *cluster* de la biosíntesis de la penicilina con el objeto de identificar y extraer el genes de la ruta de la biosíntesis de penicilina.

El segundo objetivo fue aislar las colonias de *E. coli* con el cósmido que contiene el *cluster* de la biosíntesis de penicilina. Se obtuvieron 13 colonias positivas de *E. coli* por rastreo (screening) para ambas sondas, y de estas se aisló el cósmido con el *cluster* y se analizó nuevamente por rastreo para confirmar que fueran positivas para ambas sondas.

La elección del IztapaCos-*Cluster*, observado en las figuras 5.7 y 5.8, se realizó con base a las señales de hibridación comparado con el mapa de restricción del *cluster* en esta región. Se observa que hay cuando menos 7 kb de ADN río abajo del gen *pcbAB* y 2 kb río abajo del gen *penDE*.

Con el IztapaCos-*Cluster*-5 se transformaron las cepas *P. chrysogenum* de alta y baja producción de penicilina (Wisconsin 54-1255 y P2-32), (como control *npe10*), con el objetivo de incrementar la producción de penicilina. En un trabajo previo a este Theilgaard y col. (2001) reportaron resultados positivos al transformar cepas de baja producción (Wisconsin 54-1255) con el cluster completo, sin embargo obtienen menor incremento cuando se introducen los genes separados de *pcbAB* y *pcbC-penDE*; todo esto en fermentación líquida.

Para la elección de los mejores transformantes de *npe10*, Wis 54-1255 y P2-32, éstas fueron sembradas en medio de producción de forma de cilindros de agar para conocer su resistencia a fleomicina. De los resultados obtenidos se seleccionaron aquellos conteniendo un número más alto de copias de acuerdo a sus respectivas resistencias (gen *ble*). De la cepa *npe10* obtuvimos 6 transformantes que producían penicilina; lo que confirma que el *cluster* esta completo y funcional. De la cepa Wisconsin 54-1255, 5 y P2-32, 3 estos transformantes crecieron a 60 µg en medio suplementado con fleomicina. De estos se eligieron los que mostraron concentraciones mayores de producción de penicilina (47.339 y 150.897 µg/mL respectivamente).

6.2 Fermentación líquida y sólida e implicaciones genéticas

En este trabajo utilizamos como estrategia para incrementar la producción de penicilina cultivos en medio sólido previamente reportado por Barrios-González y *col.* (1993) y medio líquido, como último objetivo del presente trabajo. El sustrato que utilizamos para realizar la fermentación sólida es una base de bagaso de caña de azúcar, utilizado como sustrato inerte. Sobre de este bagaso pretratado se cultivaron las cepas parentales y transformadas de *P. chrysogenum*, Wis 54-1255 y P2-32.

La producción de penicilina de T-Wis-5 y T-P2-5 fue evaluada comparada con la producción mostrada por las cepas paternas en el mismo experimento. Así como con las cepas paternas transformadas con IztapaCos (vector sin el *cluster*) que sirvió como control, la producción del éste ultimo transformante fue ligeramente menor que el de las cepas parentales. En relación a lo anterior los transformantes (T-Wis-5 y T-P2-5) mostraron incremento en la producción de penicilina en ambos tipos de fermentación en relación con las cepas parentales sin embargo la cepa T-P2-5 mostro mayor incremento en fermentación líquida, mostrando diferencias estadísticamente significativas comparadas con la cepa parental.

Realizando el análisis estadístico en la cepa T-Wis-5, el aumento de producción de penicilina fue más alto en FS en relación a la FL (el 67 % contra el 28 %, $P < 0.01$). Al contrario para la cepa T-P2-5, el aumento de producción fue más alto en FL (el 158 % contra el 93 %, $P < 0.001$), alcanzando 5,159 μg de penicilina por mg de micelio (gdc) en FS y 2,674 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en FL.

Por otro lado, la producción específica incrementó de 730.9 ± 57.2 a 856.9 ± 89.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la cepa T-Wis-5 ($P < 0.01$), y 748.3 ± 68.5 a 1700.1 ± 31.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ por la cepa T-P2-5 ($P < 0.0001$). Este parámetro fue determinado en FL, y muestra que el aumento de la producción de penicilina no se debe al crecimiento en biomasa.

