

Universidad Autónoma Metropolitana



Estudios moleculares de la regulación por pH en la
producción de cefalosporina C por *Acremonium*
chrysogenum

TESIS
para obtener el grado de:
Doctora en Biotecnología
PRESENTA
Tania Ethel Cuadra Zelaya

Director:
Dr. Francisco José Fernández Perrino

Octubre 2008

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través de los proyectos “Producción de cefalosporina en medio sólido: utilización de cepas convencionales de *Acremonium chrysogenum* y de cepas modificadas genéticamente de *Penicillium chrysogenum*” (ref. 36801) y “Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*” (ref. 54662)

México D.F. a 24 de octubre de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por
Acremonium chrysogenum

que presentó
Tania Ethel Cuadra Zelaya

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-director: Dr. Javier Barrios González

Asesora: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

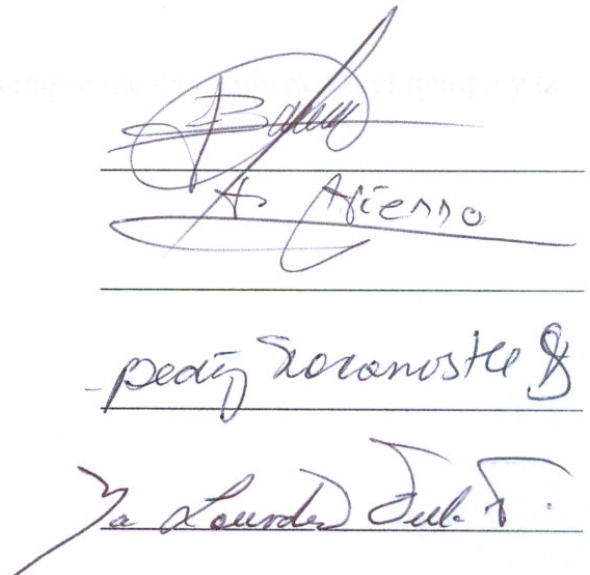
Jurado:

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Vocal: Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca



Handwritten signatures of the jury members, each on a horizontal line. The signatures are: 1. Dr. Javier Barrios González (President), 2. Dr. Francisco Fierro Fierro (Secretary), 3. Dra. Beatriz Xoconostle Cázares (Vocal), and 4. Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca (Vocal).

A Dios,

A mis padres Juan y Norma

A mis hermanas Florence y Carmen Dinora

Por las millones e inmensas muestras de amor que siempre me dan, superando el tiempo y la distancia.

Agradecimientos

A Becas FANTEL y a la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por las becas sin las cuales no habría podido realizar mis estudios de postgrado.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino: Gracias Paco por permitirme participar en tus proyectos, apoyarme y confiar en mí.

Al Dr. Javier Barrios González: Gracias por guiarme y enseñarme a interpretar los resultados, mostrarme varias formas de como las ideas pueden fluir, a superar las frustraciones y a mantener la calma cuando los experimentos no salen como uno espera.

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por sus enseñanzas, apoyo y cariño constantes durante toda mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Francisco Fierro por la exhaustiva revisión de esta tesis, valiosas sugerencias comentarios y conversaciones analíticas.

A la Dra. Lourdes Villa y Beatriz Xoconostle por su amabilidad y accesibilidad en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario: Jaime, Ángel, Jesús, Sandra, Arturo, Mónica, Rocío, Julio, Rosa, Juanito, Roxana, Maura, Hugo... por compartir la vida del laboratorio, por acompañarme y animarme en los momentos de frustración, pero sobre todo organizar esos momentos de jubiloso esparcimiento. Nadiel, Adriana, Doris, Isis, Cristian, Néstor, Jessica, Tere, Nayeli, Felipe, Octavio, Vicky y Ana por brindarme su amistad pero sobretodo enseñarme la calidez y alegría de México.

A Carolina y Gaby por incluirme en sus proyectos, motivarme, apoyarme y confiar en mí brindándome su amistad.

A la familia Gómez, Cadena, a Magally y Esther por ser mi familia aquí en México.

A Edgar Sierra por estar allí, ser mi compañero, mi amigo... por llenarme de felicidad e ilusiones.

Resumen

El pH ambiental juega un papel importante en la determinación de los niveles de transcripción de muchos genes fúngicos cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente o en las fronteras celulares, y existe evidencia de que entre los genes regulados por pH ambiental se incluyen los que codifican para antibióticos β -lactámicos.

A pesar de la importancia de *Acremonium chrysogenum* como el único microorganismo productor de cefalosporina C (CPC), la comprensión acerca de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de este compuesto es todavía limitada. Dada la relación observada entre el pH ambiental y la producción de CPC, tanto en cultivos sumergidos (FL) como en cultivos en estado sólido (FS), en el presente trabajo se consideró importante estudiar desde un punto de vista molecular la expresión de distintos genes que pudieran estar implicados en este fenómeno, bajo diferentes condiciones de pH y en los dos sistemas de cultivo mencionados.

Se encontraron similitudes y diferencias que caracterizan la producción de CPC por *A. chrysogenum* bajo condiciones variables de pH ambiental y contenido de nutrientes en FS y FL, evidenciadas mediante parámetros tales como producción de CPC, pH, crecimiento, consumo de azúcares y niveles de expresión de varios genes involucrados directa o indirectamente en la producción de CPC. Se encontraron, asimismo, indicios de que solamente algunos genes involucrados en la biosíntesis del antibiótico pudieran estar regulados por el pH ambiental, al aumentar su transcripción con el pH del medio.

Finalmente, se realizó la transformación de dos cepas de *A. chrysogenum* con secuencias del gen *pacC* diseñadas para estudiar su efecto en la expresión de genes cuya transcripción es regulada por el pH ambiental. Estos experimentos mostraron aumento de la producción de CPC, pero especialmente aumento exponencial de los antibióticos formados en los primeros pasos de su biosíntesis; lo cual sugiere la hipótesis de que uno de, o los primeros cinco genes pertenecientes a esta ruta de biosíntesis están regulados por el pH ambiental. Estos resultados confirman a esta estrategia de ingeniería genética como una prometedora alternativa para mejorar la producción del antibiótico.

Abstract

Environmental pH plays an important role on determining transcription levels of several related fungal genes related which final products should function outside of the cell environment or at the cell surface. There is also available evidence supporting the fact that among environmental pH-regulated genes those encoding β -lactam antibiotics biosynthesis can be included.

Although the importance of *Acremonium chrysogenum* as the only cephalosporin C (CPC) producer microorganism, there is still a limited understanding about molecular mechanisms regulating this antibiotic biosynthesis. Based on the relationship between environmental pH and CPC production, as well as in liquid cultures (FL) as in solid state cultures (FS), we consider important to study from the molecular point of view, the gene expression related with this phenomena, under different pH conditions in the culture systems mentioned.

It is reported by the first time many similarities and differences characterizing CPC production by *A. chrysogenum* under variable pH and nutrient content conditions in FS and FL. This characterization is supported by parameters like CPC production, pH, growth, and sugar uptake and expression levels of several genes involved in a direct or indirect way to CPC production. Available observations suggested that just some of the genes involved with the antibiotic biosynthesis could be regulated by environmental pH (regulation mediated by the transcription factor PACC) because of their increased transcription along the media pH.

Finally, the genetic transformation of two *A. chrysogenum* strains with *pacC* sequences designed to study their effect on the genes whose transcription is regulated by ambient pH. These experiments offered more data, which suggest the hypothesis that, at least one or the five of the firsts genes belonging to the CPC biosynthesis route are regulated by ambient pH, giving evidence to confirm this genetic engineering strategy as a promising alternative to improve antibiotic production.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Biosíntesis de cefalosporinas	4
2.1.1 Pasos limitantes en la biosíntesis de cefalosporina C	6
2.2 Regulación de la biosíntesis de cefalosporina C	8
2.3 Regulación por pH ambiental mediada por el factor de transcripción PACC en hongos filamentosos: alternativa para el mejoramiento genético de la producción de antibióticos β-lactámicos	10
2.3.1 Regulación por pH mediada por PACC en <i>Aspergillus nidulans</i>	11
2.3.1.1 Mutaciones en el gen <i>pacC</i> de <i>Aspergillus nidulans</i>	13
2.3.1.2 Reconocimiento de la regulación por pH ambiental mediada por el factor de transcripción PACC	13
2.4 Regulación por pH en <i>Acremonium chrysogenum</i>	14
2.4.1 Cultivos en medio sólido	14
2.4.2 Cultivos en medio líquido	16
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
6. Materiales y Métodos	21
6.1 Cepas	21
6.2. Vectores plasmídicos	21
6.3 Medios de cultivo	22
6.3.1 Medios de cultivo para bacterias:	22
6.3.2 Medios de cultivo para <i>Acremonium chrysogenum</i>	22
6.4 Crecimiento de los microorganismos	24
6.4.1 Crecimiento de <i>E. coli</i>	24
6.4.2 Crecimiento de <i>Acremonium chrysogenum</i>	25
6.4.2.1 Condiciones para la obtención de inóculo primario	25
6.4.2.2 Condiciones para la producción de inóculo	25
6.4.2.3 Producción de CPC	25
6.4.3 Cultivo en bagazo de caña	25
6.4.4 Cultivo en medio líquido	26
6.5 Condiciones de pH en los diferentes experimentos	26
6.5.1 Cultivo preliminar en medio líquido (FL) y sólido (FS)	26
6.5.2 Cultivos líquidos y sólidos con valores de pH amortiguados	27
6.6 Mantenimiento de los microorganismos	27
6.7 Técnicas analíticas	27
6.7.1 Toma de muestras	27
6.7.2 Extracción de CPC	27
6.7.3 Cuantificación de CPC	28
6.7.3.1 Método de cilindros de agar para la selección de cepas de <i>A. chrysogenum</i>	28

6.7.4 Cuantificación de azúcares totales.....	28
6.7.5 Determinación de pH.....	28
6.7.6 Determinación de humedad (FS).....	29
6.7.7 Determinación del crecimiento (FS).....	29
6.8 Técnicas moleculares.....	29
6.8.1 Obtención de ARN total de <i>Acremonium chrysogenum</i>	29
6.8.2 Obtención de sondas.....	31
6.8.2.1 Clonación de productos de PCR en el plásmido pGEM®-T Easy.....	32
6.8.2.2 Protocolo de ligación.....	32
6.8.2.3 Transformación de <i>E. coli</i>	33
6.8.2.3.1 Preparación de células competentes.....	33
6.8.2.4 Procedimiento de transformación de <i>E. coli</i>	35
6.8.3 Clonación y mutación de mimetismo alcalino del gen <i>pacC</i>	36
6.8.3.1 Obtención del ADN total de <i>Acremonium chrysogenum</i>	36
6.8.3.2 Esquema general de la digestión con una endonucleasa de restricción.....	37
6.8.3.3 Desfosforilación de los extremos 5' del ADN con fosfatasa alcalina termosensible.....	38
6.8.3.4 Ensamblaje de fragmentos de ADN con la ligasa del bacteriófago T4.....	38
6.8.4 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	39
6.8.4.1 Lisis alcalina.....	39
6.8.4.2 Minipreparaciones.....	40
6.8.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	41
6.8.6 Cuantificación de ARN y ADN.....	42
6.8.7 Electroforesis de ARN en geles con formaldehído.....	43
6.8.8 Transferencia, marcaje de sondas específicas e hibridación de ARN.....	44
6.8.8.1 <i>Northern Blot</i>	44
6.8.8.2 Marcaje de las sondas con digoxigenina.....	45
6.8.8.3 Hibridación de sondas marcadas con digoxigenina.....	45
6.8.8.4 Detección inmunológica.....	46
6.8.8.5 Marcaje de las sondas con radiactividad.....	47
6.8.8.6 Hibridación de sondas marcadas con radiactividad.....	47
6.8.8.7 Eliminación de señales y reutilización de las membranas.....	48
6.8.9 Transformación de hongos.....	49
6.8.9.1 Crecimiento del micelio.....	50
6.8.9.2 Obtención de protoplastos.....	50
6.8.9.3 Transformación de <i>A. chrysogenum</i>	51
7. Resultados.....	52
7.1 Estudios fisiológicos de la producción de cefalosporina C con <i>Acremonium chrysogenum</i>.....	52
7.1.1 Estimación del crecimiento en cultivos en medio sólido mediante cromatografía de gases.....	52
7.1.2 Cultivo en medio líquido de <i>Acremonium chrysogenum</i> , evaluación de diferentes niveles de nutrientes y comparación preliminar con cultivos en medio sólido.....	54
7.1.3 Comparación de la producción de CPC en cultivos en medio líquido y sólido de <i>A. chrysogenum</i> C10.....	58

7.1.4 Cultivos de <i>A. chrysogenum</i> C10 a pH controlado.....	61
7.2 Estudios moleculares de la producción de cefalosporina C con <i>Acremonium chrysogenum</i>	63
7.2.1 Aislamiento de ADN total de <i>Acremonium chrysogenum</i>	63
7.2.2 Obtención de sondas de los genes de biosíntesis de CPC	64
7.2.3 Extracción de ARN de <i>Acremonium chrysogenum</i> y transferencia a membranas de nylon.....	66
7.2.4 Análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de CPC en FS y FL de <i>A. chrysogenum</i>	68
7.2.4.2 Perfil de expresión del gen <i>cefEF</i> en FS y FL.....	69
7.2.4.3 Perfil de expresión del gen <i>cefD2</i> en FS y FL.....	71
7.2.4.4 Perfil de expresión del gen <i>cefT</i> en FS y FL	71
7.2.4.5 Perfil de expresión del gen <i>cahB</i> en FS y FL.....	72
7.2.5 Clonación del gen <i>pacC</i> con mimetismo alcalino.	74
7.2.5.1 Clonación de <i>pacC12</i> (gen con mimetismo alcalino, promotor propio de <i>A. chrysogenum</i> y terminador de <i>trpC</i>).....	77
7.2.5.2 Clonación de <i>pacC1</i> (gen completo, aunque con una mutación en la región determinante del procesamiento).....	79
7.2.6 Transformación de <i>A. chrysogenum</i> para producir mimetismo alcalino.....	79
7.2.6.1 Producción de protoplastos de las cepas de hongos utilizadas.....	80
7.2.6.2 Resistencia a fleomicina de los protoplastos de las cepas de hongos utilizadas.....	81
7.2.6.3 Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 y C10 y selección primaria de los transformantes.....	81
7.2.6.4 Evaluación de la producción de CPC en cepas transformantes de <i>A. chrysogenum</i>	83
8. Discusión.....	89
8.1 Estudios fisiológicos de la producción de cefalosporina C con <i>Acremonium chrysogenum</i>	89
8.1.1 Estimación del crecimiento en cultivos en medio sólido mediante cromatografía de gases	89
8.1.2 Cultivo en medio líquido de <i>Acremonium chrysogenum</i> , evaluación de diferentes niveles de nutrientes y comparación preliminar con cultivos en medio sólido.....	91
8.1.3 Comparación de la producción de CPC en cultivos en medio líquido y sólido de <i>A. chrysogenum</i> C10.....	92
8.1.4 Cultivos de <i>A. chrysogenum</i> C10 a pH controlado.....	93
8.2 Estudios moleculares de la producción de cefalosporina C en <i>Acremonium chrysogenum</i>	94
8.2.1 Aislamiento de ADN total de <i>Acremonium chrysogenum</i> y obtención de sondas de los genes de biosíntesis de CPC	94
8.2.2 Análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de CPC en FS y FL de <i>A. chrysogenum</i>	95
8.2.2.1 Perfil de expresión del gen <i>actA</i> en FS y FL.....	96
8.2.2.2 Perfil de expresión del gen <i>cefEF</i> en FS y FL.....	97
8.2.2.3 Perfil de expresión del gen <i>cefD2</i> en FS y FL.....	97
8.2.2.4 Perfil de expresión del gen <i>cefT</i> en FS y FL	98

8.2.2.5 Perfil de expresión del gen <i>cahB</i> en FS y FL	98
8.2.3 Producción de protoplastos y resistencia a fleomicina de las cepas de <i>A. chrysogenum</i> ATCC11550 y C10.	99
8.2.4 Clonación del gen <i>pacC</i> con mimetismo alcalino y transformación de <i>A. chrysogenum</i>	100
8.2.4.1 Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 y C10 y selección primaria de las transformantes.	101
8.2.4.2 Evaluación de la producción de CPC en cepas transformantes de <i>A. chrysogenum</i>	103
9. Conclusiones.....	105
10. Bibliografía.....	106
Anexos	113
Anexo 1.	113
Anexo 2.	115
Anexo 3.	116
Anexo 4.	117
Anexo 5.	125

1. Introducción

A diferencia de lo observado en el mejoramiento genético de *Penicillium chrysogenum* para la producción de penicilina (Fierro y col., 1995, Newert y col., 1997), no hay reportes disponibles que establezcan que el número de copias de los genes biosintéticos se haya incrementado en las cepas de *Acremonium chrysogenum* con alta producción de cefalosporina. Sin embargo, varias investigaciones han mostrado que los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de estas cepas son mayores (Walz y Kück, 1993; Velasco y col., 1994; Jekosch y Kück, 2000a; Schmitt y col., 2001), de tal forma que los cambios deben haberse producido preferentemente a nivel de la regulación transcripcional de los genes estructurales (Schmitt y col., 2004c).

El pH juega un papel importante en la determinación de los niveles de transcripción de muchos genes fúngicos cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente (o en las fronteras celulares), y existe evidencia de que entre los genes regulados por pH ambiental se incluyen los que codifican para antibióticos β -lactámicos (Suárez y Peñalva, 1996).

En hongos filamentosos se ha encontrado que el factor de transcripción PACC es importante para la expresión génica en respuesta al pH del ambiente. Para determinar el efecto del pH en la expresión de los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*, Schmitt y col., (2001) analizaron los niveles de transcripción de los genes *pcbC* y *cefEF* en diferentes cultivos realizados en medios amortiguados entre valores de pH de 5 a 8, encontrándolos diferentes para dos cepas de *Acremonium*. En la cepa silvestre 14553, el gen *pcbC* es expresado en niveles apreciables solamente por encima de pH 5, mientras que el transcrito del gen *cefEF* no es detectable mediante hibridación de Northern aún a pH 8. En contraste con esto, la cepa semiproductora A3/2 expresa ambos genes a lo largo del intervalo completo de pH evaluado. Este fenómeno sugiere una correlación entre el mejoramiento genético de las cepas y una posible desregulación del factor de transcripción PACC.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando la cepa *A. chrysogenum* C10 en fermentación en medio sólido en soporte impregnado, indicaron que existe un intervalo de valores de pH dentro del cual la producción de CPC es favorecida. Además del pH, se ha especulado con que en este tipo de cultivo los microorganismos reaccionan produciendo enzimas especiales, que son más eficientes en un medio con difusión restringida, o incluso que

la estructura de las membranas varía, de tal forma que las células se adaptan a un medio bajo condiciones diferentes de consumo de nutrientes y secreción de productos (Barrios González y Mejía, 1996). Todas estas diferencias podrían, de alguna forma, favorecer la producción de un metabolito exportable, como lo es la cefalosporina C.

Dada la relación observada entre la regulación del pH ambiental y la producción de CPC, tanto en cultivos sumergidos como en cultivos en estado sólido, se consideró importante estudiar desde un punto de vista molecular la expresión de distintos genes que pudieran estar implicados en este fenómeno, bajo diferentes condiciones de pH y en sistemas de cultivo en medio sólido y líquido.

Para el estudio de los aspectos moleculares de la regulación por pH en *A. chrysogenum*, se utilizaron diferentes técnicas, desde mediciones fisiológicas convencionales (pH, peso seco, azúcares totales, etc) hasta mediciones más sofisticadas, como la cromatografía de gases para la estimación del crecimiento en cultivo en medio sólido. También, se amplificaron, clonaron y secuenciaron los segmentos de ADN apropiados para servir como sondas y evaluar la expresión mediante *Northern blot* de los genes de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C.

Se realizaron cultivos de *A. chrysogenum* en medio sólido y líquido utilizando diferentes concentraciones de nutrientes, lo que nos permitió determinar las características y efectos de las variaciones de este parámetro en ambos sistemas. Asimismo, dichos cultivos posibilitaron determinar la condición para hacer una comparación más idónea, pudiendo establecerse con más certeza las similitudes, diferencias, ventajas y desventajas presentadas en cada uno de los cultivos, y en especial aquellas relacionadas con la regulación por pH ambiental.

Por otro lado, para conocer el efecto de una mutación de mimetismo alcalino en la producción de CPC se amplificó por PCR el gen *pacC*, tanto en su configuración normal como en la forma en la que produciría una proteína constitutivamente activa (mimetismo alcalino), para luego transformar la cepa silvestre ATCC11550 y la cepa mejorada C10 (ATCC48272) y verificar el efecto de un mayor número de copias, la disrupción del gen y/o el mimetismo alcalino sobre el proceso de producción de CPC por estas cepas.

Finalmente, se determinaron las condiciones para llevar a cabo un cultivo a valor de pH ácido constante, con el cual se evaluó el efecto producido por la transformación con las construcciones mencionadas.

Este trabajo presenta resultados interesantes de los estudios fisiológicos y de expresión génica en los dos sistemas de cultivo estudiados. Se señalarán en él las similitudes encontradas entre la FS y la FL, pero también las diferencias, siendo lo más relevante las diferencias en los niveles de expresión de los genes relacionados con la transformación de isopenicilin-CoA a penicilin-CoA (*cefD2*), la exportación de CPC (*cefT*) y la expresión de la acetilhidrolasa (*cahB*), pasos que afectan, directa o indirectamente, a la producción de CPC.

Finalmente, los resultados de la transformación de *A. chrysogenum* con el objeto de producir mimetismo alcalino en la cepa ofrecieron más datos que apoyaron la hipótesis de que sólo una parte de los genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de CPC están regulados por el pH ambiental y, además, proporcionó evidencia de que esta estrategia de ingeniería genética puede ser una valiosa alternativa para mejorar la producción del antibiótico.

2. Antecedentes

En 1945, *Acremonium chrysogenum* fue aislado por primera vez del agua marina cerca de la zona de salida de aguas residuales de Cagliari. Los estudios de Giuseppe Brotzu demostraron que secretaba un producto que inhibía el crecimiento de una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Brotzu, 1948). Algunos años más tarde se determinaría la estructura del compuesto activo: la cefalosporina C (Newton y Abraham, 1954).

A. chrysogenum es el microorganismo de elección para la producción de cefalosporina en cultivos sumergidos, a pesar de que pocas especies de hongos filamentosos han sido usadas para la producción industrial del antibiótico. Aproximadamente 40 años de ciclos de mutación y selección separan las cepas industriales actuales de las cepas originales de este hongo, y aunque las técnicas tradicionales utilizadas para su mejoramiento son aún herramientas indispensables para este proceso, en el cual no es necesario el conocimiento de los mecanismos moleculares de regulación involucrados en la producción de CPC. Sin embargo, la aplicación de las técnicas de ADN recombinante para otros hongos filamentosos ha permitido incrementos en la producción y el diseño de nuevas rutas biosintéticas (Díez y col., 1997). Por esta razón, el desarrollo de mejores cepas para la producción de CPC, con base en los avances en el conocimiento de la biología molecular de la biosíntesis del compuesto, surge como una posibilidad interesante.

2.1 Biosíntesis de cefalosporinas

La mayoría de los pasos implicados en la biosíntesis de las cefalosporinas en *A. chrysogenum* han sido caracterizados bioquímicamente (Fig. 1). En primer lugar, el tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (en su forma abreviada, ACV) se forma por condensación de los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina por medio de la enzima ACV sintetasa, codificada por el gen *pcbAB* (Gutiérrez y col., 1991). Este tripéptido es posteriormente ciclado para formar isopenicilina N, debido a la acción de la enzima isopenicilina N sintasa, que es codificada por el gen *pcbC* (Samson y col., 1985).

A continuación, la isopenicilina N es convertida en penicilina N mediante un sistema de dos proteínas (Ullán y col., 2002): una de ellas codificada por el gen *cefD1*, que muestra una alta similitud con las sintetisas de ácidos grasos de cadena larga dependientes de CoA (Turgay y col., 1992), y otra codificada por el gen *cefD2*, que muestra una alta similitud con las acil CoA racemasas (Schmitz y col., 1994 y 1995). La transformación final a penicilina N

requiere también una hidrólisis del tioéster de CoA, reacción que ocurre en forma no estereoespecífica, por medio de diferentes tioestearasas (Knihinicki y *col.*, 1991).

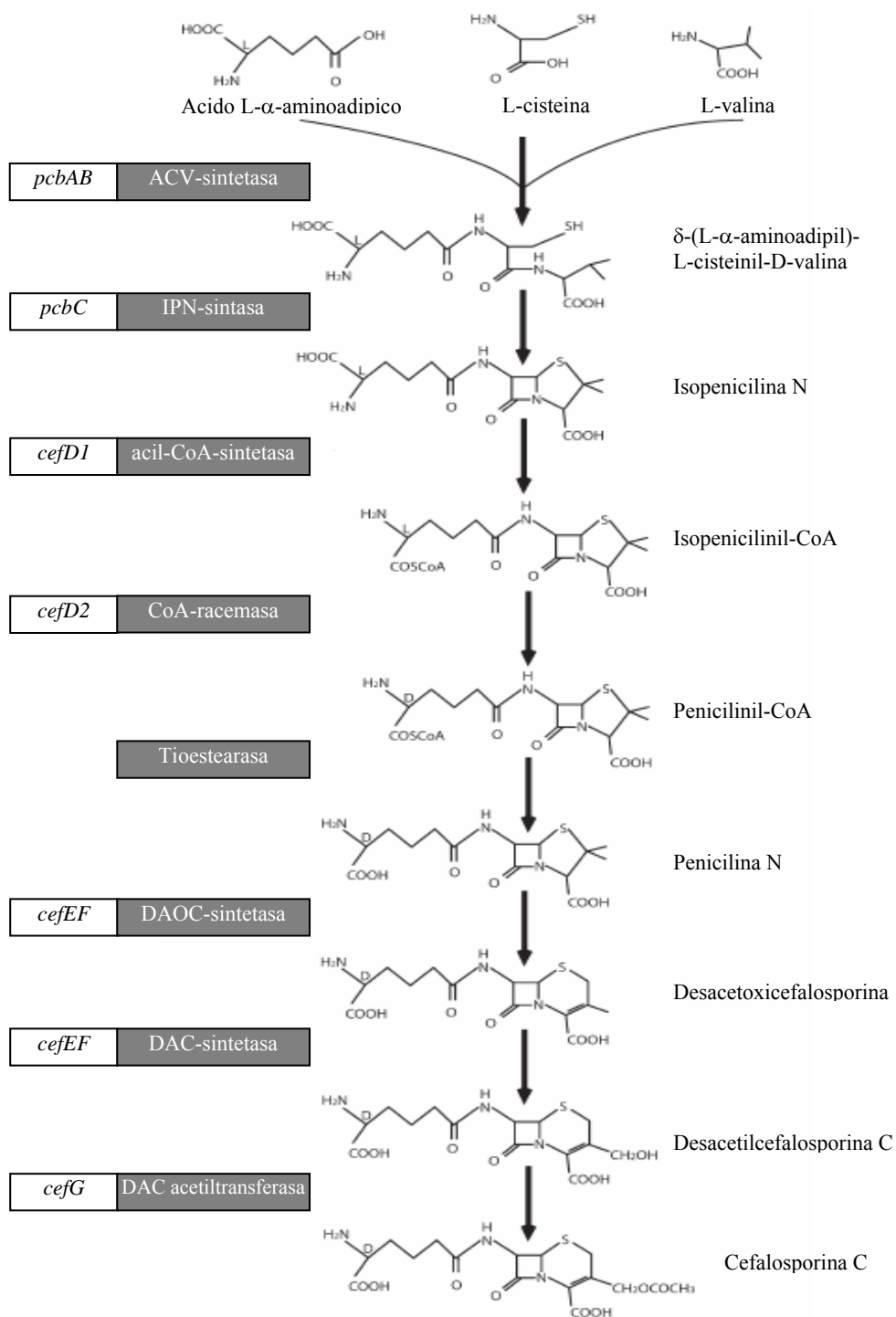


Fig. 1. Ruta de biosíntesis de la cefalosporina C (CPC) en *A. chrysogenum*. Detalle de los compuestos, genes participantes y productos de éstos en los cuadros (Schmitt y *col.*, 2004c).

La penicilina N es transformada en desacetoxicefalosporina C por medio de una enzima que convierte el anillo tiazolidínico de cinco miembros característico de las penicilinas en un anillo dihidrotiazínico de seis miembros (típico de cefalosporinas y cefamicinas). La desacetoxicefalosporina C (DAOC) es posteriormente hidroxilada por acción de la misma enzima (DAOC sintasa/DAC hidroxilasa: producto del gen *cefEF*), formándose desacetilcefalosporina C (Samson y *col.*, 1987).

El último paso de la ruta de biosíntesis de cefalosporina es la acetilación de la desacetilcefalosporina C (DAC) a cefalosporina C (Fujisawa y *col.*, 1973 y 1975) paso catalizado por el producto del gen *cefG*, la acetil CoA DAC acetiltransferasa (Gutiérrez y *col.*, 1992).

2.1.1 Pasos limitantes en la biosíntesis de cefalosporina C

La determinación de los pasos limitantes en la biosíntesis es la primera meta de una aproximación racional para mejorar los títulos de cefalosporina producidos. Esta determinación puede realizarse a través de la búsqueda de intermediarios que se acumulen en los caldos de fermentación, la medición de la actividad específica de las enzimas y/o la comparación de cepas silvestres y de alta producción, por ejemplo (Usher y *col.*, 1992).

Utilizando los conocimientos disponibles acerca de la ruta biosintética de cefamicinas y cefalosporinas en *Streptomyces clavuligerus* y *Acremonium chrysogenum*, respectivamente, varios análisis cinéticos apuntan a que la producción del tripéptido ACV es un paso limitante en la producción de antibióticos β -lactámicos (Malmberg y Hu, 1991 y 1992). La ACV sintetasa también ha sido postulada como una enzima limitante para la ruta por otros investigadores (Zhang y Demain, 1991; Kennedy y Turner, 1996).

Estudios enzimáticos con la actividad IPN sintasa (Usher y *col.*, 1988), así como los resultados de la amplificación del gen *pcbC* (Skatrud y Queener, 1989), parecen indicar que la actividad de esta enzima no es limitante para la velocidad en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

La introducción de copias adicionales del conjunto de genes que contiene los genes *cefD1* y *cefD2* llevó a un incremento del 80 al 100% en la producción de CPC en *A. chrysogenum* (Ullán y *col.*, 2004), por lo que los autores sugieren que el proceso de

epimerización también es un paso limitante en la biosíntesis de cefalosporina. Sin embargo, sería importante considerar que a pesar del aumento logrado en la actividad epimerasa los niveles de IPN (precursora de la reacción) son bastante similares entre la cepa parental y dos de las transformantes, mientras que los niveles del producto (penicilina N) también se conservan aproximadamente iguales o ligeramente mayores cuando se comparan las cepas. Esto coincide con estudios que indican que la acumulación de penicilina N sugiere más bien un cuello de botella en la siguiente reacción de la ruta de biosíntesis: la catalizada por la expandasa/hidroxilasa (Herold y *col.*, 1988; Skatrud y *col.*, 1989; Rodríguez Sáiz y *col.*, 2004). Los estudios cinéticos realizados por Malmberg y Hu (1992) también sugieren que la actividad expandasa/hidroxilasa es limitante en la producción de cefalosporina.

Mathison y colaboradores (1993) transformaron una cepa silvestre de *A. chrysogenum* con copias adicionales del gen *cefG* y observaron una correlación entre el número de copias de este gen y los títulos de cefalosporina obtenidos. Concluyen, por eso, que al menos en la cepa silvestre la actividad de la acetiltransferasa es también un paso limitante. Por otro lado, también se ha descrito una conversión ineficiente de la DAC en CPC mediada por la expresión limitada del gen *cefG* en *A. chrysogenum* C10, una cepa de mediana producción (Gutiérrez y *col.*, 1997).

Por otro lado, existen genes que si bien no se encuentran directamente implicados en la biosíntesis de CPC, intervienen en procesos importantes relacionados con la producción eficiente de esta sustancia. Un problema importante durante la producción de CPC es la hidrólisis de este producto a deacetylcefalosporina C; Velasco y colaboradores (2001) identificaron el gen *cahB* de *A. chrysogenum*, cuyo producto es una cefalosporin acetilhidrolasa con baja afinidad por la cefalosporina C. Aún así, los autores sugieren que una disrupción de dicho gen podría dar lugar a cepas que acumularan menos DAC. Ullán y colaboradores (2002), por su parte, identificaron el gen *cefT* en *A. chrysogenum* C10 y caracterizaron la proteína que produce como una bomba de flujo multisustancia. Tras la disrupción de este gen no observaron ningún efecto sobre la producción de CPC, pero al introducir copias adicionales observaron incrementos del 100% en la producción de este antibiótico. Este estudio también sugiere la posibilidad de que la proteína CEFT sea un sensor de señales extracelulares que disparen la síntesis de CPC.

2.2 Regulación de la biosíntesis de cefalosporina C

Se ha comprobado que existen diversos elementos que influyen en el crecimiento de *A. chrysogenum* y en la formación de cefalosporina C: las fuentes de carbono y de nitrógeno, el fosfato, el pH ambiental y el nivel de oxígeno (revisados por Brakhage, 1998). Velasco y colaboradores (1994) describieron, además, un efecto precursor e inductor de la metionina en la biosíntesis de cefalosporina.

Por los datos hasta ahora mencionados, la complejidad de la biosíntesis de cefalosporina C implica necesariamente diferentes niveles de regulación. De hecho, se dispone de evidencia para mecanismos reguladores que actúan tanto sobre los niveles de transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis como sobre la actividad de las enzimas involucradas. Además, investigaciones realizadas a nivel celular sugieren una fuerte correlación entre la biosíntesis de cefalosporina y la morfología y diferenciación celular (Bartoshtevich y col. 1983).

En relación con los mecanismos de regulación de los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis, se han caracterizado hasta la fecha tres factores de transcripción de *A. chrysogenum*:

a) La proteína represora CRE1 está involucrada en la regulación de al menos dos genes de biosíntesis. En presencia de suficiente glucosa se promueve el crecimiento, y la transcripción de los genes *pcbC* y *cefEF* está reprimida en la cepa silvestre. Sin embargo, en una cepa semiproductora solamente el gen *cefEF* está sujeto a represión por glucosa, mediada por el factor CRE1 (Jekosh y Kück, 2000a y 2000b).

b) El factor de transcripción PACC es un mediador en la expresión génica en respuesta al pH externo y se une al menos a cuatro sitios independientes en los promotores de los genes de biosíntesis de cefalosporina, dos en las secuencias promotoras de los genes *pcbAB* y *pcbC* y dos en las secuencias promotoras de los genes *cefEF* y *cefG* (Schmitt y col., 2001).

c) Finalmente, el factor CPC1 reconoce dos sitios de unión en la región promotora entre los genes *pcbAB* y *pcbC*. En cepas en las que se ha inactivado el gen que lo codifica se observa que el nivel de biosíntesis de penicilina N se reduce a menos del 20%, lo cual indica que este factor podría estar involucrado en la regulación de los primeros genes de biosíntesis,

más que en la expresión de los últimos (Schmitt y Kück 2000; Schmitt y *col.*, 2004a). También se ha descrito la interacción entre CPC1 y el extremo carboxilo terminal de AcFKH1, un nuevo factor de transcripción en *A. chrysogenum* del tipo Forkhead (Cabeza de horquilla). Usando análisis con geles de retardo, FKH1 reconoció dos sitios consenso del motivo cabeza de horquilla dentro del promotor *pcbAB-pcbC* de *A. chrysogenum* (Schmitt y *col.*, 2004b).

Se ha sugerido, además, que un miembro de las proteínas bHLH (Basic-helix-loop-helix) podría mediar los efectos observados de inducción de la metionina (Velasco y *col.*, 1994), debido a que se detectaron varias secuencias consenso CANNTG en la región intergénica de los genes *pcbAB* y *pcbC*. Estas secuencias son reconocidas por los miembros de esta familia de proteínas, algunas de las cuales son conocidas como elementos reguladores involucrados en el control transcripcional de la ruta del azufre en *S. cerevisiae* (Thomas y *col.*, 1989; Baker y Masison, 1990; Cai y Davis, 1990; Mellor y *col.*, 1990).

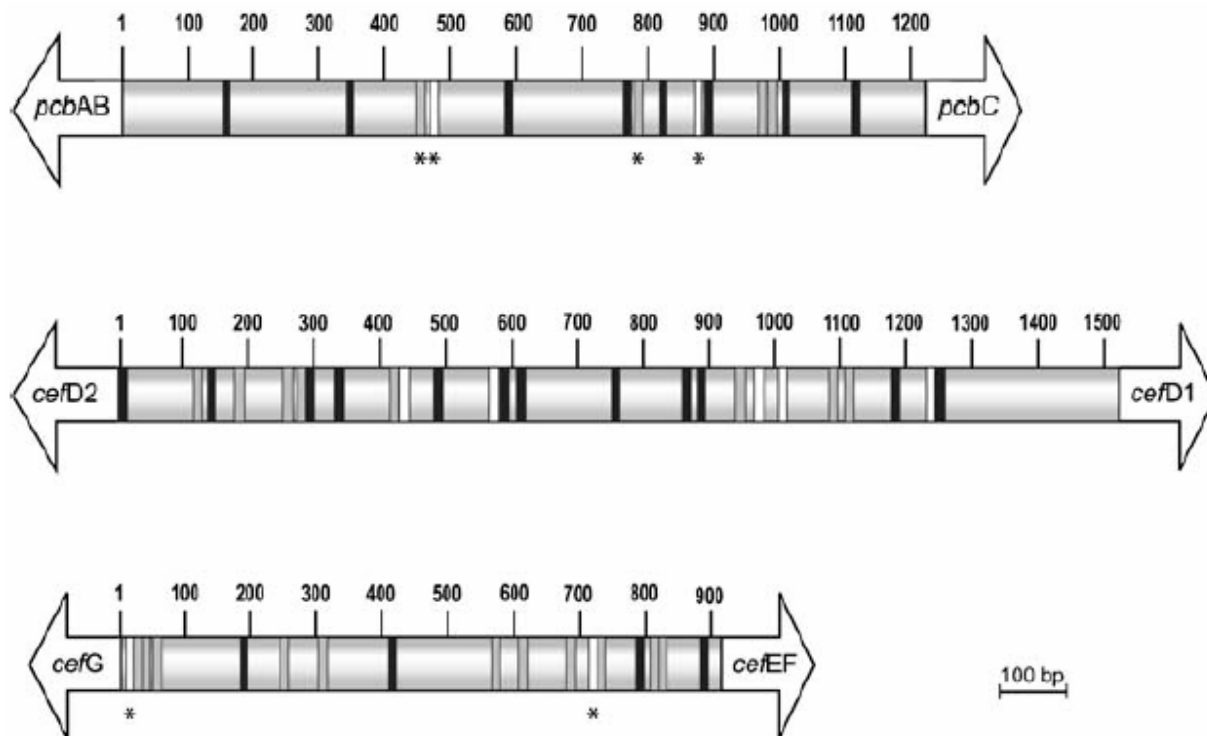


Fig. 2. Sitios de unión de los factores de transcripción en las secuencias promotoras de los genes de biosíntesis de cefalosporina orientados divergentemente *pcbAB-pcbC*, *cefD1-cefD2*, y *cefEF-cefG* (Schmitt y *col.*, 2004c). Las barras indican los sitios de reconocimiento para cada uno de los factores de transcripción: CPC1 (gris), CRE1 (negro), y PACC (blanco). Aquellos sitios de unión que han sido demostrados experimentalmente están marcados con asteriscos. El resto de los sitios marcados se ha sugerido en base a consensos en las secuencias de nucleótidos.

En la Fig. 2. se muestran las secuencias consenso de unión de los tres factores transcripcionales caracterizados en *A. chrysogenum* en cada uno de los promotores bidireccionales de los genes de biosíntesis de cefalosporina C conocidos hasta el momento.

2.3 Regulación por pH ambiental mediada por el factor de transcripción PACC en hongos filamentosos: alternativa para el mejoramiento genético de la producción de antibióticos β -lactámicos

El pH juega un papel importante en la determinación de los niveles de transcripción de muchos genes cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente o en las fronteras celulares, genes como por ejemplo aquellos que codifican para enzimas secretadas, permeasas y enzimas intracelulares que participan en la síntesis de productos exportados como toxinas, antibióticos y compuestos que tienen la capacidad de modificar el pH ambiental (Peñalva y Arst, 2002).

Condiciones de crecimiento alcalinas y mutaciones que desencadenan mimetismo alcalino (respuesta del microorganismo como si se encontrara en un ambiente alcalino, independientemente del pH del medio) en el organismo modelo *A. nidulans* provocaron incrementos sustanciales en la producción de penicilina (Shah y col., 1991; Espeso y col., 1993), determinándose que *acvA* (otro nombre para *pcbAB*), *ipnA* (*pcbC*) y *acyA* (*penDE*) (los tres genes estructurales requeridos para la biosíntesis de penicilina desde los aminoácidos precursores) se encuentran bajo control positivo de PACC (Espeso y col., 1993; Peñalva y col., 1998; Then Berg y Brakhage, 1998). Del mismo modo, se ha demostrado que mutaciones en *P. chrysogenum* equivalentes a mutaciones de mimetismo alcalino provocan la sobreproducción de penicilina (Suárez y col., 2002). La posibilidad de que mutaciones en el gen *pacC* puedan mejorar la producción de antibióticos β -lactámicos en un microorganismo productor de importancia industrial podría ser muy importante desde el punto de vista comercial, y arroja expectativas interesantes sobre la mejora en la producción de cefalosporina por *A. chrysogenum*. En este microorganismo, la determinación de los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de cefalosporina y los experimentos de retardo en gel indicaron que la regulación mediada por pH también parece jugar un papel importante (Schmitt y col., 2001).

2.3.1 Regulación por pH mediada por PACC en *Aspergillus nidulans*

El organismo eucariótico en el que se ha estudiado más ampliamente la regulación génica mediada por el pH ambiental es el ascomiceto *Aspergillus nidulans*. A continuación se resumen los conocimientos acerca del modelo de regulación por pH propuesto para este organismo.

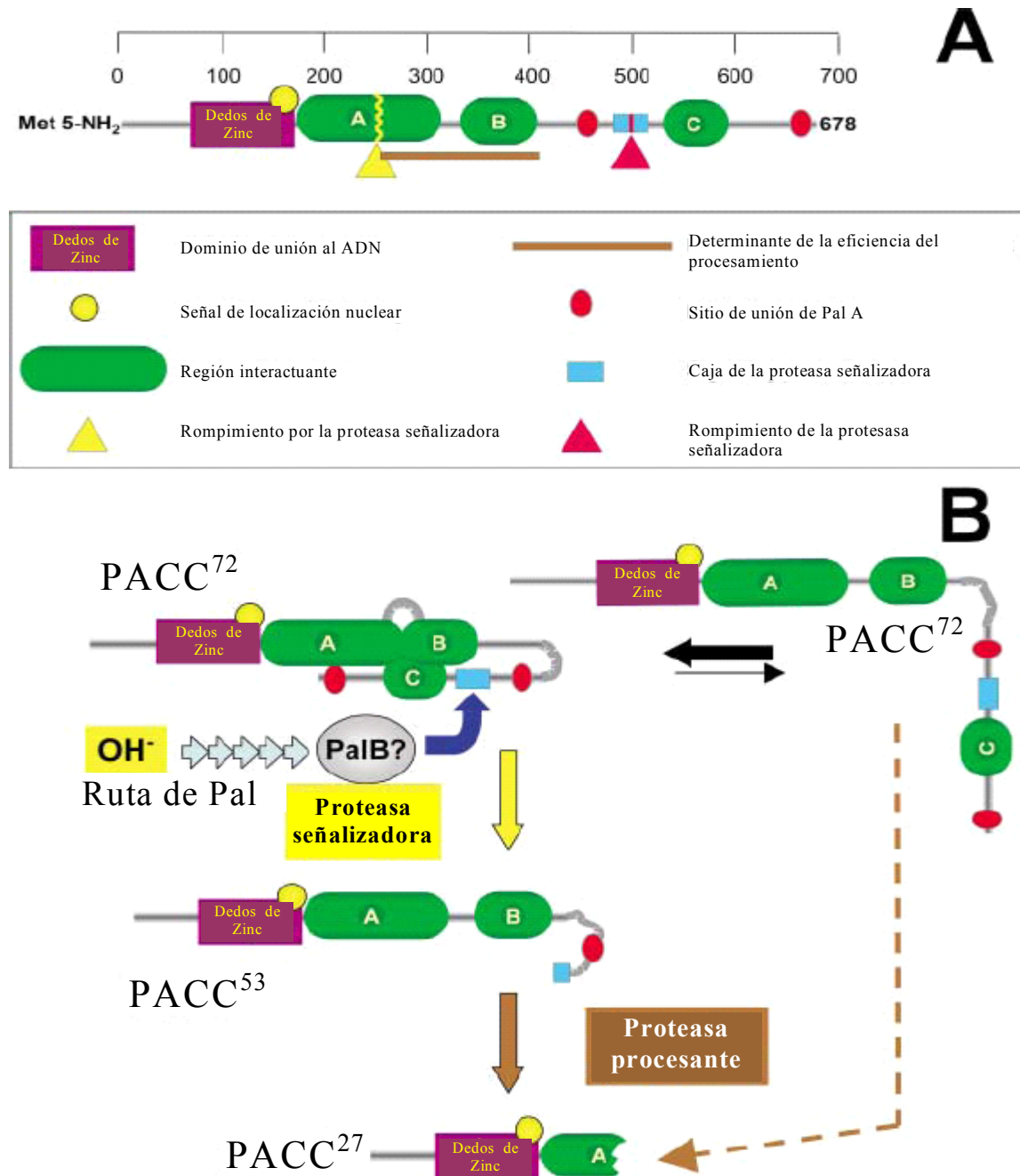


Fig. 3. (A) Características relevantes de PACC. (B) Modelo molecular para la activación del factor de transcripción PACC (detalles en el texto). En proporciones menores de PACC⁷² las interacciones que mantienen una conformación inaccesible a la proteasa procesante se relajan, favoreciendo el procesamiento directo a PACC²⁷ sin intervención de la proteasa señalizadora (y por lo tanto de la ruta Pal), como lo indica la línea discontinua (Peñalva y Arst, 2004).

El factor transcripcional del tipo “dedo de zinc” PACC es el mediador de la regulación por pH en *A. nidulans*. El producto de la transcripción y traducción de *pacC* es PACC⁷², que contiene 674 aminoácidos (Tilburn y col., 1995; Mingot y col., 1999). Tres regiones que interactúan mantienen a PACC⁷² en una forma aparentemente inerte, previniendo el procesamiento proteolítico (Espeso y Arst, 2000) (Fig. 3). Cuando el pH ambiental es neutro a alcalino, la señalización a través de los seis componentes de la ruta Pal (PalB inclusive) trae consigo el procesamiento de PACC⁷² por una proteasa señalizadora, que elimina aproximadamente 180 aminoácidos del extremo C-terminal y da lugar a PACC⁵³, con aproximadamente 495 aminoácidos. Dicho procesamiento permite, además, el acceso de la proteasa procesante (Díez y col., 2002). En una reacción independiente del pH, la proteasa procesante elimina aproximadamente 245 aminoácidos más del extremo C-terminal, para producir la forma funcional PACC²⁷, de aproximadamente 250 aminoácidos.

Dentro de PACC²⁷ se localiza el dominio de unión al ADN, que tiene tres dedos de zinc. La secuencia consenso de unión en el ADN es 5'-GCCARG-3' y se encuentra en los promotores de los genes expresados preferencialmente a pH ambiental alcalino. PACC²⁷ se une a ellos, para activar la expresión de los genes correspondientes, pero también se une a sitios blanco en los promotores de genes expresados preferentemente a pH ambiental ácido, aunque en este caso para prevenir su expresión (Tilburn y col., 1995; Espeso y Peñalva, 1996; Mingot y col., 1999; Espeso y Arst, 2000; Fernández Martínez y col., 2003).

Los productos de seis genes (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*) transmiten la señal de pH ambiental alcalino a PACC (Caddick y col., 1986; Arst y col., 1994; Denison y col., 1995; Maccheroni y col., 1997; Denison y col., 1998; Negrete-Urtasun y col., 1997 y 1999; Calcagno-Pizarelli y col., 2007). PalB, una proteasa de cisteína de la familia de las calpaínas (Denison y col., 1995; Futai y col., 1999; Sorimachi y Suzuki, 2001) parece ser la proteasa señalizadora, mientras que el proteosoma se ha propuesto como la proteasa procesante (Hervás-Aguilar y col., 2007)

A pesar de que *pacC* es expresado a pH alcalino (Tilburn y col., 1995), la aparición de niveles de transcripción constantes de los seis genes de transducción de pH dificulta la evidencia de la regulación por pH (Denison y col., 1995 y 1998; Negrete-Urtasun y col., 1997

y 1999; Maccheroni y col., 2000; Maki y col., 2002). En consecuencia, la respuesta al pH debe llevarse a cabo después de la transcripción (Peñalva y Arst, 2004).

2.3.1.1 Mutaciones en el gen *pacC* de *Aspergillus nidulans*

El gen *pacC* ha sido analizado a fondo, y la caracterización molecular de sus mutaciones ha sido crucial para el entendimiento de su activación mediada por proteólisis (Orejas y col., 1995; Tilburn y col., 1995; Espeso y col., 1997 y 2000; Mingot y col., 2001; Díez y col., 2002). La tabla 1 resume las mutaciones realizadas tanto en *pacC* como en los genes *pal*, involucrados en la regulación por pH ambiental y sus efectos.

Tabla 1. Descripción de las mutaciones estudiadas en los genes involucrados en el sistema de regulación por pH en *Aspergillus nidulans*, y sus efectos (Peñalva y Arst 2004).

Tipo de mutaciones	Genes que afecta	Descripción de la mutación	Fenotipo	Descripción del fenotipo
Nula	Cualquier gen <i>pal</i>	Perdida de la función del gen	Mimetismo ácido	Expresión alta de los genes (tipo silvestre) expresados preferentemente a pH ácido, expresión baja de los genes expresados a pH alcalino
Nula (<i>pacC</i>)	<i>pacC</i>	Cambios en el marco de lectura, truncando PACC corriente arriba o dentro del dominio de unión al ADN		Crecimiento criosensible y pobre y conidiación baja, aún a temperaturas permisivas
<i>pacC^c</i>	<i>pacC</i>	Eliminación o sustitución de aminoácidos, eliminando una o más de las regiones interactuantes y permitiendo el procesamiento constitutivo de PACC	Mimetismo alcalino	Expresión alta de los genes (tipo silvestre) expresados preferentemente a pH alcalino en pH ácido, expresión baja de los genes expresados a pH ácido
<i>pacC^{c/-}</i>	<i>pacC</i>	Proteínas truncadas corriente arriba de la caja de unión de la proteasa señal, de tal manera que el procesamiento (si ocurre) se realiza independientemente del pH y de la señal de transducción	Mimetismo neutro	Expresión alta tanto de los genes (tipo silvestre) expresados preferentemente a pH ácido como a pH alcalino, varía considerablemente el fenotipo
<i>PacC^{+/-}</i>	<i>pacC</i>	Perdida de la función del gen		Algunas de estas mutaciones muestran un fenotipo indistinguible de las mutaciones nulas de los genes <i>pal</i>

2.3.1.2 Reconocimiento de la regulación por pH ambiental mediada por el factor de transcripción PACC

Los criterios para el reconocimiento de la regulación por pH han sido especificados recientemente (Arst y Peñalva, 2003a y b):

- a) En la cepa tipo silvestre, el nivel de expresión de un gen debe variar en una progresión uniforme a medida que el pH ambiental progresivamente disminuya o aumente.
- b) Tanto las mutaciones de mimetismo ácido (*pal*, *pacC*, *pacC^{+/-}*) como las de mimetismo alcalino (*pacC^c*) deben afectar a los niveles de expresión de los genes, pero en formas opuestas. Las mutaciones de mimetismo ácido deben tener un efecto similar al de un pH ambiental ácido en la cepa silvestre, mientras que las mutaciones de mimetismo alcalino deben tener un efecto similar al de un pH ambiental alcalino en dicha cepa.
- c) La mayoría de las mutaciones *pacC* deben ser epistáticas en sus efectos sobre la expresión de los genes con mutaciones en los genes *pal* señalizadores del pH. En particular, el fenotipo de las mutaciones de fuerte mimetismo alcalino no debe ser afectado por la presencia de una mutación de mimetismo ácido *pal*.

Si alguno de los criterios anteriores no se cumple, estaría indicando que no hay una regulación del proceso mediada por PACC. El pH ambiental puede afectar alternativamente la eficiencia de permeasas y enzimas extracelulares cuyos sustratos (o productos) puedan estar involucrados en la regulación génica. Las consecuencias de un pH óptimo marcadamente ácido o alcalino sobre una permeasa, por ejemplo, no deben ser confundidas con la regulación mediada por pH.

2.4 Regulación por pH en *Acremonium chrysogenum*

En principio, el factor de transcripción PACC es un regulador positivo sobre la expresión de genes cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente (p. ej., los genes de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos). El conocimiento limitado de este factor de transcripción en *A. chrysogenum* (especialmente en los cultivos en medio sólido), determina la necesidad de estudios moleculares que expliquen la relación entre las variaciones del pH observadas en cultivos para la producción de cefalosporina y su relación con la expresión de los genes biosintéticos. Los resultados obtenidos mostrarán si en el futuro este tipo de experimentación puede contribuir al mejoramiento de los niveles de producción de cefalosporina.

2.4.1 Cultivos en medio sólido

Existen varios estudios acerca de la producción de cefalosporina C en medio sólido (Wang y *col.*, 1984; Jermini y Demain, 1989; Adinarayana y *col.*, 2003). En el caso de los estudios de Wang y Adinarayana, a pesar de presentar resultados de producción relativamente

altos (6,420 y 22,281 μg de CPC/g de sustrato, respectivamente) ninguno de ellos detalla las variaciones en los parámetros de la fermentación. En el caso del estudio de Jermini y Demain,

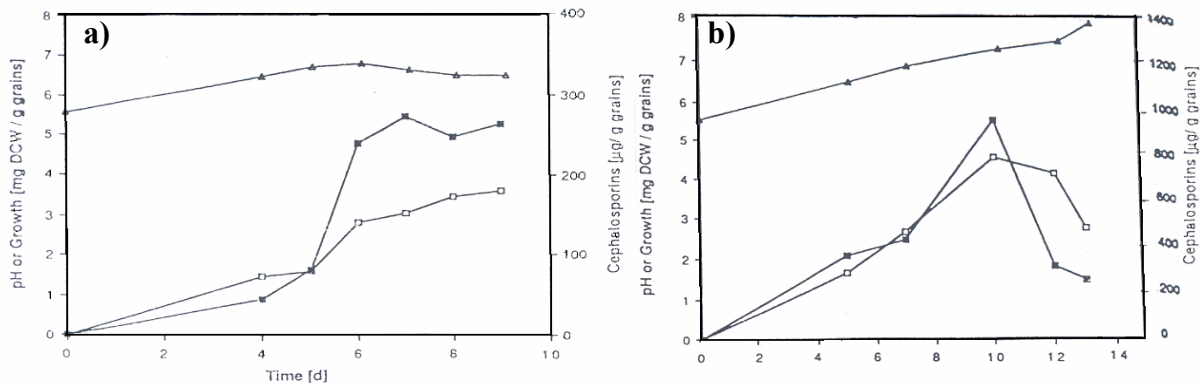


Fig. 4 pH, crecimiento y producción de cefalosporina por a) *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 y b) *Cephalosporium acremonium* C10 sobre cebada y bajo las condiciones óptimas de cultivo encontradas para cada microorganismo por Jermini y Demain (1989).

se observa un aumento más marcado de los valores de pH en el cultivo de *A. chrysogenum* que en los cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, debiéndose posiblemente a diferencias en los medios de cultivo que se utilizan, aunque también existen diferencias significativas en los niveles de producción (Fig. 4).

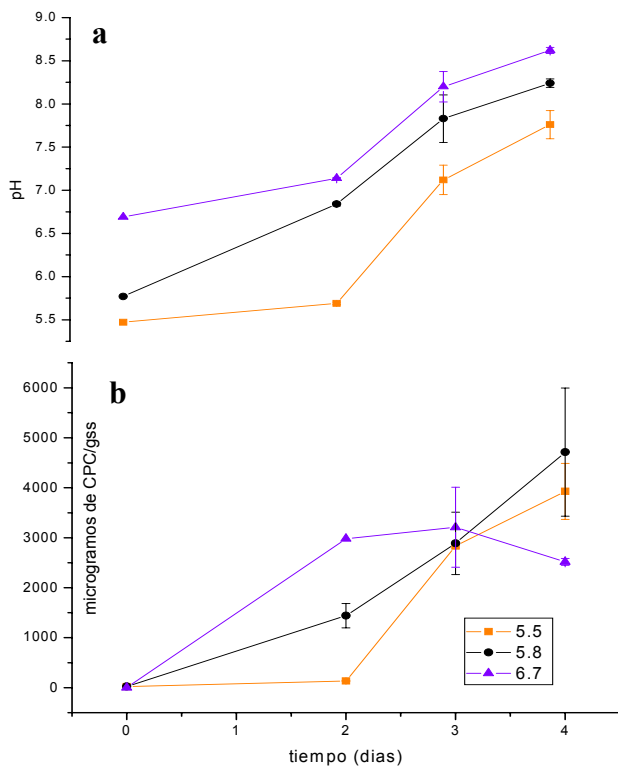


Fig. 5. Cinéticas de pH (a) y producción de CPC (b) en experimentos con diferente valor de pH inicial. Es importante notar que a un pH inicial de 5.8 la producción es ligeramente más alta y se alarga durante un día más en comparación con el pH mayor. Iniciando el experimento a un pH menor ser retrasa un día la producción de CPC.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre la producción de CPC en fermentación sólida en soporte impregnado (Cuadra, 2004), indicaron que al mantener el cultivo dentro de ciertos valores de pH (6.4-8.0) durante los días de producción se alargaba el tiempo y nivel de producción de CPC (Fig. 5).

Se considera que el pH global de la fase líquida de los cultivos en medio sólido puede ser considerablemente diferente a los valores de pH sobre la superficie sólida donde el crecimiento se está llevando a cabo, debido al efecto de la carga superficial y al equilibrio iónico modificado a través del efecto del

transporte de solutos (Mudgett y *col.*, 1986). Además, se ha especulado que en fermentaciones en medio sólido los microorganismos reaccionan produciendo enzimas especiales que son más eficientes en un medio con difusión restringida, o incluso que la estructura de las membranas varía de tal forma que se adapta a un medio bajo condiciones diferentes de consumo de nutrientes y secreción de productos (Barrios González y Mejía, 1996). Sin embargo, no se han realizado estudios que puedan comprobar estas teorías.

2.4.2 Cultivos en medio líquido

De acuerdo a lo reportado por Elander (2003), el pH de los cultivos para la producción de CPC en medio sumergido (líquido), se suele mantener entre valores de 6.2 y 7.0. Por otro lado, también se ha reportado la inestabilidad del anillo β -lactámico en condiciones básicas, lo que acoplado a la presencia de otros sitios reactivos en la CPC da como resultado la completa degradación de la molécula a pH alcalino (Peberdy, 1987).

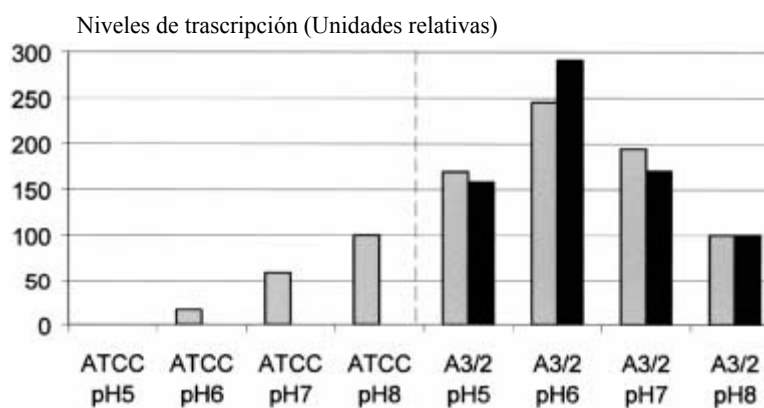


Fig. 6. Expresión de los genes de biosíntesis de cefalosporina en las cepas de *A. chrysogenum* ATCC 14553 y A3/2. El ARN proviene de cultivos que crecían en medios amortiguados a pH 5, 6, 7, y 8. Para la calibración, se hibridó un ARNr con una sonda de ADNr marcada con ^{32}P (Verbeet y *col.*, 1983) como control de carga. Los niveles de transcripción están dados en unidades relativas basados en una cuantificación densitométrica. La cantidad de transcrito expresado a pH 8 por cada cepa fue asignada como 100 unidades para facilitar las comparaciones. Las barras grises representan los niveles de transcripción del gen *pcbC*, y las barras negras los del gen *cefEF* (Schmitt y *col.* 2001).

Para determinar el efecto del pH en cultivo sumergido, sobre la expresión de los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*, Schmitt y colaboradores (2001) analizaron los niveles de transcripción de los genes para cultivos en crecimiento en medio amortiguado

(valores de pH entre 5 y 8). El análisis mostró que en la cepa silvestre ATCC 14553 el gen *pcbC* (que codifica para la proteína IPNS) es expresado a niveles apreciables solamente por encima de pH 5, mientras que el transcrito del gen *cefEF* (que codifica para la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa) no es detectable por hibridación de Northern aún a pH 8. En contraste con esto, la cepa semiproductora A3/2 expresa ambos transcritos en el intervalo completo de pH estudiado. Los niveles más altos de transcripción fueron observados para cultivos que crecían entre pH 6 y pH 7 (Fig. 6).

Los autores caracterizaron asimismo el gen *pacC* de *A. chrysogenum*, mostrando mediante ensayos de retardo en gel que la proteína que codifica (PACC) se unía de forma específica a todas las secuencias consenso presentes en las dos regiones intergénicas conocidas (*pcbAB-pcbC* y *cefEF-cefG*) de los genes de biosíntesis de CPC. Además, mediante un estudio de deleciones secuenciales de la región promotora del gen *pcbC* acopladas al gen *lacZ*, en esta investigación se encontró una secuencia responsable de la activación transcripcional de este gen, ya que al eliminarse la misma se produce una disminución de aproximadamente el 55% de la actividad β -galactosidasa, dentro de esta secuencia estaba presente un sitio de unión de PACC.

Aún no existen estudios, sin embargo, que describan los efectos causados por mutaciones en los genes involucrados en la regulación por pH sobre la biosíntesis de CPC.

3. Justificación

Las cefalosporinas son antibióticos β -lactámicos de actualidad, cuyas características bactericidas le ofrecen al médico y a los pacientes diversas ventajas: pocos efectos adversos, efectividad contra las infecciones causadas por microorganismos resistentes a otros antibióticos y disponibilidad de diferentes formas de administración, entre otras. Las características mencionadas hacen de las cefalosporinas productos de alto valor agregado, que actualmente implican aproximadamente el 21% de las ventas anuales del mercado mundial de antibacterianos, alcanzando aproximadamente 10 billones de dólares (Barber y *col.*, 2004).

Todas las cefalosporinas comerciales son semisintéticas y derivan principalmente del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA), compuesto producido por diferentes métodos a partir de la cefalosporina C, siendo éste el antibiótico β -lactámico producido normalmente por fermentación en medio líquido de cepas industriales del hongo *Acremonium chrysogenum*.

A pesar de que se han logrado mejoras significativas en la producción de CPC a través de diversos estudios de fisiología y mediante modificaciones moleculares de *A. chrysogenum*, se observa que ésta aún se encuentra a un nivel muy por debajo del alcanzado en la producción de penicilina por *P. chrysogenum* (Brakhage, 1998). Es más, mientras que el mejoramiento genético en *P. chrysogenum* es debido en buena parte a la amplificación de los genes de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos, tal rearrreglo del genoma no ha sido aún reportado para *A. chrysogenum* (Barredo y *col.*, 1989; Smith y *col.*, 1989; Walz y Kück, 1991; Fierro y *col.*, 1995; Newert y *col.*, 1997). Se ha sugerido, por lo tanto, que el mejoramiento genético en este hongo podría estar correlacionado con la alteración de los mecanismos regulatorios, lo que tendría como resultado un incremento de la transcripción (Walz y Kück, 1993; Jekosch y Kück, 2000b).

En principio, el factor de transcripción PACC es un regulador positivo sobre la expresión de genes cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente. Es, por lo tanto, un candidato prometedor para su uso en el mejoramiento molecular de los microorganismos productores. El conocimiento limitado de este factor de transcripción en *A. chrysogenum* (especialmente en los cultivos en medio sólido) determina la necesidad de estudios moleculares que expliquen la relación entre las variaciones del pH observadas en

cultivos para la producción de cefalosporina y su relación con la expresión de los factores de transcripción.

Tomando en cuenta que se ha observado que existe un intervalo de valores de pH dentro del cual la producción de CPC es favorecida en fermentación en medio sólido en soporte impregnado, y que además se han observado variaciones en la expresión de los genes biosintéticos en medio líquido que sugieren la existencia de regulación por pH mediada por PACC, a través del presente trabajo se estudiará desde un punto de vista molecular la regulación por pH mediada por este factor sobre la biosíntesis de CPC.

4. Hipótesis

Los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* C10 están regulados por el pH ambiental a través del factor de transcripción positivo PACC, por lo que una mutación de mimetismo alcalino aumentaría la producción total de CPC.

5. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la regulación por pH mediada por el factor de transcripción PACC durante la producción de CPC por *Acremonium chrysogenum*.

Objetivos particulares

1. Determinar los niveles de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de CPC en diferentes condiciones de pH, en cultivos líquidos y sólidos de *Acremonium chrysogenum* C10.
2. Clonar el gen *pacC* de *Acremonium chrysogenum* C10 y modificarlo para poder crear condiciones de mimetismo alcalino.
3. Verificar el efecto de una mutación de mimetismo alcalino en las cepas ATCC11550 y C10 de *A. chrysogenum* sobre la producción de cefalosporina C en cultivos líquidos.

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas

Acremonium chrysogenum ATCC 11550 (Brotzu): Cepa silvestre de *A. chrysogenum*, productora de cefalosporina C, desacetilcefalosporina C y penicilina N. Alcanza una producción de 200 µg/mL en matraz.

Acremonium chrysogenum ATCC 48272 (C10): Cepa de mediana-alta producción de cefalosporina C (2000 µg/mL en medio definido) liberada por PANLABS (Demain, 1983).

Escherichia coli DH5α: Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes/µg de ADN. Además posee una deleción en el gen Z del operón *lac* lo que hace que sean fácilmente seleccionables en ella los plásmidos capaces de originar α-complementación, como por ejemplo pBluescript.

Escherichia coli XL1-Blue: Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes por el método químico y electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^9 y 7.5×10^9 transformantes/µg de ADN respectivamente). También permite la selección por el mecanismo de α-complementación.

Escherichia coli ESS2231: Cepa supersensible a antibióticos β-lactámicos, utilizada para la cuantificación de cefalosporina C por bioensayo.

6.2. Vectores plasmídicos

pGem®T-Easy: Vector plasmídico para la clonación de ADN distribuido por corporación Promega, la característica principal de este vector es contener un sitio de corte EcoRV digerido al cual se le han agregado timinas a los extremos 3' lo que lo hacen un vector de clonación idóneo para productos de PCR obtenidos con Taq polimerasa que presentan adeninas en los extremos 5'.

pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado): Plásmido de 4.9 kpb. Contiene el gen de resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*. Contiene, asimismo la región de

terminación de la transcripción del gen *cycl* de *S. cerevisiae* y un gen de resistencia a cloranfenicol.

pSPUAM2 (Sierra, 2005): Plásmido derivado de pULC43, diferenciándose de este solamente por la ausencia de un sitio de corte *Pst*I y un sitio *Xba*I, ambos ubicados originalmente en la parte media del promotor del gen *pcbC*.

6.3 Medios de cultivo

6.3.1 Medios de cultivo para bacterias:

Medio Luria Bertani (LB; Miller, 1972) (g/L)

Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Se ajusta a pH 7.5 con NaOH

Para medio sólido se añaden 20 g/L de agar y se le llama medio LA

Medio Luria Bertani con ampicilina (LB; Miller, 1972) (g/L). Se permite que el medio LA enfríe a 50 °C antes de adicionar una solución de ampicilina de 50 mg/mL de tal forma de que el medio tenga una concentración final de este antibiótico de 100 µg/mL. Se vierten de 20- 25 mL de medio en cajas de petri de 90 × 15 mm. y se deja solidificar el agar.

Medio SOC (g/L)

Bactotripton	20
Extracto de levadura	5
NaCl 1 M	10 mL
KCl 1 M	2.5 mL
Sln. stock de Mg ²⁺ 2 M estéril por filtración	10 mL
Sln. stock de glucosa 2 M estéril por filtración	10 mL

Se agrega la bactotripton, el extracto de levadura, el NaCl y KCl a 970 mL de agua destilada. Se disuelve por agitación. Se esteriliza en autoclave y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agregan las soluciones stock de Mg²⁺ y glucosa indicadas y se lleva el volumen a 1 L. con agua destilada estéril. El pH final debe ser de 7.0

Solución stock de Mg²⁺ 2 M (g/L)

MgCl ₂ .6H ₂ O	203.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.5

Se agrega agua destilada para un volumen final de 100 mL y se esteriliza por filtración.

6.3.2 Medios de cultivo para *Acremonium chrysogenum*

LPE (Medio de esporulación y mantenimiento, modificado de Le Page y *col.*, 1946) (g/L)

Glucosa	1
Extracto de Levadura	2
NaCl	1.5
CaCl ₂	10
Agar	20
Se ajusta a pH 6.8 con NaOH ó HCl	

MMC (Medio definido de crecimiento, modificado de Queener y *col.*, 1985) (g/L)

Sacarosa	31.6
Glucosa	2.2
Sólidos de maceración de maíz	0.5
L-asparagina	7.5
Acetato amónico	0.22
KH ₂ PO ₄	15
K ₂ HPO ₄	21
Na ₂ SO ₄	0.75
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.18
CaCl ₂	0.06
Solución de sales	1 mL

La composición de la solución de sales en g/L:

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	15
MnSO ₄ .4H ₂ O	3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.8

Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH

MC (Medio completo, Vialta y *col.*, 1997) (g/L)

Sacarosa	20
Extracto de levadura	4
Bactopeptona	4
NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01

Se ajusta a pH 7.2 con NaOH

MSMA (Medio semilla modificado, Adinarayana y *col.*, 2003) (g/L)

Glucosa	10
Sólidos de maceración de maíz	5
Almidón soluble	15
Extracto de levadura	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
CaCO ₃	1

Se ajusta a pH 7.0 con NaOH ó HCl

MCFA (Medio complejo de fermentación para *A. chrysogenum*, Caltrider y *col.*, 1966.) (g/L)

CaCO ₃	1.5
Sólidos de maceración de maíz	5
Melazas de caña	30
Extracto de carne (Difco)	30

Se ajusta a pH 6.8 o al pH ensayado con NaOH ó HCl, En el caso de los cultivos amortiguados a pH constante se sustituirá el CaCO₃ de este medio por MES 100 mM.

MFAF (Medio de fermentación para *A. chrysogenum* con amortiguador de fosfatos 0.075M)

(g/L)

KH ₂ PO ₄	5.105
K ₂ HPO ₄	6.13
Sólidos de maceración de maíz	5
Melazas de caña	30
Extracto de carne (Difco)	30

Se ajusta a pH 6.8 o al pH ensayado con KOH ó H₃PO₄.

MDFAM/MES (Medio definido de fermentación para *A. chrysogenum*, Caltrider y *col.*, 1966.)

(g/L)

Sacarosa	1.5
Glucosa	5
DL-Metionina	30
Solución de Sales N° 1	8 mL
Solución de Sales N° 2	144 mL

Se ajusta a pH 5.7 con NaOH.

Solución de sales N°1 (g/L):

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	2
--	---

Solución de sales N°2 (g/L):

MES (C ₆ H ₃ NO ₄ S.H ₂ O)	185.1
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	11.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.34

6.4 Crecimiento de los microorganismos

6.4.1 Crecimiento de *E. coli*.

Para el crecimiento en medio líquido se utilizó medio LB, y para medio sólido LB con agar al 2% (p/v).

6.4.2 Crecimiento de *Acremonium chrysogenum*

6.4.2.1 Condiciones para la obtención de inóculo primario

Para la obtención de inóculo primario se cultivó *A. chrysogenum* en el medio LPE, en cajas de Petri con aproximadamente 25 mL de medio, durante 7 días a 28 °C. A continuación, se colectó el contenido de cada caja con 3-5 mL de MSMA, raspando con una pipeta invertida para obtener la suspensión que se utilizó para inocular el medio semilla.

6.4.2.2 Condiciones para la producción de inóculo

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de MSMA con el contenido procedente de 3 placas de medio LPE (previamente triturado con perlas de vidrio de 0.3-0.5 mm de diámetro). Se incubó a 25 °C durante 38 horas, con agitación de 200 rpm.

6.4.2.3 Producción de CPC

Condiciones generales

Temperatura: 25°C

pH inicial: Variable de acuerdo al experimento

Inóculo cultivo sólido: 0.1% peso seco biomasa/peso de soporte humedecido, procedente de cultivo de 38 h de MSMA

Inóculo cultivo líquido: 10 mL de MSMA o variable (procedente de un cultivo de 38 h) para 90 mL de MCFA en la concentración indicada para cada experimento

Aireación: (Cultivo sólido) 28 mL/min

Agitación: (Cultivo líquido) 250 rpm.

% de Humedad: 70% en bagazo de caña.

6.4.3 Cultivo en bagazo de caña

Pretratamiento del bagazo. Antes de tamizar el bagazo, éste se hirvió durante 5 minutos en agua destilada para eliminar residuos de azúcar u otras sustancias solubles en agua. Se tamizó con las mallas N° 30 y 50, utilizando la fracción que quedó retenida entre las dos (para todo este trabajo se utilizó el mismo lote de bagazo de caña). El bagazo tamizado se mezcló con aproximadamente el 35% del agua total a utilizar en el cultivo, se tapó con papel de aluminio y se sometió a vaporización en autoclave (válvula abierta) durante 30 minutos, procediéndose después de esto a la esterilización durante 15 min. a 15 lb/pulg² de presión.

Preparación del medio. Se calcularon los componentes del medio de acuerdo al agua total a utilizar en la fermentación, aunque se disolvieron en el 60% de dicha cantidad de agua. Se ajustó el pH, tomando en cuenta el volumen utilizado para luego agregar la cantidad necesaria de agua para completar el 64% del agua total.

Inoculación. Se centrifugó durante 3 minutos a 2700 rpm ($\approx 1300 - 2500 \times g$) en rotor oscilante un volumen de medio semilla de 38 horas que contenía la cantidad necesaria de micelio para inocular la fermentación, con una relación del 0.1% peso seco de biomasa/peso de soporte humedecido. Se decantó el sobrenadante y el residuo se mezcló con el medio de fermentación, se agitó durante 1 min. y se mezcló con el bagazo de caña estéril hasta lograr una coloración homogénea de la mezcla. Se consideró que este inóculo aportaba aproximadamente el 1% del agua requerida para el cultivo.

Empacado de las columnas. Se llenó la columna de fermentación con 12 g de bagacillo de caña, estéril e inoculado de la manera indicada. Las columnas se marcaron previamente, indicándose la longitud hasta la que debían llenarse para tener una densidad de empaque de 0.26 g/mL

6.4.4 Cultivo en medio líquido

Se inoculó con 10 mL de MSMA de 38 h un matraz triplemente indentado de 500 mL que contenía 90 mL del medio de fermentación seleccionado ($2.5\times$ o variable) y se incubó de acuerdo a las condiciones indicadas en el apartado 6.4.2.3.

6.5 Condiciones de pH en los diferentes experimentos

Dependiendo del tipo de cultivo se tomaron tres columnas o tres matraces para cada tiempo de muestreo.

6.5.1 Cultivo preliminar en medio líquido (FL) y sólido (FS).

Se realizó una fermentación en los dos sistemas estudiados, utilizándose MCFA $2.5\times$ sin amortiguador e iniciándose el cultivo a pH 5.8. En este cultivo se midieron los siguientes parámetros: crecimiento, CPC, pH, azúcares, % de humedad y expresión del gen *pacC* y de los genes de biosíntesis y transporte de CPC (*pcbAB*, *pcbC*, *cefD1*, *cefD2*, *cefEF*, *cefG* y *cefT*), al menos durante cuatro días de cultivo (día 2 - día 5).

6.5.2 Cultivos líquidos y sólidos con valores de pH amortiguados

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido, utilizando MCFA 2× amortiguado con MES 100 mM y fosfato monosódico 750 mM, así como en MDFA con diferentes concentraciones de MES y ajustados a pH 5.7. En estos cultivos se midieron los siguientes parámetros: crecimiento, CPC, pH y azúcares.

6.6 Mantenimiento de los microorganismos

E. coli. Se conservó en glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una concentración final del 20%.

A. chrysogenum. El micelio se conservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en DMSO al 10%, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 40%, y a 4° en medio completo de Vialta y colaboradores (1997).

6.7 Técnicas analíticas

6.7.1 Toma de muestras

En el caso de los cultivos en medio líquido, 10 mL de cada uno de los matraces se filtraron sobre filtros de nylon de $30\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro. El micelio se lavó tres veces con 10 mL de NaCl al 0.9% (p/v) y una vez con 10 mL de acetona. Se recogió el micelio y se secó a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en papel de filtro de peso conocido, hasta alcanzar un peso constante. De esta forma se determinó la cantidad de biomasa. La cantidad de penicilina, pH y azúcares se determinaron en el filtrado. Se utilizó el micelio filtrado procedente de un matraz para extraer el ARN.

Para el muestreo en FS, se tomó 1 g de la columna para la determinación de pH, 1 g para extraer la cefalosporina producida y para cuantificar los azúcares totales, 2 g se secaron sin lavar para determinar la humedad del medio y 6 g se utilizaron para la extracción de ARN de las muestras.

6.7.2 Extracción de CPC.

Cultivo en medio sólido: Se pesó 1 g de la muestra del cultivo sólido y se añadieron 6 mL de amortiguador de fosfatos de potasio (pH 5.5, 0.01 M). Se agitó y centrifugó a 2700 rpm ($\approx 1000 \times g$) durante 20 min. El sobrenadante se separó y se utilizó para determinar la concentración de CPC por medio de HPLC.

Cultivo en medio líquido: Se tomaron 100 μL del caldo de cultivo y se precipitaron las proteínas por adición de 100 μL de metanol, centrifugándose a 10000 rpm ($\approx 9500 \times g$)

durante 5 min. El sobrenadante se diluyó diez veces y se utilizó para el análisis mediante HPLC.

6.7.3 Cuantificación de CPC.

Se realizó la cuantificación por bioensayo y por HPLC. La cuantificación por bioensayo se realizó de la forma descrita en el Anexo 1.

Para la cuantificación por HPLC se utilizó una columna μ Bondapack C18 (300 \times 4 mm). La CPC se eluyó con una mezcla de solventes: A (ácido acético/acetato de sodio 10 mM, pH 4.5) y B (Acetonitrilo al 100%), utilizando un gradiente 0%-3% de solvente B (0% al tiempo cero, 3% a los 2 min., y 3% entre los 2 min. y 15 min.) con un flujo constante de 1.3 mL/min. Bajo estas condiciones, la CPC eluyó con un tiempo de retención de 8.3 min. Se identificó este compuesto por coelución en el HPLC con un estándar de CPC (sal de zinc).

6.7.3.1 Método de cilindros de agar para la selección de cepas de *A. chrysogenum*.

Se prepararon cajas de Petri de 100 \times 15 mm con 35 mL de medio MCFA (1 \times) y agar al 2%. Cuando el medio se solidificó completamente se hicieron cilindros con un sacabocados de 8 mm de diámetro. Cada cilindro se inoculó en toda su superficie, con la ayuda de un palillo de madera, con una suspensión de micelio de *Acremonium chrysogenum* preparada disolviendo una colonia pequeña del microorganismo en 20 μ L de solución salina. Se incubaron los cilindros a 25 °C y se hicieron bioensayos a los cuatro y cinco días de incubación, de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo 1.

6.7.4 Cuantificación de azúcares totales.

Utilizando los filtrados del cultivo líquido y los extractos de las muestras de cultivo sólido, se realizó la cuantificación de azúcares totales por el método de DNS modificado, descrito en el Anexo 2.

6.7.5 Determinación de pH.

La determinación del pH en las muestras de cultivo líquido se realizó directamente sobre el medio antes de filtrar.

Para las muestras de cultivo sólido, se mezcló 1 g de muestra del cultivo con 10 mL de agua destilada, agitándose durante 10 min. con agitador magnético antes de la determinación de pH con un potenciómetro.

6.7.6 Determinación de humedad (FS).

Se tomó una muestra de 2 g del sistema de fermentación y se pesó, luego se secó en una estufa a 60 °C hasta alcanzar peso constante, determinándose el porcentaje de humedad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso húmedo de la muestra} - \text{peso seco de la muestra}}{\text{peso húmedo de la muestra}} \times 100$$

6.7.7 Determinación del crecimiento (FS)

Para la cuantificación de la concentración de oxígeno y bióxido de carbono durante las fermentaciones se utilizó un cromatógrafo de gases GOW-MAC con muestreo automático. Las muestras analizadas en el cromatógrafo fueron previamente secadas haciendo pasar el aire húmedo por columnas con sílica gel con indicador de humedad.

6.8 Técnicas moleculares

6.8.1 Obtención de ARN total de *Acremonium chrysogenum*

1. Se incubó el hongo en el medio, condiciones y tiempo determinados como óptimos para la realización de los estudios con el ARN.
2. Una vez incubado durante el tiempo adecuado, el micelio se recogió por filtración a través de filtros de nylon estériles de 30 µm de diámetro de poro y se lavó con un volumen de NaCl al 0.9% (p/v) estéril.
3. Inmediatamente se congeló el micelio en nitrógeno líquido y se guardó a -20 °C ó -70 °C hasta su uso.

Para la realización de los siguientes pasos del procedimiento debe tenerse cuidado de cumplir los siguientes puntos:

- a) Conectar la centrífuga y refrigerar a 4 °C
- b) Limpiar espátula y pinzas con cloroformo.
- c) Poner N₂ en un contenedor que mantenga la temperatura
- d) Rotular tubos de 2 mL y echarlos a flotar en el N₂ y enfriar la punta de la espátula en un vaso de plástico conteniendo N₂ líquido.

e) Poner un poco de N₂ en el mortero con tallo

4. El micelio congelado se machacó en un mortero de porcelana (previamente lavado con etanol y cloroformo, y conservado en todo momento muy frío con nitrógeno líquido), hasta que se convirtió en polvo.

5. Sin dejar que se descongelara, se sacó un tubo con pinzas y se abrió. Con la espátula fría se metió el polvo en el tubo, una cantidad de micelio machacado que ocupaba aproximadamente 500 µL. Se utilizó un tubo en el caso de la extracción de muestras de cultivo sumergido y 4 tubos en el caso de los cultivos en medio sólido.

6. Se agregó 1 mL de Trizol y se mezcló vigorosamente en vortex, mientras se fue descongelando la muestra.

7. Se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, en el caso del cultivo en medio líquido. En el caso de las muestras de cultivo sólido, se centrifugó a 12000 rpm ($\approx 13500 \times g$) durante 5 min., separando el sobrenadante y colocándolo en un nuevo tubo a temperatura ambiente.

10. Se agregaron 200 µL de cloroformo, agitándose vigorosamente a mano durante 15 seg e incubándose a temperatura ambiente durante 3 minutos.

11. Se centrifugó a 4 °C, a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 15 min. colectándose la fase clara acuosa (superior).

12. A la fase acuosa se le agregaron 500 µL de isopropanol, agitándose por inversión y guardándose la mezcla a -20 °C durante toda la noche.

13. Al día siguiente, se centrifugó a 4 °C y 14000 rpm ($\approx 15400 \times g$) durante 30 min. tirándose el sobrenadante y lavándose el precipitado con 1 mL de etanol al 75% mediante agitación con vortex.

14. Se centrifugó a 4 °C y 8000 rpm ($\approx 5000 \times g$) durante 5 min. Se tiró el etanol y se secó el precipitado con una línea conectada a vacío, o al aire, durante 5-10 min.

15. El ARN se resuspendió en 11 µL de agua libre de ARNasa, se dejó en hielo durante 10 min. y se calentó a continuación a 65 °C durante 10 min., con agitación. En el caso de las muestras de cultivos sólidos se juntó el producto de los cuatro tubos en uno solo.