Estudios realizados por Barrios-González y *col.* 1993, sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum*, indican que las respuestas bioquímicas y fisiológicas de microorganismos en FS se diferencian enormemente de aquellos en FL, ya que se ven modificados los niveles de producción en ambos tipos de fermentaciones, por lo que es necesario mejorar las cepas destinadas a cada tipo de fermentación especialmente en FS ya que este es su medio natural de los hongos.

Con respecto a lo anterior en este trabajo se muestra que las cepas más cerca al tipo silvestre tienden a expresar su potencial en la producción de penicilina más eficiente en FS, sugiriendo que durante el curso de los programas de mejoramiento genético las cepas superproductoras han sido mejoradas por la industria para FL y que a su vez han perdido algunas características importantes para la adaptación en medio sólido (Barrios-González y *col.* 1993).

Contrariamente, en la cepa P2-32, con la introducción de copias extras tiene un efecto marcado en la FL. Aparentemente, "los genes de medio sólido", en Wisconsin 54-1254 se encuentran mejor conservados, por lo que la capacidad de expresión es en FS en la que al mismo tiempo adquieren una nueva capacidad de biosíntesis en en FS, mientras que el incremento de genes no conservan las

características en la cepa P2-32. Este mismo comportamiento puede explicar la diferencia entre el nivel de producción de Wis en FS y en FL (entre el sistema de cultivo) en el que se observa mayor concentración en la cepa transformante T-Wis-5 (del 49 % a casi el 100 % más alto en FS), mientras esta diferencia se hizo más pequeña en el caso de P2-32 (de 168 al 100 % más alto en FS).

Las cepas industriales de *Penicillium chrysogenum* que producen altos títulos de penicilina contienen un número de copias elevado del *cluster* de penicilina, que se encuentran en repeticiones en tándem (Fierro y col. 1995; Newbert 1997). Hasta ahora, los estudios para mejorar la producción de penicilina por la introducción de las copias adicionales de los genes de biosíntesis de penicilina solo se habían realizado en cepas de baja producción mismas que contienen una copia del *cluster* de penicilina (Veenstra y col. 1991; Theilgaard y col. 2001). Este trabajo se realizó en la cepa P2-32 que contiene 14 copias del *cluster* de penicilina (Barredo y col. 1989b).

Thykaer y Nielsen (2003) propusieron que existe un límite en cuanto al número de copias del *cluster* que están presentes en una cepa aún así la producción se ve incrementa y proponen que no existe una linealidad con respecto al número de copias entre y la producción de penicilina. Nuestros resultados muestran que aún la cepa P2-32, con un alto número de copias del *cluster* de penicilina, es todavía susceptible de mejora según la estrategia de aumentar la dosificación génica de los genes de penicilina.

6.3 Implicaciones metabólicas

Como mencionamos antes, la cepa transformante P2-32 (T-P2-5) mostró un incremento en la producción de penicilina (comparado con la cepa parental) en comparación con la transformante Wis 54-1255 (T-Wis-5), tanto en FL como FS. Estos resultados podrían tener una explicación que no esta relacionada con los genes de la biosíntesis. P2-32 es una cepa con una historia de mutaciones y selecciones para la elevar la producción de penicilina. Esto quiere decir que ha

estado acumulando mutaciones, modificando las funciones diferentes de la biosíntesis de penicilina (genes accesorios), un ejemplo podría ser la capacidad para la exportación del antibiótico de exportación.

Un número de estos genes han sido descritos por Kiel y *col.* 2005; Lamas-Maceiras y *col.* 2006; García-Rico y *col.* 2008. Las mutaciones contribuyen a una mejor expresión del alto potencial para llevar a cabo la biosíntesis de penicilina (debido al incremento de los genes de la biosíntesis). Mutaciones complementarias en la cepa P2-32, pueden haber contribuido a la secreción eficiente de penicilina después del incremento del número de copias del *cluster* de la biosíntesis de penicilina por transformación.

En el resumen, nuestros resultados muestran que tanto las cepas de baja producción como de alta que han sido transformadas con el *cluster* (*pcbAB-pcbC-penDE*) incrementan la producción de penicilina tanto en fermentación sólida como en líquido.

7. CONCLUSIONES

1. La estrategia de aumentar la dosis génica en las cepas Wisconsin 54-1255 y P2-32 es válida para incrementar la producción de penicilina mediante fermentación.
2. Al incrementar las dosis genica en la cepa Wisconsin 54-1255, que contiene una copia del *cluster* de la biosíntesis de penicilina, se incrementó la producción tanto en fermentación sólida como en la líquida.
 - a. En fermentación sólida el incremento fue mayor que en la fermentación líquida ($67 \pm 6.24\%$ y $28 \pm 10.9\%$, respectivamente).
3. Al incrementar la dosis génica en la cepa P2-32, que contiene entre 9 y 14 copias del *cluster*, también se incrementó la producción de penicilina secretada.
 - b. En fermentación líquida el incremento fue mayor que en la fermentación sólida ($158 \pm 23.1\%$ y $93 \pm 8.3\%$ respectivamente).
4. Los datos mostraron que aún con el alto contenido de copias de la cepa P2-32 se permite la posibilidad de aceptar nuevas copias del *cluster*, y esto a su vez se traduce en una mayor capacidad de síntesis de penicilina.
5. La mayor producción obtenida para la fermentación líquida fue con la cepa transformante T-P2-5, proveniente de la cepa P2-32, con una producción de 2574 ± 126 en fermentación líquida y 5159 ± 90 en sólida. Esto indica que para obtener una cepa de mayor producción es conveniente partir de una cepa sobreproductora, aunque haya sido desarrollada originalmente para fermentación líquida.

8. PERSPECTIVAS

La penicilina frecuentemente ha sido utilizada para el tratamiento de numerosas enfermedades. En la actualidad sigue siendo producida por la industria farmacéutica en altas concentraciones, en este sentido la mejora de cepas por ingeniería genética ha mostrado ser una buena estrategia para elevar su producción. En relación con lo anterior el presente trabajo plantea diferentes líneas considerando los resultados obtenidos: Los genes que fueron integrados al genoma de *Penicillium chrysogenum* se han insertado de manera azarosa es de considerar realizar una detección dentro de los cromosomas para la elección de cepas altamente productoras.

Por otro lado, y en el mismo sentido, al modificar el genoma con el cluster de la vía de la biosíntesis de penicilina el organismo en consecuencia deberá modificar algunos otros genes que estén involucrados en el proceso, como los de secreción del antibiótico. Se plantea detectar el gen que está íntimamente relacionado con la formación de microcuerpos y realizar la inserción de este y otros genes involucrados para favorecer la secreción de la penicilina sintetizada.

Estas modificaciones también recaen en el proteoma de otras vías metabólicas, ya que como consecuencia de la modificación genómica las proteínas de esta y otras vías pueden verse alteradas. A este respecto sería indispensable evaluar la concentración de proteínas producidas, para evitar “cuellos de botella” en la secreción de la penicilina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, E.P., Chain, E., Florey, H.W., Florey, M.E., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G. (1949). En *Antibiotics*, Vol. 2 (pp. 631-671). E.P. Abraham, E. Chain, H.W. Florey, N.G. Heatley, M.A. Jennings y A.G. Sanders, eds. Oxford University Press, Londres.
2. Álvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Díez, B., Martín, J.F. (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1675-1682.
3. Álvarez, E., Meeschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Díez, B., Barredo, J.L., Martín, J.F. (1993). The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-minopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. *Eur. J. Biochem.* 215:323-332.
4. Anné, J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura.* 25:1-117.
5. Aoki, H., Okuhara, M. (1980). Natural β -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:159-181.
6. Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Cole, S.C.J., Sutherland, J.D., Tobin, M.B. (1993a). On the production of α,β -heterodimeric acyl-coenzyme A:isopenicillin N-acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *FEBS Lett.* 319:166-170.
7. Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Roach, P.L., Robinson, C.V., Schofield, C.J. (1993b). Investigations into the post-translational modification and mechanism of isopenicillin N:acyl-CoA acyltransferase using electrospray mass spectrometry. *J. Biochem.* 294:357-363.
8. Backus, M.P., Stauffer, J.F (1995). The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia.* 47:429-463.
9. Balakrishnan, K., Pandey, A. (1996). Production of biologically active