Tratamiento de soluciones con dietilpirocarbonato (DEPC). Es importante que todas las soluciones que se usen en el proceso de extracción de ARN, excepto aquellas que lleven en su composición Tris-HCL, sean tratadas con DEPC con el fin de inactivar las ARNasas. Para ello se añade 0.1 % de DEPC a la solución que se desea tratar, se mezcla por agitación con una barra magnética durante 2-4 h ó se deja reposar a 37 °C toda la noche (12-16 h), finalmente se esteriliza en autoclave para eliminar el DEPC completamente.

6.8.2 Obtención de sondas

Los cebadores utilizados para la amplificación de las sondas de los genes de la ruta de biosíntesis de CPC se diseñaron con la ayuda del programa Primer Select 4.0, del Paquete DNASTAR para Windows, y se describen en la tabla 2.

La mezcla de reacción para los cebadores diseñados para todos los genes de la tabla 2 fue:

Volumen total de reacción 50 μ L

Agua destilada estéril	27 μ L
Amortiguador 10 \times para polimerasa Taq (comercial)	5 μ L
MgCl ₂ [50 mM]	1.5 μ L
Mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP [10 mM] cada uno	2 μ L
Cebador f 20 μ M	2 μ L
Cebador r 20 μ M	2 μ L
ADN molde	10 μ L
Taq polimerasa (5 U/ μ L)	0.5 μ L

Las mezclas para las sondas 1 a 7 se sometieron a amplificación con termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 62°C (hibridación) y 1 minuto a 72°C; seguido de un ciclo de 7 minutos a 72°C; para finalmente llevar a 4°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de las sondas y genes.

Sonda	Oligonucleótido	Secuencia de cebadores (5' → 3')	Especificidad	Secuencia de origen
1	<i>pacCf</i>	GTCTCCCCAGTCCAGGCACAGC	<i>pacC</i> (pos 2289-2310)	AJ251521
	<i>pacCr</i>	GTCACCCGGCATAACGACGAT	<i>pacC</i> (pos 2842-2862)	
2	<i>actAf</i>	CCTTCAACGCCCTGCCTTCTACG	<i>actA</i> (pos 1662-1685)	AF056976
	<i>actAr</i>	GTGGATGCCGCCGCTCTCG	<i>actA</i> (pos 2092-2110)	
3	<i>pcbABf</i>	CGAAGAGCCGGCAGAGTGAAAC	<i>pcbAB</i> (pos 7286-7307)	Gutiérrez y col., 1991
	<i>pcbABr</i>	GTCCGAGGCGCAGCAGAAGC	<i>pcbAB</i> (pos 7790-7809)	
4	<i>pcbCf</i>	GCGCGACACAGGCTCTTTTAC	<i>pcbC</i> (pos 114-135)	M33522
	<i>pcbCr</i>	CGTCGTCCGGCTCTTGATG	<i>pcbC</i> (pos 603-622)	
5	<i>cefD1f</i>	CACCGCCGCCGCTGCCTACC	<i>cefD1</i> (pos 3571-3590)	AJ507632
	<i>cefD1r</i>	GATATCCCGAAGCCGCTCACCAAC	<i>cefD1</i> (pos 4037-4060)	
6	<i>cefD2f</i>	GTCCGCCCCGTCCAATCACC	<i>cefD2</i> (pos 887-906)	
	<i>cefD2r</i>	CTTCCCGCCGGCCAACATCC	<i>cefD2</i> (pos 1449-1468)	
7	<i>cefTf</i>	GCCTTCTCCGCGCCGATGAC	<i>cefT</i> (pos 1116-1135)	AJ487683
	<i>cefTr</i>	CAGCACGCCGAGAGCACGACAC	<i>cefT</i> (pos 1648-1669)	
8	<i>cefEFf</i>	ATGGGCATCGGCGCAACCTGT	<i>cefEF</i> (pos 5348-5369)	AJ404737
	<i>cefEFr</i>	CCGCCAAGCCACTCCCTGAACG	<i>cefEF</i> (pos 582-600)	
9	<i>cefGf</i>	CCCAAGTGGCCCGTCTAAA	<i>cefG</i> (pos 582-600)	M91649
	<i>cefGr</i>	CGTCGTCCGAGGAACTTG	<i>cefG</i> (pos 1093-1111)	
10	<i>cahBf</i>	CGCTGGTGTTCATCGCTGGTA	<i>cahB</i> (pos 940-959)	BD267703
	<i>cahBr</i>	ACTGGCCGTTGTTGATGAGAAGGT	<i>cahB</i> (pos 1434-1457)	

Las mezclas para las sondas 8, 9 y 10 se sometieron a amplificación en las mismas condiciones que las usadas con las otras sondas, con excepción de la temperatura de hibridación de los cebadores, que fue de 65 °C, 54 °C, y 58 °C, respectivamente.

6.8.2.1 Clonación de productos de PCR en el plásmido pGEM®-T Easy.

Este sistema es conveniente para la clonación de productos de PCR. El vector ha sido preparado cortando el plásmido pGEM®-T Easy con *EcoRV* y adicionando una timina 3' terminal en ambos extremos (Fig. 7). Estas protuberancias sencillas 3' en el sitio de inserción incrementan la eficiencia de ligación en los plásmidos de los productos de PCR obtenidos con Taq polimerasa, impidiendo la recircularización del vector (Mezei y col., 1994; Robles y Doers, 1994) La Taq polimerasa a menudo adiciona una desoxiadenosina, de manera independiente de molde, a los extremos 3' de los fragmentos amplificados (Clark, 1988; Newton y Graham, 1994).

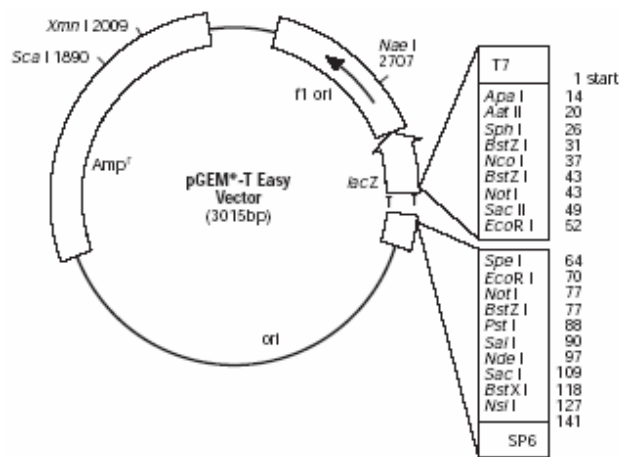


Fig. 7. Estructura y mapa de restricción del vector pGEM®-T Easy

6.8.2.2 Protocolo de ligación.

1. Se centrifugó brevemente el tubo del vector pGEM®-T Easy para recoger el contenido en el fondo del tubo.
2. Se hizo la mezcla de reacción en un tubo de microcentrífuga, como se indica en la tabla 3. Se mezcló en vortex el buffer de ligación rápida 2× antes de cada uso.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción para ligar productos de PCR con el vector pGEM[®]-T Easy.

Reactivos	Cantidad
Buffer de ligación rápida para ligasa T4	5 μ L
Vector pGEM [®] -T Easy (50 ng)	1 μ L
Producto de PCR	2-3 μ L
Ligasa T4 (3 unidades Weiss/ μ L)	1 μ L
Agua desionizada para un volumen final de	10 μ L

3. Se mezclaron las reacciones mediante pipeteo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Alternativamente, se pueden incubar las reacciones toda la noche a 4 °C, para obtener el máximo número de transformantes.

6.8.2.3 Transformación de *Escherichia coli*

Los ácidos nucleicos no entran en *E. coli* por sus propios medios, necesitan disponibilidad de la bacteria para permitir que éstos atraviesen la membrana celular y lleguen al espacio en el cual puedan expresarse y replicarse. El estado que permite el ingreso de ADN a las células se denomina “competencia” y las células que lo presentan se denominan células competentes.

6.8.2.3.1 Preparación de células competentes

La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo a lo descrito por Sambrook y Russell (2001). Este método implica los siguientes pasos:

1. Se sembró una caja de Petri de medio LB sólido con *E. coli* DH5 α o XL-Blue, de tal forma que se obtuvieran colonias aisladas, y se incubó a 37 °C durante 16 h.
2. Se inoculó con una colonia aislada un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB, incubándose a 37 °C con agitación de 250 rpm hasta el día siguiente.
3. Se inocularon 4 alícuotas de 125 mL de medio LB previamente temperado a 37 °C en matraces de 500 mL con 6.5 mL del cultivo de *E. coli* previamente obtenido, agitándose a 300 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm entre 0.35 y 0.4.

4. En dicho momento, los matraces se transfirieron rápidamente a un baño de agua con hielo durante 15-30 min. El cultivo se agitó ocasionalmente, para asegurar que el enfriamiento ocurriera uniformemente.

5. Se recogieron las células por centrifugación a $1000 \times g$ en un rotor Beckman durante 15 minutos, a una temperatura de 4°C . Los tubos de centrifuga fueron enfriados previamente a 4°C .

6. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 125 mL de agua purificada, enfriada previamente en un baño de agua y hielo (con agitación suave y manteniendo una temperatura no mayor a 4°C).

7. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas en el paso 5, durante 20 minutos. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 60 mL de glicerol al 10% (v/v) enfriado en hielo.

8. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas en el paso 7. El sobrenadante se decantó (cuidadosamente, ya que con el glicerol el precipitado pierde adherencia) y las células se resuspendieron en 2.4 mL de glicerol al 10% (v/v) enfriado en hielo. Las células se reunieron en este punto en un solo tubo de centrifuga.

9. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas en el paso 7, decantándose con cuidado el sobrenadante y usando una pipeta Pasteur conectada a una línea de vacío para eliminar cualquier gota remanente de glicerol. Se resuspendió el precipitado en 1 mL de medio GYT enfriado en hielo.

10. Se midió la densidad óptica de una dilución 1:100 de la suspensión de células, ajustando la concentración final de la suspensión a 2×10^{10} - 3×10^{10} células/mL (una unidad de densidad óptica a 600 nm equivale a aproximadamente 2.5×10^8 células/mL) con medio GYT enfriado en hielo.

11. Las células competentes así preparadas se usaron inmediatamente, o bien se conservaron a -70°C , distribuidas previamente en alícuotas de 50 μL congeladas en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

GYT: Glicerol al 10%(v/v), Extracto de levadura .125% (p/v), tristonina 0.25% (p/v)

6.8.2.4 Procedimiento de transformación de *E. coli*

Se siguieron los pasos descritos por Sambrook y Russell (2001), que se detallan a continuación:

1. Se descongelaron las células competentes en un baño de hielo y agua, donde también se colocaron un número apropiado de cubetas de electroporación y el tubo conteniendo el ADN a electroporar.

2. En un tubo de microcentrífuga frío se mezclaron 50 μ L de células electrocompetentes con 10 pg – 25 ng del ADN a electroporar (contenido en un volumen de 1 a 2 μ L).

3. Se incubó el tubo en hielo durante 30-60 seg.

4. Se ajustó el aparato de electroporación para que proporcionara un pulso de 20 μ F de capacitancia, 2.5 kV y 200 ohm de resistencia.

5. Se pipeteó la mezcla de células/ADN en una cubeta de electroporación fría, asegurándose de que esta suspensión quedara en el fondo de la cubeta. Se secó la condensación y la humedad del exterior de la cubeta.

6. Se colocó la cubeta en el aparato de electroporación.

7. Se aplicó un pulso de electricidad a las células en las condiciones indicadas en el punto 4. El aparato debía registrar un tiempo de 1-4 mseg con una fuerza de campo mínima de 8.5 kV/cm para asegurarnos que la transformación hubiera ocurrido.

8. Rápidamente después del pulso, se retiró la cubeta de electroporación y se agregó 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente.

9. Se transfirieron las células a un tubo de microcentrífuga y se incubó el cultivo a 150 rpm durante 1.5 h a 37 °C.

10. Se plaquearon diferentes volúmenes (hasta 200 μ L por caja de 90 mm) de las células electroporadas en medio LB con el antibiótico apropiado para la selección.

11. Se mantuvieron las cajas a temperatura ambiente hasta que el líquido fue absorbido.

12. Las cajas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C. Las transformantes aparecieron en 12-16 horas.

6.8.3 Clonación y mutación de mimetismo alcalino del gen *pacC*

Se utilizaron cebadores específicos para amplificar el gen *pacC* por PCR (Tabla 4). Se buscaban dos fragmentos distintos: uno del gen completo, es decir la secuencia que es procesada solamente a pH alcalino (gen control), y otro con la secuencia del gen modificada para expresar el transcrito necesario para obtenerse el factor de transcripción constitutivamente activo.

Tabla 4. Oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de *pacC* sin y con mimetismo alcalino

Oligonucleótido	Secuencia de cebadores (5'→3')	Especificidad	Secuencia de origen
<i>pacC1F</i>	TGAGATGGTGTCTACCGTTCTTTCCC	<i>pacC</i> (pos 1-26)	
<i>pacC2R</i>	TTAGGATCCGGACGAGGGGTCGATCTCACGG	<i>pacC</i> (pos 1743-1774)	AJ251521
<i>pacC1R</i>	CTCTCCAAGGAATAAAAACATCAGTCTGTATA	<i>pacC</i> (pos 3057-3089)	

La mezcla de reacción para los cebadores diseñados para todos los genes de la tabla 4 fue:

Volumen total de reacción 50 µL

Agua destilada estéril	28.5 µL
Amortiguador 10× para polimerasa Pfu con Mg (comercial)	5 µL
Mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP [10 mM] cada uno	2 µL
Cebador f 20 µM	2 µL
Cebador r 20 µM	2 µL
ADN molde	10 µL
Pfu polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL

La mezclas para la amplificación de las diferentes secuencias de *pacC* se sometieron a amplificación con un termociclador Eppendorf bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente para las sondas de hibridación, exceptuando las temperaturas de hibridación (*pacC1*: 57 °C, *pacC12*: 62 °C) y el tiempo de elongación (*pacC1*: 3 min., *pacC12*: 2.5 min.).

6.8.3.1 Obtención del ADN total de *Acremonium chrysogenum*

El método para obtener ADN total de *A. chrysogenum* es esencialmente el descrito previamente por Specht y col., (1982), con modificaciones (Fernández, 1997).

1. Se inocularon 100 mL de MMC con esporas procedentes de 6 placas de medio LPE de *A. chrysogenum* y se incubaron a 25 °C durante 48 horas.

2. Se recogió el micelio resultante por filtración a través de un filtro de nylon estéril de 30 μm de diámetro de poro. Se lavó el micelio retenido con 1 vol. de NaCl al 0.9% y posteriormente con otro vol. de tampón A. Se secó con papel de filtro, se congeló y se liofilizó.
3. Se rompió con mortero 1 g. de micelio liofilizado y se recogió parte del polvo obtenido en un tubo de microcentrífuga de 2.2 mL (sin que se superaran los 0.25 mL de volumen por tubo, aproximadamente 25 mg de micelio pulverizado). A continuación se añadieron 0.5 mL de tampón de rotura I, se homogenizó la mezcla y se añadieron 0.5 mL de fenol y 0.5 mL de CIA. Se mezcló bien, pero con suavidad, y se incubó a 50 °C durante 20 minutos (a los diez minutos de incubación se mezcló de nuevo).
4. Transcurrido este tiempo se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa. La mezcla se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (son necesarias 6 ó 7 extracciones). A continuación se hizo una nueva extracción con un volumen de CIA y se precipitó el ADN a 4 °C durante 2-4 h con 0.7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 4 °C y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 20 minutos; se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Finalmente el precipitado se secó y se resuspendió en 20 μL de TE.

Tampón de rotura I: Tris-HCl 0.2 M, SDS al 1%, EDTA 100 mM pH 8. Se ajusta el pH a 8.2 con HCl

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético pH 8 con NaOH

Fenol ácido: Se mezclan 500 mL de fenol sólido con 500 mL de H₂O, se mezcla y se retira parte de la fase acuosa. Se burbujea con N₂ gaseoso durante 15 min., se guarda a 4 °C en recipiente oscuro

Fenol neutro: Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 mL de Tris-HCl 1M pH 8. Se mantiene en reposo hasta que se separen las fases. Se conserva a 4 °C en recipiente opaco

Fenol-CIA: 1 volumen de fenol neutro -1 volumen de CIA

CIA: 24 volúmenes de cloroformo -1 volumen de alcohol isoamílico

6.8.3.2 Esquema general de la digestión con una endonucleasa de restricción

1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se mezclaron, en el orden mencionado, los siguientes componentes de la reacción.
 - a) Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.
 - b) Tampón de digestión en la concentración óptima descrita (generalmente la décima parte, ya que el tampón normalmente viene en una concentración 10 \times).

c) n μg de ADN disuelto en agua destilada estéril o en tampón TE (si el ADN fue disuelto en TE se recomienda que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción, para evitar modificar las características del tampón de digestión o inhibir la reacción enzimática a causa del EDTA).

d) 2n unidades de enzima.

2. Posteriormente se incubó a la temperatura adecuada durante 2-3 h. El ADN digerido se utilizó para su análisis por migración electroforética en geles de agarosa o se limpió mediante fenolización para un posterior uso.

6.8.3.3 Desfosforilación de los extremos 5' del ADN con fosfatasa alcalina termosensible

1. Se disolvió el ADN (0.5 μg aproximadamente) en 44 μL de agua destilada y se añadieron 5 μL de tampón de reacción (MULTICORE™ 10 \times buffer) para la fosfatasa alcalina termosensible.

2. Se calentó a 65 °C durante 10 minutos para asegurar una buena dilución del ADN y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

3. Como guía general, para reacciones que contenían hasta 1 μg de ADN, se agregó 1 unidad de enzima en un volumen de reacción total de 20-50 μL .

4. Se incubó la reacción a 37 °C durante 15 min.

5. Se inactivó por calentamiento a 74 °C durante 15 min

6. Se limpió el ADN por fenolización y se precipitó a -20 °C con 2.5 volúmenes de etanol frío.

6.8.3.4 Ensamblaje de fragmentos de ADN con la ligasa del bacteriófago T4.

1. A una cantidad de ADN del vector de entre 10 y 40 ng se le añadió una cantidad equimolar de ADN del inserto (aunque normalmente la ligación se favorece si la relación inserto/vector se duplica).

2. Se añadió el agua destilada necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 μL y se calentó la mezcla a 65 °C durante 15 s, con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes en la mezcla.

3. Se enfrió en hielo y se añadieron 2 μL de tampón de reacción $5\times$ para la ADN ligasa I y 1 μL (1 unidad) de ADN ligasa del bacteriófago T4.

4. Se incubó la reacción a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 h. Las nuevas moléculas generadas durante este proceso fueron posteriormente transformadas en la cepa de *E. coli* adecuada.

6.8.4 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

6.8.4.1 Lisis alcalina

Este procedimiento fue seguido para la obtención de ADN plasmídico a gran escala. El método fue esencialmente el descrito por Maniatis y col. (1982).

1. Se inocularon 100 mL de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretendía amplificar. Las células bacterianas se incubaron durante 12-16 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, con agitación orbital (250 rpm). El medio TB se suplementó con un antibiótico que permitió el mantenimiento del plásmido dentro de *E. coli*. La concentración final de estos antibióticos en el medio de cultivo fue la descrita por Sambrook y Russell (2001): 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso de la ampicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la kanamicina, 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el cloranfenicol y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el caso de la tetraciclina.

2. Se recogieron las células mediante centrifugación a 5000 rpm ($\approx 2000 \times g$) durante 5 min., en un rotor fijo a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspendió en 15 mL de GTE con una concentración de lisozima de 10 mg/mL (para ayudar a la resuspensión, se rompió manualmente el pellet con un palillo de madera o por pipeteo hasta que no se observaron grumos. Una completa resuspensión es crítica para obtener niveles óptimos de plásmido). Se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min.

3. Se agregaron 6 mL de solución NS y se mezcló suave pero constantemente, por inversión. La lisis celular se consideró completa cuando la solución se volvió clara y viscosa (máximo 20 min.)

4. Se agregaron 4.5 mL de solución, previamente enfriada a 4 $^{\circ}\text{C}$, de acetato potásico. Se mezcló vigorosamente y se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

5. Se centrifugó a 5000 rpm ($\approx 2,000 \times g$) durante 15 min., a temperatura ambiente.

6. Se transfirió el sobrenadante claro por filtración a través de papel Whatman N°1 a una probeta graduada limpia de 100 mL. Se midió el volumen del sobrenadante y se transfirió a un tubo de centrifuga.

7. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión, manteniéndose la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min.

8. Se centrifugó a 5000 rpm ($\approx 2,000 \times g$) durante 15 min. a 4 °C .

9. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. (v/v)

10. Se centrifugó a 5000 rpm ($\approx 2,000 \times g$) durante 5 min. a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet de ADN en 2 mL de TE. Se lavaron completamente las paredes del tubo con TE para recuperar todo el ADN.

El ADN obtenido hasta este punto puede ser utilizado para verificar la identidad del plásmido aislado por medio de la digestión con enzimas de restricción; sin embargo, para su utilización como sonda el ADN fue purificado con el sistema DNA Wizard[®]Maxipreps o con el sistema QuiaEx de Quiagen (en ambos casos se siguieron los procedimientos indicados por el fabricante).

Solución GTE: EDTA 10 mM pH 8 (ajustado a pH 8 con NaOH sólido), glucosa 50 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8

Solución NS: NaOH 0.2 N y SDS 1% (p/v)

Acetato potásico para lisis alcalina: Se mezclan 60 mL de acetato potásico 5 M, 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

Solución de lavado de columna (para cuando se usa el sistema de Maxipreps de Promega.): Acetato de potasio 80 mM, Tris.HCl 8.3 mM pH 7.5, EDTA 40 μ M y etanol al 55% (v/v).

6.8.4.2 Minipreparaciones

El método seguido para obtener ADN plasmídico a pequeña escala fue una modificación del método descrito por Holmes y Quigley (1981).

1. Se picó una colonia con un palillo estéril y se inoculó en un tubo de microcentrifuga estéril con 1 mL de medio LB al que se le añadió el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria. Se incubó el tubo a 37 °C con agitación (250 rpm) durante 6-18 h, con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria.

2. Tras este tiempo se recogieron las células mediante centrifugación a 5000 rpm ($\approx 2000 \times g$) en un rotor Eppendorf, durante 3 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 350 μ L de STET y se añadieron 10 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.

3. Se mezcló durante 30 segundos y se hirvió durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 10 minutos y se eliminaron con la ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó tras añadir 40 μL de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μL de isopropanol, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min.

4. El ADN plasmídico se centrifugó a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se secó y se resuspendió en 30 μL de TE. Dos microlitros de esta solución fueron suficientes para llevar a cabo cada uno de los ensayos de digestión con endonucleasas de restricción necesarios para el análisis de los plásmidos recuperados.

6.8.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para la determinación de la integridad del ADN genómico y el ARN, y para la verificación de los productos obtenidos en las mini preparaciones y reacciones de PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó agarosa LE grado analítico de Promega, en concentraciones entre 0.7 y 1.5%, siguiendo básicamente el siguiente procedimiento:

1. Se preparó una solución de agarosa de la concentración deseada, disuelta por calentamiento en microondas en tampón TAE 1 \times . Se vertió en la cubeta correspondiente cuando la solución se había enfriado a 65 °C.

2. Mientras el gel se solidificaba, se diluyeron de 1 a 5 μL de la muestra en agua estéril suficiente para obtener un volumen final de 18 μL .

3. En el caso de que la muestra fuera ARN se calentó a 65 °C durante 5 minutos y luego se dió un pulso de centrífuga para recolectar la muestra en el fondo del tubo.

4. Se agregaron 2 μL de tampón de carga 6 \times , se mezcló por pipeteo y se cargó el gel.

5. Se aplicó una diferencia de potencial de 1-5 voltios/cm, hasta que el frente del colorante migró a la distancia requerida.

6. Se tiñó el gel durante 10 min. con una solución de bromuro de etidio (concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua).

7. Los geles se fotografiaron con un equipo de fotodocumentación Gel Doc II (Bio-Rad).

TAE 50×: 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

Tampón de carga 6×: Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), sacarosa al 40% (p/v) y xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos. Se conserva a 4 °C para evitar el crecimiento de microorganismos.

Bromuro de etidio: Se prepara una solución 10 mg/mL en agua y se conserva a 4 °C. Para un litro de agua destilada se requieren 50 µL de esta solución.

6.8.6 Cuantificación de ARN y ADN

La cuantificación se realizó por medio de espectrofotometría, y al mismo tiempo se verificó la pureza (Serrano y *col.*, 1993)

1. Se disolvieron 2 µL de la muestra (ARN y ADN) en 998 µL de agua (DEPC en el caso de ARN), y se mezcló con vortex.

2. El blanco utilizado fue agua en el caso de ADN, y agua DEPC en el caso de ARN. Se usó una semimicro celda de cuarzo para todas las mediciones.

3. Se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 230, 260 y 280 nm.

4. Se realizaron los cálculos para conocer la pureza y concentración, utilizando los siguientes criterios y fórmulas:

El cociente A_{260}/A_{280} debe ser 1.8 (ADN) y 2.0 (ARN) si están libres de impurezas que absorben en el ultravioleta. Cocientes menores se deben a contaminación por proteínas, fenol o material insoluble.

El cociente A_{260}/A_{230} debe ser mayor que 2 y menor que 2.4 tanto para ADN como para ARN. Cocientes menores se deben a contaminación por una sal de guanidinio o por β-mercaptoetanol.

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{Abs_{260} \times 40}{2}$$

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{Abs_{260} \times 50}{2}$$

6.8.7 Electroforesis de ARN en geles con formaldehído

Para que la movilidad electroforética del ARN sea dependiente del tamaño hay que destruir las estructuras secundarias con formaldehído. Ello impide usar en la electroforesis tampones con grupos amino como el Tris. En el presente método se utiliza MOPS.

1. Se limpió previamente la cubeta y tanque de electroforesis con SDS 1% (p/v) para asegurar que se encontraran libres de ARNasas y se enjuagó luego con agua tratada con DEPC.

2. Para preparar un gel de 11×14 cm se necesitaron 100 mL de solución de agarosa al 1.2%. Se mezclaron primero 1.2 g de agarosa y 84 mL de agua.

3. Se disolvió la agarosa en un horno microondas y se esperó que enfriara hasta aproximadamente 60°C , agregándose 10 mL de MAE $10\times$.

4. Se esperó a que el gel llegara a una temperatura de $50\text{-}55^\circ\text{C}$ (hasta que se pudiera sostener el frasco con la mano sin quemarse demasiado; en adelante se trabajó en campana de gases para evitar los vapores de formaldehído) y se añadieron 3 mL de formaldehído al 37%.

5. Se mezcló y virtió la solución en la cubeta para que gelificara.

6. Tras la gelificación, se colocó en el tanque de electroforesis tampón MAE $1\times$.

7. Se preparó la muestra mezclando un volumen de ARN con $7.5\ \mu\text{g}$ y agua DEPC hasta alcanzar un volumen de $15\ \mu\text{L}$. En el caso del marcador de peso molecular se usaron $3\ \mu\text{L}$ de muestra ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

8. Se agregaron $15\ \mu\text{L}$ de tampón de carga para ARN y se calentaron las muestras durante 5 minutos a 55°C . Se centrifugó cada muestra con un pulso para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.

9. Se aplicaron las muestras a los pocillos y se corrió el gel durante 2-4 h a 100 V. Se visualizaron las bandas con luz UV.

Los geles se fotografiaron con un equipo de fotodocumentación Gel Doc II (Bio-Rad).

MAE $10\times$: MOPS 0.2 M, acetato de sodio 50 mM, y EDTA 10 mM. Se ajustó a pH 7.0 con NaOH. Se esterilizó por filtración y se guardó refrigerado protegido de la luz.

Tampón de carga para ARN: Para preparar 4 mL, se mezclaron 2.2 mL de formamida desionizada, 0.8 mL de formaldehído, 0.5 mL de MAE $10\times$, 0.4 mL de glicerol al 80% (v/v), 0.1 mL de azul de bromofenol al 2% (p/v) y 20 μL de bromuro de etidio 0.1% (p/v). Se guarda congelado.

6.8.8 Transferencia, marcaje de sondas específicas e hibridación de ARN

6.8.8.1 Northern Blot

La transferencia de ARN se realizó a través del procedimiento de capilaridad y utilizando membrana de nylon, siguiendo los pasos siguientes:

1. Se colocó una cantidad suficiente de tampón de transferencia en el recipiente (en nuestro caso fue una cubeta de electroforesis) hasta los 2 bordes.

2. Enseguida se colocaron dos tiras de papel Whatman 3MM del ancho del gel, pero con el largo adecuado para que colgaran bien en el recipiente (se mojaron por capilaridad). Se evitaron las burbujas de aire entre el papel y el soporte.

3. Con mucho cuidado, se colocó el gel de ARN con la superficie inferior hacia arriba, de manera que la transferencia se realizara desde la parte más plana, evitando nuevamente la formación de burbujas de aire.

4. Se agregaron 2 ó 3 mL de tampón de transferencia sobre la superficie del gel y se colocó la membrana seca sobre el gel, la cual se marcó para saber de qué lado se realizó la transferencia (se aseguró la eliminación de todas las burbujas de aire entre el gel y la membrana, tratando de no mover la membrana después de este paso). La membrana debe tener un tamaño de 2 a 3 mm mayor que el gel, para evitar una transferencia incompleta o incorrecta.

5. Se colocaron 6 cuadrados de papel Whatman 3MM humedecidos en el tampón de transferencia seguidos de 5-8 cm de papel de periódico, todo ello del tamaño del gel.

6. Encima del papel de periódico se colocó un vidrio cuadrado (centrado) y un libro de 250-500 gramos. Este sistema se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 12-16 horas.

7. Se desmontó la transferencia, asegurándose de marcar la parte superior izquierda de la membrana.

8. Se fijó el ARN a la membrana con luz ultravioleta, ocupando la fuente de luz ultravioleta de un transiluminador UVP TFM-20, exponiendo 2 minutos la membrana en forma paralela a la alineación de las lámparas, y otros 2 minutos con la membrana ubicada en forma perpendicular a la alineación de las lámparas.

9. Terminado el ciclo, se señalaron los ARN ribosomales, y se identificó la membrana.
10. Se lavó la membrana con agua destilada por 3 minutos
11. Se envolvió la membrana con plástico autoadherible y se guardó a 4 °C, hasta su hibridación posterior.

Tampón de transferencia: SSC 20×: este tampón está compuesto por citrato sódico 0.3M y NaCl 3 M. El pH se ajusta a un valor de 7 con NaOH. Para utilizarlo en experimentos con ARN se trata la solución con un 0.1% (v/v) de DEPC y se esteriliza en autoclave.

6.8.8.2 Marcaje de las sondas con digoxigenina

1. Se mezcló 1 µg. del ADN a marcar con agua suficiente para completar 16 µL
2. Se desnaturalizó el ADN calentando en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y rápidamente se enfrió en un baño de hielo, manteniéndose durante 5 minutos.
3. Se mezcló con vortex el Dig-High Prime 5× y se añadieron 4 µL al ADN desnaturalizado, se mezcló y se realizó un pulso de centrifuga para colectar todo el contenido en el fondo del tubo.
4. Se incubó a 37 °C durante 20 horas.
5. Se detuvo la reacción añadiendo 2 µL de EDTA 0.2 M pH 8.0 y/o calentando a 65 °C durante 10 minutos.

6.8.8.3 Hibridación de sondas marcadas con digoxigenina

1. Se realizaron todos los pasos siguientes en tubos de vidrio de 50 o 100 mL o en bolsas sellables de plástico resistentes a las altas temperaturas. No se deben usar contenedores abiertos con el tampón DIG Easy Hyb.
2. Se precalentó un volumen apropiado de Dig Easy Hyb (10-15 mL/100 cm² de filtro) a la temperatura de hibridación (50 °C o variable, dependiendo de la sonda).
3. Se prehibridó el filtro durante 30 minutos con agitación suave en un tubo de hibridación cerrado, evitando la formación de burbujas en este proceso.
4. Se desnaturalizó la cantidad apropiada de sonda de ADN marcada con Dig (concentración final con Dig Easy Hyb de aproximadamente 50 ng/mL) hirviendo durante 5 min. y enfriando rápidamente en un baño de hielo.

5. Se agregó la sonda desnaturalizada a una cantidad apropiada de solución Dig Easy Hyb precalentada (3.5 mL/ 100 cm² de membrana) y se mezcló bien evitando la formación de espuma.

6. Se descartó la mezcla de prehibridación y se agregó la mezcla sonda/tampón de hibridación a la membrana.

7. Se incubó durante 16 horas con agitación suave.

8. Se decantó la solución de hibridación a un tubo estéril (esta mezcla de hibridación puede ser almacenada de -15 a -25 °C y ser reusada varias veces si se desnaturaliza a 68 °C durante 10 min. antes de usar).

9. Se lavó la membrana 2 veces durante 5 minutos con 50 mL de solución SSC 2× y 0.1% SDS (p/v) a una temperatura de 15-25 °C, con agitación constante.

10. Se lavó 2 veces durante 15 minutos con 100 mL de solución 0.5× SSC y 0.1% SDS (precalentada a la temperatura de lavado) a una temperatura de 65-68 °C, con agitación constante.

Preparación de la solución de trabajo DIG Easy Hyb: Se agrega cuidadosamente 64 mL de agua doble destilada estéril en dos porciones a los granulos de DIG Easy Hyb (Frasco 7). Se disuelven con agitación durante 5 minutos a 37 °C

6.8.8.4 Detección inmunológica

A continuación se describe como se realizó la detección inmunológica en una membrana de 100 cm². Todas las incubaciones se realizaron de 15-25 °C, con agitación. Si la membrana iba a ser reutilizada no se permitió que se secase en ningún momento.

1. Después de la hibridación y los lavados de astringencia, se enjuagó la membrana brevemente (3-5 min.) en 90 mL de tampón de lavado, en un contenedor nuevo.

2. Se incubó durante 30 min. en 100 mL de solución de bloqueo.

3. Se incubó durante 30 min. en 20 mL de solución de anticuerpo.

4. Se lavó 2 veces durante 15 min. en 100 mL de tampón de lavado.

5. Se retiró el tampón de lavado y se equilibró durante 2 a 5 minutos en 20 mL de tampón de detección.

6. Se colocó la membrana (con el ARN hacia arriba) en un fólter de revelado y sobre plástico autoadherible, a continuación se aplicaron de 1 a 2 mL de solución de trabajo CDP-Star.

7. Inmediatamente se cubrió la membrana con el resto de plástico autoadherible y se distribuyó uniformemente y sin burbujas el sustrato sobre la membrana.

8. Se incubó durante 5 min. a 15-25 °C.

9. Se eliminó el exceso de líquido y se sellaron los bordes de la carpeta de revelado.

10. Se expuso la membrana frente a una película Lumi-Film (u otra película fotográfica apropiada) durante 30 min. a 1 h a 15-25 °C. La luminiscencia continuó durante al menos 24 horas, y la intensidad de la señal permaneció casi constante durante las primeras horas. Se realizaron exposiciones múltiples hasta conseguir la intensidad de señal deseada.

11. Los resultados fueron documentados escaneando la película revelada.

12. Se evaluó la intensidad de las señales utilizando al ARN ribosomal 18S como control de carga y utilizando el programa ImageJ para hacer el análisis densitométrico.

Si se deseaba utilizar nuevamente la membrana no se permitió que se secara, almacenándose en una bolsa de plástico con tampón de ácido maleico, o en SSC 2×, hasta que se utilizó de nuevo.

Tampón de lavado: ácido maléico 0.1M, NaCl 0.15M, ajustar a pH 7.5; Tween 20 0.3% (v/v)

Tampón de ácido maleico: ácido maléico 0.1M, NaCl 0.15M, ajustar con NaOH (sólido) a pH 7.5 (20 °C).

Tampón de detección: Tris HCl 0.1M, NaCl 0.1M pH 9.5 (20 °C)

Solución de bloqueo: Debe prepararse el día de su uso y contiene otras soluciones que pueden estar preparadas previamente: Se diluyen 10 mL de la solución de bloqueo 10× (vial 6) en 90 mL de tampón de ácido maléico, esto es suficiente para una membrana de 100 cm².

Solución de anticuerpo: Debe prepararse exactamente en el momento previo a su uso, ya que solamente es estable 2 h a 4 °C. Para ello se centrifuga la Anti-digoxigenina-AP (vial 4) durante 5 min. a 10000 rpm ($\approx 7800 \times g$) en el vial original, previamente a cada uso. Posteriormente se utilizan 4 μ L para 20 mililitros de solución total.

Solución de trabajo CDP-Star: Se diluyen 2 μ L de CDP-Star en 2 mL de buffer de detección, antes de utilizarla.

6.8.8.5 Marcaje de las sondas con radiactividad

Para el marcaje de las sondas se utilizó el kit Nick Translation System de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se separó de la sonda de ADN marcada el exceso de isótopo radiactivo utilizando el Wizard DNA Clean-Up System de promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente la sonda purificada se mezcló con 500 μ L de agua, se hirvió durante 10 min y se colocó en hielo para su posterior uso.

6.8.8.6 Hibridación de sondas marcadas con radiactividad

Se realizaron todos los pasos siguientes en tubos de vidrio aislantes de radiactividad.

1. Se colocó la membrana en el tubo de hibridación.

2. Se añadieron 10 mL de PSE al tubo y prehibridar en horno de hibridación a 65°C por al menos 5 min.
3. Se mezclaron otros 10 mL de PSE con la sonda marcada
4. Se descartó el PSE de hibridación del tubo y se puso el PSE nuevo con la sonda marcada
5. Se hibridó a 65°C toda la noche
6. Al día siguiente, se vació el líquido con la sonda en un tubo falcon, por si existe la necesidad de hibridar nuevamente
7. Se lavó la membrana 2 veces con 100 mL de solución de lavado en el mismo tubo de hibridación en horno de hibridación a 65°C.
8. Se secó el exceso de líquido de la membrana sobre papel filtro Whatman y se envolvió en plástico autoadherible para evitar que se secase
9. Se midió la radiactividad con el Geiger (el ruido nos dió una idea del tiempo de exposición de la película para la autoradiografía).
10. Se detectaron los híbridos radiactivos mediante autoradiografía con película Kodak X-OMAT AR o Fuji RX.
11. Los resultados fueron documentados escaneando la película revelada.
12. Se evaluó la intensidad de las señales utilizando al ARN ribosomal 18S como control de carga y utilizando el programa ImageJ para hacer el análisis densitométrico.

6.8.8.7 Eliminación de señales y reutilización de las membranas

1. Se llevaron a ebullición 500 mL de solución de SDS 0.1% (p/v).
2. Se transfirió la membrana hibridada y húmeda a un contenedor limpio.
3. Se cubrió inmediatamente la membrana con la solución caliente de SDS 0.1% y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se equilibró brevemente con SSC 2× y se almacenó en bolsa de plástico hasta que se utilizó de nuevo, en la forma descrita anteriormente.

Si se deseaba utilizar nuevamente la membrana no se permitió que se secase, almacenándose en una bolsa de plástico con tampón de ácido maleico, o en SSC 2×, hasta que se utilizó de nuevo.

6.8.9 Transformación de hongos

La transformación de hongos con selección por resistencia a fleomicina no requirió la obtención previa de mutantes específicos, pero si un estudio preliminar para determinar el nivel basal de resistencia a fleomicina de la cepa sin transformar.

La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy 1980). Es un antibiótico de amplio espectro producido por una cepa mutante de *Streptomyces verticillus*, activo sobre la mayoría de levaduras y hongos y tóxico para células vegetales y animales en concentraciones que van desde 0.1 a 50 µg/mL. Actúa a nivel del ADN originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario (Hertzberg y col., 1985).

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) localizado en la región central del transposón Tn5 de bacterias Gram negativas (Genilloud y col., 1984; Collins y Hall, 1985), en el plásmido pUB110 de bacterias Gram positivas (Mckenzie y col., 1986) y en el ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt y col., 1990).

El gen *ble* de *S. hindustanus* posee las siguientes características principales:

El gen, de 375 pb comienza en un sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa *NcoI* (CCATGG), que incluye el triplete inicial de la traducción.

El único sitio de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción que comparte con los vectores normalmente utilizados es una secuencia de reconocimiento y corte para la enzima *SmaI*, lo que es muy útil en el proceso de construcción de los plásmidos que se utilizarán en la transformación.

Los niveles de resistencia al antibiótico están directamente relacionados con el nivel de expresión del gen *ble*. La expresión de este gen viene determinada por dos variables: la fuerza del promotor bajo el que se expresa el gen y el número de copias del gen *ble* integradas en el genoma del transformante.

En nuestros experimentos el gen *ble* fue integrado en el denominado “módulo de resistencia a fleomicina”, compuesto por el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* (0.8

kpb), el gen *ble* de *S. hindustanus* (0.4 kpb) y el terminador del gen *cyc1* de levaduras (0.3 kpb). Los dos últimos componentes de esta unidad fueron obtenidos a partir del plásmido pUT713 (Gatignol y col., 1987) y el conjunto se encuentra integrado en el plásmido pULJL43 (Barredo, 1990).

El método de transformación que se siguió fue el descrito por Queener y col. (1985) con algunas modificaciones.

6.8.9.1 Crecimiento del micelio

1. Se inocularon 100 mL de MMC con las esporas procedentes de seis placas de medio LPE que habían sido incubadas a 28 °C durante 6 días, y se incubó el cultivo a 25 °C durante 20 horas, con 200 rpm de agitación.
2. Se centrifugó el micelio a 4000 rpm ($\approx 1300 \times g$) durante 8 minutos y se decantó el sobrenadante.
3. Se añadieron 100 mL de NaCl 0.9% (p/v) y se recogió el micelio por centrifugación a 4000 rpm ($\approx 1300 \times g$) durante 8 min., a temperatura ambiente.

6.8.9.2 Obtención de protoplastos

4. Se resuspendió el micelio en 100 mL de TPC suplementado con DTT (ditiotreitól) 0.1 M, y se incubó a 28 °C con fuerte agitación durante 2 horas. Esta incubación con DTT se realizó para reducir las uniones disulfuro de la pared del hongo y así facilitar el proceso de liberación de protoplastos.
5. Se recogió el micelio correspondiente a 15 mL de cultivo, centrifugando con las mismas condiciones que en el paso 2, y se resuspendió en 4 mL de TPC.
6. A continuación se agregaron otros 4 mL de TPC en el que habíamos disuelto previamente 160 mg (concentración final 20 mg/mL) de Driselase[®]. Se incubó la mezcla en un matraz de 100 mL durante el tiempo necesario para la obtención de protoplastos (no más de 5 h) a 28 °C, con agitación orbital de 100 rpm. La liberación de protoplastos se observó al microscopio cada hora.
7. Se filtró la suspensión de protoplastos/restos de micelio a través de un filtro de nylon de 30 μm de diámetro de poro, convenientemente colocado sobre un embudo y esterilizado, con el fin de separar los restos de micelio de los protoplastos. Se precipitaron los protoplastos

por centrifugación a temperatura ambiente durante 4 min. y 2500 rpm ($\approx 1000 \times g$). Se lavó el precipitado obtenido con 5 mL de NaCl 0.8 M y se sedimentaron los protoplastos como en el paso anterior. Se repitió este lavado con NaCl tres veces consecutivas.

8. Se lavó el precipitado obtenido de la última centrifugación con 5 mL de tampón NCM y se centrifugó de nuevo, en las condiciones anteriormente descritas. Se resuspendieron los protoplastos en NCM a una concentración de 1×10^8 protoplastos/mL (aproximadamente 5 veces el volumen del precipitado) y se añadió 1/10 del volumen total de tampón CCM. Se mantuvo esta suspensión de protoplastos en hielo hasta que se realizó la transformación.

TPC: NaCl 0.8 M; Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, después de esterilizar en autoclave se añade $MgSO_4$ 0.02 M
NCM: NaCl 0.8 M; $CaCl_2$ 50 mM; MOPS 10 mM pH 7.
CCM: $CaCl_2$ 50 mM; MOPS 10 mM pH 7; PEG 8000 18% (p/v).

6.8.9.3 Transformación de *A. chrysogenum*.

Se mezclaron en el fondo de un tubo de 10 mL los siguientes componentes:

Suspensión de protoplastos	100 μ L
DNA	1-10 μ L (1-10 μ g)
ATA 0.1 M (opcional)	10 μ L

Se mantuvieron durante 20 min. en hielo

9. Se añadieron 500 μ L de CCM, se mezcló y mantuvo a temperatura ambiente 20 min. más.
10. Se diluyó el polietilenglicol presente en el CCM añadiendo 600 μ L de NCM. Se mantuvo esta mezcla de transformación a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo.

7. Resultados

7.1 Estudios fisiológicos de la producción de cefalosporina C con *Acremonium chrysogenum*

7.1.1 Estimación del crecimiento en cultivos en medio sólido mediante cromatografía de gases

Los experimentos con cultivos en medio sólido de *A. chrysogenum* presentan la limitante de una difícil estimación del crecimiento por medio de la medición de la concentración de glucosamina, y aún la observación microscópica de su morfología es

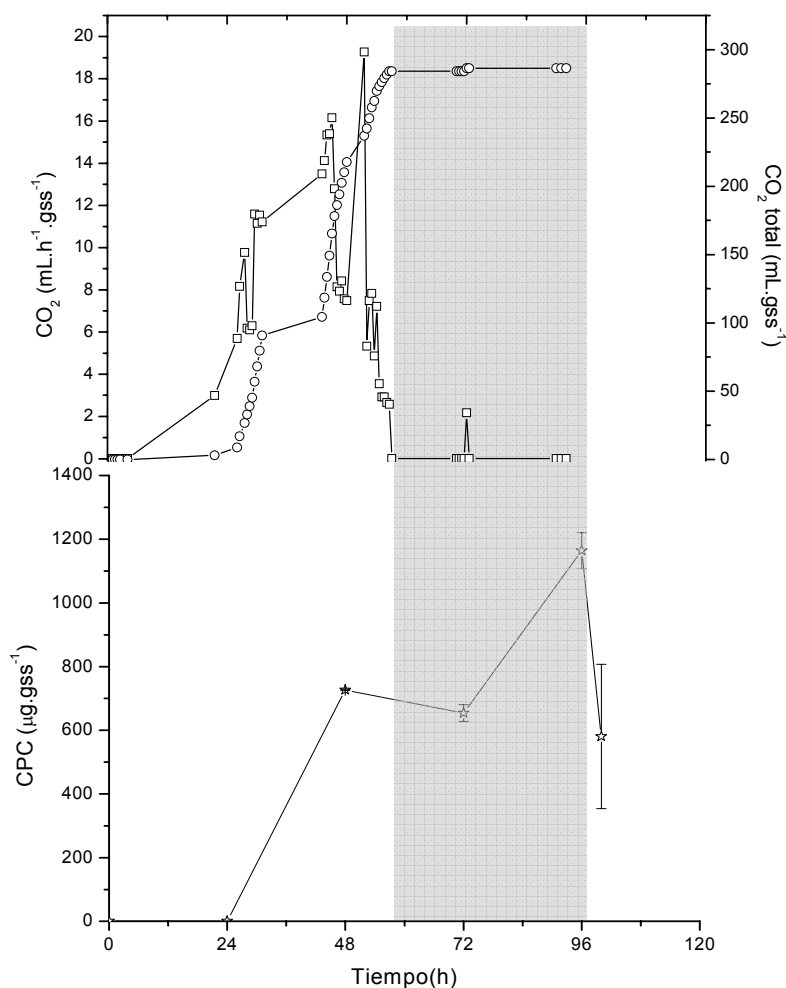


Fig. 8 Cinéticas del cultivo de *Penicillium chrysogenum* modificado para producir CPC. (□) Velocidad de producción de CO₂ (cinética derivada), (○) CO₂ producido (cinética integrada), (☆) Producción de antibiótico.

prácticamente imposible debido al bajo crecimiento (Cuadra, 2004) y las características morfológicas que este microorganismo presenta (Bartoshevich y col., 1983). Estos problemas hicieron necesario el montaje de mediciones respirométricas que anteriormente ya habían demostrado ser eficientes, no solamente para realizar estimaciones del crecimiento de los microorganismos en cultivo sólido, sino también para tener datos acerca de la actividad metabólica de los cultivos (Saucedo-Castañeda y col., 1994; Domínguez y col., 2000).

Para el montaje de la técnica de estimación del crecimiento mediante cromatografía de gases (respirometría) se

realizaron, en primer lugar, mediciones en un cultivo en medio sólido de *Penicillium chrysogenum* modificado genéticamente para producir cefalosporina C (Paniagua, 2004), utilizando bagazo de caña como soporte. Los componentes de la FS fueron usados en las siguientes proporciones: bagazo de caña (14.6%), nutrientes (15.4%) y agua (70%).

En la figura 8 se observa que en la producción rápida de CO₂ del cultivo sólido de *Penicillium chrysogenum* en medio sólido se distinguen al menos dos picos de máxima producción: de 20-25 h, de 26-46 h y de 48-58 h de cultivo aproximadamente. Es necesario indicar que debido a fallas en el suministro de energía eléctrica no fue posible hacer mediciones entre las 30 y 42 h, lo cual afectó la aireación del cultivo y posiblemente produjo una disminución de la actividad metabólica del mismo, lo que también se refleja en la producción de antibiótico encontrada a las 72 h. Por otro lado, se observó una fase estacionaria de crecimiento (sombreado) después de los tiempos de producción rápida de CO₂ anteriormente mencionados. El primer descenso en la producción de CO₂ coincide con el inicio de la producción de antibiótico. Se observó un nivel de producción de penicilina de aproximadamente 1200 µg/gss, mientras que no se detectó la producción de CPC.

Por otro lado, se observó la

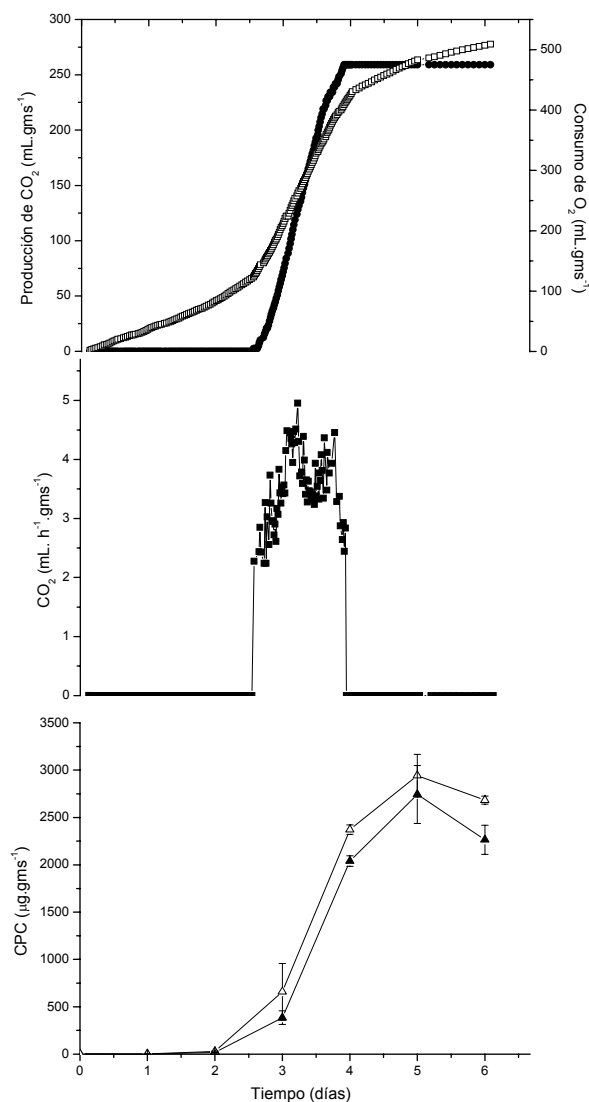


Fig. 9. Cinéticas de cultivo de *A. chrysogenum* en FS. (□) Consumo de O₂ (cinética integrada), (●) Producción de CO₂ (cinética integrada), (■) Producción de CO₂ (cinética derivada), (Δ) CPC determinada sin penicilinas, (▲) CPC determinada con penicilinas.

formación de esporas después del tercer máximo de producción de CO₂, coincidiendo la disminución de la actividad metabólica con la formación de estas estructuras de supervivencia.

El protocolo completo utilizado para las mediciones respirométricas se encuentra descrito en el anexo 4.

También se realizaron mediciones respirométricas en la FS de *A. chrysogenum* C10 para la producción de cefalosporina, en las cuales se observaron resultados muy diferentes a los observados en los cultivos con *Penicillium*. El medio utilizado fue el MFAF 2.5×, cuya composición fue: bagazo de caña (16.6%), nutrientes (13.4%) y agua (70%)

En el caso de las cinéticas integradas de producción de CO₂ y de consumo de O₂ (Fig. 9, gráfica superior), se observaron curvas muy definidas del tipo de las curvas normales de crecimiento de microorganismos, determinándose que la fase de crecimiento rápido se dió aproximadamente de las 60 a las 96 h, prácticamente acoplada con la fase de producción rápida de CPC. Parecería como si la producción de cefalosporina C se realizó independientemente del crecimiento, solamente desde las 96 a las 120 h.

Información más detallada se encontró en las cinéticas derivadas de CO₂ (Fig. 9, gráfica intermedia) y de O₂ (Fig. 14), en las que se observó una primera fase de producción rápida de CO₂ desde las 60 hasta aproximadamente las 80 horas, para luego observarse un descenso de esta producción durante aproximadamente 8 h. El descenso en la producción de CO₂ coincidió con el tiempo en el que se observó el inicio de la producción rápida de CPC. Posteriormente se produjo otro período de aumento rápido en la producción de CO₂, de otras 12 horas, en las cuales se continuaba con el comportamiento de producción rápida de CPC.

El detalle y relación de la producción de O₂ se describen con más detalle en la sección 7.1.3.

7.1.2 Cultivo en medio líquido de *Acremonium chrysogenum*, evaluación de diferentes niveles de nutrientes y comparación preliminar con cultivos en medio sólido.

Para determinar la posibilidad de producir CPC al realizar cultivos en medio líquido de *A. chrysogenum* con concentraciones de nutrientes más altas que las utilizadas normalmente (Caltrider y col., 1966), se realizaron experimentos, utilizando diferentes niveles de concentración de nutrientes, de forma similar a lo realizado previamente con cultivos sólidos

de este microorganismo (Cuadra y col., 2004). Estos experimentos nos permitirían investigar además si el efecto del pH en la producción de CPC es particular para la fisiología del microorganismo en FS o si tiene el mismo comportamiento en FL.

En un primer experimento se compararon las concentraciones 1× y 2× de MCFA (Fig. 10), utilizando un inóculo del 10%, es decir 10 mL de MSMA de 48 horas en 90 mL de MFAF, utilizando matraces de 500 mL con triple indentación y las demás condiciones de fermentación que se indican en los materiales y métodos.

En las dos condiciones estudiadas, se observó crecimiento de *A. chrysogenum*, prácticamente desde el inicio del cultivo hasta las veinticuatro horas. El crecimiento continuó de forma más lenta las siguientes 24 h.

En las dos concentraciones, a partir de las 72 horas del experimento se apreció un descenso drástico de la biomasa formada.

Los resultados de producción de CPC indicaron, de forma similar, un inicio rápido de ésta en las dos condiciones, que en el caso del medio

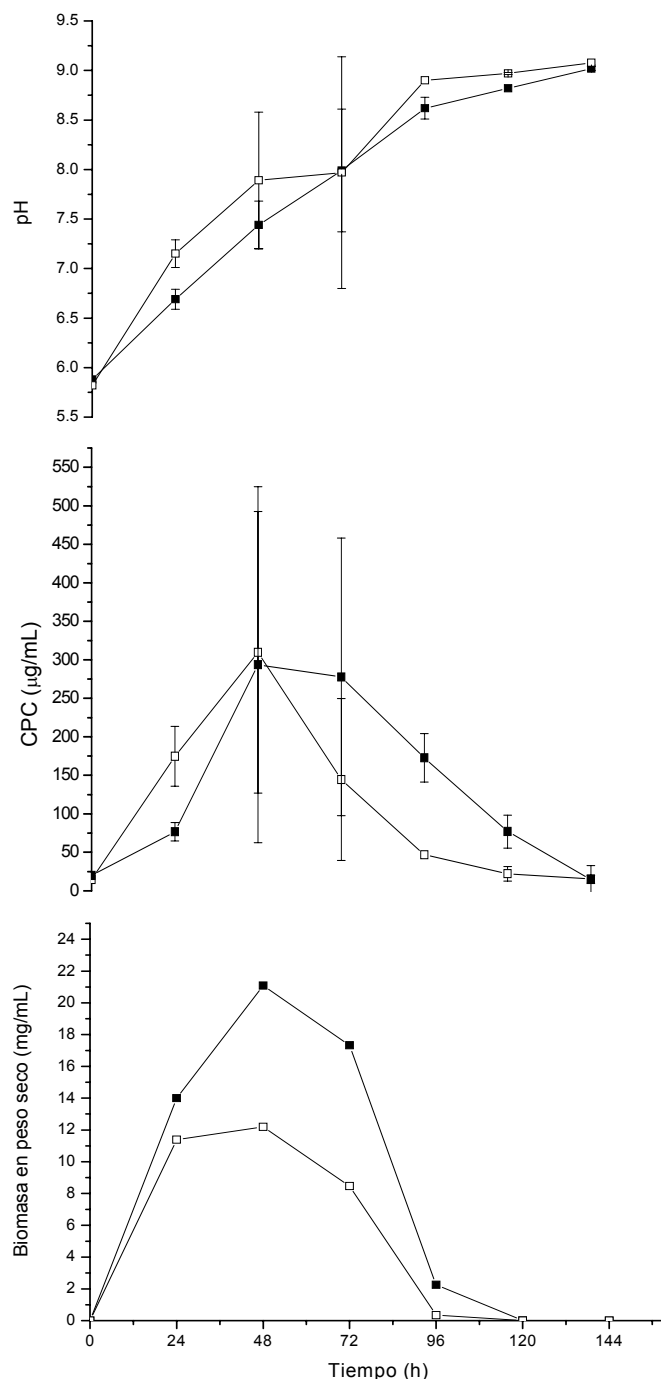


Fig. 10 Cinéticas de pH, producción y crecimiento de cultivo en medio líquido de *Acremonium chrysogenum* C10 bajo dos condiciones de concentración de MCFA: símbolos abiertos concentración 1×, y símbolos cerrados concentración 2×. El inóculo utilizado 10%v/v.

de concentración normal (1×) inició en un valor de pH entre 6.0 y 7.1, y llegó a su fin cuando el pH alcanzó un valor de aproximadamente 7.9. En el caso del medio de doble concentración se observó que la producción rápida inició con un valor de aproximadamente 6.6, y aunque después de un pH de 7.2 no siguió aumentando si se mantuvo el nivel de producción hasta que se llegó a un pH de 8.0. En ambos casos se detectó una disminución rápida de la CPC presente en los cultivos después de llegar al valor de pH de 8.0.

La cinética de pH (Fig. 10) indicó un aumento muy rápido de esta variable, que fue ligeramente mayor durante las primeras 48 horas en el cultivo con concentración normal de medio de cultivo. Sin embargo, bajo las dos condiciones alcanzó valores bastante superiores a 8.0. En general, no se observaron diferencias significativas en la evolución del pH entre las dos condiciones estudiadas en medio líquido.

Para este experimento se utilizó una cantidad de micelio de 10% (v/v) (aproximadamente 4% p/v), la cual se considera una cantidad relativamente alta en comparación con el inóculo utilizado para la FS, y que podría haber producido el aumento tan rápido en todas las variables de este experimento. Sin embargo, este experimento demostró la factibilidad de realizar cultivos líquidos con niveles de nutrientes similares a los utilizados en la FS.

Con el objeto de investigar si el efecto del pH en la producción de CPC es particular de la fisiología en FS o tiene el mismo comportamiento en FL, se realizó un segundo experimento preliminar de FL para establecer condiciones análogas a las utilizadas en la FS (Fig. 11). Se efectuaron cultivos líquidos utilizando MFAF con dos concentraciones de nutrientes (1× y 2.5×), aunque ahora con un inóculo de medio semilla de 38 h en cantidad necesaria para tener de 1.5% (p/v) de micelio en la FL. En este caso se iniciaron los cultivos a un pH de 6.0.

El crecimiento del micelio en este caso (Fig. 11) aumentó de forma más lenta a lo observado en el experimento anterior, pero la cantidad de biomasa fue mayor en las dos condiciones (18 vs. 33 mg de micelio seco/mL en 1× y 2.5×, respectivamente). La producción de tanto micelio como CPC fue mayor en este experimento que en el anterior.

Además, en este experimento, se observó que el intervalo de pH en el cual se dio la producción rápida de CPC en el medio de concentración normal está entre 7.2 – ≈ 8.0, similar al intervalo en el que se realizó la producción en el medio 2.5× (6.75-7.75). Es decir, que en

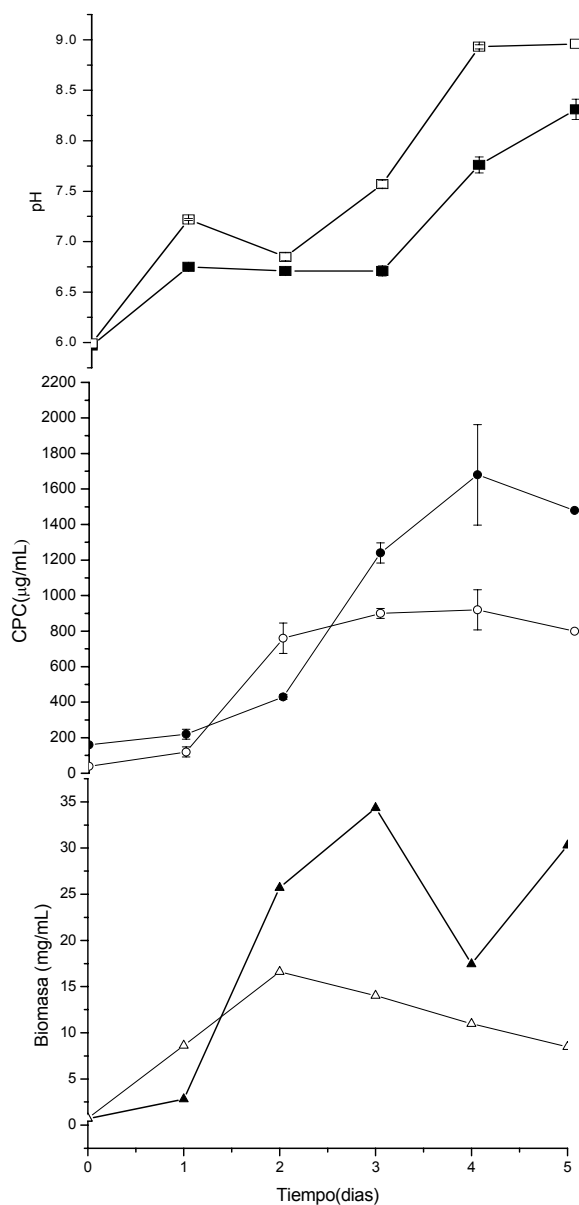


Fig. 11 Cinéticas de producción (○), pH (□) y crecimiento (△) en FL de *Acremonium chrysogenum* C10 bajo dos condiciones de concentración de MFAF: símbolos abiertos concentración normal (1×), y símbolos cerrados concentración 2.5×. Inóculo utilizado 1.5%(p/v)

este sistema, y de forma análoga a lo observado en la FS, ya se perfila un intervalo de valores de pH durante el que se realiza la producción de CPC. Esta evidencia sugiere nuevamente una influencia importante de esa variable en la producción de CPC.

Los resultados de este experimento también indicaron una diferencia significativa en el nivel máximo de producción (aproximadamente del 83%), siendo la producción de 900 µg/mL en el caso del medio 1× y de 1700 µg/mL en el caso de la concentración 2.5×.

Por otro lado, no parece existir represión de la producción de CPC por la alta concentración de fosfatos utilizada en la concentración más alta de nutrientes (0.075 M), ya que, a pesar de observarse diferencias en las velocidades de inicio de la producción rápida, los dos sistemas muestran niveles de producción inicial de CPC similares.

Para completar el estudio del efecto de la concentración de nutrientes, se realizó una FS utilizando medio 1× comparado con un control 2.5×, ambos amortiguados con fosfatos. Sorpresivamente, el nivel de CPC producido por el medio 1× no difirió significativamente del nivel producido por el medio más concentrado (Fig. 12). Esta figura también muestra que el

buen nivel de producción en el medio 1× se relacionó con una lenta evolución del pH y del

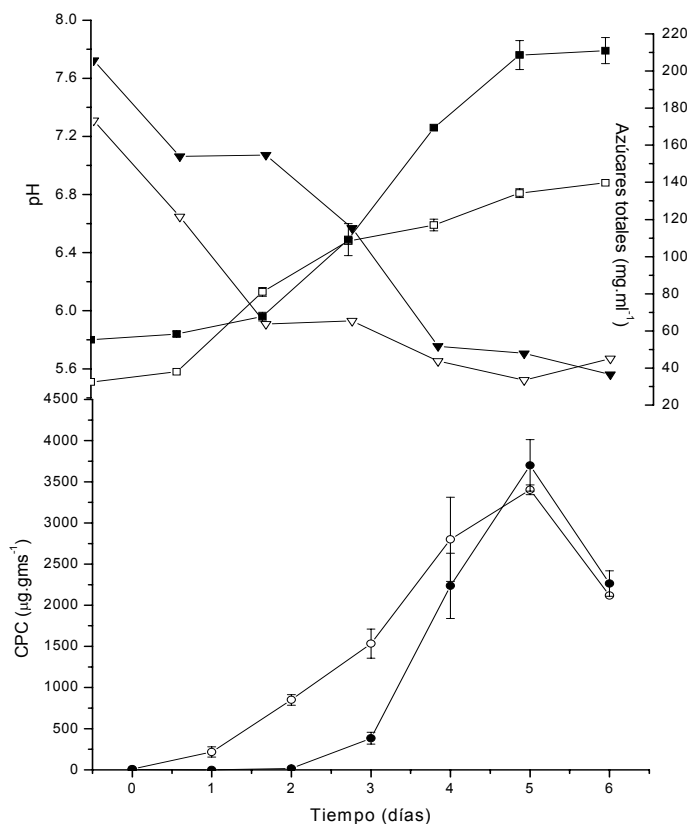


Fig. 12. Producción de CPC (○), pH (□), y azúcares totales (▽) de FS de *A. chrysogenum* SSF bajo dos niveles de nutrientes. Símbolos abiertos concentración normal (1×), símbolos cerrados medio 2.5×.

consumo de nutrientes, específicamente del segundo al quinto día de cultivo. Es interesante destacar que ambos cultivos finalizaron con una concentración residual de azúcares muy similar (1× = 35.3 y 2.5 × = 36.4 mg glucosa/gms), indicando que este nivel de azúcar es una concentración umbral y que se dificulta su consumo en este sistema, observándose descenso de la producción aún cuando se encuentra en un valor de pH neutro en el cual no se ha observado la degradación de CPC anteriormente.

y sólido de *A. chrysogenum* C10.

7.1.3 Comparación de la producción de CPC en cultivos en medio líquido

Una vez comprobada la posibilidad de usar un medio concentrado (2.5×) en la producción de CPC por *A. chrysogenum* en FL, se realizaron cultivos en FS y FL, utilizando el medio MFAF en una concentración 2.5×, iniciando la FS a pH de 5.8 y la FL a pH de 5.75.

Los resultados muestran un aumento del pH (Fig. 13) durante la progresión de ambos cultivos. Los cambios se realizan con mayor rapidez en el sistema líquido que en el sólido; alcanzándose en los dos casos valores alcalinos al final de la fermentación (FL>8.25, FS ≈ 8.0). Estas condiciones nos permiten observar todos los fenómenos que se realizaron en ambos sistemas en un intervalo de 3.5 unidades de pH (5.7-8.3), abarcando condiciones ácidas, neutras y alcalinas.

El intervalo de pH en el que se observó la producción de CPC en FL (Fig. 13) se encuentra entre 5.77 y 7.9, observándose este intervalo entre los días uno y cinco de la fermentación. En el caso de la FS, la producción es observable durante menos tiempo, entre los días dos a cinco, encontrándose el pH (de forma similar a la FL) entre valores de 5.96 y 7.74. Lo anterior señaló cierta dificultad para la producción de CPC por *Acremonium chrysogenum* en la FS con valores de pH menores a 5.9 y mayores a 7.8.

Analizando las diferencias entre la producción de cefalosporina reportada por el bioensayo con y sin penicilinas, se puede apreciar que a pesar de que no hay diferencias significativas en los valores de máxima producción entre las dos condiciones, en la FL se observa en el cuarto día una cantidad significativamente menor de CPC que de antibióticos

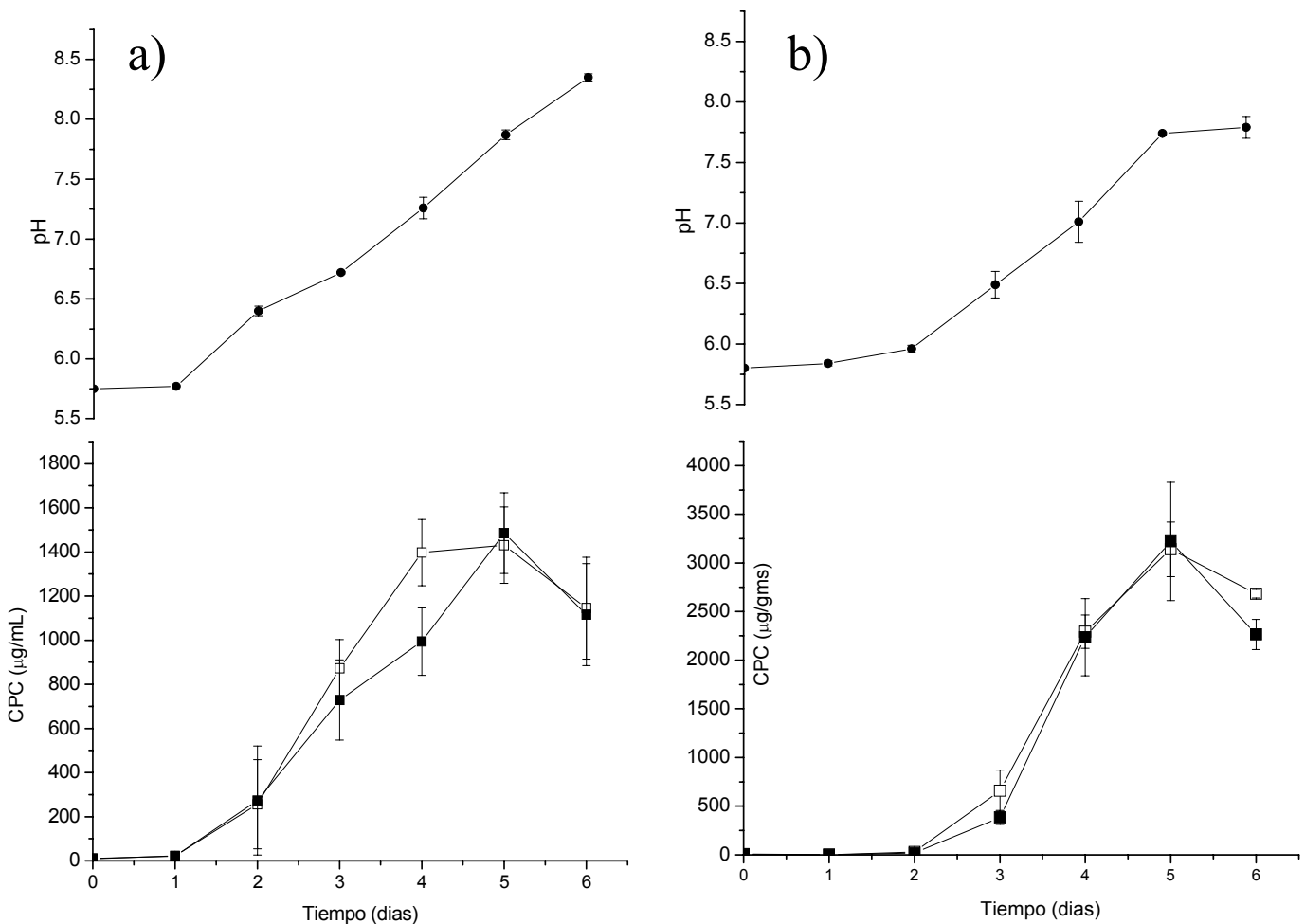


Fig. 13 Cinéticas de producción de CPC y pH en: a) FL y b) FS con *A. chrysogenum* en medio MFAF 2.5×. La CPC fue medida por bioensayo sin penicilinas (símbolos abiertos) y con penicilinas (símbolos cerrados).

totales, evidenciando una mayor cantidad de penicilina N presente en la FL que en la FS en los tiempos previos al día de producción máxima (Fig 13).

Con el objeto de determinar la producción específica a las 96 y 120 horas en ambos cultivos, se realizó la cuantificación de biomasa por la técnica de la glucosamina. La medición de glucosamina en la FL nos indicó que 1 g de micelio seco contiene ≈ 31.9 mg de glucosamina. Los resultados (Tabla 5) indicaron una mayor productividad de los dos tipos de fermentación a las 120 h que a las 96 h, pero con una diferencia mayor en el caso de la FL.

Tabla 5. Productividad de la FL y FS a las 96 y 120 h.

Tiempo (h)	FL	FS
	(μg de CPC/mg de micelio seco)	(μg de CPC/mg de micelio seco)
96	27.09	44.57
120	44.16	47.07

Por otro lado, además del retraso en el inicio de la producción de CPC en la FS en relación con la FL, también se observó un retraso en el inicio del crecimiento. La cinética de

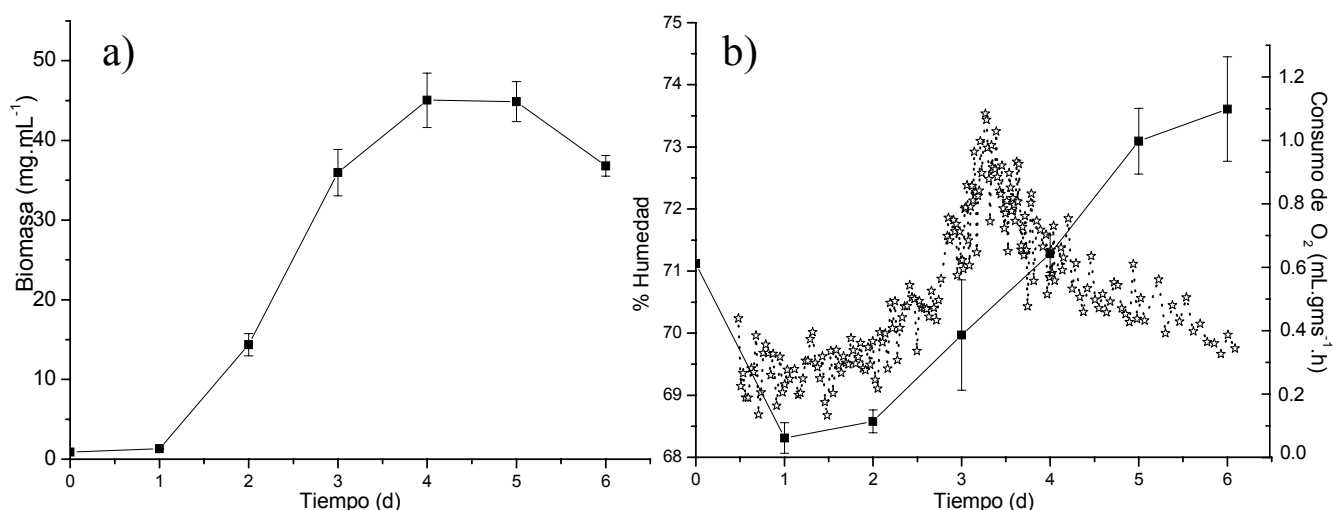


Fig. 14 Crecimiento de *A. chrysogenum* en medio MFAF 2.5 \times comparando FL vs. FS a) Peso seco de micelio de FL, b) Cinéticas de consumo de O₂ y humedad en FS.

consumo de O₂ en la FS (Fig. 14) indica un aumento rápido de esta variable desde aproximadamente las 60 hasta las 72 h, es decir más de 24 h después de lo observado en el

cultivo líquido y durante un día menos. El intervalo de pH durante el cual se realizó el crecimiento rápido es más amplio en el caso de la FL (5.77-7.26) que en la FS (5.96-7.01).

Considerando la cinética de humedad como un indicador muy relacionado con el crecimiento, sus resultados confirmaron lo observado mediante las mediciones respirométricas, el porcentaje de humedad aumenta del 69% al 73% del segundo al quinto día de cultivo (Fig. 14).

La cinética derivada del consumo de O₂ (Fig. 14) en la FS indicó que el inicio de la producción rápida de CPC se realizó simultáneamente con el descenso en la alta tasa de consumo de O₂, revelando el final de la fase de crecimiento rápido y el inicio del metabolismo secundario después de las 72 h de cultivo.

7.1.4 Cultivos de *A. chrysogenum* C10 a pH controlado.

Para verificar el efecto de un pH constante en cultivos de *A. chrysogenum*, se centrifugaron 10 mL de un cultivo de medio semilla (MSMA) de 38 h a 3000 rpm ($\approx 1500 \times g$); se decantó el sobrenadante y se resuspendió el micelio en la misma cantidad del medio de prueba a utilizar en la fermentación, utilizándose esta suspensión como inóculo para 90 mL de medio líquido.

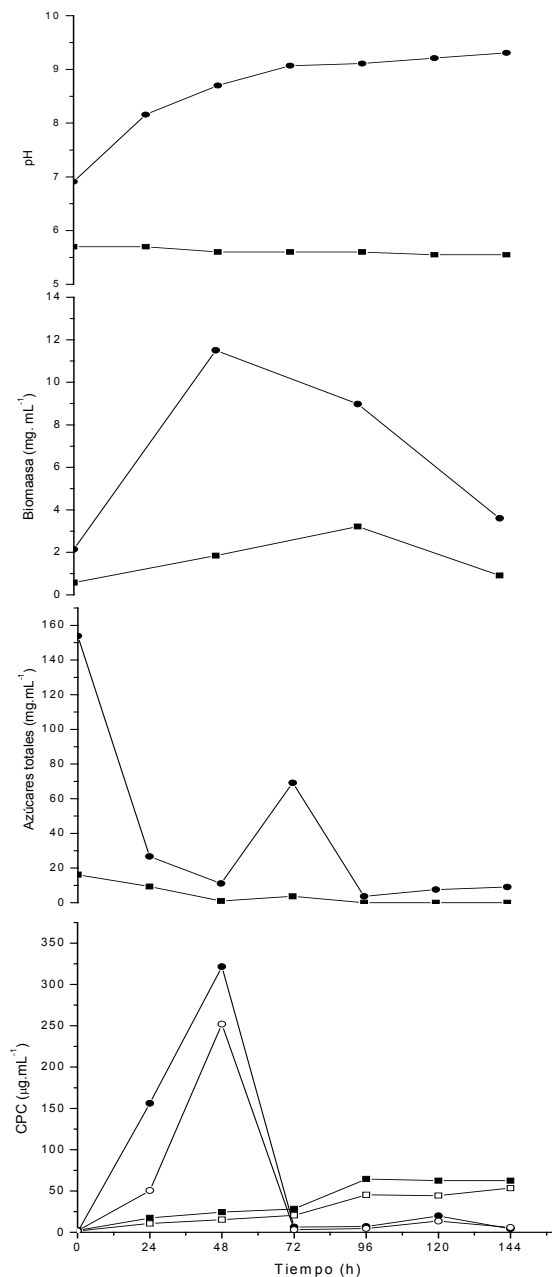


Fig. 15 Cinética de cultivo de *A. chrysogenum* C 10. Dos medios diferentes para el control de pH. Condiciones: (●) MCFAM, (■) MDFAM. En el caso de la producción de CPC los símbolos cerrados corresponden a bioensayo sin penasa y los abiertos a bioensayo con penicilinas.

Se utilizaron dos medios de prueba, ajustados a pH 5.7 antes de esterilizar: medio definido de fermentación para *Acremonium* (MDFAM) amortiguado con MES 0.01 M y medio complejo de fermentación para *Acremonium* (MCFAM) amortiguado con carbonato 0.03 M. Después de la esterilización se observó que los cultivos empezaron a valores de pH de 5.6 para el MDFAM y de 6.8 para el MCFAM.

Los cultivos se incubaron en matraces de 500 mL triplemente indentados, a 25 °C y con una agitación de 250 rpm durante 6 días. Se analizaron tres matraces por cada tiempo de muestreo.

Comparando las cinéticas de pH de los medios MCFAM vs. MDFAM/MES 0.1 M (Fig. 15) se observó que el medio MDFAM amortiguó mejor el pH, observándose solamente una variación de 0.2 unidades de pH en el caso del medio definido y de un poco más de 2 unidades de pH en el medio complejo.

La producción fue baja en las dos condiciones estudiadas (Fig. 15), de 325 y 45 µg CPC/mL en medio complejo y definido, respectivamente.

Por otro lado, se observaron detalles característicos del metabolismo secundario de hongos,

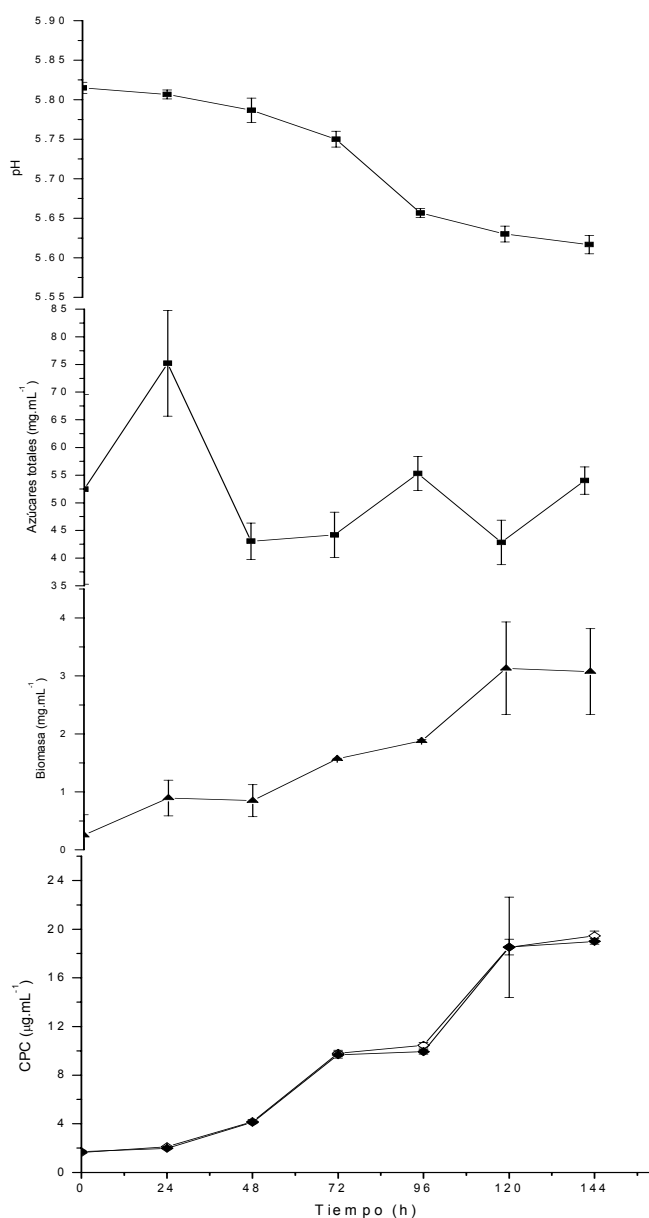


Fig. 16 Cinética de cultivo de *A. chrysogenum* C 10. MDFAM/ MES 0.125 M. Inóculo centrifugado y lavado. En la producción de CPC los símbolos cerrados corresponden a bioensayo sin penicilinasa y los abiertos a bioensayo con penicilinasa.

ya que la producción de CPC comenzó después del descenso rápido de los azúcares en ambos medios (Fig. 15). En el caso del medio complejo se observó un consumo más rápido, desde el inicio hasta las 24 h de cultivo, observándose después de este tiempo el inicio de la producción rápida de CPC. El consumo rápido de azúcares en el medio definido se observó desde el inicio hasta las 48 h de cultivo, pero solo después de las 72 h se pudo observar un ligero aumento de la cantidad de antibiotico detectada.

En el caso de la producción de biomasa (Fig. 15) su aumento estuvo acoplado al consumo rápido de azúcares, en las dos condiciones estudiadas.

En vista de la imposibilidad de mantener constante el pH en el medio complejo (MCFAM), se descartó su uso para experimentos sucesivos.

Se realizó una nueva prueba para verificar la eficiencia del medio definido en el mantenimiento de los valores de pH constantes, utilizando MDFAM amortiguado con MES 0.125 M (Fig. 16).

En este experimento, la variación en el pH fue muy similar a la observada en el experimento preliminar (iniciando a 5.82 y terminando en 5.61), considerándose una variación aceptable para la finalidad del experimento. Se hicieron al menos cuatro repeticiones en la medición de azúcares, biomasa y CPC (Fig. 16), lo cual confirmó que el consumo rápido de azúcares se realizó desde el inicio hasta las 48 h de cultivo, pero en este caso el consumo no se vió acoplado al crecimiento rápido de la biomasa, observándose un crecimiento lento pero constante durante toda la duración de la fermentación.

La producción de CPC, por otro lado, inició después del consumo rápido de azúcares, al igual que lo observado en el experimento anterior. El nivel de producción detectado (Fig.16), nuevamente fue muy bajo (18 μg CPC/mL).

7.2 Estudios moleculares de la producción de cefalosporina C con *Acremonium chrysogenum*

7.2.1 Aislamiento de ADN total de *Acremonium chrysogenum*

Se realizó la extracción del ADN de este microorganismo como se indica en el procedimiento detallado en los materiales y métodos. Sin embargo, este protocolo tuvo que modificarse, debido a que la cantidad mínima de micelio liofilizado recomendada en el mismo

daba lugar a una separación deficiente de las proteínas. Por ello se realizó la extracción con el micelio equivalente a sólo 0.1-0.25 mL, lo cual es una cantidad suficiente al encontrarse liofilizado.

La figura 17 muestra las diferencias observadas al realizar la extracción partiendo de diferentes cantidades de micelio.

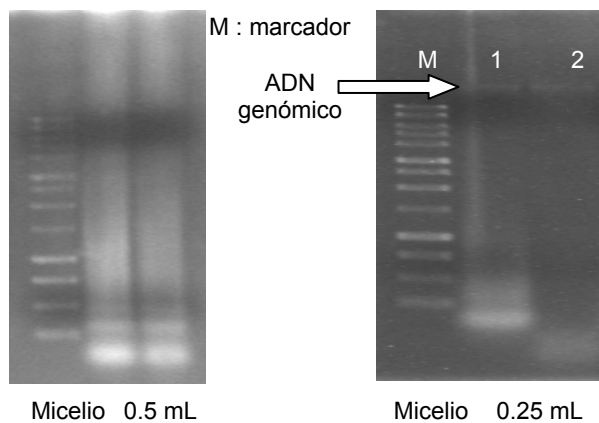


Fig. 17 Geles de electroforesis indicando la eficiencia en el aislamiento de ADN de micelio liofilizado de *Acremonium chrysogenum* C10.

7.2.2 Obtención de sondas de los genes de biosíntesis de CPC

La Fig. 18 muestra 9 de los 10 fragmentos de genes implicados en la biosíntesis de CPC por *A. chrysogenum* obtenidos por PCR. Todas las amplificaciones parecen tener los tamaños esperados, sin embargo al insertar estos fragmentos en pGEM[®]-T Easy y digerir los plásmidos aislados no se observa la progresión esperable en el tamaño de los fragmentos correspondientes a los insertos. Esto se pudo explicar al encontrarse que algunos de los insertos contienen sitios de reconocimiento y corte para la endonucleasa *EcoRI* que fue la utilizada para digerir el vector.

La amplificación del fragmento del gen *cahB* se realizó posteriormente a la de las otras amplificaciones, sin embargo se confirmó la secuencia de todas las inserciones realizadas en pGEM[®]-T Easy, detallándose los resultados en la Tabla 6. La más alta similitud encontrada coincidió en todos los casos con las secuencias reportadas para *A. chrysogenum*. En el caso de las secuencias de los genes *pcbC* y *cefEF* clonadas, no fue posible confirmar su secuencia dentro del vector, debido posiblemente a la alta similitud de algún fragmento del mismo con los oligonucleótidos utilizados para amplificar esas secuencias. Sin embargo, sí se confirmó la

identidad de los productos de PCR obtenidos inicialmente para esas secuencias, de tal forma que en esos casos fueron los productos de PCR los que fueron utilizados finalmente como sondas.

Tabla 6. Resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR para ser utilizados como sondas en los análisis de expresión de los cultivos de *A. chrysogenum*.

Sonda	Secuencia de origen	Método de comparación	Porcentaje de similitud
<i>pacC</i>	AJ251521	Blast	99%
<i>actA</i>	AF056976	Blast	100%
<i>pcbAB</i>	Gutiérrez y col., 1991	Manual	100%
<i>cefD1</i>	AJ507632	Blast	100%
<i>cefD2</i>		Blast	100%
<i>cefT</i>	AJ487683	Blast	99%
<i>cefG</i>	M91649	Blast	99%
<i>cefEF</i>	AJ404737	Blast	99%
<i>pcbC</i>	M33522	Blast	99%
<i>cahB</i>	BD267703	Blast	99%

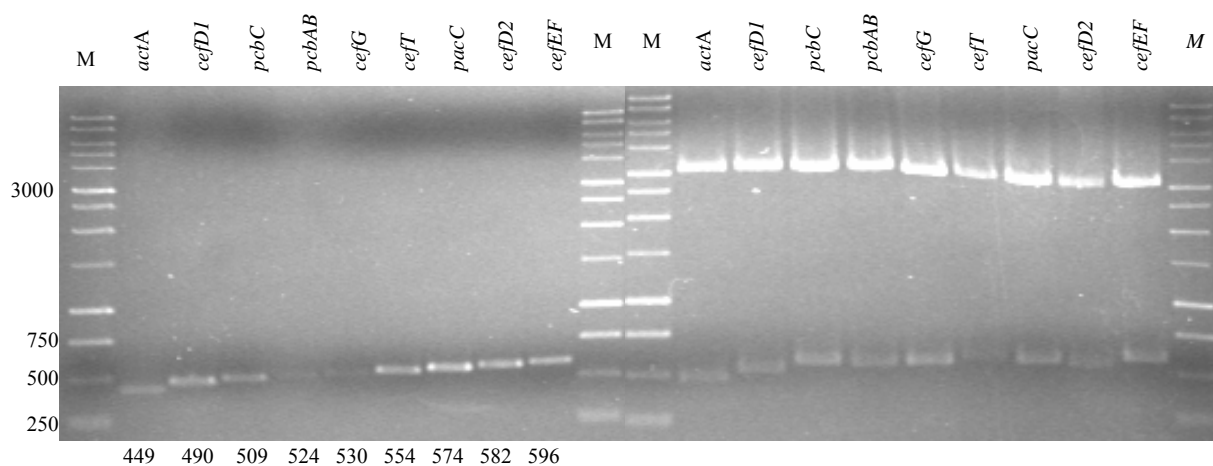


Fig. 18 Geles de electroforesis con a) Productos de PCR obtenidos con los oligos descritos en la tabla y b) plásmidos pGemT Easy conteniendo los insertos de los productos de PCR de a). En la parte superior se indica el gen al cual corresponde cada uno de los fragmentos, y en la parte inferior se indica el tamaño esperado de los productos de PCR

7.2.3 Extracción de ARN de *Acremonium chrysogenum* y transferencia a membranas de nylon.

Se realizó la extracción y cuantificación de ARN, tanto del inóculo de MSMA de 38 h como de cada día de estudio del cultivo FS vs. FL en MFAF 2.5×, en la forma descrita en los materiales y métodos. Sin embargo, a pesar de realizarse las mediciones de acuerdo al protocolo, las cantidades cargadas en los geles desnaturalizantes no parecen ser homogéneas y hasta parecería existir un cierto grado de degradación en algunos tiempos de cultivo (Fig. 19, muestras FL: 96 y 48 h, FS: 144,120 y 96 h). Es importante resaltar que se realizó un control en el que se extrajo ARN solamente del bagazo de caña utilizado como soporte en la FS, siendo el resultado una ausencia total de bandas de ARN. Esto asegura el que no haya ninguna interferencia debida al soporte utilizado en los resultados posteriores.

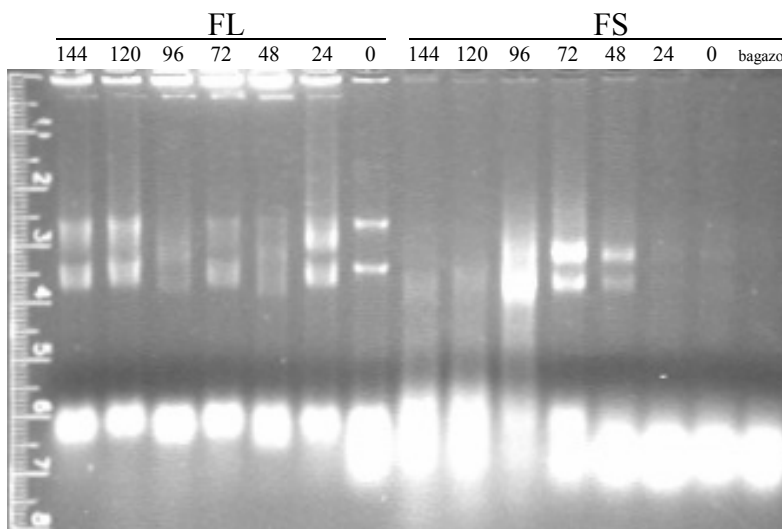


Fig. 19 ARN de experimento de FS vs. FL en MFAF 2.5×. Los encabezados señalan el tiempo de muestreo para cada una de los cultivos en horas. La muestra de bagazo es obtenida a partir de bagazo con medio y sin inóculo.

Se purificó nuevamente ARN de los tiempos en los que parece existir degradación, tanto en FS como en FL, y fue sometido a mediciones espectrofotométricas que permitieron apreciar valores de pureza diferentes entre las muestras obtenidas en FS y FL (Fig. 20a). Por eso, se obtiene un gel en el que parece existir degradación de ciertos tiempos en ambos cultivos (Fig. 20a). Dado este resultado, se realizó una repurificación de las muestras que parecen degradadas (FL: 48, 96, 120 y 144 h; FS: 96, 120, 144 h) mediante un paso extra de

fenolización, lo cual llevó a obtener muestras con bandas de los ARN ribosomales 18S y 28S mejor definidas (Fig. 20b).

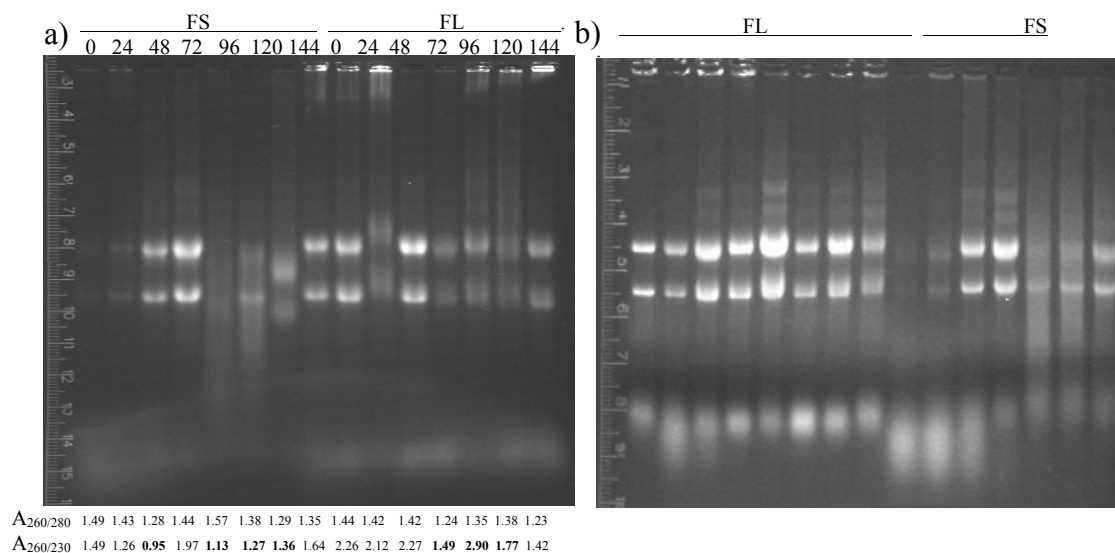


Fig. 20 ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído a) muestras con una sola purificación, b) muestras con dos purificaciones. Los números superiores señalan tiempo de muestreo en horas

Se considera necesario aclarar que cuando se realizó el paso extra de fenolización y posterior disolución del ARN se observó que la falta de resolución de las bandas en el primer gel más bien era causada por una disolución deficiente de la muestra, más que por falta de pureza.

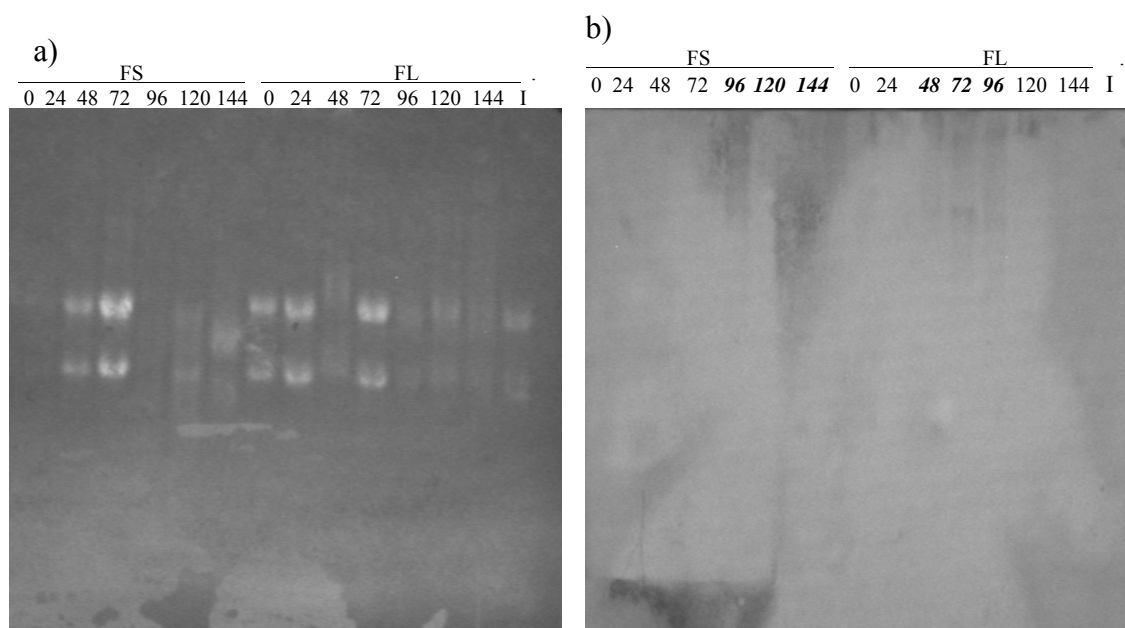


Fig. 21 ARN recién transferido a membrana e iluminada con UV (a), y membrana hibridada con sonda *pcbAB* marcada con digoxigenina, revelada con método cromogénico e iluminada con luz visible (b).

Se nota aún en el gel de la Fig. 20b cierto nivel de barrido en las muestras de los últimos tiempos de FS (96-144), además de notarse la presencia de impurezas en la muestra líquida de ARN, con aspecto viscoso y color marrón (similar al de la melaza de caña utilizada para el medio de cultivo), lo cual sugiere la presencia de una mayor cantidad de polisacáridos y o pigmentos en esos tiempos de la FS.

En una primera hibridación, se utilizó gel de la Fig. 20a para realizar la transferencia y fijación de ácidos nucleicos a la membrana de nylon a través de la técnica de *Northern blot* descrita en los materiales y métodos. La fijación de los ácidos nucleicos se realizó mediante exposición directa de la membrana a la luz UV, usando un transiluminador UVP (UVP, Inc. CA. USA) durante 4 minutos (Fig. 21a).

Los experimentos de hibridación se intentaron en principio utilizando sondas marcadas con digoxigenina y usando el método de detección colorimétrico. Los resultados de esta prueba mostraron una ligera revelación del transcrito buscado en ciertos tiempos de fermentación señalados en negritas y cursivas en la Fig. 21b; lo cual confirmó la baja sensibilidad del método para los fines de nuestro estudio. Ante este resultado se optó por utilizar métodos de detección quimioluminiscentes o métodos de marcaje radiactivos en las siguientes pruebas.

7.2.4 Análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de CPC en FS y FL de *A. chrysogenum*.

Se probaron tanto la detección con radiactividad como la detección con quimioluminiscencia para investigar la expresión de los genes *pcbC*, *cefD1*, *cefG*, *pacC* y *pcbAB*. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos sistemáticos en la modificación de las condiciones de astringencia, y los resultados positivos de los controles de identidad de las sondas, controles de marcaje de las mismas y de los resultados de hibridación satisfactorios con otros genes; no fue posible obtener señal alguna que indicara la expresión de los primeros cuatro genes, y sólo fue posible obtener manchas indefinidas en el caso del gen *pcbAB*.

Estos resultados no indican la ausencia de expresión de los mencionados genes, pues la evidente producción de CPC rechazaría esa hipótesis, por lo que solamente son evidencia de la necesidad de una metodología más sensible que permita evaluar la expresión de estos genes.

7.2.4.1 Perfil de expresión del gen *actA* en FS y FL

La actina es uno de los componentes principales del citoesqueleto y una de las proteínas más abundantes encontradas en las células eucarióticas. El estudio de la expresión del gen de γ -actina en FS y FL de *Acremonium chrysogenum* (Fig. 23) permitió la detección de un transcrito ubicado bajo el ARN ribosomal 18S (menor a 1.7 kb), cuya expresión no fue homogénea durante el desarrollo de los cultivos estudiados. La expresión de la γ -actina se observó entre las 0 y 96 h en FL, y entre las 48-96 h en la FS, reapareciendo en este último caso a las 144 h. El análisis densitométrico de los transcritos indicó una expresión aproximadamente constante desde las 48 a las 96 h, reapareciendo casi en la misma magnitud a las 144 h en el caso de la FS. Por otro lado, no se encontró ninguna relación entre la evolución del pH y la expresión de este gen.

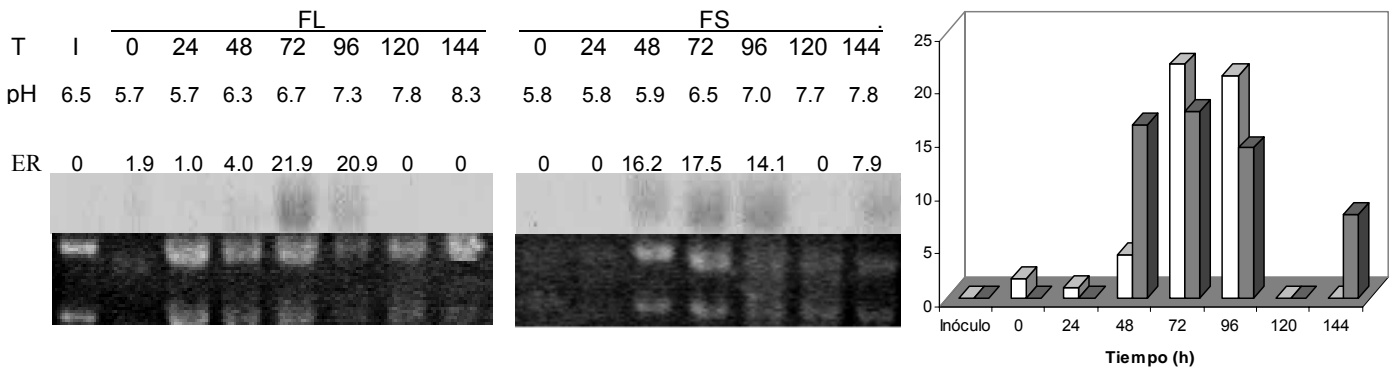


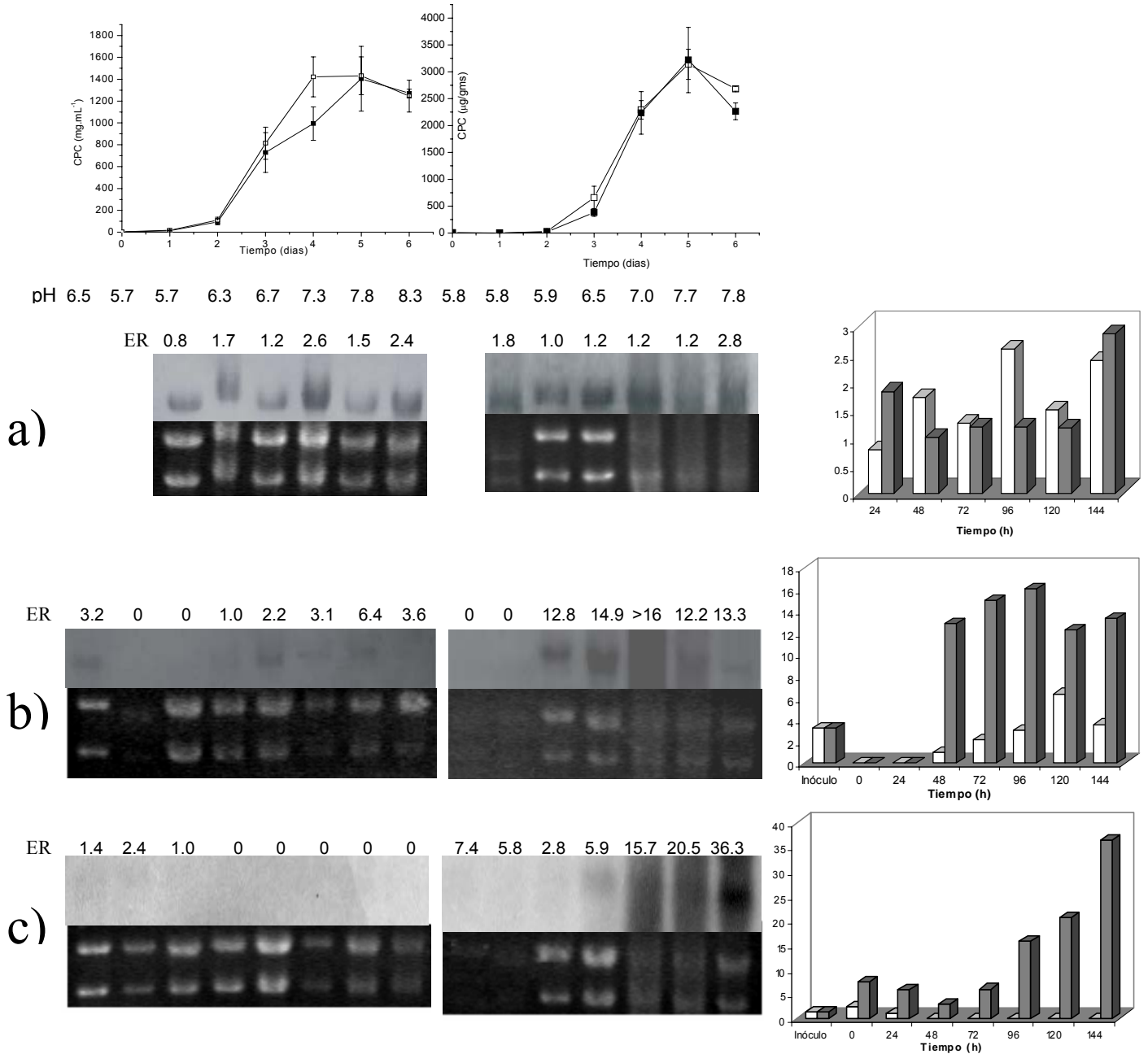
Fig. 22 Expresión del gen *actA* en el experimento de FL vs. FS. Lado izquierdo: se indica el tiempo (T) y la expresión relativa (ER) del gen t. Derecha: gráfica correspondiente al análisis densitométrico de la hibridación: FL barras blancas, FS barras grises. Para normalizar la carga se dividió la densidad óptica de cada transcrito entre la densidad óptica del ARN ribosomal 18S (control de carga). Los niveles de transcripción están dados en unidades relativas, el transcrito con menor expresión encontrado en cada caso fue designado como la unidad.

Las diferencias encontradas en la expresión de este gen, además de que indicaron que no es un espécimen adecuado para ser usado como control de carga en la evaluación de los niveles de expresión de los demás genes en este experimento, sugieren variaciones morfológicas o de composición de las células del microorganismo a lo largo de los cultivos estudiados.

7.2.4.2 Perfil de expresión del gen *cefEF* en FS y FL

El gen *cefEF* codifica para una proteína con actividad expandasa e hidroxilasa, lo cual implica la transformación de penicilina en cefalosporina a través de la inserción de un átomo de carbono en el núcleo de la penicilina (Valegård y col., 2004). Posteriormente, esta enzima cataliza una reacción de hidroxilación del anillo (Samson y col., 1987).

Los resultados de la hibridación mostraron (Fig. 23) una transcripción constante y alta



de este gen desde el principio del cultivo, no encontrándose tampoco ninguna relación entre la evolución del pH y su expresión. A pesar de que no se observa mayor expresión de este gen en

FS que en FL es posible que, debido a las características de la FS, el sistema sólido presente ventajas sobre el líquido en términos de la actividad de la enzima codificada por este gen.

7.2.4.3 Perfil de expresión del gen *cefD2* en FS y FL

El gen *cefD2* codifica para la isopenicilina N-CoA epimerasa, cuya actividad es similar a la actividad epimerasa de sistemas involucrados en la degradación de ácidos grasos raros o metabolitos tóxicos en otras células eucarióticas (Knihinicki y *col.*, 1991; Shieh y Chen 1993; Schmitz y *col.*, 1995).

Los resultados del experimento mostraron (Fig. 23) un mayor nivel de expresión de este gen en FS que en FL. A pesar de que la expresión se observó en el inóculo, la transcripción de este gen parece empezar a las 48 h, de forma leve en FL y en un nivel muy alto en FS. La expresión de este gen coincidió aproximadamente con el inicio de la producción rápida de CPC, en ambos casos a las 48 h (Fig. 13), y con el valor de pH idóneo para la producción que se mencionó anteriormente (apartado 7.1.3).

No se pudo determinar el nivel de expresión a las 96 h en FS, ya que el resultado de la hibridación fue una mancha muy densa. Es posible que el barrido observado en las hibridaciones de esta muestra y las siguientes que se presentan indiquen una alta expresión del espécimen en estudio, junto con una alta presencia de contaminantes en la muestra.

Las diferencias de expresión de este gen entre FS y FL son significativas, al menos desde las 74 a las 144 h, siendo al menos el cuádruple en el caso de la FS.

Estas diferencias presentan una correlación muy alta con la mayor cantidad de intermediarios de la ruta de biosíntesis de CPC encontrados en FL, con respecto a la FS.

7.2.4.4 Perfil de expresión del gen *cefT* en FS y FL

Los resultados del experimento de hibridación con la sonda del gen *cefT* (Fig. 23) podrían indicar un cierto grado de degradación, o la unión inespecífica de las sondas con las muestras de los últimos tiempos de la FS. Sin embargo, es necesario notar una mayor intensidad alrededor de una región cercana al tamaño del ARN ribosomal 18S (1.7 kb), lo cual estaría de acuerdo con lo reportado para el transcrito de este gen (1.4 kb) por Ullán y *col.* (2002), en un trabajo que describe la participación de este gen en la exportación de CPC por la célula.

Los resultados indicaron una alta expresión de *cefT* solamente en los transcritos de FS (Fig. 23), desde las 72 a las 144 h, en presencia de los valores de pH idóneos para la producción de CPC (apartado 7.1.3). Sin embargo, dados los altos niveles de expresión no fue posible la cuantificación entre las 96 y las 144 h. Fue indetectable la expresión de este gen en la FL; a pesar que se repitió el experimento con membranas conteniendo más cantidad de RNA de este cultivo, no fue posible detectar expresión de este gen en este sistema. Estos resultados parecerían suponer una mayor actividad exportadora del hongo en FS que en FL.

7.2.4.5 Perfil de expresión del gen *cahB* en FS y FL

El experimento de hibridación realizado para analizar la expresión del gen *cahB* en FL y FS dió como resultado la autorradiografía mostrada en la Fig. 24a.

En principio, este resultado parecería producto de una alta hibridación inespecífica con las bandas de ARN ribosomal. Sin embargo, considerando que la identidad de la sonda fue confirmada, y que condiciones fuertemente astringentes fueron usadas durante la hibridación, los resultados más bien sugieren hibridación de la sonda con transcritos de diferentes genes de proteasas o acetilhidrolasas presentes en los cultivos. Además, como se puede observar, los transcritos no sólo no coinciden con el tamaño reportado para el gen *cahB* (1.4 kb) sino que tampoco lo hacen con el tamaño de los ARN ribosomales (1.7 y 4 kb), ya que se encontraron transcritos de 1.8, 5 y hasta de 8 kb.

Para hacer un mejor análisis de los resultados de esta hibridación, se dividió el resultado de la autorradiografía en dos partes (Fig. 24b). Se observaron mayores niveles de expresión de acetilhidrolasas en FS que en FL. La expresión de los transcritos de 8 y 5 kb en la FL son las únicas que muestran aumento conforme aumentaron los valores de pH. En el caso de la expresión de estos transcritos en FS puede ser que suceda lo mismo pero por la alta intensidad de las señales es posible que esta tendencia esté siendo enmascarada.

Los transcritos de 5 y 1.8 kb (Fig. 15b) se expresaron no sólo en el inóculo, sino también durante todos los tiempos en FL y FS. También se observó que la expresión de ambos fue baja entre las 24 y las 48 h en los dos sistemas de fermentación, y aumentó después de este tiempo (simultáneamente con el inicio de la producción rápida de CPC), pero en mayor magnitud en la FS.

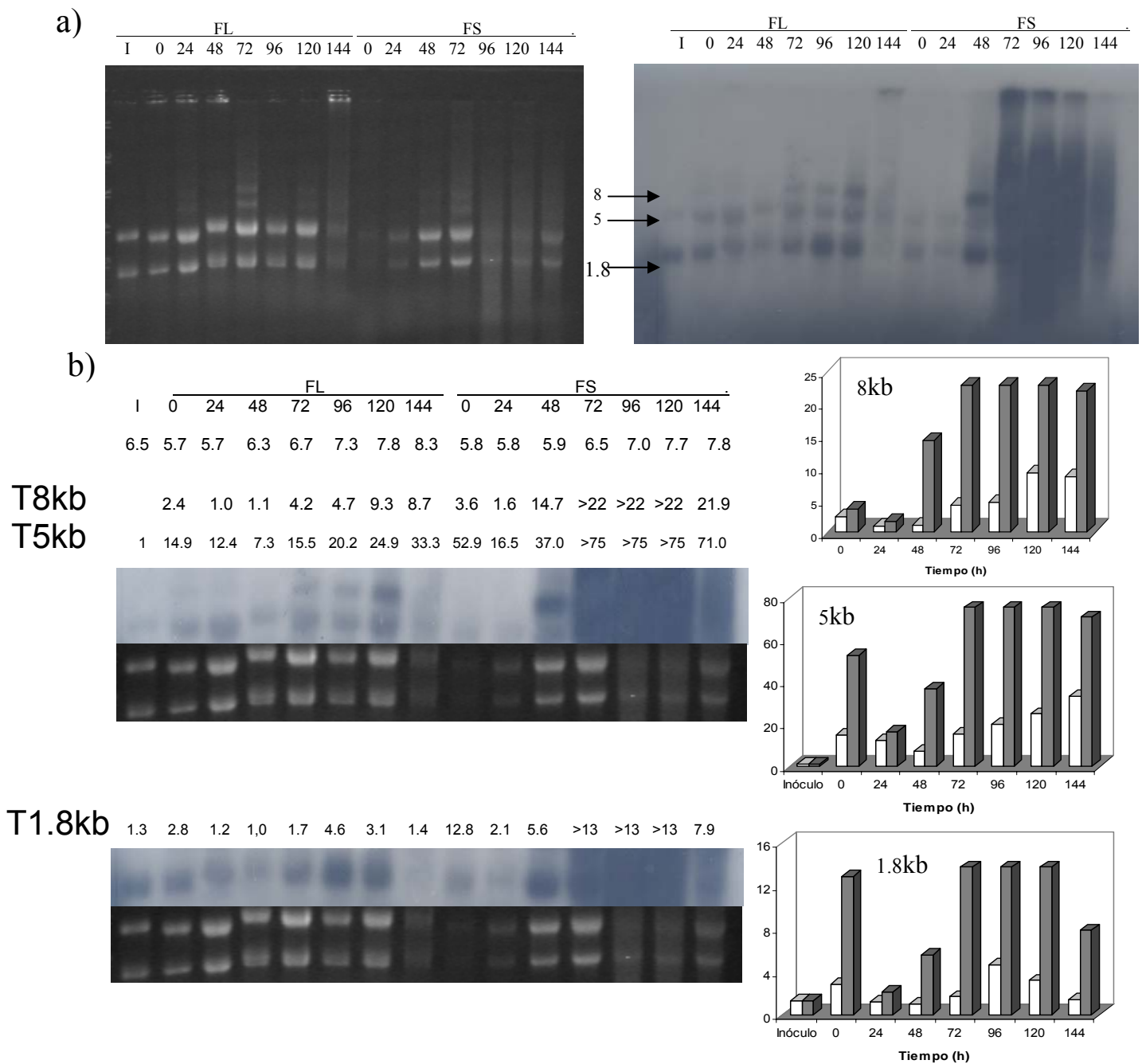


Fig. 24 Resultado de la hibridación de la membrana de ARN con la sonda para el gen *cahB*. a) Contraste de la membrana recién transferida (Izq.) y resultado de la hibridación (Der.). b) Análisis densitométrico de los transcritos: barras blancas FL y barras grises FS. Para normalizar la carga se dividió la densidad óptica de cada transcrito entre la densidad óptica del ARN ribosomal 18S (control de carga). Los niveles de transcripción están dados en unidades relativas, el transcrito con menor expresión encontrado en cada caso fue designado como la unidad.

Por otro lado, se observó un barrido en los resultados de hibridación de los carriles de ARN de los últimos tiempos de la FS; especialmente en el caso de las 96 y 120 h. Este barrido interfirió con la cuantificación de la expresión en estos tiempos, aunque se consideró que no

necesariamente era debido a una degradación de las muestras: en el caso de otras hibridaciones en las que se utilizó ARN de la misma calidad, no solamente se obtuvieron bandas definidas en esos tiempos, sino incluso ausencia de señal (Fig. 23). Es posible, como se mencionó antes, que el barrido mencionado se deba a una alta presencia de transcritos de acetilhidrolasas, unida a la presencia de contaminantes derivados de la fermentación (carbohidratos y pigmentos) aún presentes en la muestra, y que posiblemente afectaron también a los resultados de las hibridaciones de los genes *cefD2* y *cefT*.

7.2.5 Clonación del gen *pacC* con mimetismo alcalino.

Se usaron cebadores específicos para las distintas amplificaciones del gen *pacC* (N° de acceso EMLB: AJ251521, indicados en la tabla 4), que se realizaron con una polimerasa termoestable de alta fidelidad de copia. El esquema de obtención de los productos se detalla en la Figura 25.

Las amplificaciones obtenidas por PCR se ligaron en el plásmido pGemT-Easy y se clonaron en *E. coli* XL1-Blue para posteriormente ser enviadas para su secuenciación. Los resultados se procesaron con el programa Seqman (DNASTAR), comparándolos con la secuencia reportada por Schmitt y col. (2001) ((N° de acceso EMLB: AJ251521) (Fig. 26).

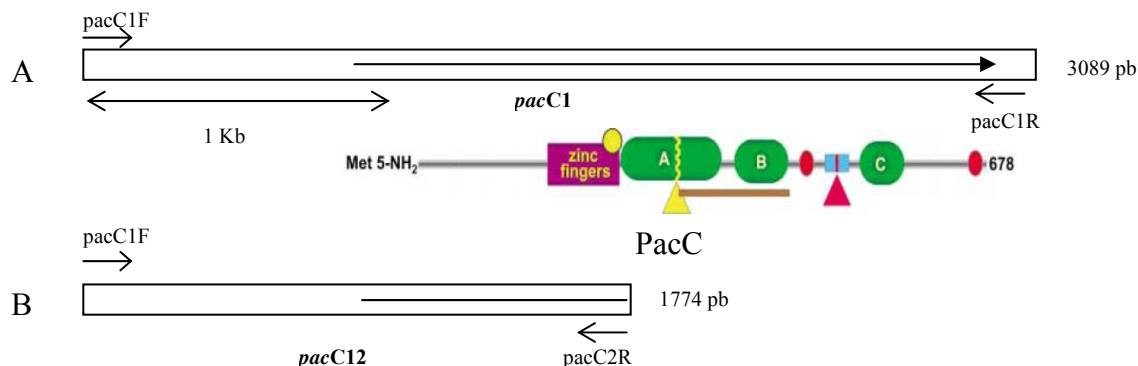


Fig. 25 Esquema de las distintas amplificaciones del gen *pacC* a obtener. (A) Gen completo con su propio promotor, se obtiene la proteína completa, (B) Fragmento de gen para expresión de mimetismo alcalino.

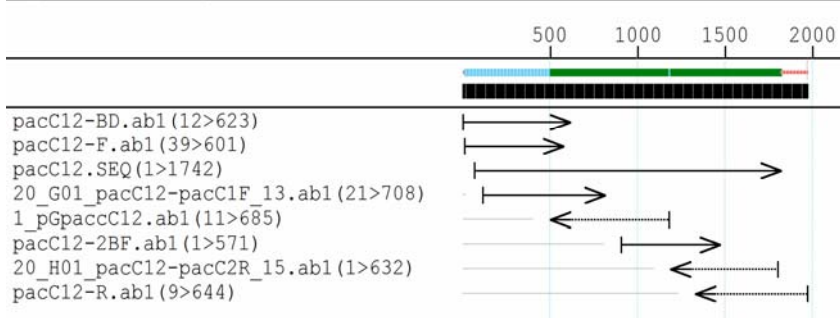
El análisis de las secuencias indicó:

1. Secuencia de *pacC12* correcta en toda su extensión.
2. Cambio de un nucleótido en la posición 2459 de *pacC1* (contiene A en vez de G). El error se encuentra en una región cercana a la región determinante del procesamiento y

provoca el cambio de un aminoácido (Fig. 27), con lo cual deberán tomarse con precaución los resultados una vez realizada la transformación de *A. chrysogenum*.

a) *pacC12* (1-1794). Secuencia 100% idéntica a lo reportado en literatura

domingo, 22 de julio de 2007 19:15
Project: Untitled Contig 5



b) *pacC1* (1-3089). Conflicto: 1 error, cambio de G por A en nucleótido 2459

martes, 04 de diciembre de 2007 15:41
Project: pacC1.SQD Contig 6

Page 1

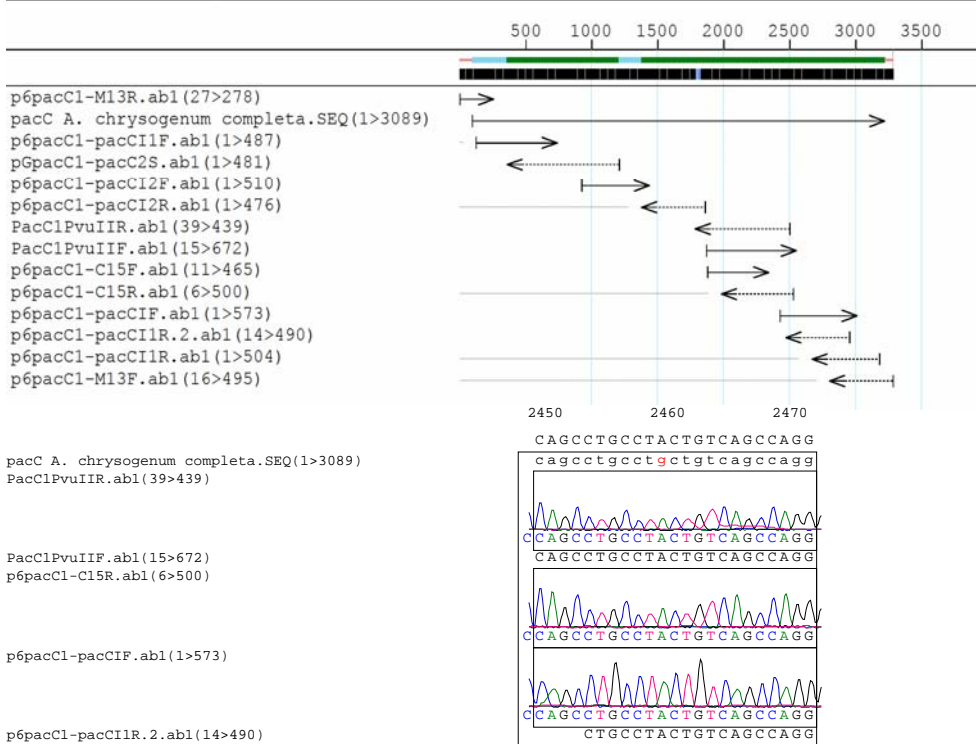


Fig. 26. Análisis en Seqman® de las secuencias obtenidas de las amplificaciones de *pacC*. a) *pacC* con promotor propio y mimetismo alcalino, b) *pacC* completo.

7.2.5.1 Clonación de *pacC12* (gen con mimetismo alcalino, promotor propio de *A. chrysogenum* y terminador de *trpC*)

Debido a que el gen clonado carece de terminador, la estrategia de clonación de este (Fig. 28) se realizó con la inserción dirigida del terminador del gen *trpC* (procedente de pAN52-1)

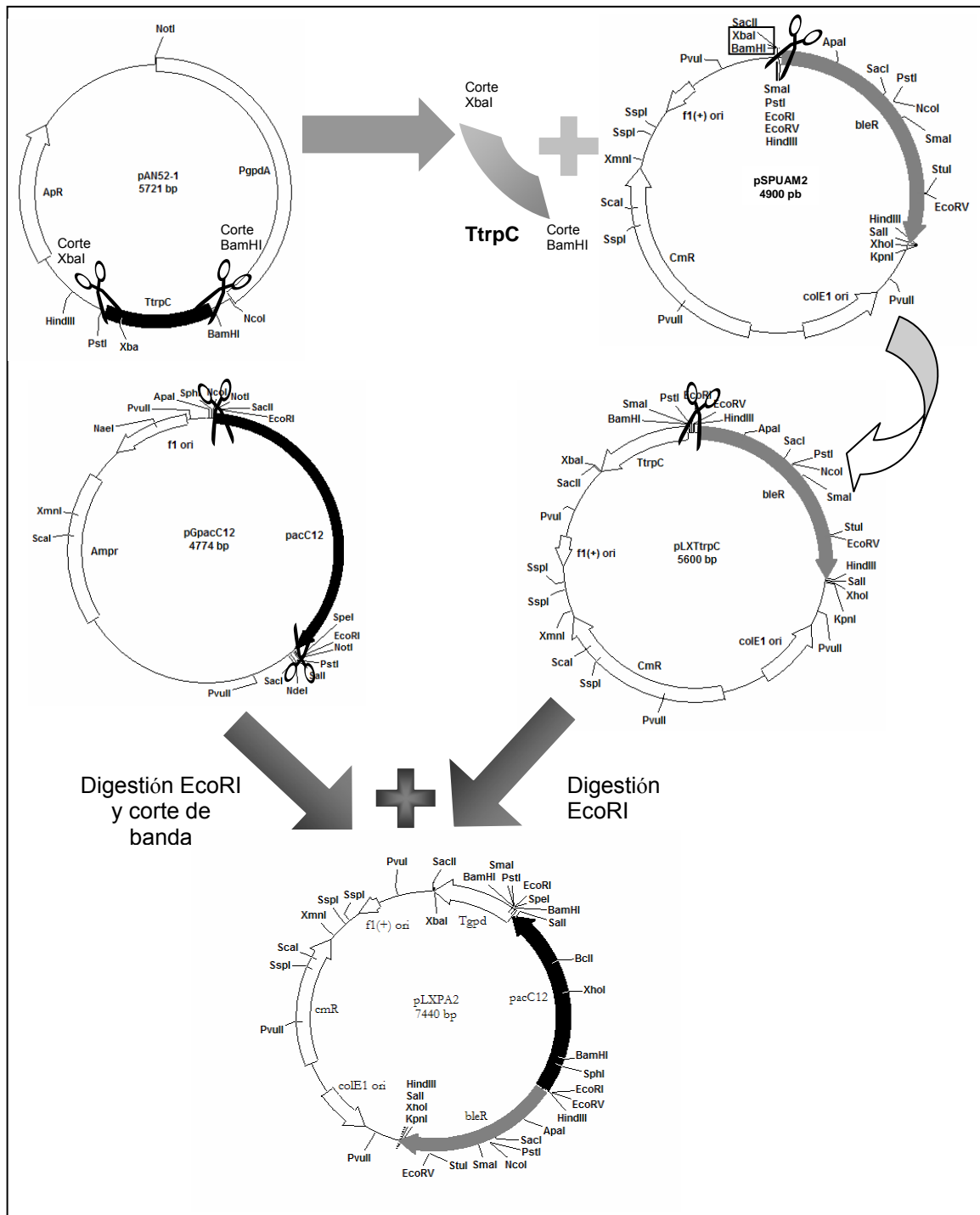


Fig. 28 Estrategia de clonación de *pacC12* (gen con mimetismo alcalino, promotor de *A. chrysogenum* y terminador TtrpC)

en el plásmido pSPUAM2 y la posterior incorporación del fragmento *pacC12* en el mencionado plásmido. En la figura 29 se observa el plásmido final construido, que se utilizará para expresar el gen con la mutación de mimetismo alcalino en *A. chrysoenum* C10 y ATCC 1150.

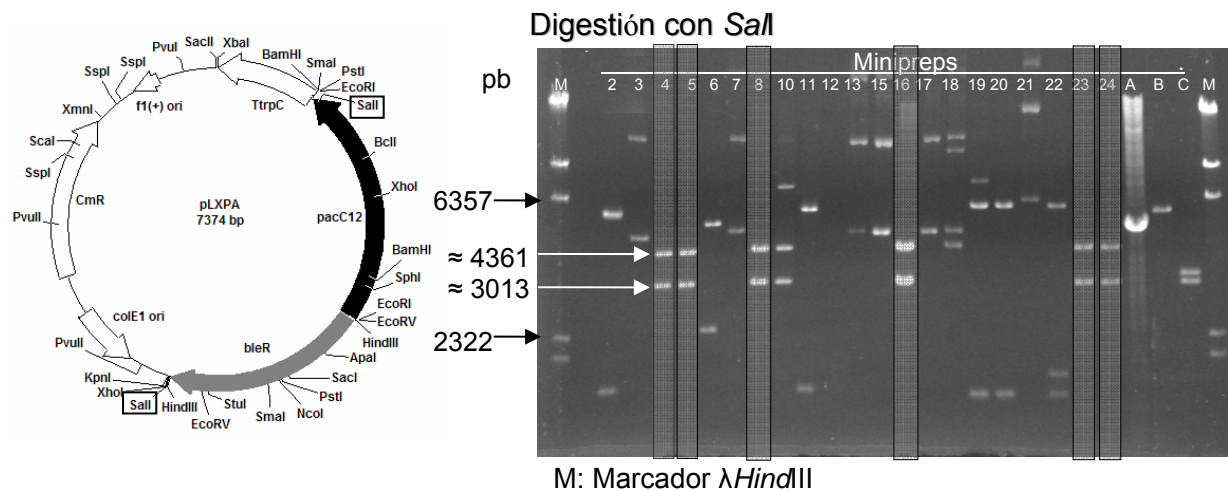


Fig. 29 Plásmido obtenidos de la ligación del *TtrpC* y *pacC12* en el plásmido pULC43Xba (Sierra, 2004). La digestión con *SalI* indica que las minipreps 4, 5, 8, 16, 23 y 24 corresponden a pLXPA.

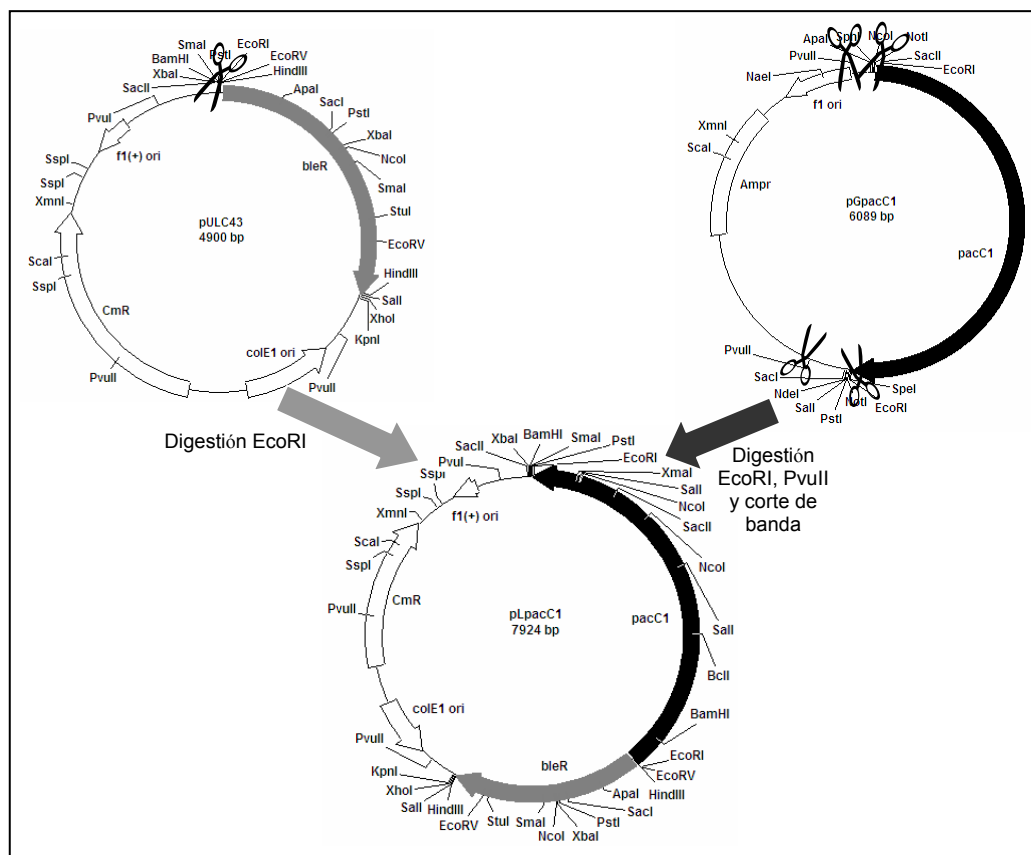


Fig. 30 Estrategia de clonación y corrección de *pacC1* (gen completo con una mutación en la región determinante del procesamiento)

7.2.5.2 Clonación de *pacC1* (gen completo, aunque con una mutación en la región determinante del procesamiento)

De acuerdo a lo descrito anteriormente (Mingot y col., 1999), la mutación de este gen se encuentra cercana a la denominada región determinante del procesamiento, aunque no se sabe cuanta importancia tendrá este cambio. Por ello, se decidió continuar con el trabajo y ligar el fragmento obtenido del plásmido pGpacC1 al plásmido pULC43 digerido con *EcoRI* (Fig. 30).

De forma similar al caso anterior, después de la digestión con *SalI* se determinó que la construcción pLpacC1 era correcta (Fig. 31). La construcción obtenida se utilizó para transformar *A. chrysogenum* C10, pero además se utilizó para transformar *A. chrysogenum* ATCC 11550, una cepa silvestre, con el objeto de verificar el efecto de esta construcción.

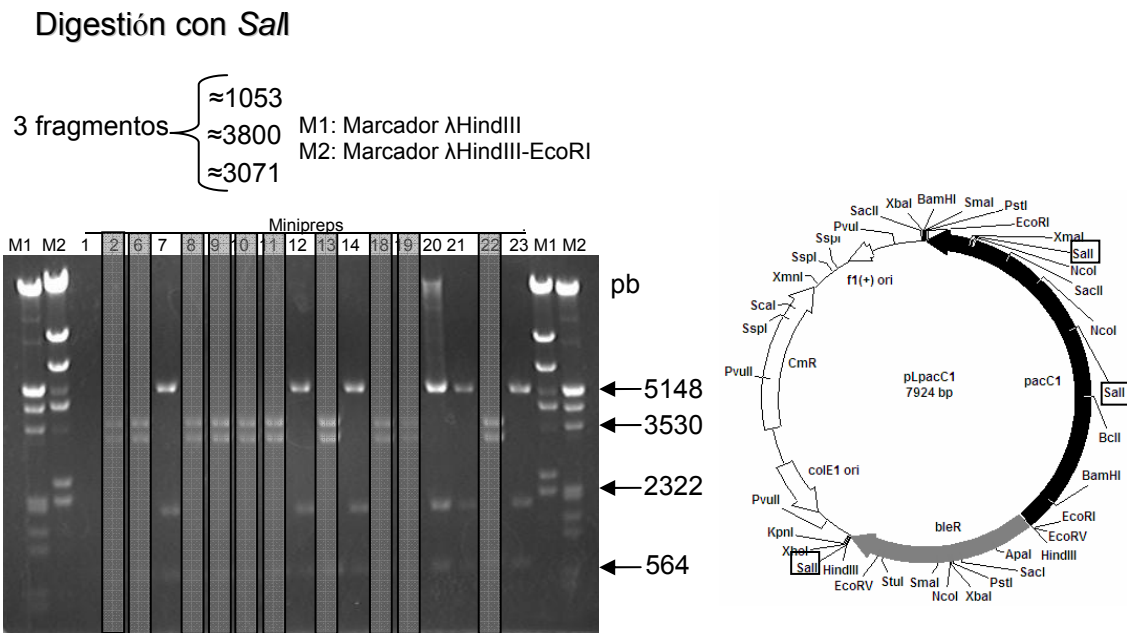


Fig. 31 Plásmido obtenido de la ligación de *pacC1* en el plásmido pULC43. La digestión con *SalI* indica que las minipreps 2, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 19 y 22 corresponden a pLpacC1.

7.2.6 Transformación de *A. chrysogenum* para producir mimetismo alcalino.

En el tiempo de experimentación del programa de doctorado, solamente fue posible obtener las construcciones pLpacC1 y pLXPA, las cuales servirían para estudiar el efecto de una modificación en la región determinante del procesamiento y también para tratar de producir el efecto de mutación de mimetismo alcalino respectivamente, en las cepas a transformar.

Se decidió transformar dos cepas de *A. chrysogenum* disponibles en el laboratorio: ATCC 11550 (cepa silvestre de Brotzu) y ATCC 48572 (o C10, cepa semi-industrial derivada de la de Brotzu); para verificar el efecto de los plásmidos mencionados sobre la producción de CPC por estas cepas.

7.2.6.1 Producción de protoplastos de las cepas de hongos utilizadas

Se siguió el procedimiento indicado en los materiales y métodos (6.8.10.2) y se logró la obtención de protoplastos de las cepas ATCC 11550 y 48272 (C10), a las 1.5 y 2.8 h después de la adición de la Driselasa, respectivamente. Se evaluó la acción de dos tipos de enzimas líticas para la producción de protoplastos de las dos cepas estudiadas arrojando resultados diferentes, aunque relativamente satisfactorios en ambos casos. En el caso de las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* se requirieron tiempos de 3 y 5 h para las cepas silvestre y C10, respectivamente, obteniéndose una menor cantidad de protoplastos que con la otra mezcla de enzimas. Se realizó la mayoría de transformaciones con protoplastos producidos con Driselase.

Las observaciones microscópicas realizadas al inicio y el final de proceso de producción de protoplastos indican no solamente la obtención de las estructuras unicelulares necesarias para el procedimiento de transformación, sino que además aparecen residuos de micelio (Fig. 32). Se consideró que los restos celulares encontrados con los protoplastos no interferirían con los resultados de obtención de transformantes, ya que lo más probable es que fueran eliminados por acción del antibiótico usado como marcador de selección, además de el control negativo de la transformación confirmaría si los resultados son fiables o no.

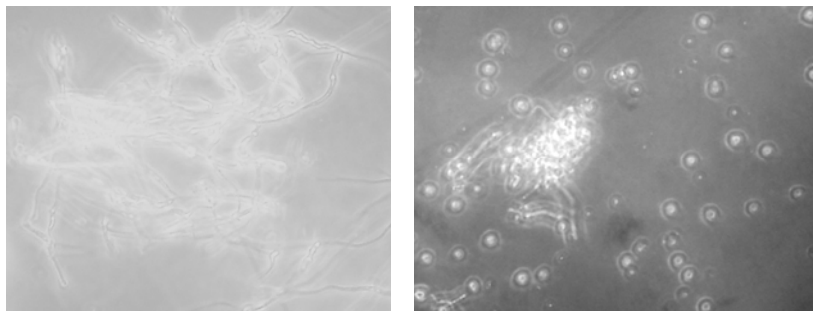


Fig. 32. Morfología microscópica de *A. chrysogenum* C10 observada: a) Antes del proceso de producción de protoplastos y b) Después del proceso de producción de protoplastos.

7.2.6.2 Resistencia a fleomicina de los protoplastos de las cepas de hongos utilizadas

Se siguió el mismo procedimiento para la producción de protoplastos indicado en la sección anterior y luego se siguió el procedimiento indicado para la transformación en los materiales y métodos, salvo que no se añadió plásmido alguno. Se plaquearon los protoplastos con concentraciones crecientes de fleomicina, para cuantificar la resistencia de estos a la fleomicina. Al final de 7 días de incubación a 25 °C se obtuvieron los resultados indicados en la tabla 7.

Tabla 7. Resistencia a fleomicina de protoplastos de las cepas de *A. chrysogenum* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)
ATCC 11550	10
ATCC 48272 (C10)	20

7.2.6.3 Transformación de *A. chrysogenum* ATCC 11550 y C10 y selección primaria de los transformantes.

La tabla 8 indica las condiciones de transformación aplicadas a los protoplastos de cada cepa estudiada en este experimento, a través del cual se deseaba obtener transformantes de *A. chrysogenum* que presentaran la mutación de mimetismo alcalino. Además de los plásmidos construidos con el objeto de producir la mutación deseada (*pLpacC1* y *pLXPA2*) se utilizaron otros plásmidos y condiciones control, la tabla 8 también indica la nomenclatura utilizada para las transformantes obtenidas en este trabajo.

Tabla 8. Tratamientos de transformación aplicados en este trabajo, y nomenclatura de las transformantes obtenidas.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6
ADN plasmídico	-	-	<i>pSPUAM2</i>	<i>pLXTtrp</i>	<i>pLXPA</i>	<i>pLpacC1</i>
Fleomicina	No	CMI*	Si	Si	Si	Si
Variable a evaluar	Viabilidad	Sensibilidad	Efecto del plásmido solo	Efecto del plásmido solo	Efecto de gen diseñado para producir la proteína PACC procesada	Efecto de cambios en la secuencia y/o efecto en el aumento de copias del gen
Nombre de transformante de C10	C10X [†]	Crecimiento ausente	CLX	CRX	CAX	CPX
Nombre de transformante de ATCC11550	WTX	Crecimiento ausente	WLX	WRX	WAX	WPX

*Concentración mínima inhibitoria

[†] X= Número de transformante

Se obtuvo mayor cantidad de transformantes de la cepa ATCC 11550 que de la C10, siendo la eficiencia de transformación de aproximadamente 2 y 0.5 transformantes/ μg de ADN (se utilizaron aproximadamente 10 μg de ADN por transformación) para cada una de estas cepas, respectivamente. Por otro lado, se observó la aparición de transformantes de la cepa silvestre desde el tercer día, mientras que las transformantes de la cepa C10 sólo empiezan a presentarse a partir del séptimo día.

Todas las transformantes obtenidas fueron cultivadas en medio LPE con doble concentración de fleomicina, en relación con la concentración de este antibiótico en la cual aparecieron. De esta forma se aseguró el crecimiento exclusivo de verdaderas transformantes.

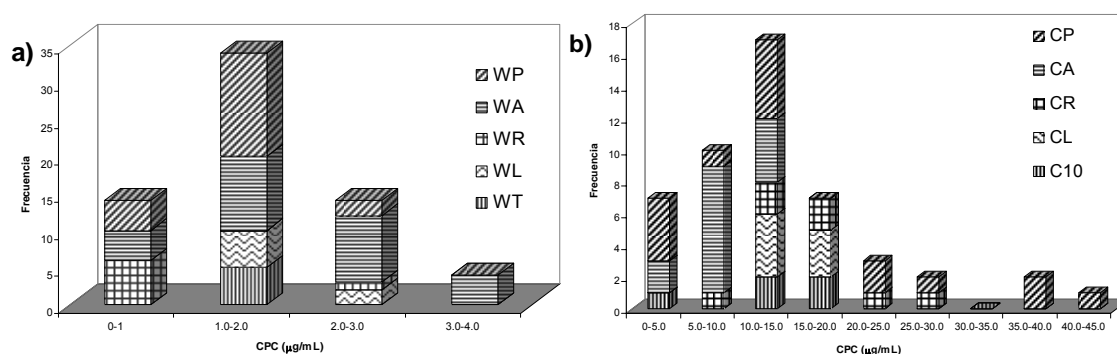


Fig. 33. Histogramas de frecuencia de la producción de CPC por las transformantes y controles de las cepas a) ATCC11550 y b) C10. Nomenclatura detallada en tabla 8.

A continuación, los niveles de producción de CPC de las 65 transformantes de la cepa silvestre y las 52 de la cepa C10 (entre las que se encontraban tanto aquellas conteniendo los plásmidos de interés como los de control) fueron evaluados de forma preliminar de acuerdo a lo indicado en los materiales y métodos (punto 6.7.2.1). Se interpolaron los valores de los halos de inhibición formados por los cultivos en cilindros de agar con los obtenidos en la curva de calibración y se construyeron los histogramas de distribución de frecuencias que se muestran en la figura 33.

En este punto de selección primaria de las transformantes se encontró que el nivel de producción encontrado para todas las cepas control probadas (WT, C10, WL, CL, WR y CR) nunca llegó a encontrarse en los rangos superiores y 5 de cada 6 de las transformantes WR (que contienen el plásmido pLXTtrpC) no presentaron siquiera producción de CPC.

Para pasar a la selección secundaria de los transformantes, se eligieron 13 transformantes de la cepa silvestre y 14 de la cepa C10, entre las que se encontraban aquellas con el nivel de producción más alto y los 3 tipos de cepa control, como se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Producción de CPC por las cepas control y transformantes de *A. chrysogenum*.

Transformantes cepa silvestre	CPC ($\mu\text{g/mL}$)	Transformantes cepa C10	CPC ($\mu\text{g/mL}$)
WT-3	1.998	C10-2	16.927
WL01	2.334	CL05	19.611
WR01	2.637	CR03	22.138
WA02	3.678	CA01	8.395
WA04	2.522	CA04	3.211
WA05	3.719	CA13	*
WA06	2.467	CA15	*
WA07	2.696	CA16	*
WA11	2.467	CP01	35.029
WA12	2.494	CP06	35.029
WA19	3.220	CP09	29.206
WA21	2.413	CP10	23.522
		CP11	36.897
		CP17	*

* Estas transformantes fueron sometidas a selección secundaria directamente debido a que aparecieron en el medio de cultivo de selección después de 12 días de incubación mientras las demás estaban siendo analizadas.

Es necesario señalar que debido a que no se encontró ninguna cepa del tipo WP que produjera cantidades mayores de CPC en la selección realizada, no se incluyó ninguna transformante de este tipo para los estudios posteriores. Sin embargo, algunas de las transformantes de la cepa C10 que presentaron cambios morfológicos, anteriormente señalados como indicadores de mejoramiento genético para este microorganismo (colonias más compactas que la cepa parental, Vialta y *col.*, 2003), fueron incluidas para la selección secundaria a pesar de no presentar niveles muy altos de producción de CPC en el bioensayo con cilindros de agar.

7.2.6.4 Evaluación de la producción de CPC en cepas transformantes de *A. chrysogenum*.

Tras el cultivo en LPE y en medio semilla de cada una de las transformantes elegidas para la selección secundaria, se sembró un matraz con medio MDFA/MES 0.125 M para cada

transformante, y se midió la producción de CPC y la cinética de pH, obteniéndose los resultados mostrados en las Fig 34 y 35.

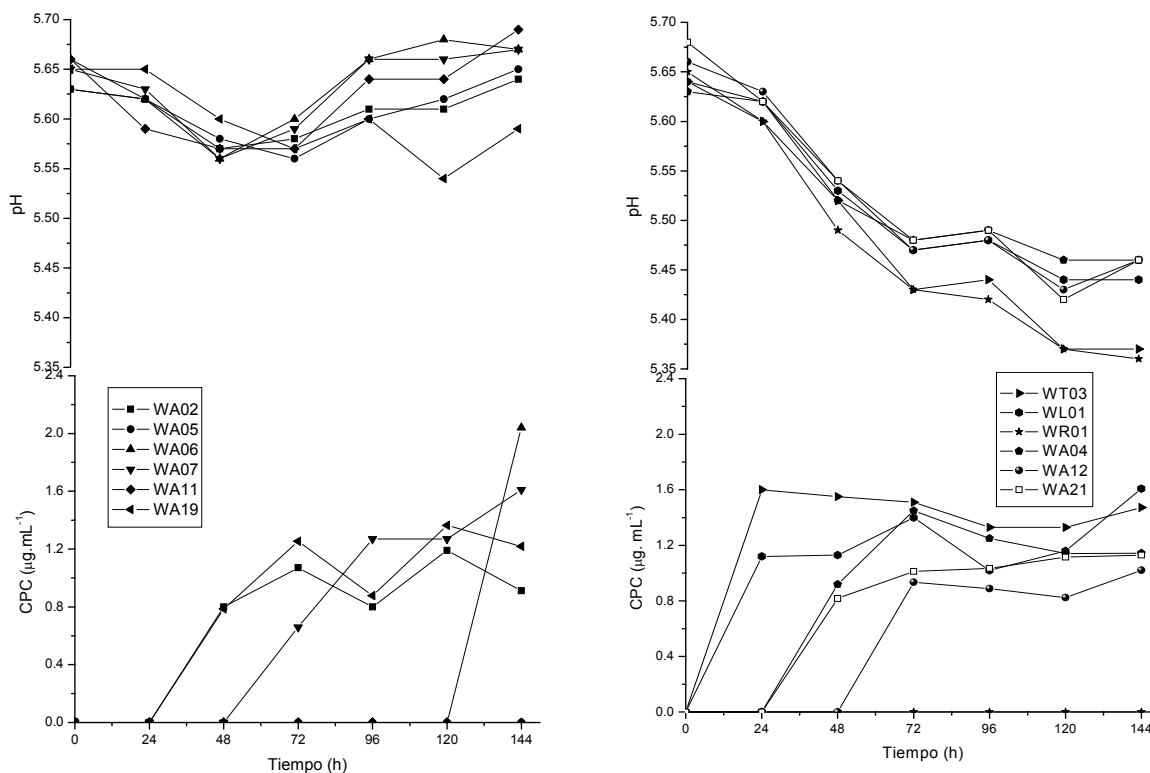


Fig. 34. Cinéticas de evolución de pH y producción de CPC por la cepa ATCC 11550 (WT) y sus transformantes.

En los cultivos de la cepa silvestre (nombrada como WT03 en la Fig. 34) y sus transformantes, la principal diferencia observada fue en las cinéticas de pH, en las que se observó que la mayoría de cepas transformadas con el plásmido pLpacC1 presentan una tendencia a mantener estable o a elevar el pH del medio de cultivo. Por otro lado, en el caso de la cepa parental, las cepas transformadas con plásmidos control y solamente algunas cepas transformadas con pLpacC1 disminuyen el pH de la fermentación líquida. Estas diferencias no se relacionaron, sin embargo, con diferencias en el nivel de producción de CPC. Si bien no se detectó producción de este metabolito en algunas transformantes, las que sí produjeron no lo hicieron en niveles significativamente diferentes a los alcanzados por la cepa parental y las cepas control; solamente la cepa WA06 mostró una producción un 27% mayor que la cepa parental (WA06 = 2.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y WT03 = 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aunque en un tiempo muy tardío del cultivo. La diferencia principal que se pudo encontrar entre las cepas estudiadas fue que la

producción máxima de CPC se retrasó entre 24 y 120 h en las transformantes respecto a la parental, cuya producción máxima se observa a las 24 h.

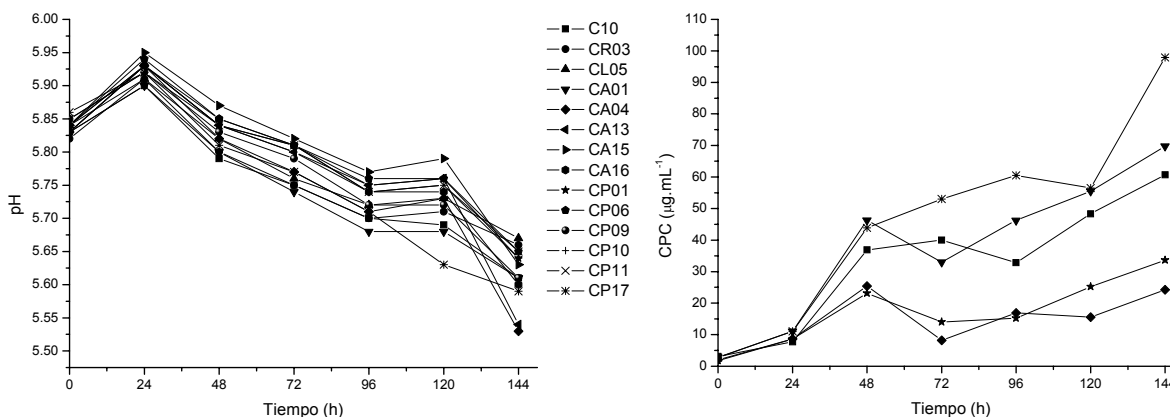


Fig. 35. Cinéticas de pH y producción de CPC por la cepa C10 y sus transformantes.

Es necesario hacer notar que se hizo una medición preliminar del inóculo utilizado para los matraces de fermentación de esta cinética, a través de centrifugación en un rotor oscilante a 2700 rpm ($\approx 1000 \times g$) durante 8 min. Se observó que el inóculo utilizado para las cepas transformantes era alrededor de la cuarta parte (aproximadamente 0.5 mL de micelio empacado) del inóculo para la cepa control (aproximadamente 2 mL de micelio empacado). Las transformantes de la cepa C10 presentan al igual que en el caso anterior menor crecimiento, pero en proporción menor, crecen aproximadamente la mitad que la cepa parental. Los siguientes experimentos se hicieron tratando de homogenizar la cantidad utilizada de inóculo, bajo las mismas condiciones de cultivo.

Tabla 10. Producción máxima de la cepa C10 y sus transformantes en cultivo líquido a pH ácido.

Cepa	Producción máxima de CPC ($\mu\text{g/mL}$)	Cepa	Producción máxima de CPC ($\mu\text{g/mL}$)
C10	60.7	CA16	62.9
CR03	56.1	CP01	33.6
CL05	49.3	CP06	53.8
CA01	69.8	CP09	41.8
CA04	25.4	CP10	56.1
CA13	42.5	CP11	56.6
CA15	39.3	CP17	97.9

La cepa C10 y sus transformantes mostraron tendencias muy similares en las cinéticas de evolución del pH (Fig. 35), y aunque la mayoría de las transformantes mostraron una producción máxima menor al control (Tabla 10), dos de ellas (CA01 y CP17) mostraron niveles de CPC mayores desde las 96 horas de cultivo.

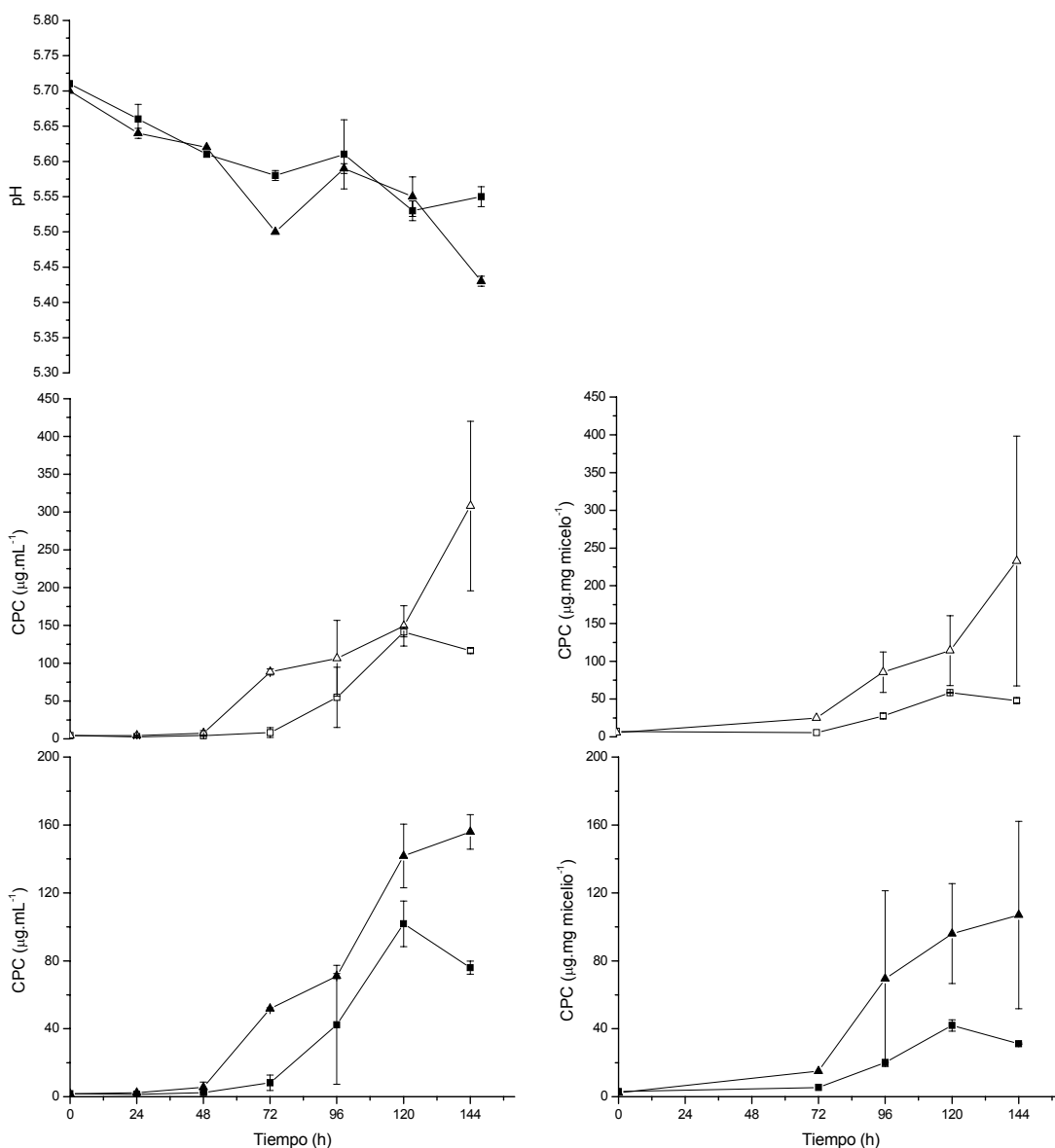


Fig. 36 Cinéticas de pH y producción volumétrica y específica de CPC por la cepa C10 (■) y la transformante CP17 (▲). Los símbolos cerrados indican el resultado del bioensayo con penicilinas y los abiertos el bioensayo sin penicilinas.

Para la gráfica de la cinética de producción de la Fig. 35 solamente se tomaron las dos cepas de mayor producción antes mencionadas, la cepa control y dos cepas que mostraron

menor producción. Estos perfiles son representativos de los presentados por las demás cepas estudiadas, y son bastante similares a lo descrito anteriormente en los experimentos iniciales de cinéticas de producción en este medio para la cepa C10.

Finalmente se realizó un experimento para hacer una comparación más exacta de la producción de CPC, cinética de pH y crecimiento de las transformantes CA01 y CP17 con la cepa control (C10).

Los resultados de este último experimento no indicaron diferencias entre los niveles de producción volumétrica ni producción específica de las cepas control y CA01, por lo que solamente se muestran los resultados para la cepa control y la transformante CP17. La Fig 36 indica mayores variaciones en el pH del cultivo de la cepa CP17 que en el de la cepa control, los descensos más drásticos en este parámetro se observan de las 48 a 72 y de las 120 a las 144 h en la cepa CP17, coincidiendo con el aumento de las pendientes de producción de antibiótico reportada por los bioensayos con penicilinas y sin penicilinas, respectivamente. Es decir, la mayor actividad de metabolismo secundario se acoplaría con mayores variaciones en el pH en el caso de esta transformante.

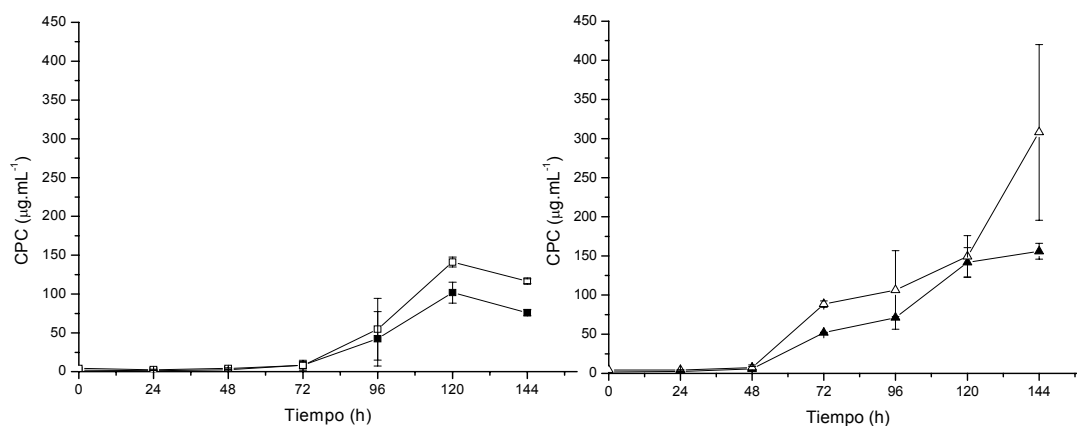


Fig. 37 Cinéticas de producción volumétrica de CPC por la cepa C10 (Der) y la transformante CP17 (Izq). Los símbolos cerrados indican el resultado del bioensayo con penicilinas y los abiertos el bioensayo sin penicilinas.

Las cinéticas de producción volumétrica de CPC indican diferencias significativas entre los niveles de producción de CPC y de antibióticos totales ($P < 0.0069$ y $P < 0.072$ respectivamente, Prueba: T-student), siendo mayor la producción de CPC (55%) y de antibióticos totales (118%) de la cepa CP17 ($144 \text{ h} = 155.98 \pm 10.18$ y $144 \text{ h} = 308.01 \pm$

112.26 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) que de la cepa control (120 h = 101.81 ± 13.45 y 120 h = 141.23 ± 6.40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Todas estas diferencias se evidencian mejor en la Fig. 37.

Los datos más interesantes de este experimento son los ofrecidos por las gráficas de producción específica (Fig. 36), en las cuales se pudo observar una producción específica mayor de la transformante que de la cepa parental. Sin embargo, necesario destacar la poca variabilidad de este parámetro en el caso de la cepa control, en contraste con las grandes desviaciones presentadas por la cepa transformante.

En detalle, la grafica de producción específica de CPC indica que esta aumenta rápidamente de las 72 a las 96 h para luego mantenerse aproximadamente constante de las 96 a las 144 h; mientras que la producción específica de antibióticos totales muestra un aumento exponencial de las 72 a las 144 h.

Por otro lado, aunque estos resultados se consideran positivos, las amplias variaciones en la producción específica encontrada en el cultivo de la transformante podrían estar indicando heterogeneidad o cambios en el micelio, resaltando la necesidad de algún tipo de purificación genética y estudios de estabilidad de este tipo de transformantes.

8. Discusión

8.1 Estudios fisiológicos de la producción de cefalosporina C con *Acremonium chrysogenum*

8.1.1 Estimación del crecimiento en cultivos en medio sólido mediante cromatografía de gases

En un estudio previo en el cual se relacionan las mediciones respirométricas de un cultivo en medio sólido con su metabolismo secundario (Domínguez y col., 2000), se detalla que se producen perfiles característicos de producción de CO₂ dependiendo del contenido de nutrientes, humedad y bagazo en el sistema. Este estudio determinó que en FS se observan diferentes picos de producción de CO₂, que van acoplados con las fases del cultivo; el primero con la trofofase y desde ninguno hasta dos con la idiofase.

Las mediciones respirométricas de la FS de la cepa de *Penicillium chrysogenum* modificada genéticamente indicaron que el primer pico de producción de CO₂ (Fig. 8) corresponde a la idiofase del cultivo, lo cual se confirmó con el nivel de antibiótico producido a las 48 h, es decir después del descenso de producción de CO₂. Es necesario notar que este primer máximo de producción es relativamente pequeño comparado con los demás picos de producción observados en este cultivo, lo cual puede estar sugiriendo un nivel bajo de crecimiento.

Las concentraciones de los componentes de este cultivo utilizadas son bastante cercanas a las óptimas encontradas para otras FS de *P. chrysogenum*, y el nivel de antibiótico producido también es similar al de las cepas parentales (Barrios González y col., 1997).

Mediante el bioensayo utilizado para la cuantificación, no se detectó la producción de CPC, debido posiblemente a la ausencia del gen *cefD* o de algún gen responsable de la conversión de isopenicilina N a penicilina N en la transformante estudiada (Paniagua, 2004), aunque es posible que mediante el uso de otras técnicas analíticas se pueda determinar si se realizó la producción de metabolitos diferentes con actividad antibiótica.

Las mediciones respirométricas de la FS de *A. chrysogenum* indicaron que a pesar de la baja actividad metabólica observada (producción máxima de CO₂ ≈ 5 mL/h.gss, Fig. 9; y consumo máximo de O₂ ≈ 1.15 mL/h.gss, Fig. 14), la producción de CPC si fue considerable (2800 µg/gss). En un comportamiento similar a lo ocurrido para la producción de penicilina en FS se observó la coincidencia entre el descenso de la producción de CO₂ y el inicio de la

producción rápida del antibiótico. El primer pico correspondería, por lo tanto, a la trofofase del cultivo y el segundo a la idiofase del mismo. Más notoriamente, el consumo de O₂ disminuyó drásticamente, señalando de forma clara el cambio de estado metabólico del cultivo.

Analizando la cinética integrada de producción de CO₂ en el cultivo de *P. chrysogenum* (Fig. 8) se puede observar que de forma similar a lo expuesto en estudios anteriores (Domínguez y col., 2000) se distingue una primera fase que indica latencia del cultivo (0-20 h), una segunda fase con la mayor pendiente en el gráfico (20-25 h) que coincide con la trofofase y una tercera fase de pendiente menor a la anterior (44-58 h) correspondiente a la idiofase. Finalmente, se observó una cuarta fase completamente estacionaria (>58 h), que sólo ha sido observada en estudios respirométricos previos en algunos casos de FS de *P. chrysogenum*, aunque en tiempos mucho más avanzados de cultivo (>100 h). Esto último indica un crecimiento y paso a metabolismo secundario muy rápido del cultivo.

La cinética integrada de producción de CO₂ en la FS de *A. chrysogenum*, de forma similar a la de *P. chrysogenum*; presenta las tres fases indicadas en el párrafo anterior (Fig. 9): Latencia (0-60 h), trofofase (60-80 h), idiofase (80-92 h) y fase estacionaria (>92 h). Estos últimos resultados (fase de latencia larga, trofofase e idiofase cortas), así como los bajos niveles de producción de CO₂ sugieren que el nivel de inóculo utilizado es bajo, por lo que queda abierta la posibilidad de mejorar la producción con niveles más altos de inóculo.

En un estudio anterior (Cuadra, 2004), ya se habían comparado los resultados de la composición de nutrientes utilizada en este trabajo con un sistema en el cual se utilizaron niveles mayores de bagazo de caña (20.6%) y menores de nutrientes (9.4%) (Medio 2×). Los resultados indicaron que el sistema de menor concentración de bagazo y más nutrientes (Medio 2.5×) ofrecía mejores resultados. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de comprobar si el comportamiento de la producción, en relación a los componentes del cultivo, observado en las FS de *P. chrysogenum* (Domínguez y col., 2001) también se cumple para las FS de *A. chrysogenum*.

8.1.2 Cultivo en medio líquido de *Acremonium chrysogenum*, evaluación de diferentes niveles de nutrientes y comparación preliminar con cultivos en medio sólido.

La cepa C10 de *Acremonium chrysogenum* fue reportada originalmente como una cepa de alta producción (Shen y col., 1986), sin embargo Vialta y col. (1997) reportaron un importante descenso del nivel de producción en la cepa mencionada adquirida de diferentes fuentes. Este dato, fundamentó la necesidad de una comparación precisa entre FL y FS con la cepa disponible, ya que solamente se contaba con mediciones de producción de la cepa en FS. Los experimentos en FL, además de confirmar el bajo nivel de producción de nuestra cepa (1165 µg/mL) también mostraron la factibilidad de comparar las características generales de los cultivos de *Acremonium chrysogenum* C10 en medios concentrados, tanto en FL como en FS, especialmente aquellas relacionadas con la respuesta de ambos sistemas a los cambios de pH y concentración de nutrientes.

Los resultados de los cultivos sumergidos usando medios concentrados, mostraron que no solamente era posible establecer una FL utilizando un medio 2.5 veces concentrado sino que también este cultivo alcanzó un nivel de producción 40% más alto (1646 µg/mL) que el obtenido con medio de concentración normal, en contraste con otros estudios de FS en soporte impregnado (Barrios González y col., 1988, Barrios González y Tomasini 1996, Baños y col., 2005), en los cuales no solamente se demostró que la necesidad de medios más concentrados es característica de la fisiología particular de los hongos en medio sólido, sino que también en FL afectaba negativamente a la producción de metabolitos secundarios. A pesar de que los mayores niveles de producción de CPC han sido obtenidos en FL y FS con niveles más altos de nutrientes, en ambos casos las mejores eficiencias fueron observadas con niveles menores de nutrientes, sugiriendo que aún cuando es posible la aplicación de niveles mayores de nutrientes siempre es necesario un proceso de optimización. En este punto, es necesario destacar que los resultados que se obtuvieron en el experimento en el que se usa el medio 1× en la FS ayudaron a ampliar la visión del efecto de la concentración del medio y la importancia de la regulación del pH en la producción de CPC en este sistema, contrastando con lo descrito para la producción de penicilina, aflatoxinas y lovastatina (Barrios González y col. 1988, Barrios González y Tomasini 1996). En el presente trabajo, la alta producción de

CPC en el medio de baja concentración se correlacionó con un lento cambio en el pH, que alcanzó un valor de 6.9 el día de máxima producción. Este comportamiento del pH, acompañado de un consumo lento de azúcares, contribuyó a la activación del metabolismo secundario en el hongo, lo que se reflejó en una producción elevada de CPC en FS.

En cuanto a la disminución en la biomasa, se aprecia un comportamiento similar de este microorganismo en las dos condiciones. Experimentos anteriores en los que se realizó la cuantificación de la glucosamina ya indicaban la disminución de este compuesto (y por lo tanto de la biomasa) entre las 48 y 72 horas en FS (Cuadra, 2004). Ullán y *col.* (2004) también han reportado un fenómeno similar en estudios con la misma cepa de *Acremonium chrysogenum*, aunque la disminución observada de biomasa es menos drástica que en nuestro caso. Eventos similares en el perfil de crecimiento se reportan con otras cepas de *Acremonium* (Hoff y *col.*, 2005; Kim y *col.*, 2005). Por otro lado, también se ha reportado la producción de proteasas alcalinas por este microorganismo (Bartoshevich y *col.*, 1983; Isogai y *col.*, 1991), lo cual también podría estar contribuyendo a la aparición de este fenómeno. Esta situación ocurre de manera similar en los cultivos en medio sólido, los cuales alcanzan valores de pH mayores a 8.0 desde las 72 horas, cuando los cultivos se han iniciado con un valor de pH de aproximadamente 5.8 (Cuadra, 2004).

En ambos casos se detecta una disminución rápida de la CPC presente en los cultivos después llegar a 8.0, la cual se puede deber a la hidrólisis química de la CPC a esos valores de pH (Konecny y *col.*, 1972), en combinación con algún tipo de actividad acetilhidrolasa alcalina (Velasco y *col.*, 2001).

8.1.3 Comparación de la producción de CPC en cultivos en medio líquido y sólido de *A. chrysogenum* C10.

Dada la evidencia encontrada, se considera al pH como un parámetro importante a estudiar en la biosíntesis de CPC, puesto que se observó que la producción de este antibiótico se da en un rango muy definido de pH. En el experimento comparativo FL vs. FS en MFAF 2.5× se detectó que la síntesis del antibiótico también se realizaba en exactamente el mismo intervalo (6.4-7.8) observado anteriormente para la FS. Lo anterior muestra que, a pesar de

tratarse de distintos sistemas, las mediciones del pH realizadas son equiparables e indican la misma correlación entre el pH del medio y la producción de CPC.

En general se considera que el pH global de la fase líquida de la FS puede ser considerado diferente de los valores de pH locales de las superficies sólidas cuando se desarrolla el crecimiento, debido a las cargas superficiales y al equilibrio iónico modificado por el efecto del transporte de solutos (Mudgett, 1986). Los resultados de este trabajo son los primeros que indican que el valor global de pH encontrado en FS se relaciona bien con el valor de la FL, debido al intervalo específico en el cual se realiza la producción de CPC.

Se observaron otras características importantes en la comparación FS vs. FL. El crecimiento de *Acremonium chrysogenum* y la producción de CPC fueron más lentas en FS que en líquida cuando el cultivo se encontraba en valores de pH menores a 6.4, pero esas mismas actividades fueron más rápidas en FS que en FL cuando el pH era mayor que el valor mencionado. Se encuentran mayores cantidades de penicilina N en la FL en tiempos previos al de la máxima producción que las encontradas en FS, sugiriendo mejores condiciones de este último sistema que contribuyen ya sea a superar el paso limitante desde penicilina N a desacetoxicefalosporina C, o el paso limitante anterior de isopenicilina N a penicilina N (Skatrud y col., 1989; Zhou y col., 1992; Rodríguez Sáiz y col., 2004, Ullán y col., 2004).

Aún cuando la producción de CPC en FL parece desarrollarse en parte acoplada al crecimiento (Fig 13), las mediciones respirométricas en FS indicaron que la producción de CPC en FS no empieza hasta el final del consumo rápido de O₂, una característica importante que ya había sido observada anteriormente en las mediciones respirométricas de la producción de penicilina en FS (Domínguez y col., 2000). Todo parece indicar que la respirometría es una metodología muy eficiente para indicar el inicio del metabolismo secundario.

8.1.4 Cultivos de *A. chrysogenum* C10 a pH controlado.

A pesar de que se observa un mayor nivel de producción con el medio MCFAM (330 µg/mL) que con MDFAM (60 µg/mL), no es posible lograr un buen control de pH en él a pesar de intentar la regulación del pH con MES. Por dicha razón se descartó continuar con ese medio. La evaluación del paso de lavado con el medio de prueba resultó ser significativa, pues

se observó una mayor variación de los valores de pH en el caso del inóculo sin lavado de medio (el pH desciende 0.6 unidades, en comparación con el inóculo lavado, en el que desciende solamente 0.4 unidades).

Por lo tanto, se encontró que el medio adecuado para mantener el pH constante es el MDFAM, amortiguado con MES 0.125 M. Aunque no permite una alta producción de CPC si sirve para poder evaluar los cambios relacionados con el pH, punto central del trabajo.

Sería interesante, por otra parte, evaluar la producción de CPC en este mismo medio con los otros pH de prueba (6.8 y 7.9), esperando que los datos que aporten ayuden a determinar de forma más concluyente el efecto del pH sobre los cultivos de *A. chrysogenum* y la producción de esta sustancia.

8.2 Estudios moleculares de la producción de cefaloprina C en *Acremonium chrysogenum*

8.2.1 Aislamiento de ADN total de *Acremonium chrysogenum* y obtención de sondas de los genes de biosíntesis de CPC

No se encontró antecedente alguno de dificultades en la extracción de ADN genómico de *A. chrysogenum*, sin embargo nuestros experimentos mostraron dificultades al realizar esta extracción, a pesar de estar utilizando cantidades de micelio liofilizado similares a las utilizadas para la extracción de ADN de hongos como *P. chrysogenum* o *Amylomyces rouxii*. Nuestros resultados indican que la cantidad de proteínas presentes en el micelio de *A. chrysogenum* es mayor que la encontrada en cantidades proporcionales de micelio de los hongos mencionados, aunque también se encontró que cantidades muy pequeñas de micelio liofilizado de *A. chrysogenum* (de hasta 25 mg) son suficientes para la extracción de cantidades de ADN observables en geles de agarosa.

El proceso de amplificación de las 10 sondas a utilizar en los estudios de expresión de *A. chrysogenum*, así como el de los genes a utilizar para producir el mimetismo alcalino en este microorganismo fueron exitosos. Sin embargo, la identificación de las secuencias de las sondas evidenció, en la mayoría de ellas, cambios en uno o dos nucleótidos en comparación con las secuencias reportadas en las bases de datos. No se consideró que esta eventualidad

influyera en la confiabilidad de las sondas para su uso en los estudios de expresión debido a que la similitud con otras secuencias fue mucho menor (<97%), por lo cual no se creyó necesario realizar la secuenciación desde los dos extremos de las secuencias. Entre otras posibilidades que puedan explicar estas diferencias en las secuencias pueden citarse mutaciones debidas a la polimerasa utilizada y/o variaciones dependientes del tipo de cepa.

8.2.2 Análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de CPC en FS y FL de *A. chrysogenum*.

Son pocos los estudios previos relativos a la expresión de genes en cultivos de FS (Biesebeke y col., 2005), y los datos presentados corresponden a tiempos muy tempranos en la fermentación (<48 h). Nuestro estudio sería el primero en presentar observaciones de tiempos avanzados en cultivos para la producción de metabolitos secundarios en FS utilizando bagazo de caña como soporte impregnado, lo cual se tradujo en deficiencias en la calidad del ARN extraído, especialmente en los últimos tiempos de un cultivo. De forma similar a lo observado en los estudios de Barrios González y col. (2008), una alta presencia de pigmentos y carbohidratos en el ARN extraído en tiempos avanzados de cultivo (96-144 h) exige una purificación extra con fenol, aunado a que ya anteriormente se había mencionado la existencia de altas actividades hidrolíticas en los cultivos de *A. chrysogenum* (Velasco y col., 2001).

El efecto fisiológico del ambiente líquido sobre la biomasa y la formación de productos por hongos filamentosos ha sido extensivamente estudiado en FL (Smith y Berry, 1976; Dumenil, 1989) y la poca información disponible del efecto del ambiente sólido en la FS (Biesebeke y col., 2005; Barrios González y col., 2008) indica diferencias en la expresión genética que dan lugar a que la fisiología en medio sólido pueda ser tan diferente que los microorganismos producen enzimas con características diferentes a las reconocidas en FL (Alazard y Rimbault, 1981; Acuña-Arguelles y col., 1995). La evaluación de los niveles de expresión de diferentes genes involucrados en la biosíntesis de CPC a partir del ARN del experimento comparativo FL vs. FS (apartado 7.1.3) mostró por primera vez la existencia de mayores niveles de expresión de los genes que codifican para las actividades epimerasa y de exportación de metabolitos en FS, que se reflejan en el aumento de la producción de CPC en FS (Adinarayana y col., 2003). Por otro lado, a pesar de que se había hipotetizado acerca de la ventaja de este mismo sistema en la provisión de oxígeno, no se encontró diferencia entre la

transcripción del gen *cefEF* en medio líquido y medio sólido. Sin embargo, no puede descartarse que la FS favorezca la producción a nivel de la actividad expandasa/hidroxilasa, al contribuir a una mejor transformación de los intermediarios de la biosíntesis de la CPC en este sistema.

Como se mencionó anteriormente, hubo dificultad para determinar los niveles de expresión de la mitad de los genes incluidos en este estudio. Es posible explicar esto tomando en cuenta las limitaciones propias del método de *Northern blot*, que consisten principalmente en su baja sensibilidad (en comparación con otros métodos de análisis de expresión génica) y en el hecho de que la inmovilización de un ARN blanco a un soporte sólido puede impedir en cierta forma la completa accesibilidad de esas moléculas a una sonda de ácidos nucleicos (Farrell, 2005).

Sin embargo, a pesar de las limitantes expresadas, se considera al *Northern blot* como el mejor análisis para revelar la longitud completa del ARN mensajero en estudio. Fue así que aunque los resultados de hibridación obtenidos con *pcbAB* (datos no mostrados) sugirieron una mayor expresión en FS, su alto tamaño y el grado de degradación del transcrito de este gen bajo las condiciones de análisis produce manchas demasiado difusas que no permitieron evaluar su expresión relativa.

8.2.2.1 Perfil de expresión del gen *actA* en FS y FL

Si bien los resultados de expresión de este gen coinciden con lo reportado por Diez y *col.* (2000), en los que se señala una expresión constante del gen a las 60 y 120 h (en forma similar a lo que sucede en nuestro caso, a las 48 y 72 h), debido a que en este trabajo se pretende verificar resultados de un período más largo de tiempo se descartó este gen como control interno y se eligió la expresión del gen para el ARN ribosomal 18S como referencia.

Es posible que las diferencias en la expresión del gen *actA* en nuestro caso sean debidas a la conocida diferenciación morfológica experimentada por *A. chrysogenum* (Bartoshevich y *col.*, 1990), más aún si se tiene en cuenta que este gen da lugar a una proteína que forma parte del citoesqueleto, con influencia en procesos importantes como la regulación del crecimiento y la diferenciación, endocitosis, exocitosis y la estabilidad estructural (Sheterline y *col.*, 1996).

8.2.2.2 Perfil de expresión del gen *cefEF* en FS y FL

El perfil de expresión observado para este gen fue similar a lo reportado por Schmitt y *col.* (2004) en una cepa mejorada, donde se observa una transcripción bastante homogénea durante todo el tiempo de cultivo. Este dato es congruente con nuestros resultados, teniendo en cuenta que *A. chrysogenum* C10 se considera una cepa de mediana producción y en la que ya existe sobreexpresión de al menos uno de los genes relacionados con la biosíntesis de cefalosporina C (Schmitt y *col.*, 2001). Se ha observado que las reacciones catalizadas por el producto de este gen son pasos limitantes en la producción de CPC, contribuyendo a la acumulación de penicilina N (Skatrud y *col.*, 1989) y que sus actividades catalíticas requieren α -cetoglutarato, Fe^{+2} y O_2 (Dotzlaf y Yeh, 1987). Los niveles de transcripción de este gen fueron similares en ambos sistemas, lo cual descarta, al menos hasta el nivel de la producción de ARN, que éste sea el elemento que determine las diferencias en los niveles encontrados de intermediarios de la ruta en los dos tipos de cultivo.

8.2.2.3 Perfil de expresión del gen *cefD2* en FS y FL

El gen *cefD2* de *A. chrysogenum* codifica para la proteína isopenicilina N-CoA epimerasa, cuya actividad es similar a la actividad epimerasa de sistemas involucrados en la degradación de ácidos grasos raros o metabolitos tóxicos en otras células eucarióticas (Knihinicki y *col.*, 1991; Shieh y Chen, 1993; Schmitz y *col.*, 1995). Se ha observado también que existe una correlación entre la presencia de esta proteína y ciertos tipos de cáncer cuya aparición se correlaciona a su vez con el consumo de alimentos ricos en ácidos grasos de cadenas ramificadas, como el ácido fitánico y el pristánico (Moblely y *col.*, 2003).

En trabajos previos se ha reportado que el proceso en el que participa esta enzima constituye un paso limitante en la producción de CPC en FL (Ullán y *col.*, 2004), limitación también observada en el experimento en el que se comparó la FL vs FS. Nuestro experimento mostró una expresión al menos 3 veces más alta de este gen en FS respecto a la FL, coincidiendo con una mejor transformación de los intermediarios de la ruta de biosíntesis de CPC durante todo el tiempo del cultivo (Fig 13 y Fig 23). En este punto, sería interesante estudiar los mecanismos subyacentes a esta superioridad en FS, pudiéndose especular con que

la acumulación de ciertas sustancias en este sistema, como ácidos grasos de cadena ramificada, pudiera influir en este proceso.

8.2.2.4 Perfil de expresión del gen *cefT* en FS y FL

Se ha descrito el gen *cefT* de *A. chrysogenum* como el gen que codifica para una proteína dentro de la familia de proteínas membranales MFS (*Major Facilitator Superfamily*), proteínas que son bombas de flujo de multisustancias. Este transportador de membrana confiere resistencia a los ácidos isovalérico y fenilacético (Ullán y col., 2002). Se ha mencionado anteriormente que las diferencias entre los cultivos en medio sólido y líquido incluyen condiciones físicas que necesariamente involucran diferencias en la regulación transcripcional de los genes involucrados con los procesos metabólicos (Akao y col., 2002; Biesebeke y col., 2005), siendo nuestro estudio la primera evidencia que confirma esa hipótesis señalando superioridad de la FS en la expresión de un gen relacionado con la exportación de sustancias de la célula. Más aún si se considera la posibilidad sugerida en el estudio de Ullán y colaboradores (2002) de que este gen podría codificar para un sensor: la expresión de este gen en FS estaría indicando la existencia de señales extracelulares estimuladoras de la síntesis de CPC producidas en FS y no en FL.

8.2.2.5 Perfil de expresión del gen *cahB* en FS y FL

Numerosos estudios han descrito la presencia de altos niveles de enzimas hidrolíticas en extractos de hongos filamentosos incubados sobre diferentes sustratos sólidos (Pandey y col., 1999).

Los resultados de hibridación de la sonda para el gen *cahB* podrían estar confirmando lo anterior, ya que sugieren la presencia de distintos genes de acetilhidrolasas expresados por *A. chrysogenum*, que son evidentemente más abundantes en FS que en FL. Esta evidencia es apoyada por los resultados obtenidos por Velasco y col. (2001) en un trabajo en el que, de forma similar a nuestros resultados, se señala la presencia de múltiples actividades acetilhidrolasas en cultivos líquidos de este hongo y en el que además se reportó la posibilidad de hibridación de este gen con la secuencia de un gen de proteasa de *Tritiachium album*, indicando una alta similitud de esta secuencia con la de otras proteínas. Por lo tanto, si bien la

secuencia de la sonda utilizada apoyaría la especificidad de nuestro estudio, no es posible eliminar la posibilidad de que la secuencia del gen descrito por Velasco *y col.* (2001) sea afín a otras acetilhidrolasas, o incluso proteasas, presentes en el genoma de *A. chrysogenum*. Esta eventualidad sugiere el estudio de perspectivas de mejora de cultivos en medio sólido impregnado para la producción de CPC con este microorganismo, a través de la búsqueda de estrategias de disminución de actividades acetilhidrolasas en este sistema.

8.2.3 Producción de protoplastos y resistencia a fleomicina de las cepas de *A. chrysogenum* ATCC11550 y C10.

Se observaron diferencias en el tiempo de obtención de protoplastos con las dos enzimas estudiadas y también en la resistencia a fleomicina de las cepas estudiadas.

Las diferencias en el tiempo de obtención de protoplastos y en la resistencia a fleomicina de las cepas salen fuera del alcance de este estudio, y seguramente son debidas a características genómicas y/o fisiológicas propias de ellas. Sin embargo, las diferencias encontradas en la producción de protoplastos, en relación con el tipo de enzima utilizada, están muy posiblemente relacionadas con las diferencias en la composición de las mezclas enzimáticas utilizadas (Anexo 5). En el caso de la Driselasa prevalece la acción de enzimas degradadoras de polisacáridos, mientras que las enzimas líticas poseen quitinasas y proteasas. Es posible que la rapidez de producción de protoplastos se vea beneficiada por la degradación de los polisacáridos de las células, lo que a su vez parecería estar ejerciendo un efecto adverso sobre la regeneración de protoplastos (algo que no sería tan evidente si no se hubiera realizado la comparación con la regeneración de protoplastos producidos por las enzimas líticas).

La resistencia de los protoplastos a la fleomicina coincidió con lo reportado por Gutiérrez (1994). De la misma forma que se menciona en esta referencia, en nuestro caso se sembraron las transformantes, obtenidas en TSAS, sobre medio LPE con concentración doble de la concentración mínima inhibitoria requerida de fleomicina para utilizarlas posteriormente en la selección primaria.

8.2.4 Clonación del gen *pacC* con mimetismo alcalino y transformación de *A. chrysogenum*

Existen estudios detallados que demuestran los efectos de las mutaciones del gen *pacC* sobre la producción de metabolitos secundarios en hongos, la mayoría de ellos realizados con mutantes obtenidos a través de métodos de genética clásica y por la acción de métodos físicos o químicos (Then Bergh y Brakhage, 1998; revisado ampliamente en Peñalva y Arst 2002; Eisendle y *col.*, 2008) o tratando de realizar la interrupción del gen mediante mecanismos de recombinación homóloga (Flaherty y *col.*, 2008). Este es el primer estudio en el que se aplican los conocimientos de los efectos de mutaciones de mimetismo alcalino en la producción de CPC, realizado a través de ingeniería genética dirigida a la construcción específica, clonación y expresión de secuencias que contienen las características necesarias para producir el efecto de mimetismo alcalino en el gen *pacC* de *A. chrysogenum*.

A pesar de que ninguno de los resultados de los estudios de expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de CPC indicó directamente la regulación por pH, la simple presencia de las secuencias de unión de *pacC* en sus promotores y los resultados encontrados anteriormente por Schmitt y *col.* (2001) indican una alta posibilidad de ver incrementados los títulos de CPC por efecto de las proteínas producidas por cualquiera de las dos construcciones utilizadas.

La dos construcciones utilizadas para realizar la mutación de mimetismo alcalino utilizan los plásmidos pULC43 (Gutiérrez, 1994) y un derivado de éste, el plásmido pSPUAM2 (Sierra, 2005). La característica principal de estos plásmidos es la presencia del gen de resistencia a fleomicina bajo el control del promotor del gen *pcbC*, el cual es reconocido por *A. chrysogenum*. Los fragmentos introducidos en estos plásmidos consisten en:

- *pacC12*: el gen *pacC* amplificado del ADN de *A. chrysogenum* C10 hasta la señal de localización nuclear (Schmitt y *col.*, 2001) acoplado con el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* (obtenido del plásmido pAN52.1 (NCBI gi: 475161)), el cual ya ha sido utilizado anteriormente en estudios con *A. chrysogenum* (DeModena y *col.*, 1993)
- *pacC1*: el gen *pacC* completo amplificado del ADN de *A. chrysogenum* C10. La secuencia obtenida difiere en 1 nucleótido de la reportada por Schmitt y *col.* (2001), lo que podría tener diferentes explicaciones (desde errores en el proceso de amplificación hasta diferencias propias de la cepa).

Los objetivos de introducir estas construcciones en los genomas de las cepas de *A. chrysoenum* fueron poder tener un efecto de mimetismo alcalino, aumentar el número de copias del gen productor de la proteína nativa o activa y/o realizar la disrupción del gen endógeno, para verificar el efecto de estas estrategias en la producción de CPC. Se ha reportado que la recombinación homóloga es un evento muy raro en *A. chrysoenum* (Walz y Kück, 1993; Schmitt y col., 2004c) y la mayoría de eventos de integración del ADN se realizan via transformación heteróloga y con muy baja eficiencia. Sin embargo, no es posible excluir ninguno de los dos eventos en nuestro estudio.

8.2.4.1 Transformación de *A. chrysoenum* ATCC 11550 y C10 y selección primaria de las transformantes.

Se observó una frecuencia de transformación muy baja de *A. chrysoenum* con los dos plásmidos estudiados, pero en mayor magnitud con la cepa C10 que con la cepa silvestre de Brotzu. Es posible que la mayor cantidad de mutaciones presentes en la cepa de mediana producción le confieran menor capacidad de recepción de cambios, pero que cuando se realizan presenten un mayor impacto que los cambios realizados en la cepa silvestre.

Los diferentes cambios observados en las transformantes, que incluyen morfología colonial más compacta, disminución en la magnitud del crecimiento, así como variación del perfil de pH en la FL, indican que la introducción de las secuencias codificadas en los plásmidos pLpacC1 y pLXPA está dando lugar efectivamente a estos cambios en las cepas estudiadas. Es posible que debido a la introducción de las secuencias de estudio se esté realizando la expresión de genes que normalmente no se expresarían en la condición probada, implicando simultáneamente la limitación de la expresión de genes involucrados con el crecimiento y/o el consumo de nutrientes.

Por otro lado, la selección primaria de las transformantes indicó que no se presenta ningún efecto por la introducción de los plásmidos pULC43 y pSPUAM2. Sin embargo, la introducción del plásmido pLXTtrpC mostró el efecto de eliminar la producción de CPC en las transformantes de la cepa silvestre. Es posible que la inserción del terminador *Ttrp* de *A. nidulans* se esté realizando en genes involucrados con la producción de CPC, contribuyendo a la terminación de la transcripción de alguno de ellos y por lo tanto al cese en la producción de

este antibiótico. Sin embargo, al no observarse este fenómeno en las transformantes de la cepa C10 parecería indicar que el efecto podría estar ejerciendo sobre algún elemento regulador, que no participaría de la misma forma en la cepa mejorada y en la silvestre. Otra posibilidad que contribuya a este efecto es algún mecanismo mediante el cual los elementos componentes del plásmido pLXTtrpC funcionaran como atractores de la maquinaria de transcripción, captando de esta forma los elementos necesarios para la transcripción de los genes de biosíntesis de CPC.

La selección primaria, que se basó en la utilización del método de cilindros de agar, ha demostrado ser de utilidad para la elección de cepas con mejoras en la producción de CPC (Trilli y col. 1978). Su uso, sin embargo, se ve limitado dependiendo del tipo de cambios genéticos y el efecto que se espera de estos, lo cual requeriría del medio y tiempo de muestreo apropiados para hacer una selección adecuada. Otra forma de selección que ha mostrado tener un alto grado de efectividad en la selección de cepas de *A. chrysogenum* es la utilización de características morfológicas, del tal forma que las cepas que formen colonias compactas serán las mejores productoras (Vialta y col. 1997). En nuestro estudio las dos metodologías fueron contempladas, aunque no se encontró ninguna transformante de la cepa silvestre que formara colonias compactas en el medio LPE, y ninguna mostró un nivel de producción de CPC significativamente diferente al de la cepa parental en FL. Para las transformantes de la cepa C10 si se pudieron aplicar los dos tipos de selección y de todas las cepas seleccionadas por los dos métodos para la comparación en FL, al menos una de las elegidas por el criterio morfológico mostró un nivel de producción de CPC mayor al de la cepa parental. Por lo tanto, se considera la selección morfológica como un mejor criterio de selección de las transformantes en este estudio.

La mayoría de las transformantes evaluadas mostraron un menor nivel de producción volumétrica de CPC que las cepas parentales. El bajo crecimiento mostrado por las cepas transformantes, que llega a ser de hasta una cuarta parte de lo observado en las cepas parentales, podría ser la causa principal del bajo nivel de producción volumétrica reportado. Por ello, es posible que la determinación de la producción específica pudiera señalar ventajas en el nivel de producción de estas cepas. Otra posible explicación para los resultados observados en las transformantes del plásmido que contiene la secuencia *pacC12* es que

debido a la presencia de sitios de unión de *pacC* en el mismo gen, exista algún tipo de autorregulación que esté limitando su misma expresión, y por lo tanto la expresión de los genes que regula. Una posibilidad más remota que ha sido utilizada para explicar este tipo de comportamiento de las transformantes es que éste es consecuencia de la integración homóloga de los plásmidos introducidos (Gutiérrez, 1994), cuyo efecto sería la distorsión del ambiente genético endógeno que llevaría al efecto contrario al esperado, es decir a una secuencia codificante de una proteína resistente al procesamiento proteolítico y por lo tanto dando lugar al mimetismo ácido, y en consecuencia a una menor producción de CPC (Mingot y col. 1999).

Sin embargo, debido a los cambios en los niveles de producción y cinética de pH de las transformantes estudiadas no es posible negar la inserción de los plásmidos utilizados. Finalmente, al tratarse de un regulador molecular de rango amplio de la transcripción genética del hongo, es posible que su efecto sea más evidente en la cepa mejorada debido a que las mutaciones ya presentes en ésta potencien la producción de CPC. Las reflexiones anteriores muestran que existe la necesidad de más análisis que permitan definir la extensión en la que las inserciones pueden estar afectando a las cepas de *A. chrysogenum* estudiadas.

8.2.4.2 Evaluación de la producción de CPC en cepas transformantes de *A. chrysogenum*.

A pesar de que en la selección primaria en FL líquida la cepa CA01 demostró un nivel de producción de CPC mayor que la parental C10, al realizar la FL con mayores unidades de análisis no se observaron diferencias entre ellas. Una posible explicación de estos resultados es que exista un fenómeno de autorregulación del gen que no esté permitiendo obtener el efecto de mimetismo alcalino deseado de este tipo de transformantes. Por otro lado, se ha reportado que los fenómenos de rearrreglos cromosómicos que a veces se dan en cepas mutadas pueden llevar a la pérdida de ciertas características, anteriormente observables en ellas. Lo anterior, aunado a que para el almacenamiento de la cepa previo a su utilización en el último experimento se realizó el tercer pase del cultivo sobre medio sin fleomicina (es decir, sin presión selectiva), podría haber tenido como consecuencia la pérdida de la característica en la cepa.

En trabajos realizados con *A. nidulans* se ha observado que es posible que una mutación puntual en la secuencia que codifica para la región determinante del procesamiento

de PACC dé origen al efecto de mimetismo alcalino (Mingot y *col.*, 1999), con lo cual existe una alta probabilidad de producir una mutación de mimetismo alcalino mediante la introducción de la secuencia de *pacC* contenida en nuestro plásmido pLpacC1.

Los criterios que definen las características que debe presentar un gen para considerar que se encuentra regulado por pH ambiental ya han sido descritos detalladamente (Arst y Peñalva (2003b)). El primero de los criterios consiste en observar un incremento progresivo de la expresión de los genes en estudio. Los datos de expresión del experimento FS vs FL en MFAF 2.5× indican que el gen *cefD2* (perteneciente a los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de CPC), el gen *cefT* (exportación) y dos de los transcritos que hibridaron con la sonda *cahB* muestran aumento de su expresión tanto en medio líquido como sólido conforme aumenta el pH, por lo que se tienen indicios de que al menos uno de los genes pertenecientes a las primera fase de la ruta de biosíntesis de CPC (*cefD2*) pueda cumplir con la primera condición, y que una mutación de mimetismo alcalino pueda resultar beneficiosa para la producción de CPC, siempre y cuando supere algún efecto en la expresión de genes de hidrolasas y/o proteasas.

El segundo criterio a cumplir para evidenciar la regulación por pH consiste en demostrar que una mutación de mimetismo alcalino afectaría los genes, de tal forma que se observara un incremento progresivo de la expresión al disminuir el pH. En el cultivo a pH ácido en medio definido se observó un aumento de la producción específica de CPC en la transformante de las 72 a las 96 h, sin embargo ésta se mantiene aproximadamente constante el resto del cultivo, lo cual sugeriría el rechazo del segundo criterio al menos para el caso de los últimos genes de biosíntesis de CPC. Por otro lado, se observa un aumento constante y aproximadamente exponencial de la producción específica de antibióticos totales producidos por la cepa transformante, lo cual puede deberse a un aumento de la transcripción de los genes involucrados en la ruta; sugiriendo la presencia del mimetismo alcalino en esta cepa. La evaluación de la expresión de los genes que se han señalado como codificantes de pasos limitantes de la ruta (*pcbAB*, *cefD2*, *cefEF* y *cefG*), en cultivos líquidos en medio definido con pH controlado ácido (5.5) y alcalino (7.8), y la comparación de resultados entre cepa parental y transformante confirmarán no solamente la realización de una mutación de mimetismo alcalino sino también la efectividad de esta estrategia de mejoramiento genético en la producción de CPC.

9. Conclusiones

- *Acremonium chrysogenum* C10 presentó dificultad de crecimiento a valores de pH menores de 5.8, tanto en cultivos líquidos como sólidos, determinando que el inicio de cultivos en estos sistemas con amortiguador de fosfatos no puede ser menor a este valor.
- Tanto en cultivos en medio sólido como en medio líquido existe un intervalo de pH en el cual se realiza la producción de CPC y se encuentra entre valores de pH de 6.4 a 7.8.
- Una alta concentración de nutrientes en el medio permite una mayor producción de CPC, siempre y cuando exista una forma de mantener el pH dentro de valores que no afecten negativamente la producción de este metabolito.
- Se mostró el efecto del pH como un elemento importante a controlar en FS y FL para la producción de CPC con *A. chrysogenum*.
- No se consideró a *actA* como un gen de expresión constitutiva que sirva para determinar los niveles de expresión relativa de los genes de este estudio ya que se detectaron diferencias significativas en su expresión en los diferentes tiempos de cultivo de FS y FL.
- La expresión del gen *cefEF* es fuerte, constante y homogénea durante todo el tiempo en FS y FL, sin mostrar diferencias significativas entre estos sistemas de cultivo.
- Se observa una mayor expresión de los genes *cefD2*, *cefT* y *cahB* en FS que en FL, siendo probablemente la mayor expresión de los dos primeros la causa de la menor cantidad de intermediarios de la ruta de biosíntesis de CPC en FS.
- Solamente la expresión de los genes *cefT* y *cefD2* y de los transcritos de identidad desconocida de aproximadamente 8 y 5 kb que hibridan con la sonda *cahB*, aumentan con el incremento del pH, sugiriendo la posibilidad de encontrarse regulados por *pacC*.
- La introducción del plásmido con el gen *pacC1* produjo, al menos, una transformante de *A. chrysogenum* capaz de producir 55% mayor cantidad de CPC que la cepa parental C10, confirmando el beneficio de usar esta estrategia para el mejoramiento genético.

10. Bibliografía

- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V y Jhansi Lakshmi P. 2003. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation of *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*. 39(2):171-177
- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus Níger* in submerged and solid state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:808-814
- Akao T, Gomi K, Goto K, Okazaki N y Akita O. 2002. Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr Genet* 41:275-281
- Alazard D, Raimbault M. Comparative study of Amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *Euro J Appl Microbiol* 12: 113-117
- Arst HN Jr y Peñalva MA. 2003a. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19:224-31
- Arst HN Jr y Peñalva MA. 2003b. Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal genetics and biology* 40:1-3
- Arst HN Jr, Bignell E y Tilburn J. 1994. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 245:787-790
- Baker, RE y Masison DC. 1990. Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere-binding protein CP1. *Mol. Cell. Biol.* 10:2458-2467
- Barber MS, Giesecke U, Reichert A y Minas W. 2004. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 88:179-215
- Barredo JL, Díez B, Alvarez E, Martín JF. 1989. Large amplification of a 35-kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Gen* 16(5-6):453-459.
- Barredo JL. 1990. Análisis de una región del genoma de *Penicillium chrysogenum* que contiene los genes *pcbC* y *penDE*. Tesis doctoral. Universidad de León
- Barrios-González J, Tomasini A, Viniegra-González G, Lopez L. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol Lett* 10:793-798
- Barrios-González J y Tomasini A. 1996. Production of aflatoxins in solid state fermentation. *J Sci Ind Res* 55:424-430
- Barrios-González J y Mejía A. 1996. Production of secondary metabolites by solid state fermentation. *Biotechnology Annual Review* 2: 85-121
- Barrios-González J, Baños J, Covarrubias A, Garay-Arroyo A. 2008. *Lovastatin biosynthetic genes of Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:179-186
- Baños JG, Tomasini A, Száckacs G, Barrios-González J. 2005. Fisiología y producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida de dos fases. VI Congreso nacional de biología molecular y celular de hongos. Michoacán México
- Bartoshevich IuE, Iudina OD, Shuvalova IA, Novak MI, Dmitrieva SV. 1983 Correlation of cephalosporin C synthesis and proteolytic enzymes in a differentiating culture of *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*) mutants. *Antibiotiki* 28(1): 3-10
- Berdy J. 1980. Bleomycin type antibiotics. Handbook of antibiotic compounds vol IV (pp 459-491). CRC Press, Boca Ratón. EUA
- Biesebeke R te, van Biezen N, de Vos WM, van den Holden CAMJJ y Punt J. 2005. Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:75-82
- Brakhage A. 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 547-585
- Brotzu G. 1948. Ricerche Su di un Nuovo Antibiotico. Lavori dell'Istituto D'Igiene di Cagliari. 1-11
- Caddick MX, Brownlee AG y Arst HN Jr. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203:346-353
- Cai M y Davis RW. 1990. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-loop protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* 61:437-446

- Calcagno-Pizareli A, Negrete-Urtasun S, Denison S, Rudnicka J, Bussink A, Múnera-Huertas T, Stanton L, Hervás-Aguilar A, Tilburn J, Espeso E, Arst jr H y Peñalva MA. 2007. Establishment of the ambient pH signalling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assist plasma membrane localization of PalH. *Eukaryotic cell* 6(12):2365-2375
- Caldtrider PG y Niss HF. 1966. Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl. Microbiol.* 14:746-753
- Clark JM. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 16, 9677-86
- Collins CM y Hall. 1985. Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycins, bleomycins and Tallisomycins. *Plasmid.* 14:143-151
- Cuadra T. 2004. Producción de cefalosporina C por fermentación en medio sólido de *Acremonium chrysogenum* C10. Tesis para obtener el grado de maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México
- Demain AL. 1983. Biosynthesis of β -lactam antibiotics. In: Demain AL& Solomon NA (ed.). Antibiotics containing the β -lactam structure (pp 189-228). Springer-Verlag, Berlín
- DeModena JA, Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Fachini RA, Galazzo JL, Hughes DE y Martín JF. 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobine. *Bio/Technology* 11:926-929
- Denison SH, Orejas M y Arst HN Jr. 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 270:28519–28522
- Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30:259–264
- Díez B, Mellado E, Rodríguez M, Fouces R y Barredo JL. 1997. Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 216-226
- Díez E, Álvaro J, Espeso EA, Rainbow L y Suárez T 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21:1350–1359
- Dotzlaef JE y Yeh W-K. 1987. Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *J Bacteriol* 169: 1611–1618
- Domínguez M, Mejía A, Barrios-González J. 2000. Respiration studies of penicillin solid-state fermentation. *J Biosc Bioeng.* 89(5):409-413
- Drocourt D, Camels T, Reynes JP, Baron M y Tiraba G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* *ble* gene for the transformation of lower and higher eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* 18:4009-4009
- Dumenil GS. 1989. En : Larpent JP, Sanglier JJ (eds) Biotechnologie des antibiotiques. Paris, Masson 195-917
- Einsendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P y Haas H. 2008. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the pacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* 3(2):561-563
- Elander RP. 2003. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:385–392
- Espeso EA y Arst HN Jr. 2000. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell. Biol.* 20:3355–3363
- Espeso EA y Peñalva MA. 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 28825-28830
- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr. y Peñalva MA. 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12:3947-3956
- Espeso EA, Tilburn J, Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr. y Peñalva MA. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* 274:466–480
- Espeso EA, Roncal T, Díez E, Rainbow L y Bignell E 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19:719–728
- Farrell RE jr. 2005. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. Elsevier Academic Press. California.USA
- Fernández-Martínez J, Brown CV, Díez E, Tilburn J y Arst HN Jr 2003. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* 334:667–684

- Fernández Perrino FJ. 1997. Caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (penDE) de la ruta de penicilina. Tesis Doctorado en Biología. Universidad de León. España
- Fierro F, Barredo JL, Díez B, Fernández FJ y Martín JF. 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6200-6204
- Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm HM y Woloshuk CP. 2003. PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* 69(9): 5222-5227
- Fujisawa Y, Shirafuji H, Kida M, Nara K, Yoneda M y Kanzaki T. 1973. New findings on cephalosporin C biosynthesis. *Nature New Biol.* 246: 154-155
- Fujisawa Y, Shirafuji H, Kida M, Nara K, Yoneda M y Kanzaki T. 1975. Accumulation of deacetylcephalosporin C by cephalosporin C negative mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Agr. Biol. Chem.* 39:1295-1301
- Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S y Suzuki K. 1999. The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 260:559–568
- Gagnon A, Baron M y Tiraby G. 1987. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene form transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. genet.* 207:342-348
- Genilloud O, Garrido MC y Moreno F. 1984. The transposon TN5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene.* 32:225-233
- Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E y Martín JF. 1991. Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding α -aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: Linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin-biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.* 173: 2354-2365
- Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ y Martín JF. 1992. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 174: 3056-3064
- Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B y Martín JF. 1997. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:606-614.
- Gutiérrez S. 1994. Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España
- Herold T, Bayer T y Schugerl K. 1988. Cephalosporin production in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:168-173
- Hertzberg RP, Carafa MJ y Hecht SM. 1985 DNA methylation diminishes bleomycins mediated strand scissions. *Biochem.* 24:5285-5289
- Hervás-Aguilar A, Rodríguez J, Tilburn J, Arst H y Peñalva MA. 2007. Evidence for de direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* 282(48):34735-34747
- Holmes DS y Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197
- Hoff B, Schmitt EK y Ulrich Kück. 2005. CPCRI, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*. *Mol Microbiol* 56 (5):1220-1233
- Isogai T, Fukagawa M, Kojo H, Kohsaka M, Aoki H y Imanaka H. 1991. Cloning and nucleotide sequences of the complementary and genomic DNAs for the alkaline protease from *Acremonium chrysogenum*. *Agric Biol Chem* 55:471–477
- Jekosch K y Kück U. 2000a. Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. *Curr. Genet.* 37:388-395
- Jekosch K y Kück U. 2000b. Glucose repression is lost in an *Acremonium chrysogenum* β -lactam producer strain and can be restored by multiple copies of the *cre1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:556-563
- Jermini MFG y Demain AL. 1989. Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. *Experientia* 45:1061-1065
- Kennedy J y Turner G. 1996. δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 253:189-197

- Kim JH, Lim JS, Kim CH y Kim SW. 2005. Morphology and kinetics studies on cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium* M25 in a 30-l bioreactor using a mixture of inocula. *Lett Appl Microbiol* 40 (5): 307-311
- Knihinicki RD, Day RO y Williams KM. 1991. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs--II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters. *Biochem Pharmacol.* 42(10):1905-1911
- Konecny J, Felber E, Gruner J. 1972. Kinetic of the hydrolysis of cephalosporin C. *J Antibiot* 26:135–141
- LePage GA y Campbell E. 1946. Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* 162: 163-171
- Maccheroni W, May GS, Martinez-Rossi NM y Rossi A. 1997. The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 194:163–67
- Maki M, Kitaura Y, Satoh H, Ohkouchi S, Shibata H. 2002. Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1600:51–60
- Malmberg LH y Hu WS. 1991. Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Bioeng.* 38:941-947
- Malmberg LH y Hu WS. 1992. Identification of rate limiting steps in cephalosporin C biosynthesis in *Cephalosporium acremonium*: a theoretical analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:122-128
- Maniatis T, Frist EF y Sambrook J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York
- Mathison L, Soliday C, Stephan T, Aldrich T y Rambossek J. 1993. Cloning, characterization and use in strain improvement of *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyltransferase. *Curr. Genet.* 23:33
- McKenzie T, Hoshino T, Tanaka T y Sueoka N. 1986. The nucleotide sequence of pUB110; some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid.* 15:93-103
- Mellor J, Jiang W, Funk M, Rathjen J, Barnes CA, Hinz T, Hegemann JH y Philippsen P. 1990. CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *EMBO J.* 9:4017-4026
- Mezei LM y Storts DR. 1994. Purification of PCR products, en: PCR technology: Current innovations Griffin HG y Griffin AM, eds. CRC Press, Boca Raton, FL 21
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31:426-429
- Miller J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 352-355
- Mingot JM, Tilburn J, Díez E, Bignel E y Orejas M 1999. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19:1390–1400
- Mingot JM, Espeso EA, Díez E y Peñalva MA. 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21:1688–1699
- Mobley JA, Leav I, Zielie P, Wotkowitz C, Evans J, Lam YW, L'Esperance BS, Jiang Z y Ho SM. 2003. Branched fatty acids in dairy and beef products markedly enhance α -methylacyl-CoA racemase expression in prostate cancer cells in vitro. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 12:775-783
- Mudgget RE. 1986. En: Demain AL, Solomon NA (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington: American Society for Microbiology. pp 66-84
- Negrete-Urtasun S, Denison SH y Arst HN Jr. 1997. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* 179:1832–35
- Negrete-Urtasun S, Reiter W, Díez E, Denison SH y Tilburn J 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* 33:994–1003
- Newert RW, Barton B, Greaves P, Harper J y Turner G 1997. Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:18-27
- Newton GGF y Abraham EP. 1954. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem. J.* 58:103-111.
- Newton CR y Graham A. 1994. En: PCR, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, 13
- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN Jr. y Peñalva MA. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9:1622–1632

- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR y Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 77:149-162
- Paniagua DS. 2004. "Complementación de la ruta metabólica de cefalosporina en *Penicillium chrysogenum* con el gen *cefD* de *Nocardia lactamdurans*". Servicio Social para obtener el grado de Ingeniero Bioquímico Industrial. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Peberdy JF. 1987. Genetics of *Acremonium*. En: *Penicillium and Acremonium-Biotechnology Handbooks* (Peberdy JF Ed) Vol 1. Plenum Press, New York. pp 122-126
- Peñalva MA y Arst HN Jr. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:426-446
- Peñalva MA y Arst HN Jr. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:425-451
- Peñalva MA, Rowlands RT y Turner G. 1998. The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol.* 16:483-489
- Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, Chapman JL y Kaster KR. 1985. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Microbiology* 468-472
- Robles J y Doers M. 1994. pGEM[®]-T vector systems troubleshooting guide. Promega Notes 45, 19-20
- Rodríguez-Sáiz M, Lembo M, Bertetti L, Muraca R, Velasco J, Malcangi A, de la Fuente J y Barredo JL. 2004. Strain improvement for cephalosporin production by *Acremonium chrysogenum* using geneticin as a suitable transformation marker. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:43-49
- Sambrook J y Russell DW. 2001. Molecular cloning. a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, van Frank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW e Ingolia TD. 1985. Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* 318:191-194.
- Samson SM, Dotlaf JE, Slisz ML, Becker GW van Frank RM, Veal LE, Yeh W, Miller JR Queener SW e Ingolia TD. 1987. Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Biotechnol.* 5:1207-1214
- Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernandez MR, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Dufour D, Raimbault M. 1994. Online automated monitoring and control-systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid state fermentations. *Process Biochem* 29(1):13-24
- Schmitt EK y Kück U. 2000. The fungal CPC1 protein, which binds specifically to β -lactam biosynthesis genes is related to human RFX transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275:9348-9357
- Schmitt EK, Kempken R y Kück U. 2001. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics.* 265:508-518
- Schmitt EK, Bunse A, Janus D, Hoff B, Friedlin E, Kürnsteiner H y Kück U. 2004a. The winged helix transcription factor CPC1 is involved in the regulation of β -lactam biosynthesis in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell.* 3:121-134
- Schmitt EK, Hoff Birgit y Kück U. 2004b. AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with the RFX transcription factor CPC1 in the cephalosporin C-producing fungus *Acremonium chrysogenum*. *Gene.* 342:269-281
- Schmitt EK, Hoff Birgit y Kück U. 2004c. Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 88:1-43
- Schmitz W, Fingerhut R y Conzelmann E. 1994. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 222: 313-323
- Schmitz W, Albers C, Fingerhut R y Conzelmann E. 1995. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur. J. Biochem.* 231(3):815-822
- Serrano R, Cid A, Caldeira MT, Eraso P, de Larrinoa IF, Ferrando A, Frías I, Gaxiola R, Glaser HU, Barz E, Márquez JE, Miralles V, Monk BC, Montesinos C, Montrichard F, Palmgrem MG, Pardo JM, Portillo F, Roldán M, Vallejo CG y Villalba JM. 1993. Métodos de bioquímica y biología molecular. Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Valencia, España

- Shah AJJ, Tilburn MW, Adlard MW y Arst HN Jr. 1991. pH regulation in penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:209-212
- Shelterline P, Clayton J y Sparrow JC. 1996. In: *Actins*, 3era ed. Academic Press. Londres
- Shen Y-Q, Wolfe S y Demain AL. 1986. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/technology* 4: 61-64
- Shieh WR y Chen CS. 1993. Purification and characterization of a novel 2-arylpropionyl-CoA epimerases from rat liver cytosol and mitochondria. *J Biol Chem* 268:3487–3493
- Sierra E. 2005. Construcción de un cósmico para la clonación y expresión de genes fúngicos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México
- Skatrud PL y Queener SW. 1989. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene.* 79:331
- Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL y Queener SW. 1989. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* 7: 477-485
- Smith DJ, Bull TH, Edwards J y Turner G. 1989. Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet.* 216: 492-497
- Smith JE y Berry DJ. 1976. An introduction to biochemistry of fungal development. London. New York; Academic Press
- Sorimachi H y Suzuki K. 2001. The structure of calpain. *J. Biochem.* 129:653–664
- Specht CA, DiRusso C, Novotny CP y Ullrich RC. 1982. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119:158-163
- Suárez T, Arst Jr. HN, Turner G y Peñalva MA. 2002. Penicillin production using transgenic meridioid strains. International patent application PCT/ES00/00464
- Suárez T y Peñalva MA. 1996. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20: 529-540
- Then-Berg K y Brakhage AA. 1998. Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PACC. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:843-849
- Thomas D, Cherest H y Surdin-Kerjan Y. 1989. Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Mol. Cell. Biol.* 9:3292-3298.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA y Orejas M 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
- Trilli A, Michelini V, Mantovani V y Pirt J. 1978. Development of the agar disk method for the rapid selection of cephalosporin producers with improved yields. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 13(1):7-13
- Turgay K, Krause M y Marahiel MA. 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* 6(4):529-546.
- Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S y Martín JF. 2002. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of Isopenicillin N into Penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 277(48):46216-46225
- Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L y Martín JF. 2004. Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis. *Mol.Gen. Genomics.* 272: 562-570
- Usher JJ, Lewis MA, Hughes DW y Compton BJ. 1988. Development of the cephalosporin C fermentation taking into account the instability of cephalosporin C. *Biotechnol. Lett.* 10:543-548
- Usher JJ, Hughes DW, Lewis MA y Chiang SD. 1992. Determination of the rate limiting step(s) in the biosynthetic pathways leading to penicillin and cephalosporin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 10:157-163
- Valegård K, Terwisscha van Scheltinga AC, Dubus A, Ranghino G, Öster LM, Hajdu J y Andersson I. 2004. The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme. *Nat Struct Mol Biol* 11:95–101
- Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C y Martín JF. 1994. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC* y *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 176(4): 985-991

- Verbeet MP, Klootwick J, van Heerikhuizen H, Fonijn R, Vreugdenhil E y Planta RJ. 1983. Molecular cloning of the rADN of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* 23:52-63
- Vialta A, Ferreira Catani C, Bonatelli Jr R y Lúcio Acevedo J. 1997. Cephalosporin C production and genetic improvement of the fungus *Acremonium chrysogenum* based on morphological mutant isolation. *Braz. J. Genet.* 20(2):165-170
- Wang HH, Chiou JY, Hong CY y Tsen WC. 1984. Cephalosporin C production by solid state fermentation with rice grains (Article en chino). *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 17(1):55-69
- Wang NS. 2003. Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric method. Department of Chemical Engineering. University of Maryland. nsw@eng.umd.edu.
- Walz M y Kück U. 1991. Polymorphic karyotypes in related *Acremonium chrysogenum* strains. *Curr. Genet.* 19: 73-76
- Walz M y Kück U. 1993. Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Curr. Genet.* 24:421-427
- Zhang JY, Demain AL. 1991. Regulation of ACV synthetase in penicillin- and cephalosporin-producing microorganisms. *Biotech. Adv.* 9:623-641
- Zhou W, Holzhauer-Rieger K, Dors M y Schügerl K. 1994. Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C. *Enzyme Microb Technol* 10:848-854

Anexos

Anexo 1.

Ensayo General de Potencia de Cefalosporina C

Condiciones Generales para el Ensayo

Medio de cultivo:	TSA 1%
Microorganismo de prueba:	<i>Escherichia coli</i> ESS 2231
Absorbancia de inóculo a 600 nm:	1
Concentración de inóculo en el medio de cultivo:	1 mL por cada 15 mL de medio
Volumen de penicilinasas en ensayo	CSP inhibir 100 µg/mL de penicilina
Medio inoculado a verter en placa (150 × 15 mm):	50 mL
Medio inoculado a verter en bandeja:	220 mL
Concentraciones de estándar :	25, 15, 10, 5, 2.5 µg/mL
Diámetro de las perforaciones en el agar:	8 mm
Volumen de st. o muestra a inocular en cada perforación:	60 µL

Técnica

Pesar exactamente una cantidad de estándar equivalente a 100 mg de cefalosporina C sal de zinc (base seca). Colocar en matraz volumétrico de 100 mL, disolver en EDTA 0.01M y llevar a volumen.

De la solución anterior tomar una alícuota de 25 mL colocarla en matraz volumétrico de 50 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada. Esta solución stock tiene una concentración de 500 microgramos de Cefalosporina C, sal de zinc/mL

Curva de calibración

De la solución stock tomar una alícuota de 5 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada. Concentración final: 25 µg/mL

Tomar una alícuota de 3 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. Concentración final: 15 µg/mL

De la solución stock tomar una alícuota de 1 mL colocarla en un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con agua destilada. (oncentración final: 10 µg/mL

Tomar una alícuota de 1 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. Concentración final: 5 µg/mL

De la solución stock tomar una alícuota de 0.5 mL colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. Concentración final: 2.5 µg/mL

Una vez cargadas las placas de bioensayo, se incuban a 4 °C durante al menos 1 h, tiempo en el que el antibiótico difundirá al medio. Después de ese tiempo las placas de bioensayo se incubarán durante 12-15 h a 37 °C. El antibiótico presente en el medio inhibirá el crecimiento del microorganismo inoculado, dando lugar a halos de inhibición de crecimiento. Los tamaños de los halos de inhibición obtenidos se encuentran entre los 15 y los 28 mm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de cefalosporina C sal de zinc nos permiten realizar una recta patrón que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de cefalosporina con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en el bioensayo. La interpolación en esta recta de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitirá determinar la concentración de antibiótico en los caldos de fermentación.

Preparación de penicilinasa de *B. cereus* para bioensayo.

1. A partir de glicerol se siembra *Bacillus cereus* en TSA 2% y se incuba a 30 °C durante 18-24 h.
2. Se toma 1 colonia y se siembra en 100 mL de medio Bactocasitone al que se le agregaron 50 U/mL de penicilina G (300 mg totales \equiv 3 mL de una solución de penicilina G 1 mg/mL). Se incuba a 30 °C durante 18 h.
3. El caldo se recoge por centrifugación y posteriormente se esteriliza por doble filtración. Esta preparación no actúa sobre DAC ó CPC pero sí sobre penicilina N.
4. Se hacen pruebas agregando diferentes cantidades de esta preparación de penicilinasa (0, 50, 100 y 200 μ L) en 30 mL de TSA 1% vertido en cajas de 100 \times 15 mm y retando la degradación de 60 μ L de una solución de penicilina G 100 mg/mL.
5. En el bioensayo en caja se utiliza una cantidad de penicilinasa proporcional a la utilizada para degradar la solución de penicilina en las cajas de Petri 100 \times 15 mm.

Medio Bactocasitone: (g/L) casaminoácidos 20, KH₂PO₄ 6.5, FeSO₄ (1 mg/mL) 1 mL, MgSO₄·7H₂O 0.4. Ajustar a pH 7.3 con KOH.

Anexo 2.

Ensayo para la determinación de azúcares totales (DNS modificado)

(Miller, 1959; Wang, 2003)

Curva Patrón

Tubo	Volumen de solución estándar de glucosa (1g/L) (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Cada uno de estos tubos se hace por duplicado.

Procedimiento

1. Colocar 1 mL de muestra en un tubo de ensayo
2. Agregar 20 microlitros de HCl concentrado a la muestra (1), agitar en el vortex
3. Permitir la hidrólisis a 90°C durante 5 minutos
4. Agregar 50 microlitros de KOH 5 N para neutralizar el ácido, agitar en el vortex
5. Adicionar 1 mL de reactivo DNS, agitar en el vortex
6. Llevar a ebullición en baño maría durante 5 minutos
7. Enfriar inmediatamente con hielo o agua helada
8. Agregar 8 mL de agua destilada
9. Agitar en vortex y leer la absorbancia a 575 nm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de glucosa nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente la concentración de glucosa con la absorbancia. La interpolación en esta recta de las absorbancias de las muestras problema permitirá determinar la concentración de glucosa en los caldos de fermentación.

Anexo 3.

Prueba de Glucosamina

Curva Patrón

Tubo	Volumen de solución estándar de glucosamina (1 mg/mL) (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Concentración de glucosamina en el tubo (mg/mL)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Cada uno de estos tubos se hace por duplicado.

Procedimiento

1. Pesar 0.3 g de soporte cultivado secado a 60 °C durante 48 h.
2. Agregar 5 mL de ácido sulfúrico al 72%
3. Incubar a 25 °C y 130 rpm durante 30 minutos
4. Diluir con 54 mL de agua destilada
5. Calentar en autoclave la mezcla a 121 °C y 15 lbs de presión durante 1 hora.
6. Neutralizar a pH 7.0 con hidróxido de sodio 10 M y 0.5 M (anotar volúmenes)
7. Centrifugar
8. Tomar 2 mL de muestra hidrolizada (sobrenadante del centrifugado)
9. Agregar 1 mL de solución A (1 mL de acetilacetona en 50 mL de carbonato de sodio 0.5 N, de preparación reciente).
10. Agregar 1 mL de agua destilada
11. Llevar a baño maría durante 15 minutos
12. Enfriar los tubos y adicionar 4 mL de etanol
13. Adicionar 1 mL de reactivo B (0.8 g de p-dimetilamino benzaldehído disuelto en 30 mL de HCl 12 N más 30 mL de metanol)
14. Adicionar 1 mL de etanol
15. Agitar y dejar reposar 30 minutos en la oscuridad
16. Determinar la absorbancia a 530 nm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de glucosamina nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente la concentración de glucosamina con la absorbancia. La interpolación en esta recta de las absorbancias de las muestras problema permitirá determinar la concentración de glucosamina en las muestras de fermentación.

Anexo 4

Protocolo de uso del cromatógrafo de gases Gow-Mac Series 580.

Parte I: Encendido del equipo

Antes de iniciar el uso del cromatógrafo de gases es necesario verificar que se encuentre apagado, en especial la corriente del detector para evitar que éste se quemé.

1. Abrir la llave del tanque de Helio
2. Verificar que la presión de salida del tanque sea mayor de 500 psi. En caso de que sea igual o menor, notificar al profesor responsable de que ya es necesario realizar la requisición de Helio.
3. La presión de entrada del gas al cromatógrafo debe ser de 60 psi.
4. Verificar que el flujo de gas acarreador a través de las columnas sea igual entre ellas (aprox. 32 mL/min; la medición con el rotámetro del laboratorio coincide con el número 40. Ver Fig. 1A - d)). Nota importante: la modificación del flujo hacia las válvulas debe hacerse despacio y cuidadosamente, debido a que son válvulas de aguja y por lo tanto delicadas.

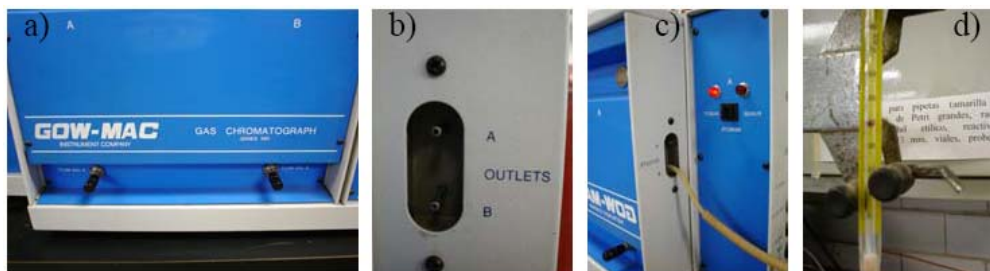


Figura 1A. Componentes del cromatógrafo de gases. a) Válvulas de flujo a las columnas, b) Tubos indicadores de flujo en columnas, c) Forma de adaptar el medidor de flujo, d) Rotámetro del laboratorio.



Figura. 2A. tablero de control del cromatógrafo Gow Mac

5. Encender el cromatógrafo con el botón de atrás
6. Verificar que esté apagada la corriente del detector (set = 001, Fig. 2A).
7. Poner el set de la temperatura del detector en 120 °C, la temperatura del inyector en 60 °C y la de la columna en 40 °C **(Punto crítico porque dependen de la temperatura del laboratorio)**.
8. Esperar al menos tres horas para que se establezca la temperatura del detector
9. Esperar a que la temperatura del detector sea mayor a 115 °C
10. Encender la corriente del detector a 125 mA.
11. Abrir la llave de paso del aire comprimido
12. Encender el *multiposition control module*
13. Habilitar los canales a utilizar
14. Encender la computadora para pasar a la parte II

Parte II: Encendido del software

Esta parte comienza cuando ya se encuentra encendida la computadora asociada al equipo.

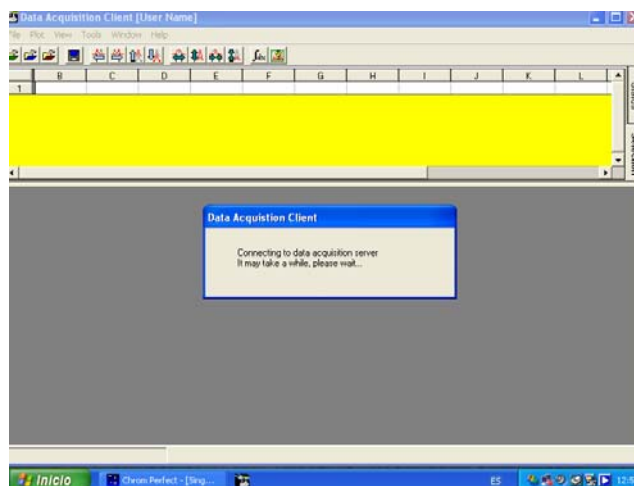
Adquisición de datos por el equipo

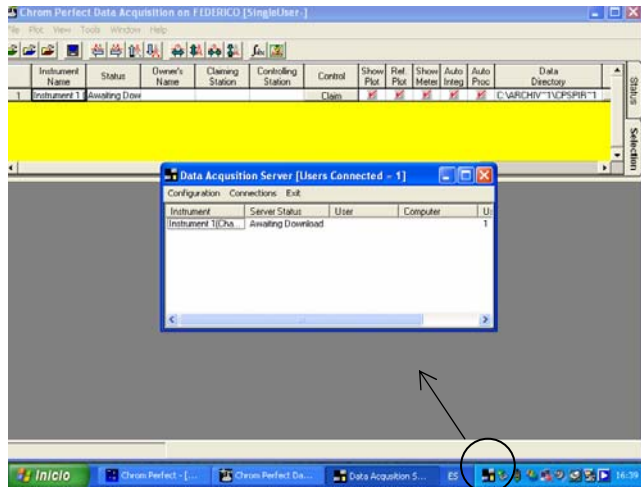
15. Hacer click en el icono de Chrom Perfect 5



16. Aparece la pantalla principal: Chrom Perfect [Single user]. Hacer click en *acquisition*

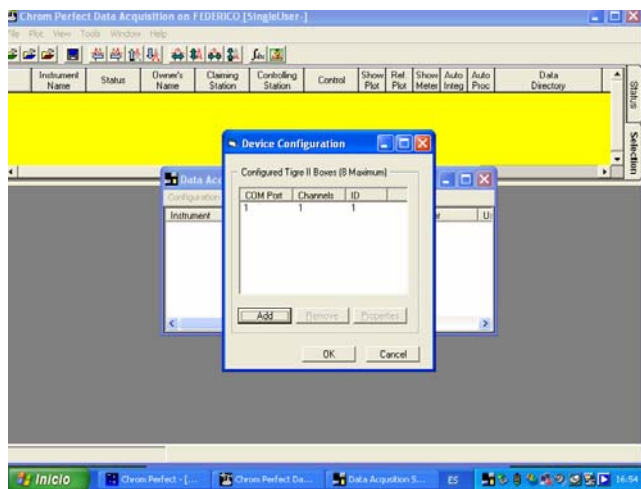
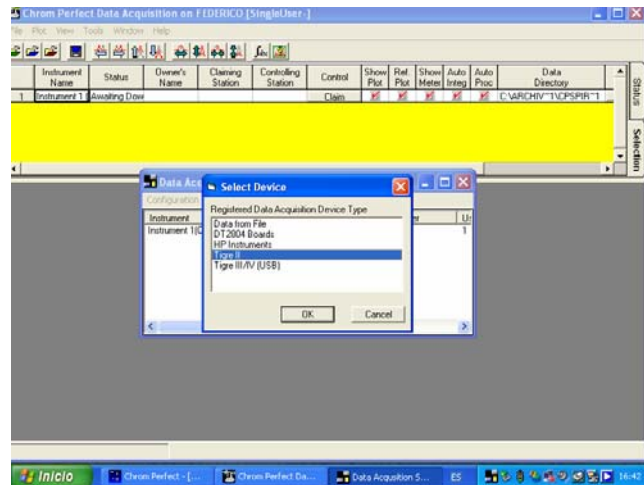
17. Aparece la ventana de "Data Adquisition Client [User Name], y un mensaje de esperar la conexión con el *acquisition server*, por lo que se debe esperar a que aparezca en la barra de inicio.



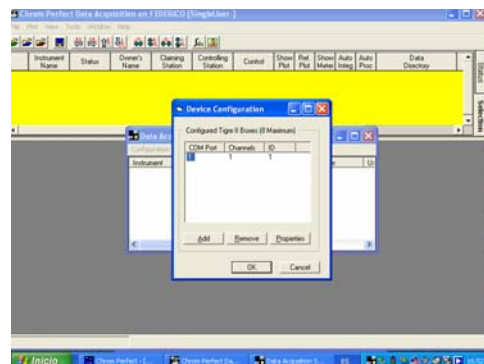


18. Hacer doble click en el icono de la barra y aparecerá la ventana de “Data Acquisition Server [Users Connected =1]”. Hacer click en Configuración.

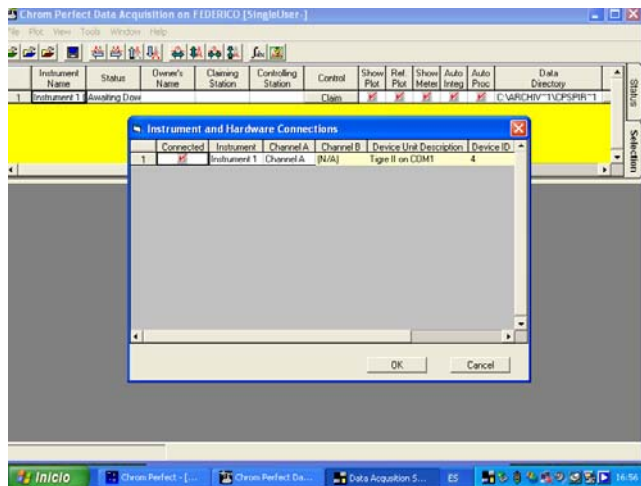
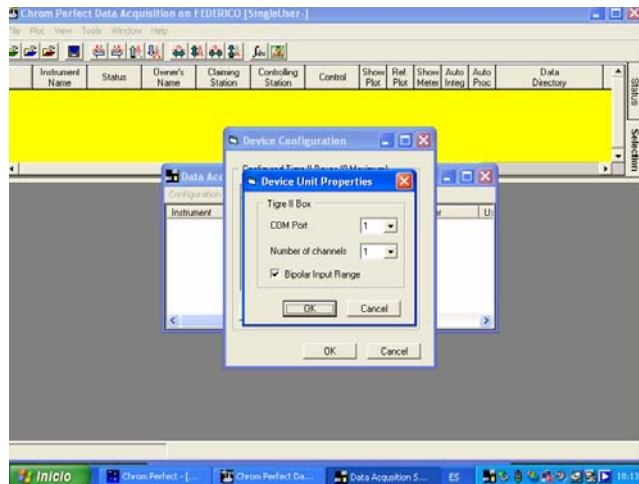
19. Aparecerá la ventana “Select Device”, allí seleccionar “tigre II”.



20. Aparecerá la ventana “Device Configuration” seleccionar “COM Port 1” y se habilitarán los botones de Eliminar y Propiedades. Hacer click en el botón Propiedades.

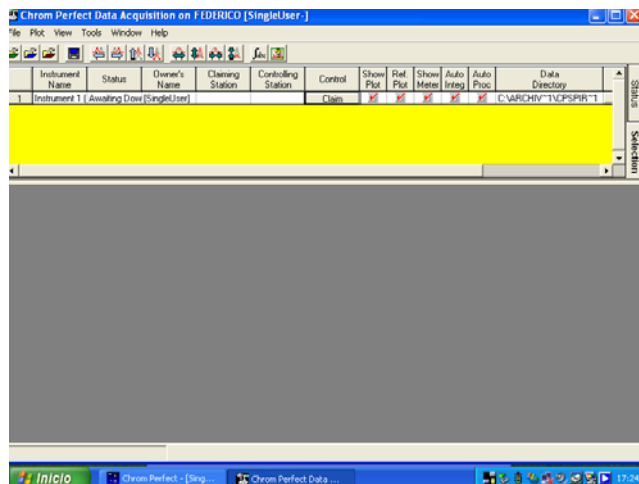


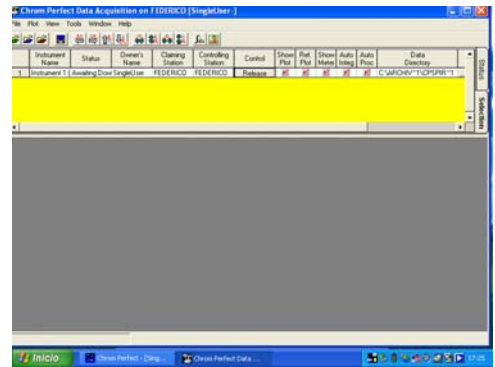
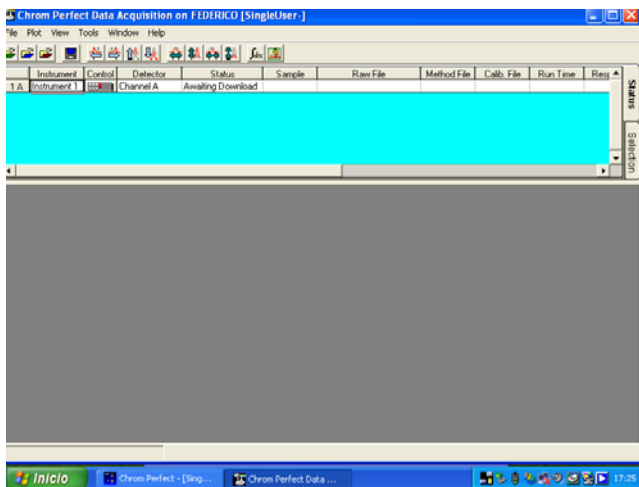
21. Aparecerá la ventana “Device Unit Properties”, asegurarse de que se encuentran seleccionados COM port 1 y Number of channels 1. Hacer click a Ok y se cerrará esa ventana. Hacer clic a Ok de nuevo para cerrar la ventana “Device configuration”.



22. Aparecerá la ventana “Instrument and Hardware Connections”. Hacer click en Ok y finalmente cerrar la ventana de “Data Acquisition Server [Users Connected =1]”.

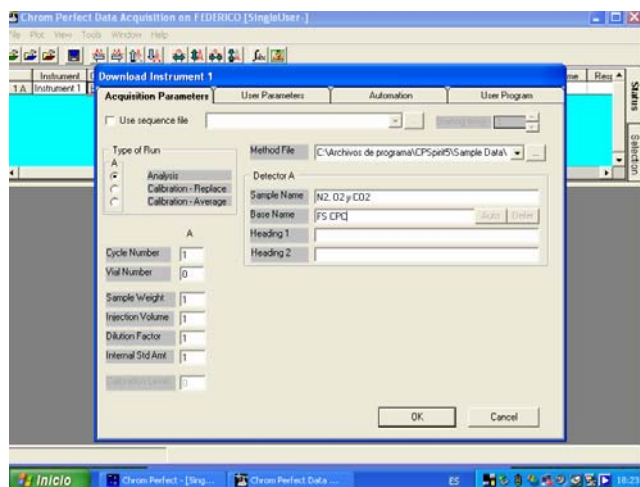
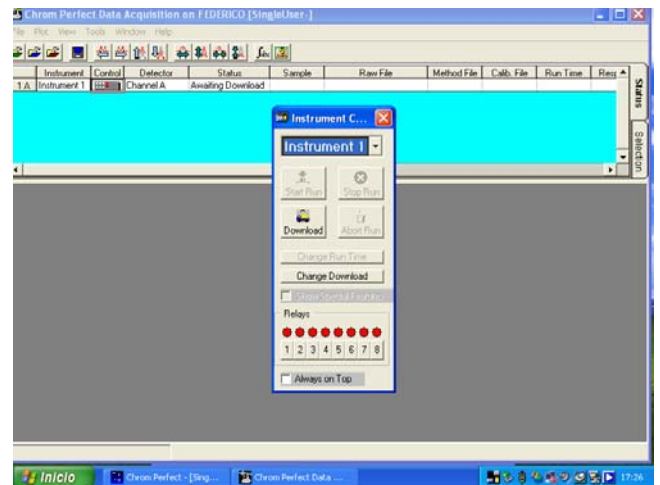
23. En la ventana “Data Acquisition Client”, presionar el botón “Chaim” y aparecerá Federico.





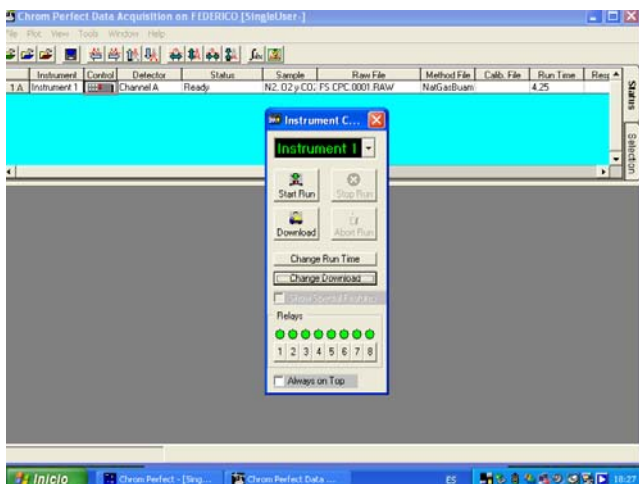
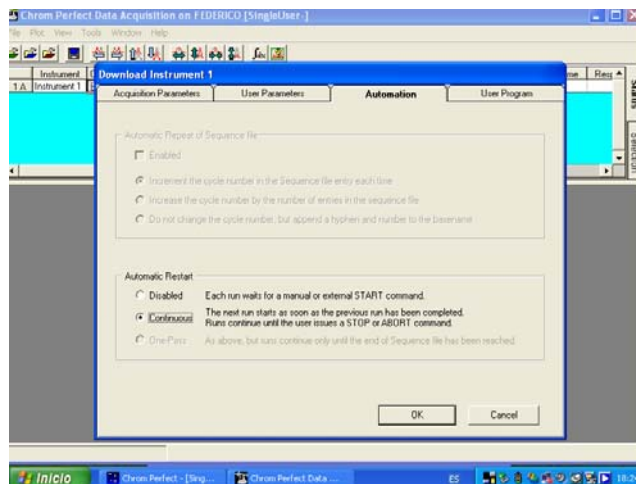
24. Ir a la pestaña de “status” que se encuentra a la derecha de la ventana y presionar para que aparezca una ventana azul. Presionar el dibujo debajo de la palabra control.

25. Aparecerá la ventana “Instrument Control”. Presionar el botón “download”.



26. Aparecerá la ventana “Download Instrument 1”. En la pestaña de “Acquisition Parameters” seleccionar el archivo de método:
 C:\Archivos de programa\CPSpirit5\Sample Data\NatGasBuamTania.met
 Poner el nombre de muestra y el del experimento (Base).

27. En la pestaña de “Automation” seleccionar el modo “continuous” si queremos que la información de las lecturas sea almacenada de forma continua. Dar click en Ok y se regresará a la pantalla anterior “Instrument Control”.



28. Se habilitará el botón “Star Run” (a veces tarda un poco). Hacer click en él para que empiece la lectura y el análisis.

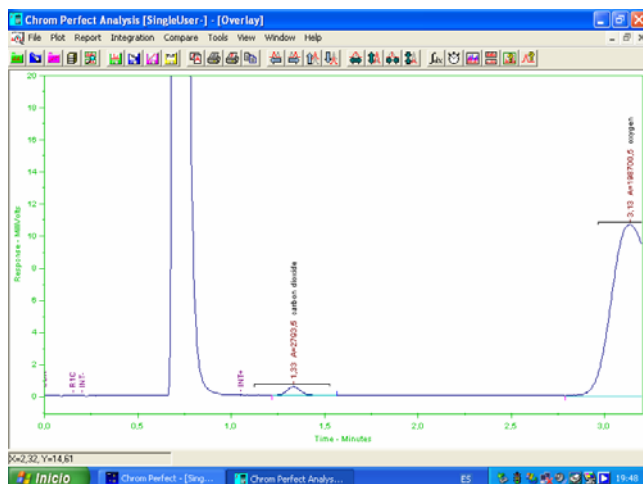
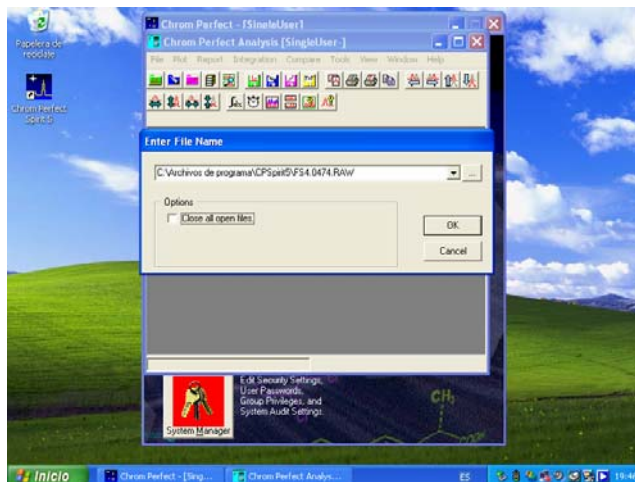
29. Este programa está diseñado para análisis de 6.5 minutos, en los que se separan el CO₂, O₂, y N₂ a los 1.3, 3.25 y 4.72 minutos respectivamente.
30. Al principio, en medio y al final de los análisis se inyecta una muestra del gas de referencia (CO₂ = , O₂ = y N₂ =) para poder utilizar los resultados en los cálculos finales de la muestra.

Análisis y recuperación de los datos

En el momento de la escritura de este anexo, el programa determina los valores de las áreas bajo los picos cuando considera significativas esas áreas. Así, en algunas ocasiones (sobre todo en el caso del CO₂), aunque el pico es evidente el área no es calculada por el equipo. Este es un aspecto a mejorar.

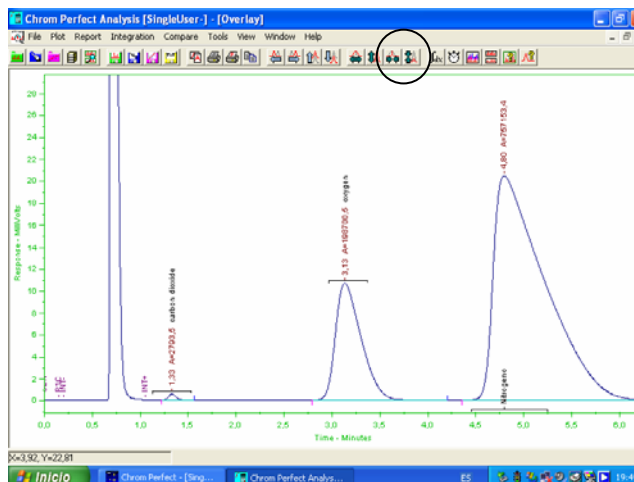
31. Hacer click en el botón “Análisis” de la ventana principal “Chromperfect Spirit [Single User]” (paso 16)

32. Aparecerá la ventana “Chrom Perfect Analysis [SingleUser-]” y automáticamente también una ventana que dice “Enter File name”. Normalmente los archivos de los análisis son almacenados en el directorio C:\Archivos de Programa\CPSpirit5\Nombre que se puso en Base Name (Paso 27). RAW. De tal forma que se debe hacer la búsqueda en ese directorio con el nombre que elegimos como nombre base. Hacer clic en OK.



33. Se abrirá la ventana “Chrom Perfect Analysis [SingleUser-]-[Overlay]”, se debe ampliar la ventana “Chrom Perfect Analysis [SingleUser-]” y luego esta nueva para poder visualizar mejor el cromatograma.

34. Con ayuda de los botones para contraer la imagen se hace posible visualizar el cromatograma completo y obtener los datos de valores de área que se utilizan en el siguiente paso del proceso.



Parte III: Cálculos de la cromatografía de gases

36. Se obtuvo el área bajo la curva de todos componentes de los cromatogramas de los estándares y de las muestras del cultivo,
37. Se determinó el factor de respuesta interno (relativo al nitrógeno) para el componente a determinar (CO_2 u O_2), usando los valores en % del cromatograma estándar en la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de respuesta interno} = \frac{\text{Área del N}_2 \times \text{Concentración de N}_2}{\text{Concentración del O}_2 \text{ o del CO}_2 \times \text{Área del O}_2 \text{ o del CO}_2}$$

38. Para determinar la cantidad de compuesto específico (CO_2 u O_2) se consideró la concentración de N_2 como constante (79%)

$$\text{Concentración de compuesto específico (\%)} = \frac{\text{Concentración (EI)} \times \text{Área (CE)} \times \text{FRI (CE)}}{\text{Área (EI)}}$$

Donde: EI = Estándar interno
CE = Compuesto específico
FRI = Factor de respuesta interno

Todos los valores utilizados, excepto el FRI, corresponden a los datos obtenidos en cada cromatograma analizado.

39. El resultado del cálculo anterior nos proporcionó la concentración del CO_2 y del O_2 en porcentaje
40. Para el cálculo del CO_2 y del O_2 en mL/gms.h se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración CE (mL.gms}^{-1}\text{.h)} = \frac{\text{Flujo de aire del cultivo}}{\text{gms}} \times \frac{\% \text{ del CE}}{100} \times 60$$


Donde: gms = gramos de materia seca en la columna


En el caso de la fermentación sólida de cefalosporina el flujo de aire en el cultivo utilizado es de 28 mL/min, por lo cual se hace la conversión a horas multiplicando por 60.

El valor de los gramos de materia seca se calcula sacando el valor promedio de la materia seca obtenida los primeros 2 días, los siguientes 2 y los últimos dos, así como se usa el FRI inicial, medio y final para los cálculos de esos días.

Anexo 5

Hojas de especificación de las enzimas utilizadas para la producción de protoplastos

 SIGMA-ALDRICH	
SpecificationSheet	
Product Name	Driselase® Basidiomycetes sp., plant cell culture tested
Product Number	D8037
Product Brand	Sigma
CAS Number	85186-71-6
Storage Temp	-20°C
TEST	SPECIFICATION
PROTEIN BY BIURET	> OR = 10%
CELLULOSE ACTIVITY	> OR = 100 UNITS/G SOLID
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL LIBERATE 1.0 MICROMOLE OF GLUCOSE FROM CELLULOSE IN ONE HOUR AT PH 5.0 AT 37 DEG C.
LAMINARINASE ACTIVITY	> OR = 10 UNITS/G SOLID
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL LIBERATE 1.0 MG OF REDUCING SUGAR (MEASURED AS GLUCOSE) FROM LAMINARIN PER MINUTE AT PH 5.0 AT 37 DEG C.
XYLANASE ACTIVITY	> OR = 3 UNITS/G SOLID
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL LIBERATE 1.0 MG OF REDUCING SUGAR (MEASURED AS GLUCOSE) FROM XYLAN PER MINUTE AT PH 4.5 AT 37 DEG C.
PLANT CELL CULTURE DOCUMENT #	PASS D8037/05/05/08/2

 SIGMA-ALDRICH	
SpecificationSheet	
Product Name	Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i> , lyophilized powder
Product Number	L1412
Product Brand	Sigma
Storage Temp	2-8°C
TEST	SPECIFICATION
APPEARANCE	REPORT RESULT
CELLULOSE ACTIVITY	REPORT RESULT
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL LIBERATE 1.0MICROMOLE OF GLUCOSE FROM CELLULOSE IN ONE HOUR AT PH5.0 AT 37DEGC (2HR INCUBATION TIME).
CHITINASE ACTIVITY	REPORT RESULT
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL LIBERATE 1.0MG OF N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE FROM CHITIN PER HOUR AT PH6.0 AT 25DEGC. (2HR INCUBATION TIME)
PROTEASE ACTIVITY	REPORT RESULT
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL HYDROLYZE CASEIN TO PRODUCE COLOR EQUIVALENT TO 1.0MICROMOLE (181UG) OF TYROSINE PER MINUTE AT PH7.5 AT 37DEGC (COLOR BY FOLIN-CIOCALTEU REAGENT).
	DOCUMENT # L1412/04/14/99/2

México D.F. a 24 de octubre de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por
Acremonium chrysogenum

que presentó
Tania Ethel Cuadra Zelaya

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-director: Dr. Javier Barrios González

Asesora: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

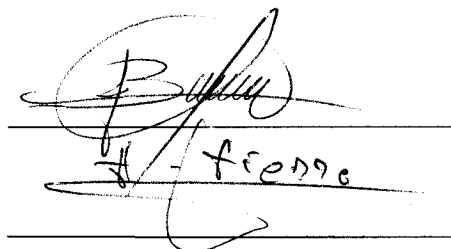
Jurado:

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

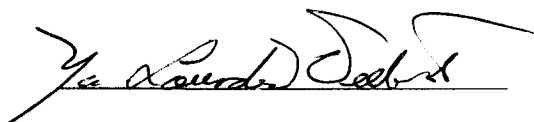
Vocal: Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca



Handwritten signature of Dr. Javier Barrios González, consisting of a stylized 'J' and 'B' followed by 'barrios', written over two horizontal lines.



Handwritten signature of Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, written in cursive over two horizontal lines.



Handwritten signature of Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca, written in cursive over two horizontal lines.