- secondary metabolites in solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 55:365-372.
10. Banko, G., Wolfe, S., Demain, A.L. (1986). Cell-free synthesis of δ (L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine, the first intermediate of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:528-535.
 11. Banko, G., Demain, A.L., Wolfe, S. (1987). δ (L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine: a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillins and cephalosporins precursors. *J. Am. Chem. Soc.* 109:2858-2860.
 12. Barredo, J.L. (1990). Análisis de una región del genoma de *Penicillium chrysogenum* que contiene los genes *pcbC* y *penDE*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
 13. Barredo, J.L., Díez, B., Álvarez, E., Martín, J.F. (1989a). Large amplification of a 35 kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 16:453-459.
 14. Barredo, J.L., van Solingen, P., Díez, B., Álvarez, E., Cantoral, J.M., Kattevilder, A., Smaal, E.B., Groenen, M.A.M., Veenstra, A.E., Martín J.F. (1989b). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A: 6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. *Gene.* 83:291-300.
 15. Barrios-González, J., Castillo, T.E., Mejía, A. (1993). Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnol Adv* 11:539-547.
 16. Barrios-González, J., Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotech. Annu. Rev.* 2:85-88.
 17. Barrios-González, J., Fernández, F.J., Tomasini, A. (2003). Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J. Biotech.* 2:322-333.
 18. Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H.C., Rolinson, G.N. (1959). Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations.

- Nature*. 183:257-258.
19. Bul'Lock, J., Halminton, D., Hulme, M.A., Powell, A.J., Shepherd, D., Smalley, H.M., Smith, G.N. (1965). *Canadian Journal of Microbiology*. 11:765-778.
 20. Carr, L.G., Skatrud, P.L., Scheetz, M.E.2nd., Queener, S.W., Ingolia, T.D. (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene*. 48:257-266.
 21. Cantoral, J.M., Gutierrez, S., Fierro, F., Gil Espinosa, S., van Liempt, H. Y Martin, J.F. (1993). Biochemical characterization and molecular genetic of nine mutant of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillum biosynthesis. *J. Biol. Chem*. 268: 737- 744.
 22. Chang, L.T., Terasaka, D.T., Elander, R.P. (1982). Developments in Industrial *Microbiology*. 23:21-9.
 23. Davis, B.D. (1949). The isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by means of penicillin. *Proceedings of the national academy of sciences USA*. 35: 1-10
 24. Deacon, J.W. (1984). Introduction to modern mycology. Oxford, Blackwell Science.
 25. Demain, A.L. (1980). The new biology: opportunities for fermentation industry, in Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 4 Ed. Tsao, G.T. pp. 93-208. Orlando, Academic Press.
 26. Díez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H., Martin, J.F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes *J. Biol. Chem*. 265 (27):16358-16365.
 27. Elander, R.P. (1983). Strain improvement and preservation of β -lactam producing microorganisms. In: Antibiotics Containing the β -Lactam Structure (Demain AL and NA Solomon, eds), pp 97-146, I Springer, Berlin Heidelberg New York.
 28. Elander, R.P. (1985). Present and future roles for biotechnology in the fermentation industry, in *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 26.

- Ed. Underkofler, L.A., pp. 347-376. Arlington, Society for Industrial Microbiology.
29. Elander, R.P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:385-392.
 30. Fernández, F.J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*). de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León.
 31. Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A. (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 246:110-118.
 32. Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B., Martín, J.F. (1993). Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 mb). in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 mb). in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* 241:573-579.
 33. Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Martín, J.F. (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6200-6204.
 34. Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10:226-236.
 35. Florey, H. 1945. The use of micro-organisms for therapeutic purpose. *British medical Journal.* 635-642.
 36. García-Rico, R.O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández, B., M.A., Martín, J.F. (2008). The heterotrimeric G α protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* (in press).
 37. Hahn-Hägerdal, B. (1986). Water activity: A possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme. Microbiol.* 8:322-327.
 38. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with

- plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
39. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. En: DNA cloning: a practical approach (pp. 109-135). D.M. Glover, ed. IRL Press, Oxford.
 40. Hersbach, G.J.M., van der Beek, C.P., van Dijck, P.W.M. (1984). The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation. *Biotechnol. Industr. Antibiot.* 22:45-140.
 41. Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64:175-186.
 42. Holmes, D.S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.
 43. Hynes, M.J., Corrick, C.M., King, J.A. (1983). Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol. Cell Biol.* 3:1430-1439.
 44. Kennedy, J., Turner, G. (1996). δ -(L- α aminoadipy')-L-cysteinyl-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 253:189-197.
 45. Kiel, J., van der, J., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A.L., Veenhuis, M. (2005). Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum* 42:154-162.
 46. Kobs, G. (1996). pGEM®-T Vector: Cloning of modified blunt-ended DNA fragments. *Promega Notes Magazine.* 55:28.
 47. Komatsu, K., Mizuno, M., Kodaira, R. (1975). Effect of methionine on cephalosporin C and penicillin production by a mutant of cephalosporium acremonium. *J. Antibiotc.* 28:881-887.
 48. Kosalková, K., Marcos, A.T., Fierro, F., Hernando-Rico, V., Gutierrez, S., Martín, J.F. (2000). A novel heptameric sequence (TTAGTAA). is the binding site for a protein required for high level expression of *pcbAB*, the first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 275:2423-2430.
 49. Laich, F., Fierro, F., Martín, J.F. (2002). Production of penicillin by fungi

- growing on food products: identification of a complete penicillin genecluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1211-1219.
50. Lamas- Maceiras. M., Vaca, I., Rodríguez, E., Casqueiro, J., Martín, J.F. (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an arylcapping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochem J.* 395:147-155.
51. Lein, J. (1986). The Panlabs penicillin strain improvement program. In: Vanek, Z., Hostalek, Z. (Eds.), *Overproduction of Microbial Metabolites*. Butterworths, Boston, pp. 105-139.
52. Lendenfeld, T., Ghali, D., Wolchek, M., Kubicek-Pranz, E.M., Kubicek, C.P. (1993). Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 268:665-671.
53. Liras, P., Martín, J.F. (2006). Gene cluster for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have cluster involved, and from where did they originate? *Int. Microbiol.* 9:9-19.
54. Lode, H., Janish, P., Kupper, G., Weuta, H. (1974). Comparative clinical pharmacology of three ampicillins and amoxicillin administered orally. *J. Infect. Dis.* 129 (supl.): S156-S169.
55. Lopez-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M., Martín, J.F. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of α -amino adipyl-L-cysteinyl-D-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:343-351.
56. Luengo, J.M. (1995). Enzymatic synthesis of hydrophobic penicillins. *J. Antibiot.* 48:1195-1212.
57. Luengo, J.M., Peñalva, M.A. (1993). Penicillin biosynthesis. En: "Aspergillus: 50 years on". *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 29 (pp.603-638). S.D. Martinelli y J.R. Kinghorn, eds. Elsevier, Amsterdam.
58. MacDonald, K.D., Hold, G. (1976). Genetics of biosynthesis and overproduction of penicillin. *Sci. Prog. Science Progress.* 63:547-573.
59. Martín, J.F. (2000). A novel heptameric sequence (TTAGTAA). is the binding site for a protein required for high level expression of *pcbAB*, the

- first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 275:2423-2430.
60. Martín, J.F., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Velasco, J., Fierro, F., Marcos, A.T., Kosalkova, K. (1994). Expression of genes and processing of enzymes for the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Antonie van Leeuwenhoek* 65:227-243.
61. Martín, J.F., Liras, P. (1989). Molecular genetics of fungal secondary metabolites. En *Applied Molecular genetics of filamentous fungi* (pp. 214-252). J.R Kinghorn y G. Turner, eds. Blakie and Son Ltd; Glasgow, Reino Unido.
62. Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics* (pp. 352-355). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
63. Montenegro, E. (1996). Caracterización del gen *penDE* de *Aspergillus nidulans*, y su producto génico, isopenicilina N aciltransferasa. Tesis Doctoral. Universidad de León.
64. Moyer, A.J., Coghill, R.D. (1946). Penicillin. IX. The laboratory scale production of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). *J. Bacteriol.* 51:79-93.
65. Mudgett, R.E., (1986). Solid state fermentation, In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Eds. Demain AL & Solomon NA, Washington, *American Society for Microbiology*, 66-84.
66. Müller, W.H., Bovenberg, R.A.L., Groothuis, M.H., Kattenvilder, F., Smaal, E.B., van der Voort, L.H.M., Verkleij, A.J. (1992). Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis *Biochim. Biophys. Acta* 1116:210-213.
67. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalized chain reaction. *Methods in enzymology.* 155:335-350. R. Wu. Ed. Academic Press, San Diego, E.U.A.
68. Nielsen, J. (1997). *Physiological engineering aspects of Penicillium chrysogenum*. Singapore: World Scientific Publishing. pp.269.
69. Nielsen, J., Krabben P. (1995). Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 46:588-598.

70. Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchel, D. (2000). New developments in solid state fermentation. I processes and products. *Process Biochem.* 35:1153-1169.
71. Pateman, J.A., Kinghorn, J.R. (1976). Nitrogen metabolism. Pp. 159-237. In: J. E. Smith and D.R. Berry (eds.). *The Filamentous Fungi*, Vol. II. Edward Arnol, London, UK.
72. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *J. Biotech.* pp. 1:174-187.
73. Ramos, F.R., López-Nieto, M.J., Martín, J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:380-387.
74. Rao, K.C.S., Karanth, N.G., Sattur, A.P. (2005). Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochem.* 40:2517-2522.
75. Raper, K.B., Alexander, D.F., Coghill, R.D (1944). *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bacteriol.* 48:639-659.
76. Roach, P.L., Clifton, I.J., Fülöp, V., Harlos, K., Barton, G.J., Hajdu, J., Andersson, I., Schofield, C.J., Baldwin, J.E. (1995). Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature.* 375:700-704
77. Robinson, T., Singh, D., Nigem, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 55:284-289
78. Rowlands, R.T (1991). Industrial improvement of the Panlabs Penicillin Club. p. 258-264. In Kleinkauf, H. and H. von Döhren (eds.), 50 years of penicillin application, history and trends. PUBLIC Ltd., Czech Republic.
79. Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Hurn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-1354.
80. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory*

- manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
81. Samsom, S.M., Belagaje, R., Blankenship, D.T., Chapman, J.L., Perry, D., Skatrud P.L., van Frank, R.M., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Queener, S.W., Ingolia, T.D. (1985). Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* 318:191–194.
 82. Sierra, E.C. (2005). Construcción de un cósmido para la clonación y expresión de genes fúngicos. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
 83. Smith, D., Burnham, M.K.R., Edwards, J., Earl, A.J., Turner, G. (1990). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology* 8:39-41.
 84. Somerson, N.L., Demain, A.L., Nunheimer, T.D. (1961). Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -amino adipic acid. *Arch. Biochem.* 93:238-241.
 85. Theilgaard, H., van Der Berg, M., Mulder, C., Bovenberg, R., Nielsen, J. (2001). Quantitative Analysis of *Penicillium chrysogenum* Wis54-1255 Transformants overexpressing the Penicilin Biosynthetic genes. *Biotech. Bioeng.* 724:379-388.
 86. Thykaer, J., Nielsen, J. (2003) Metabolic engineering of β -lactam production. *Metabol. Eng.* 5:56-69.
 87. Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., Arst, H.N.Jr. (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.
 88. Tobin, M.B., Baldwin, J.E., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Skatrud, P.L., Sutherland, J.D. (1993). The requirement for subunit interaction in the production of *Penicillium chrysogenum* acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase in *Escherichia coli*. *Gene* 132:199-206.
 89. Tobin, M.B., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Baldwin, J.E., Sutherland, J.D. (1995). Amino-acid substitutions in the cleavage site of acyl-coenzyme

- A:isopenicillin N acyltransferase from *Penicillium chrysogenum*: effect on pro-enzyme cleavage and activity. *Gene* 162:29-35.
90. Tobin, M.B., Fleming, M.D., Skatrud, P.L., Miller, J.R. (1990). Molecular characterization of the acyl-Coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:5908-5914.
91. Veenstra, A.E., van Solingen, Bovenberg R.A.L., Vorort, v.d. (1991). Strain improvement of *Penicillium chrysogenum* by recombinant DNA techniques. *J. Biotech.* 17:81-90.
92. Vining, L.C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:395-427.
93. Wainwright, M. (1992). Introducción a la Biotecnología de los Hongos. España. Ed. Acribia S. A pp. 24-25.

México D.F. a 21 de Julio del 2009

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

**Incremento en la dosis génica (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) en *Penicillium
chrysogenum* para elevar la producción de penicilina G en fermentación
sólida y líquida**

que presentó

Carolina Campos Muñiz

Comité Tutorial

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesora: Dra. Adriana Garay Arroyo

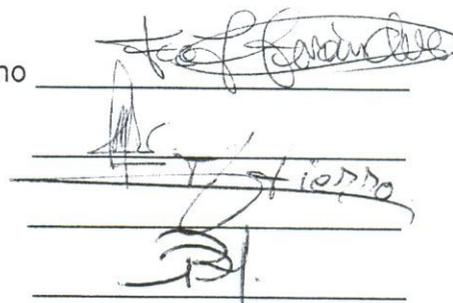
Jurado

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura



Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines.