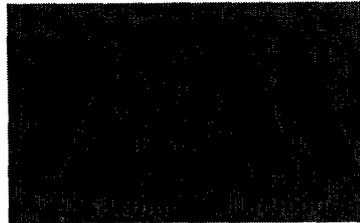


UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



402

**EFFECTO DEL INCREMENTO DE LA DOSIS GÉNICA
(GENES *pcbC* Y *penDE*) EN *Penicillium chrysogenum*
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA G EN
FERMENTACIÓN LÍQUIDA Y SÓLIDA.**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

I.B.I. JUAN CARLOS LEYVA CONTRERAS

TUTORES:

DR. JAVIER BARRIOS GONZÁLEZ
DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

ASESOR:

DR. ARMANDO MEJÍA ÁLVAREZ

MÉXICO D. F. JULIO 2000.

El trabajo que a continuación presento se llevó cabo en el **Laboratorio de Metabolitos Secundarios e Ingeniería Genética** del Departamento de Biotecnología en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud dentro de la **Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa**.

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

El presente trabajo de Tesis pertenece a la **Maestría de Biotecnología**, impartida en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

La Maestría de Biotecnología se encuentra inscrita en el **Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

El trabajo de Tesis de Maestría fue parcialmente financiado por CONACyT en el periodo comprendido entre mayo de 1998 y agosto de 1999.

Número de Beca y registro de becario: 124387/134035.

110
27 = 0.20 6 x

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre que no fue en vano su partida:

Ma.Teresa Contreras (q.e.p.d.) quien siempre con todo su amor hasta el final me llenó de enseñanzas y valores (en todo momento esta conmigo).

Dedico el presente trabajo *a mi padre*: **Antonio Leyva** quien con grandes sacrificios y mayor convencimiento y amor me abrió camino y me enseñó a caminar (aún es mi guía).

Gran parte de lo que soy ahora se lo debo a los sabios ejemplos de mis padres.

A mis hermanos y hermanas: **Silvia, Isabel, Marco, Mauricio, Jenny y Verónica** que juntos desde la infancia hemos formado una gran familia. No somos muy sentimentales pero siempre estamos apoyándonos unos a otros, cada quien con su estilo.

A mis hermanos que nunca conocí.

A mis sobrinos: **Ale, Hugo, Maga, David, Lupita, Angel y Jacquelin** quienes son como mis hermanos, Han crecido y están creciendo a nuestro lado, regalándonos alegrías y alicientes que le dan sentido a la vida.

A mi gran amigo **Martín** quien también se fue, pero me dejó ese gran sentimiento que es la amistad.

A todos mis amigos actuales, de la infancia y de siempre con los que he compartido aventuras, travesuras y tareas.

A todos mis maestros que fueron y han sido parte fundamental de mi formación profesional y personal.

A mis luceros que iluminan mi vida, *mis dos hijos*: **Imanol y Zyanya**, ellos, junto con mi esposa, son la razón de mi existir, fuente de mi alegría e inspiración de mis anhelos.

A mi amiga y esposa **Addy**, con la que he compartido la primavera de la vida, floreciente e impetuosa; el verano, lleno de frutos que maduran; el otoño, en espera apacible pero con gran potencial; y el invierno, quizá el ocaso, no obstante la etapa cumbre, el clímax de dos vidas que se han fundido en una sola. Addy gracias por compartir.

Al concluir este estudio quiero expresar mi profunda gratitud a las personas e instituciones que hicieron posible la culminación de esta investigación.

En primer lugar, quiero agradecer a la **Universidad Autónoma Metropolitana**; en especial al Departamento de Biotecnología, por haberme facilitado iniciar y culminar satisfactoriamente el posgrado de Biotecnología.

En este sentido, agradezco al **Dr. Javier Barrios González** por su invaluable dirección y asesoría a esta investigación, desde su más incipiente gestación, desarrollo hasta su finalización.

También, quiero agradecer al **Dr. Armando Mejía Álvarez**, por proporcionar las condiciones de trabajo adecuadas, sus acertadas observaciones y su participación como sinodal del presente estudio.

Quiero externar mi reconocimiento especial al **Dr. Francisco José Fernández Perrino**, por su valiosa e incondicional asesoría y dirección permanentes, por compartir sin límites sus conocimientos y habilidades como investigador y por brindar abiertamente en un trato personal su amistad.

Agradezco al **Dr. Octavio Loera** sus atinadas correcciones y su atenta participación como sinodal del presente trabajo de tesis.

En suma, agradezco a todo el cuerpo de profesores del posgrado en Biotecnología de la UAM-I por contribuir a mi formación profesional; y al personal administrativo de tal institución por todas las atenciones brindadas; sobre todo, al **Lic. José Atenco** y a la **Lic. Violeta**.

Por último, mi agradecimiento a todos **mis amigos** de posgrado, sobre todo a mis compañeros del Laboratorio que no sólo me ofrecen su amistad sino que me han apoyado constantemente para concluir esta tesis.

CONTENIDO.

ÍNDICE.	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.	X
ÍNDICE DE GRÁFICAS.	X
ÍNDICE DE TABLAS.	X
ABREVIATURAS.	XI
RESUMEN.	XIII
INTRODUCCIÓN.	1
1. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.	3
1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.	3
1.2. SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS.	4
1.2.1. PRIMERAS EXPLICACIONES DEL CONCEPTO DE ANTIBIOSIS.	5
1.2.2. HISTORIA DE LOS ANTIBIOTICOS.	6
1.2.3. GENERALIDADES DE LOS ANTIBIOTICOS.	7
1.3. ESTUDIOS SOBRE LA PENICILINA.	10
1.3.1. ALEXANDER FLEMING Y EL DESCUBRIMIENTO DE LA PENICILINA.	10
1.3.2. PRIMERAS REACCIONES AL DESCUBRIMIENTO DE FLEMING.	11
1.3.3. EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE OXFORD.	12
1.3.4. INICIOS DE LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA.	12
1.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS, GENERO <i>Penicillium</i> .	14
1.4.1. FUNCIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS EN LOS HONGOS FILAMENTOSOS.	18
1.5. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE PENICILINA POR <i>Penicillium chrysogenum</i> .	19
1.5.1. OBTENCIÓN DE PENICILINA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA.	19
1.5.2. PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACIÓN.	20
1.6. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.	21
1.6.1. FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.	21
1.6.2. MODERNOS SISTEMAS DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.	22
1.6.3. NUEVAS APLICACIONES.	23
1.6.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.	23
1.6.5. ASPECTOS FISIOLÓGICOS.	24
1.7. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.	24
1.7.1. LOS SISTEMAS DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.	25
1.7.2. LOS MICROORGANISMOS Y SUS PRODUCTOS.	25
1.8. CEPAS PRODUCTORAS Y NIVELES DE PRODUCCION.	26
1.8.1. CEPAS ESPECIALES PARA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.	26
1.8.2. EFICIENCIA DE LAS CEPAS EN FS.	26
1.8.3. MEJORAMIENTO DE CEPAS PARA FS.	27
1.9. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS.	27
1.9.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PENICILINA.	29

1.10. GENES Y ENZIMAS INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINAS.	30
1.10.1. VÍA BIOSINTÉTICA DE LAS PENICILINAS.	30
1.10.2. EL GEN <i>pcbA</i> CODIFICA PARA LA ACV SINTETASA.	32
1.10.3. EL GEN <i>pcbC</i> CODIFICA PARA LA ISOPENICILINA N SINTASA.	34
1.10.4. EL GEN <i>penD</i> CODIFICA PARA LA ISOPENICILINA N ACILTRANSFERASA.	34
1.11. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA AL MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS.	37
1.11.1. AUMENTO EN LA DOSIS DE LOS GENES PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.	37
1.11.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES.	38
1.11.3. MODIFICACIÓN DE PROMOTORES.	39
HIPÓTESIS.	40
OBJETIVO GENERAL.	40
OBJETIVOS PARTICULARES.	40
2. MATERIALES Y METODOS.	41
2.1. MICROORGANISMOS.	41
2.1.1. CEPAS BACTERIANAS.	41
2.1.2. CEPAS FÚNGICAS.	41
2.2. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.	41
2.3. VECTORES DE CLONACIÓN.	42
2.3.1. PLÁSMIDOS.	42
2.4. REACTIVOS.	44
2.5. EQUIPO.	45
2.6. MEDIOS DE CULTIVO.	46
2.6.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.	46
2.6.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>Penicillium chrysogenum</i> .	47
2.6.3. SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES ESPECÍFICOS PARA BIOLOGÍA MOLECULAR.	48
2.7. CONDICIONES Y DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.	51
2.7.1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS.	51
2.7.2. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO EN LAS CEPAS BACTERIANAS.	51
2.7.3. CONDICIONES PARA LA ESPORULACIÓN DE <i>Penicillium</i> .	51
2.7.4. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>Penicillium</i> EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA.	52
2.7.5. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>Penicillium</i> EN FERMENTACIÓN SÓLIDA.	52
2.8. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>Escherichia coli</i> POR EL MÉTODO DEL CLORURO DE RUBIDIO.	52
2.9. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> DH5α.	53
2.10. EXTRACCIÓN DE ADN PLÁSMIDICO DE <i>E. coli</i>.	54
2.10.1. MINIPREPARACIONES. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A PEQUEÑA ESCALA.	54
2.10.2. LÍISIS ALCALINA. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA.	55
2.10.3. MEGAPREPARACIONES. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA.	55

2.11. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.	56
2.12. COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DE LOS PLÁSMIDOS.	57
2.12.1. DIGESTIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.	57
2.12.2. ELECTROFORESIS DE ADN PLASMÍDICO EN GELES DE AGAROSA.	58
2.13. PROCESO DE CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pUAMJC1.	58
2.13.1. EXTRACCIÓN DEL ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.	59
2.13.1.1. EXTRACCIÓN POR CONGELACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN A TRAVÉS DE LANA DE VIDRIO.	59
2.13.1. 2. EXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA QUIAEX.	59
2.13.2. ENSAMBLAJE DEL FRAGMENTO DE 5.1 kpb CON EL pC43.	60
2.14. TRANSFORMACIÓN DE <i>Penicillium chrysogenum</i>.	60
2.14.1. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BASAL A FLEOMICINA.	61
2.14.2. CRECIMIENTO DEL MICELIO.	62
2.14.3. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.	62
2.14.4. TRANSFORMACIÓN.	62
2.14.5. EXTENSIÓN EN PLACA.	62
2.15. PROCESO DE SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE <i>Penicillium chrysogenum</i>.	63
2.15.1. CONFIRMACIÓN DE TRANSFORMANTES GENERADOS.	63
2.15.2. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE ALTA RESISTENCIA A FLEOMICINA.	63
2.15.3. BIOENSAYO POR EL MÉTODO DE COBERTERA.	64
2.15.4. BIOENSAYO POR EL MÉTODO DE CILINDROS DE AGAR.	65
2.16. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO.	66
2.16.1. COSECHA DE ESPORAS DE <i>Penicillium</i> .	66
2.16.2. OBTENCIÓN DEL INÓCULO	66
2.16.3. CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA G POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA.	66
2.16.3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS EN MEDIO LÍQUIDO.	67
2.16.4. CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA G POR FERMENTACIÓN SÓLIDA.	67
2.16.4.1. PRETRATAMIENTO DEL SOPORTE SÓLIDO.	67
2.16.4.2. OBTENCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO.	67
2.16.4.3. PRODUCCIÓN.	68
2.16.4.4. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS EN MEDIO SÓLIDO.	68
2.17. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>Penicillium chrysogenum</i>.	68
2.18. TRANSFERENCIA DE SOUTHERN.	69
2.19. MARCAJE DE LAS SONDAS.	70
2.20. HIBRIDACIÓN Y AUTORADIOGRAFÍA.	71
2.20.1. PREHIBRIDACIÓN.	72
2.20.2. HIBRIDACIÓN.	72
2.20.3. LAVADO.	72
2.20.4. AUTORADIOGRAFÍA.	72
3. RESULTADOS.	73
3.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pUAMJC1.	73
3.1.1. AMPLIFICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DE LOS PLÁSMIDOS pC43 y pJL33.	74
3.1.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pUAMJC1.	74
3.1.3. AMPLIFICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DEL VECTOR pUAMJC1.	75
3.2. ESTUDIO DE RESISTENCIA A LA FLEOMICINA.	76
3.3 OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES.	77

3.3.1. TRANSFORMANTES DE ALTA RESISTENCIA.	77
3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES PARA PRODUCCIÓN DE PENICILINA.	79
3.4.1 BIOENSAYOS POR EL MÉTODO DE COBERTERA.	80
3.4.2 BIOENSAYOS POR CILINDRO DE AGAR.	82
3.5. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.	90
3.5.1. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.	93
3.5.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.	94
3.6. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.	97
3.6.1. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.	100
3.6.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.	101
3.7. ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT PARA LA COMPROBACIÓN DE COPIAS INTEGRADAS.	103
4. DISCUSIÓN.	106
4.1. CONSTRUCCIÓN Y COMPROBACIÓN DEL PLÁSMIDO pUAMJC1.	106
4.2. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES MEJORADOS.	107
4.3. EVALUACIÓN DE LOS TITULOS DE PENICILINA ELABORADA POR LOS TRANSFORMANTES EN FL Y EN FS.	111
4.3.1. EVALUACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.	112
4.3.2. EVALUACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.	114
5. CONCLUSIONES.	116
6. PERSPECTIVAS.	117
7. BIBLIOGRAFÍA.	118

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1. Estructura química básica de penicilinas.	30
Figura 1.2. Ruta de biosíntesis de penicilinas.	31
Figura 1.3. Agrupamiento de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.	33
Figura 1.4. Esquema de la región de ADN de 5.1 kpb que contiene los genes <i>pcbC</i> y <i>penDE</i> en <i>P. chrysogenum</i> .	36
Figura 2.5. Esquema del plásmido pC43.	42
Figura 2.6. Esquema del plásmido pJL33.	43
Figura 3.7. Análisis electroforético. Patrón de bandas de los plásmidos pJL33 y pC43.	73
Figura 3.8. Esquema de construcción del plásmido integrativo pUAMJC1.	74
Figura 3.9. Análisis de migración electroforética en gel de agarosa. Patrón de bandas de los plásmidos pC43 y pUAMJC1.	75
Figuras 3.10a y 3.10b. Ensayo de resistencia a fleomicina de los transformantes de la cepa <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b).	78
Figuras 3.11a y 3.11b. Placas de bioensayo por cobertera.	80
Figuras 3.12a y 3.12b. Placas de bioensayo por cilindros de agar.	83
Figura 3.13. Análisis de hibridación de Southern (derecha) y Comigración de ADN genómico de transformantes y parentales <i>P. chrysogenum</i> (izquierda).	104

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráficas 3.1a y 3.1b. No. de transformantes de las cepas <i>P. chrysogenum</i> resistentes a fleomicina.	79
Gráficas 3.2a y 3.2b. Diámetro del halo de inhibición y nivel de resistencia a la fleomicina de los mejores transformantes en bioensayos por cobertera.	81
Gráficas 3.3a y 3.3b. Grado de producción de penicilina de los transformantes y parentales en bioensayos por cilindros de agar.	85
Gráficas 3.4a y 3.4b. Transformantes Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). % de incremento en la producción.	86
Gráfica 3.5a y 3.5b. Transformantes Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados.	87
Gráficas 3.6a y 3.6b. Cinética de producción de penicilina en FL.	91
Gráficas 3.7a y 3.7b. Cinética de producción específica de penicilina en FL.	93
Gráficas 3.8a y 3.8b. Cinética de producción de biomasa en FL.	94
Gráficas 3.9a y 3.9b. Cinética de producción de penicilina en FS.	98
Gráficas 3.10a y 3.10b. Cinética de producción específica de penicilina en FS.	100
Gráficas 3.11a y 3.11b. Cinética de producción de biomasa en FS.	101

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1. Especies productoras y principales grupos de antibióticos β -lactámicos.	28
Tabla 3.2. Crecimiento cualitativo de las colonias de los distintos microorganismos.	77
Tabla 3.3. Producción de penicilina en bioensayos por cobertera de los dos mejores transformantes.	82
Tabla 3.4. Producción de penicilina por el método de bioensayo en cilindros de agar de todos los transformantes.	84
Tablas 3.5a y 3.5b. Valores de producción de penicilina en cilindros de agar, % de incremento y coeficiente de variación.	88
Tablas 3.6a y 3.6b. Valores de producción máxima de penicilina y % de incremento en la producción en FL.	92
Tablas 3.7a y 3.7b. Valores máximos de producción específica de penicilina y % de incremento en la producción específica en FL.	95
Tablas 3.8a y 3.8b. Valores de producción máxima de penicilina y % de incremento en la producción en FS.	99
Tablas 3.9a y 3.9b. Valores máximos de producción específica de penicilina y % de incremento en FS.	102

ABREVIATURAS.

AAT:	acil-CoA:6-APA aciltransferásica
7-ACA:	ácido 7-aminocefalosporánico
ACV:	δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina
ACVS:	ACV sintetasa
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNasa:	desoxirribonucleasa
Ap:	gen de resistencia a la ampicilina
6-APA:	ácido 6-aminopenicilánico
ARN:	ácido ribonucleico
ARNasa:	ribonucleasa
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	adenosina 5' trifosfato
Bq:	Becquerelio
Ci:	Curio
CIA:	cloroformo-alcohol isoamílico
Cm:	gen de resistencia al cloranfenicol
cm:	centímetro
CoA:	coenzima A
col.:	colaboradores
Da:	Dalton
dATP:	desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP:	desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP:	desoxiguanosina 5' trifosfato
DO:	densidad óptica
DTT:	ditiotreitól
dTTP:	desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EtBr:	bromuro de etidio
FL:	Fermentación Líquida
FS:	Fermentación Sólida
g:	gramo
h:	horas
H₂O_d:	agua destilada
IAT:	isopenicilina N aciltransferasa
IPN:	isopenicilina N
IPNS:	isopenicilina N sintasa
kDa:	kiloDalton
kpb:	kilopares de bases
L:	litro
L-α-AA:	ácido L- α -aminoadípico
M:	concentración molar
mg:	miligramo
mL:	mililitro

mM:	milimolar
mm:	milímetro
mmol:	milimol
MOPS:	ácido morfolinopropanosulfónico
N:	concentración normal
ng:	nanogramo
nm:	nanometro
NRRL:	Northern Regional Research Laboratory
°C:	grado centígrado
p/v:	relación peso-volumen
PE:	tampón con etanol
PEG:	polietilenglicol
pg:	picogramo
QX1:	tampón con sal caotrópica
r.p.m.:	revoluciones por minuto
SDS:	laurilsulfato sódico
TP	transformantes P2-32
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
TW	transformantes Wisconsin
U:	unidades
UV:	ultravioleta
v/v:	relación volumen-volumen
µg:	microgamo
µL:	microlitro
µm:	micrometro

RESUMEN.

Los avances en ingeniería genética están dando forma a un nuevo estilo de mejoramiento genético. Se ha intentado una de las estrategias de mejora en la producción de penicilina: el aumento en la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* en *Penicillium chrysogenum* implicados en los dos últimos pasos de la vía biosintética. Se obtuvieron transformantes *P. chrysogenum* derivados de la cepa P2-32 (de alta producción) y Wisconsin 54-1255 (de baja producción) utilizando al vector de clonación construido para probar el efecto de introducir una o más copias extras de estos dos genes *pcbC* y *penDE* en ambas cepas recipientes. En la construcción de este vector bifuncional fueron incluidas secuencias de ADN del plásmido pC43, como el origen de replicación *colE1*, el gen *Cm* para la resistencia al cloranfenicol y el módulo para la resistencia a fleomicina. Un fragmento de ADN de 5.1 kpb flanqueado por secuencias para reconocimiento de la enzima *SalI* fue obtenido del plásmido pJL33. Este fragmento contiene a los dos genes de interés y se ligó dentro del único sitio para la enzima *SalI* del pC43, lo cual permitió crear al vector de expresión nombrado pUAMJC1. Se empleó el sistema de selección por resistencia a fleomicina para la transformación de *P. chrysogenum*. El sistema de transformación resultó ser el doble de lo efectivo para la cepa de alta producción (28 transformantes recuperados del medio) que para la cepa de baja producción (13 clones resistentes). El 50 % de los transformantes derivados de la cepa Wisconsin 54-1255 (TW) presentaron resistencias a la fleomicina de 40 a 60 µg/mL. Mientras que los originados de la cepa P2-32 (TP) 30 % de los transformantes adquirieron resistencias de 50 a 80 µg/mL. Los transformantes TP generaron en promedio zonas de inhibición mayores (34 mm) a los TW (20 mm), en bioensayos por cobertera. Con este método, se apreció una correlación directa entre el tamaño de halo y el grado de resistencia adquirida a fleomicina, correlación más definida para los transformantes TW. De tal forma que el porcentaje promedio de aumento en la producción de penicilina G en medio por cobertera, llevada a cabo por los transformantes TW fue de 80 a 100 % en comparación a la cepa sin transformar y, de 25 a 29 % para los clones TP. El método de cobertera aplicado para la selección de transformantes mejorados fue un sistema válido que se puso a punto, tiene un grado aceptable de fiabilidad, la variabilidad de los valores es pequeña y es un ensayo repetitivo y representativo con los resultados de FL. El 45 % de los transformantes TW y 30 % de los TP exhibieron una relación directa entre la resistencia a la fleomicina y la cantidad de penicilina generada. Dos de los tres transformantes TW analizados, adquirieron porcentajes de incremento en la producción específica de penicilina G que van del 116 al 224 % en FL con respecto a la cepa parental; y un clon TP generó un porcentaje de incremento del 48 %. El nivel de producción específica en FL alcanzado por las colonias TW en general fue parecido al de los clones TP. A diferencia de la FL, ninguno de los transformantes evaluados en la FS fueron capaces de obtener porcentajes de incremento importantes en los niveles de producción específica de penicilina G con respecto a las cepas parentales. Los transformantes TP presentaron producciones específicas ligeramente superiores a los TW en FS. Los niveles de producción de penicilina de los transformantes TW y TP en FS fueron, respectivamente, 2.5 y 3.5 veces superiores al alcanzado en FL y, la producción específica obtenida por ambos transformantes fue casi del doble en FL que en FS.

INTRODUCCIÓN.

La producción de antibióticos ha resultado ser una de las más lucrativas actividades de la industria farmacéutica en los últimos cincuenta años, razón por la cual en este tiempo se han conseguido los mayores avances en el conocimiento de la biosíntesis de tales antibióticos. En este sentido, la penicilina es un buen modelo y un ejemplo. El conocimiento de los mecanismos básicos de biosíntesis de antibióticos, sobre todo los denominados beta-lactámicos, ha permitido la puesta a punto de importantes procesos de producción a gran escala. A medida que se optimizaron la composición del medio de cultivo, los factores ambientales, o se mejoraron las cepas productoras, utilizando técnicas de mutagénesis al azar, se logró aumentar en varios ordenes de magnitud la producción de dichos compuestos.

La Biología Molecular supone una herramienta avanzada en cuanto a la posibilidad de mejora genética de las cepas de producción industrial. Tales técnicas posibilitan la modificación controlada del genoma del microorganismo, permitiendo en todo momento asignar una relación causa-efecto entre la alteración introducida y el resultado observado. Sin duda, algo mucho más completo de analizar que en el caso de las mutaciones inducidas por “métodos clásicos de mutagénesis”. Gracias a esta disciplina, se puede observar el efecto de cambios introducidos en todos los niveles de la ruta de biosíntesis.

En el caso de los antibióticos beta-lactámicos, una vez clonados los genes responsables de la vía, los primeros intentos de mejora de las cepas de producción se basaron en la idea de que si la producción dependía de la expresión de unos genes, todo cambio capaz de afectar positivamente a dicha expresión podría traducirse en un incremento de la producción. La forma más inmediata de aumentar la producción de estas fases iniciales de aplicación de las técnicas del ADN recombinante consistió en el incremento de la dosis génica. Esto es, el aumento del número de copias de los genes que codifican para una proteína determinada dentro del microorganismo.

La primera aplicación exitosa del incremento de la dosis génica, como estrategia de mejoramiento genético en el campo de los antibióticos, fue con el gen *cefEF* en *A. chrysogenum* [1]. En cuanto a los genes de biosíntesis de penicilina, la sobreexpresión del gen *pcbAB* en *A. nidulans* ha llevado a una producción 30 veces superior a la de la cepa parental, si bien los valores obtenidos siguen siendo muchos órdenes de magnitud inferiores a los de las cepas de *Penicillium chrysogenum* utilizadas a nivel industrial [2]. El gen *penDE* de *P. chrysogenum* también ha sido utilizado en este tipo de experimentos [3], y de *A. nidulans* [4], los resultados no condujeron a la aparición de resultados satisfactorios. En otros experimentos de transformación [5], se incluyó el fragmento de 5.1 kpb que contiene los genes *pcbC* y *penDE*: los dos mejores transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 alcanzaron un incremento de producción de penicilina del 40%. Solamente, se ha logrado integrar todo el conjunto de los genes para la vía de penicilina, en hongos no productores, los genes se han expresado heterológamente confiriendo así capacidad productora de penicilina a estos organismos [6]. En este sentido, la posibilidad de aplicación de dichas técnicas es enorme, y su utilización puede afectar tanto a procesos de nuevo diseño como a procesos ya optimizados.

Por otra parte, se ha demostrado la necesidad de utilizar cepas específicas [7] para la fermentación sólida (FS). Esto ha despertado el interés por un mayor conocimiento de la fisiología microbiana en medio sólido junto con el desarrollo de la metodología necesaria para generar cepas sobreproductoras especiales para FS.

El presente trabajo pretende evaluar el efecto del incremento de la dosis génica sobre la producción de penicilina en sistemas de fermentación sólida y fermentación líquida (FL), por cepas de *P. chrysogenum* de alto y de bajo nivel de producción.

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios e Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

1. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.

1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.

Anteriormente los fisiólogos microbianos asumían que la fase estacionaria del crecimiento microbiano representaba una inactividad metabólica total para el microorganismo. Fueron los químicos de productos naturales quienes cuestionaron tal concepto. Entre 1920 y 1930, los químicos orgánicos encontraron que los cultivos fúngicos en fase estacionaria eran una fuente inagotable de compuestos orgánicos complejos. Según sus estructuras moleculares, se evidenció que estos compuestos no jugaban un papel importante durante la fase exponencial del crecimiento del hongo. Algunos años antes, los fisiólogos vegetales reconocieron dos clases de compuestos producidos por las plantas; compuestos como la clorofila, que es sintetizada por todas las plantas, y que fueron nombrados productos primarios del metabolismo (como amino ácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos, que son esenciales para el crecimiento), y a los compuestos como el alcanfor y los taninos, que sólo son producidos por una especie particular de plantas, y que no se asigna ninguna función metabólica. Estos últimos fueron llamados productos secundarios del metabolismo [8].

Poco más de dos décadas después, el término fue usado para describir un amplio rango de compuestos producidos por microorganismos, compuestos que no tienen una relación directa con los constituyentes de la célula. Hoy día, el término metabolito secundario frecuentemente está más asociado a productos microbianos que a productos vegetales. Una definición adecuada para estos compuestos es la propuesta por Demain et al., 1997 [9]: metabolitos no esenciales para el crecimiento vegetativo de organismos productores en cultivos puros. A pesar de la enorme diversidad de estructuras químicas encontradas en los metabolitos secundarios, muchos de estos compuestos pueden agruparse en pocas clases en función de su origen biosintético [10].

Los metabolitos secundarios o idiolitos, como también se denominan, no son esenciales para el crecimiento del microorganismo productor, pero tienen diversas funciones en la naturaleza. Los metabolitos secundarios se usan en la naturaleza o en la industria como antibióticos, pigmentos, toxinas, efectores de competición ecológica o simbiosis, feromonas, inhibidores enzimáticos, inmunomoduladores, agonistas de los receptores, pesticidas, agentes antitumorales y potenciadores del crecimiento de animales y plantas. Estos compuestos tienen un efecto importante en la salud, nutrición y economía. En contraste con los metabolitos primarios, los secundarios son producidos por algunas especies de un género, y por algunas variantes. La mayoría de los microorganismos que producen metabolitos secundarios llevan a cabo procesos complejos de diferenciación celular. Se han descubierto alrededor de 10 000 metabolitos microbianos y se caracterizan por poseer estructuras químicas complejas, entre las que se incluyen anillos beta-lactámicos, péptidos cíclicos que contienen aminoácidos no naturales, azúcares poco frecuentes, etc. Generalmente tienen actividad biológica o farmacológica y son producidos después de la fase de crecimiento exponencial, durante la llamada idiofase.

Los metabolitos secundarios, normalmente se producen como familias de compuestos como resultado de la baja especialidad de las enzimas del metabolismo secundario. La abundancia relativa de uno de los miembros de la familia puede incrementarse por la adición de precursores (biosíntesis dirigida). Los principales tipos de vías metabólicas implicadas son aquellas que participan en la síntesis de compuestos aromáticos y anillos beta-lactámicos.

La producción de metabolitos secundarios está fuertemente regulada por los factores ambientales en los que crece el microorganismo. Debido a que una de las funciones del metabolismo secundario en la naturaleza es permitir la supervivencia del microorganismo, especialmente bajo condiciones de ayuno o de superpoblación, no es sorprendente que los genes del metabolismo secundario no sean expresados bajo condiciones que permiten la máxima velocidad de crecimiento. En consecuencia, el ambiente del microorganismo en el tanque de fermentación tiene importancia crucial para la expresión genética en la industria. Para producir metabolitos eficientemente, el ambiente debe ser limitante en una o más fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo. Otras condiciones a tener en cuenta son la presencia de inductores o represores, regulación por producto final, pH, temperatura y suministro de oxígeno.

1.2. SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS.

El término antibiótico fue propuesto por Waksman, descubridor de la estreptomicina, para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. La búsqueda de antecedentes previos demuestra que en 1889 Vuillemin, en un trabajo titulado Antibiose et symbiose, crea el término antibiosis para describir la lucha entre seres vivos para la supervivencia. Más tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano.

Las sustancias medicinales tienen el poder de destruir o detener el crecimiento de organismos infecciosos en el cuerpo. Un grupo particular de estos agentes se constituye de drogas llamadas antibióticos, del griego “anti” (contra) y “bios” (vida). Algunos antibióticos se producen de organismos vivientes tales como bacterias y hongos. Otros son sintéticos (producidos artificialmente).

La penicilina es quizás el mejor antibiótico conocido. Su descubrimiento y posterior desarrollo ha permitido a la profesión médica tratar efectivamente muchas enfermedades infecciosas mortales.

1.2.1. PRIMERAS EXPLICACIONES DEL CONCEPTO DE ANTIBIOSIS.

Ya a finales del siglo XIX existen estudios que sugieren la posibilidad de aprovechamiento de las interferencias producidas por el desarrollo de determinados microorganismos sobre el crecimiento de otros y que empiezan a demostrar las propiedades antibacterianas de determinadas especies del género *Penicillium*.

Así, John Burdon Sanderson, bacteriólogo, y William Roberts, profesor de medicina, observaron de forma independiente en 1871 y 1874, respectivamente, que la presencia de alguna especie de este género fúngico en un medio de cultivo suprimía el crecimiento bacteriano.

Los primeros en asociar estos estudios acerca del antagonismo microbiano producido por el hongo *Penicillium* con su uso terapéutico fueron Joseph Lister y Ernst Duchesne. El primero de ellos describía en una carta su esfuerzo en la búsqueda de un antibiótico no tóxico, efectivo contra las bacterias pero no lesivo para el cuerpo humano. En 1872 observó que el hongo *Penicillium glaucum* era capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en la orina humana. Parece que en 1884 Lister utilizó un extracto de este microorganismo para aplicarlo localmente sobre una herida infectada de una enfermera del Kings College londinense. De ser así, y aunque no ha quedado constancia del procedimiento empleado ni del éxito o fracaso del tratamiento, la hermana Ellen Jones fue el primer paciente tratado con penicilina.

Por su parte, Duchesne (médico militar) estudió el efecto antibiótico del hongo *Penicillium* sobre bacterias en organismos íntegros. En un experimento utilizó conejillos de Indias para infectarlos con suspensiones bacterianas de *Escherichia coli* y con las mismas suspensiones bacterianas mezcladas con un cultivo de *Penicillium glaucum*. Los animales inoculados con la mezcla de bacterias y hongos fueron los únicos supervivientes, mientras que los que habían recibido solamente la suspensión bacteriana murieron en un periodo máximo de 24 horas. El experimento de Duchesne (recogido en su Tesis Doctoral, presentada en Lyon en 1897) permanecería en el olvido hasta casi 40 años después. Alexander Fleming no conocía estos estudios en el momento en que se considera “oficialmente descubierta” la penicilina.

En la segunda mitad del siglo XIX la posibilidad de que un microorganismo interfiriera con el crecimiento de otro fue un tema de activa investigación: así, en 1877 Pasteur y Joubert mencionan también las posibilidades terapéuticas de este fenómeno. Cornil y Babes realizan en 1885 experimentos sobre antagonismo microbiano “in vitro”, sugiriendo que una sustancia química producida por uno de los microorganismos actuaba como inhibidor del crecimiento del otro. Garre, en 1887, demuestra que una sustancia de *Bacillus fluorescens* inhibe el crecimiento de *Staphylococcus pyrogenes*. En 1889 Vuillemin le asigna a este fenómeno el nombre de **antibiosis: *vida contra vida***.

A finales del siglo XIX el concepto de antibiosis se encontraba perfectamente definido: el antagonismo microbiano podía estar causado por una sustancia específica liberada por uno de los microorganismos presentes. La idea adquirió una forma mucho más nítida cuando en 1896 Gosio consiguió cristalizar una sustancia (ácido micofenólico) con una poderosa acción antiséptica frente a *Bacillus anthracis*, a partir de caldos de cultivo de *Penicillium*.

1.2.2. HISTORIA DE LOS ANTIBIOTICOS.

El mecanismo de acción de los antibióticos no había sido conocido de forma científica hasta el siglo XX; sin embargo, la utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección se conoce desde la antigüedad.

Los extractos de ciertas plantas medicinales se han utilizado durante siglos, y también existe evidencia de la utilización de los hongos que crecen en ciertos quesos para el tratamiento tópico de las infecciones. La primera observación de lo que hoy en día se denominaría efecto antibiótico fue realizada en el siglo XIX por el químico francés Louis Pasteur, al descubrir que algunas bacterias saprofitas podían destruir gérmenes del ántrax. Hacia 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf von Emmerich aisló una sustancia, capaz de destruir los gérmenes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo. Sin embargo, no eran eficaces en el tratamiento de las enfermedades.

En la primera década del siglo XX, el físico y químico alemán Paul Erlich ensayó la síntesis de compuestos orgánicos capaces de atacar de manera selectiva a los microorganismos infecciosos sin lesionar al organismo huésped. Sus experiencias permitieron el desarrollo, en 1909, del **salvarsán**, un compuesto químico de arsénico con acción selectiva frente a las espiroquetas, las bacterias responsables de la sífilis. El salvarsán fue el único tratamiento eficaz contra la sífilis hasta la purificación de la penicilina en la década de 1940. En la década de 1920, el bacteriólogo británico Alexander Fleming, que más tarde descubriría la penicilina, encontró una sustancia llamada lisozima en ciertas secreciones corporales como las lágrimas o el sudor, y en ciertas plantas y sustancias animales. La lisozima presentaba una intensa actividad antimicrobiana, principalmente frente a bacterias no patógenas.

La **penicilina**, el arquetipo de los antibióticos, es un derivado del hongo *Penicillium notatum*. Se descubrió de forma accidental en 1928; esta sustancia demostró su eficacia frente a cultivos de laboratorio de algunas bacterias patógenas como las de la gonorrea, o algunas bacterias responsables de meningitis o septicemia. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos. Howard Florey y Ernst Chain, en 1940, fueron los primeros en utilizar la penicilina en seres humanos.

La **tirotricina** fue aislada de ciertas bacterias del suelo por el bacteriólogo René Dubos en 1939; fue el primer antibiótico utilizado en enfermedades humanas. Se emplea para el tratamiento de ciertas infecciones externas, ya que es demasiado tóxico para su utilización general. Los antibióticos producidos por un grupo diferente de bacterias del suelo denominadas actinomicetos han resultado más eficaces. La **estreptomicina** pertenece a este grupo; fue descubierta en 1944 por el biólogo americano Selman Waksman y colaboradores; es efectiva en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, incluidas algunas contra las que la penicilina no es eficaz, como la tuberculosis.

Desde la generalización del empleo de los antibióticos en la década de 1950, ha cambiado de forma radical el panorama de las enfermedades.

Enfermedades infecciosas que habían sido la primera causa de muerte, como la tuberculosis, la neumonía o la septicemia, son mucho menos graves en la actualidad.

También han supuesto un avance espectacular en el campo de la cirugía, permitiendo la realización de operaciones complejas y prolongadas sin un riesgo excesivo de infección. Se emplean igualmente en el tratamiento y prevención de infecciones por protozoos u hongos, especialmente la malaria (una de las principales causas de muerte en los países en desarrollo). Sin embargo, los avances han sido pocos en el campo del tratamiento de las infecciones virales.

Existen fármacos para el tratamiento del herpes zoster o de la varicela. Y se está realizando una intensa labor de investigación para encontrar un tratamiento eficaz para la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con incidencia mundial en la actualidad.

1.2.3. GENERALIDADES DE LOS ANTIBIOTICOS.

Acción de los antibióticos. Los antibióticos pueden ser bacteriostáticos (detienen el crecimiento de las bacterias) o bactericidas (matan a las bacterias). El modo de acción de los distintos antibióticos es diverso, pero todos ellos tienen como requisito un contacto físico entre antibiótico y microorganismo susceptible. En algunos casos no se conoce perfectamente su modo de acción, en otros afecta a la superficie celular impidiendo el crecimiento, en otros más el mecanismo de acción se ejecuta imposibilitando la biosíntesis de proteínas microbianas.

En el laboratorio, el análisis de la acción de los antibióticos consiste en la determinación de la cantidad de droga necesaria para frenar la reproducción o eliminar las bacterias. Sin embargo, las dosis terapéuticas siempre son inferiores a este valor teórico, pues la reducción del número de agentes infecciosos en el organismo (sin llegar a la eliminación total) facilita la aparición de una inmunidad corporal. Por otro lado, si las dosis aplicadas son excesivamente bajas se corre el riesgo de la aparición de bacterias resistentes a su acción (lo que supone un grave problema en la actualidad).

Fabricación: Natural. Inicialmente, todos los antibióticos empleados para el tratamiento de algunas enfermedades provenían de la biosíntesis llevada a cabo por ciertos organismos vivos. Este proceso de biosíntesis de antibióticos, se sigue usando actualmente para la elaboración a nivel industrial de una gran variedad de estos compuestos con acción antibacteriana. En este sentido, es necesario proveer las condiciones ambientales favorables en el medio de cultivo para que los organismos puedan llevar a cabo la producción del antibiótico, que posteriormente se extrae de la mezcla de cultivo aprovechando las propiedades fisicoquímicas que presentan estos compuestos orgánicos.

Actualmente, se elaboran una gran cantidad de antibióticos de manera **sintética**. En el caso de los antibióticos derivados directamente de las penicilinas, se aprovecha el hecho de que este tipo de antibióticos poseen un núcleo químico llamado anillo beta-lactámico. Este anillo tiene adjunto una cadena química que es diferente en cada tipo de penicilinas.

Tal cadena se puede intercambiar químicamente por otras moléculas diferentes dando como resultado la síntesis química de distintos antibióticos que en muchos casos presentan propiedades totalmente distintas del que derivaron, además, de que presentan efectos potencialmente diferentes sobre organismos diferentes. En este sentido, algunas de estas drogas sintéticas se han empleado para tratar más eficientemente procesos de infección en el organismo.

Aunando a este hecho, varias industrias farmacéuticas ahora usan imágenes generadas por computadora del anillo beta-lactámico que les permiten realizar experimentos con una gran variedad de cadenas químicas potenciales a ser unidas. Así, los investigadores han desarrollado antibióticos sintéticos con una actividad terapéutica de mayor duración que los originales. Tal hecho ha permitido la aparición de drogas más efectivas contra un rango más amplio de procesos infecciones de lo que eran las drogas anteriores.

Espectro bacteriano. El estudio de la acción de un antibiótico permite determinar su efecto antibacteriano en términos del espectro bacteriano dentro del cual es efectivo. De tal forma, que en ensayos efectuados en varios laboratorios se ha observado que algunos antibióticos como la penicilina, tienen acción efectiva contra un rango restringido de microorganismos como los de tipo cocos gram negativos y gram positivos, espiroquetas y bacterias gram positivas. Por esta razón, los antibióticos con esta característica se les llama de espectro limitado. También, existen otros antibióticos como las tetraciclinas y el cloranfenicol, que presentan un rango más amplio de acción terapéutica razón por la cual se les denomina antibióticos de amplio espectro.

Antibiograma. Comúnmente se le suele llamar antibiograma a una prueba de laboratorio que consiste en determinar la resistencia o sensibilidad de las bacterias que se hacen crecer en placas con medio de cultivo suministrados con diferentes concentraciones de diversos tipos de antibióticos. En este estudio, si un microorganismo que está en contacto con la droga por un tiempo determinado conserva aún su capacidad reproductora, se deduce que el antibiótico es inoperante farmacológicamente para tal microorganismo: hay resistencia al antibiótico. Contrariamente, si aparece en la placa una zona libre de colonias bacterianas producida por la acción del antibiótico se dice que el microorganismo es sensible a la droga. Esta zona circundante al antibiótico, se le suele llamar halo de inhibición.

Clasificación. Existe una gran variedad de antibióticos que se agrupan según su diferente origen y propiedades. Los que a continuación se mencionan son los de mayor uso común:

Penicilinas. Los diversos tipos de penicilinas constituyen un gran grupo de antibióticos de los cuales las bencil penicilinas son los únicos que se producen de manera natural. La Penicilina G y la ampicilina son los mejores representantes de esta clase de antibióticos. Así mismo, se conoce otro tipo de penicilina, la llamada piperacilina, que ha mostrado ser muy efectiva contra varias infecciones sin ocasionar los frecuentes efectos colaterales indeseables de muchas drogas terapéuticas. Es bien sabido que las penicilinas se administran frecuentemente en combinación con algunas otras drogas de otra categoría para potenciar el efecto antibacteriano y propiciar una mayor eficiencia en el tratamiento de la enfermedad.

Cefalosporinas. Estas drogas muy parecidas en estructura a las penicilinas, las cefalosporinas frecuentemente se utilizan cuando se presentan cuadros de hipersensibilidad (reacción alérgica) a cualquier tipo de penicilina.

Aminoglucosidos. Son antibióticos que en su estructura poseen una función amino y un glúcido sustituidos. Los aminoglucosidos incluyen al tipo de drogas denominadas estreptomina y neomicina. Estas drogas se emplean muy a menudo en los tratamientos contra los efectos infecciosos provocados por la tuberculosis, la peste bubónica, y otras infecciones fuertes. A causa de que la terapia llevada a cabo con estos antibióticos muchas veces conlleva a la aparición de efectos colaterales serios en el organismo, tales como la aparición de un grave trastorno en el oído y una gran sensibilidad del ojo a la luz, estas drogas se deben administrar con mucho cuidado.

Tetraciclinas. Las tetraciclinas han demostrado ser muy efectivas contra enfermedades infecciosas como la neumonía, el tifo, y otras parecidas. Sin embargo, se ha encontrado que pueden dañar el buen funcionamiento de órganos como el hígado y los riñones.

Macrolidos. Los macrolidos son antibióticos que se usan frecuentemente en pacientes que presentan cuadros de alergia a la acción de la penicilina. En este sentido la **eritromicina**, es la mejor medicina conocida de este grupo.

Polipeptidos. La clase de antibióticos llamado polipeptidos es bastante tóxica si se administra al organismo de forma intramuscular, intravenosa y oral, por lo tanto en los casos que sea usada debe administrarse localmente.

Sulfonamidas. Fue la primer droga antimicrobiana empleada para fines terapéuticos. Las sulfadrogas, se sintetizaron a partir de compuestos químicos sintéticos y tienen en su mayoría los mismos efectos antibacterianos que las penicilinas. Debido a que estos antibióticos sintéticos pueden ocasionar efectos nocivos sobre los riñones, cuando es tratada una enfermedad infecciosa del riñón con estas drogas; se recomienda administrarlas siempre con grandes cantidades de agua para impedir la formación de cristales del compuesto.

Otros Antimicrobianos: Antifúngicos. Los Antifúngicos se emplean comúnmente para combatir las enfermedades ocasionadas por hongos tales como los del género *Candida*. Estos antimicrobianos generalmente se suministran de forma local.

Antivirales. Se conoce muy poco a cerca de cómo tratar infecciones producidas por virus. Un virus es un agente infeccioso que tiene la capacidad de duplicarse (reproducirse), además, estos agentes infecciosos poseen la propiedad de mutar o cambiar su material genético, con gran rapidez y eficacia, razones por la cual existen pocas drogas realmente efectivas contra las infecciones virales.

1.3. ESTUDIOS SOBRE LA PENICILINA.

La penicilina fue descubierta por el bacteriólogo Alexander Fleming, en el St. Mary's Hospital de Londres, el cual dio cuenta de su hallazgo en una comunicación publicada en 1929 en el *British Journal of Experimental Pathology*.

Sin embargo, no se consideró seriamente hasta 1940, cuando en la universidad de Oxford el profesor Howard Florey y el bioquímico Ernst Chain consiguieron producir y presentar la penicilina en una forma utilizable. Una serie de empresas del Reino Unido reconocieron su utilidad para el tratamiento de heridas de guerra y comenzaron a fabricarla a partir de cultivos de *Penicillium* desarrollados en botellas de vidrio. Las cantidades producidas eran insuficientes, por lo que Florey se desplazó a Estados Unidos para convencer a las compañías farmacéuticas de que fabricaran penicilina. La empresa química estadounidense Pfizer, de Brooklyn, que fabricaba ácido cítrico mediante la fermentación de melazas, después de muchas investigaciones adaptó dicho proceso para producir penicilina. Después de la guerra, los tres científicos recibieron el Premio Nobel por sus trabajos, y la penicilina pasó a estar disponible en todo el mundo.

1.3.1. ALEXANDER FLEMING Y EL DESCUBRIMIENTO DE LA PENICILINA.

En los tiempos previos al “descubrimiento” de la penicilina, Alexander Fleming se encontraba investigando sobre el crecimiento y las propiedades de los estafilococos en el hospital Saint Mary de Londres. Para ello cultivaba *Staphylococcus aureus* sobre agar en placas de Petri y frecuentemente dejaba las placas descubiertas para permitir que los posibles contaminantes del aire crecieran sobre el agar. En septiembre de 1928 Fleming descubrió que una de las placas se había contaminado con una spora fúngica y que en las proximidades del micelio del hongo habían desaparecido prácticamente todos los estafilococos. Fleming fue capaz de interpretar correctamente este hecho, y en esta explicación radica buena parte del enorme esfuerzo que posteriormente se aplicará a la producción de antibióticos con fines terapéuticos, concluyendo que probablemente el hongo produce una sustancia bacteriolítica que difundiría a través del agar [11]. Si se cultivaba el hongo en medio líquido y a continuación se retiraba el micelio por filtración conseguía detectarse la presencia de la sustancia activa en el medio de cultivo. Fleming identificó el hongo contaminante como *Penicillium rubrum* y por ello denominó **penicilina** al caldo de cultivo obtenido tras el crecimiento del hongo y la filtración del micelio. En 1932, el micólogo americano Charles Thom identificó la “cepa de Fleming” como *Penicillium notatum* [12]. A continuación, Fleming estudió la sensibilidad de varias cepas bacterianas a dicha sustancia antibacteriana en placas con agar, encontrando que un buen número de especies patógenas para el hombre eran sensibles a este filtrado: estafilococos, estreptococos, neumococos y gonococos entre ellas. Determinó, asimismo, que diluciones 1:800 de este filtrado eran suficientes para inhibir el crecimiento de los cultivos bacterianos y que no era irritante ni tóxico en tejidos animales de conejo, ratón o de humano. La penicilina era el primer producto conocido más dañino para las bacterias que para los leucocitos.

Basándose en la actividad antibiótica del filtrado, Fleming lo utilizó para el aislamiento de bacterias no sensibles a penicilina, como por ejemplo *Bacillus influenzae*, a partir de cultivos mixtos. También estudió la estabilidad del compuesto y llegó a tres conclusiones importantes:

1. Es muy lábil: la actividad se perdía casi completamente en 10-14 días si se mantenía el filtrado a temperatura ambiente; en solución alcalina era un poco más estable.
2. El calentamiento del filtrado a 100 °C condujo a una disminución o pérdida de la actividad. La disminución era más acusada cuando se utilizaban soluciones alcalinas. Sin embargo, no tenían efecto negativo sobre la actividad temperaturas de alrededor de 80 °C aplicadas durante una hora.
3. Tampoco tiene ninguna influencia sobre la capacidad antibacteriana la esterilización por filtración.

Los intentos posteriores de Fleming y sus colaboradores Ridley y Craddock para aislar el compuesto químico responsable de la actividad biológica resultaron bastante desalentadores, porque consiguieron extraer la sustancia activa en etanol, a pH bajo, pero la inestabilidad del compuesto en medio ácido hizo que el procedimiento fuera tedioso y con un rendimiento muy bajo [13]. Como consecuencia de ello los experimentos realizados por Fleming y sus colaboradores se basaron en la utilización de caldos de cultivo crudos [14].

1.3.2. PRIMERAS REACCIONES AL DESCUBRIMIENTO DE FLEMING.

En 1930-31 G. Paine en la Royal Infirmary de Sheffield, usó un filtrado obtenido a partir de la cepa original de Fleming para tratar infecciones oculares y cutáneas, con resultado dispar: cuatro pacientes con infecciones oculares producidas por neumococos y gonococos fueron curados mientras que en otros casos, especialmente aquellos que presentaban infecciones en la piel, no se obtuvo respuesta positiva. Sin embargo, Paine nunca publicó estos resultados.

En 1930, R. Reid en el Pennsylvania State College, empieza a trabajar en el campo de la penicilina, estimulado por la publicación de Fleming. En 1935 publica que la penicilina se destruye por destilación y diálisis y no se forma o se destruye cuando el cultivo fúngico es expuesto al efecto de la luz ultravioleta o del oxígeno.

H. Raistrick, W. Clutterbuck y R. Lovell de la Royal School of Hygiene and Tropical Medicine, en Londres, comenzaron en 1932 sus estudios con la cepa productora de penicilina descrita por Fleming y demostraron que la penicilina podía ser sintetizada por el hongo cuando este crecía sobre medios sintéticos. El hongo podía crecer en medio Czapek-Dox modificado en 16-20 días. El filtrado que contenía la sustancia activa se mantuvo estable a pH 5-6 durante más de tres semanas. Asimismo, al igual que Fleming y sus colaboradores, consiguieron la extracción en éter de la sustancia activa a partir de un medio de cultivo acidificado. Los intentos para reaislar dicha sustancia a partir del éter condujeron, sin embargo, a la inactivación de la misma. La presencia de agentes oxidantes y de contaminantes bacterianos conducía también a la rápida destrucción de la penicilina.

1.3.3. EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE OXFORD.

El grupo de Oxford, fundamentalmente W. Florey, Ernst Chain y Edward Abraham, en la Sir William Dunn School of Pathology, realizó un prodigioso progreso en poco tiempo. Su trabajo comenzó a finales de 1939 y en ese momento la penicilina no podía ser obtenida en cantidades suficientes como para satisfacer la futura demanda, fundamentalmente debido al comienzo de la 2ª Guerra Mundial.

El primer gran logro del grupo consistió en la introducción de un nuevo elemento en los medios de cultivo utilizados: se basaron en el medio desarrollado por Raistrick y sus colaboradores y lo suplementaron con extracto de levadura hervido. Con ello consiguieron acortar el tiempo de crecimiento del hongo desde las dos o tres semanas habituales a unos diez días.

A continuación, optimizaron la superficie útil del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo mediante el empleo de vasos de cultivo de cerámica especialmente fabricados para este uso. También definieron una unidad que sirvió como patrón cuantitativo, la denominada unidad de Oxford, que equivale a aproximadamente 0.6 µg de penicilina G, tanto en forma de sal sódica como en su forma de sal potásica.

Tras esto elaboraron un procedimiento de separación de la penicilina del filtrado. Que consistía en que el filtrado se extraía con éter o acetato de amilo a pH 2 en frío y la reextracción de la penicilina se conseguía con un tampón de fosfato o agua a pH 6-7. Los contaminantes que daban color a la preparación se eliminaban por adsorción sobre carbón activo seguida de cromatografía en una columna de óxido de aluminio. Tras lavar la columna con éter, el compuesto activo se eluía con tampón de fosfato, se reextraía con éter y se transformaba en su sal sódica. El resultado de liofilizar esta solución era un polvo pardo bastante higroscópico. La disponibilidad de penicilina en forma de polvo (aunque todavía con una pureza del 1-2 %) resultaría fundamental para el desarrollo de los estudios químicos, bacteriológicos y terapéuticos que permitieron la utilización del compuesto en el campo sanitario. Las cantidades producidas, sin embargo, todavía eran insuficientes ya que se requerían mayores cantidades para su aplicación en humanos. Por último, procedieron a la aplicación a pacientes de dosis periódicas de penicilina, observando su eficacia contra infecciones de tipo bacteriano. En algunos casos aislados se encontraron fenómenos de alergia.

Estos experimentos demostraban la gran capacidad terapéutica del antibiótico en estudio, pero quedaba un problema por resolver: ¿cómo producir penicilina en mayores cantidades?.

1.3.4. INICIOS DE LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA.

Florey y sus colaboradores decidieron buscar financiamiento para solventar este tema y así, en Junio de 1941, Florey y Heatley viajaron a Estados Unidos. A su llegada, los científicos ingleses visitaron a algunos expertos en fermentación del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de Peoria (Illinois).

A partir de ese momento en Estados Unidos se desarrolló un enorme esfuerzo, perfectamente coordinado por el Gobierno, por parte de los Institutos Nacionales de Investigación, de las Universidades, de los Hospitales y de las industrias farmacéuticas con el fin de obtener suficientes cantidades de penicilina; en principio para usos militares y ensayos clínicos y, posteriormente, para el suministro a la población civil.

Tras la visita de Florey, el NRRL se constituyó en el centro de desarrollo en Estados Unidos de las investigaciones relacionadas con la penicilina.

Como consecuencia de los trabajos de R. Coghill y A. Moyer, en el NRRL se consiguieron importantes progresos y se sentaron las bases de la futura producción de penicilina a gran escala. Se destacan los siguientes resultados:

1. La adición al medio de cultivo de “corn steep liquor”, un subproducto en la producción de almidón de maíz que en Peoria se encontraba en grandes cantidades y a bajos costos, conducía a un incremento de unas diez veces en la producción de penicilina. Tras este cambio el hongo ya no producía penicilina F, sino fundamentalmente penicilina G.
2. El cambio en el medio de fermentación de glucosa por lactosa también incrementaba la formación del producto de interés.
3. Se comprobó que *Penicillium* es capaz de crecer sumergido en tanques de fermentación, lo que permitió unas mayores posibilidades para el crecimiento a gran escala que las que proporcionaba el crecimiento tradicional en superficie.
4. Finalmente, se probaron nuevos hongos con el fin de encontrar microorganismos con una mayor capacidad de producción. Así se encontró una nueva cepa (*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951) en un melón mohoso localizado en el mercado de Peoria (Illinois). Esta cepa producía mayores cantidades de penicilina (0.07 g/L, en comparación con los 0.0012 g/L producidos por la cepa de *P. notatum* aislada por Fleming) y era más adecuada para la realización de cultivos sumergidos. Algunos mutantes de esta cepa producían incluso más.

En 1941, cuando Florey y Heatley viajaron a Estados Unidos, sólo tres compañías farmacéuticas norteamericanas (Merck, Squibb y Pfizer, esta última con experiencia en técnicas de fermentación microbiana debido a la utilización de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico) se comprometieron seriamente en la investigación de este nuevo producto. Así, rápidamente se incorporaron a la producción las compañías Abbott y Winthrop y a mediados de 1943 el número de compañías productoras de penicilina era de veintidós.

Toda la producción se destinaba a fines militares (salvo una pequeña parte destinada a ensayos clínicos) y hubo que esperar hasta mediados de 1945 para que comenzase una distribución regular en los hospitales. Al mismo tiempo, y coincidiendo aproximadamente con el final de la guerra, el precio de la penicilina se redujo unas veinte veces. Pfizer, la mayor productora americana de penicilina hasta 1948 produjo 6 800 Megaunidades de penicilina en 1943 y 723 000 Megaunidades en 1944, una producción más de 100 veces superior. La entrada en funcionamiento de una nueva planta de fermentación con 14 tanques de 7 000 litros de capacidad cada uno fue la responsable de este incremento.

En 1943 el proceso de extracción a partir del filtrado de la fermentación se basaba en la adsorción de la penicilina en carbón, elución, extracción con cloroformo y reextracción con una solución de bicarbonato. Esta técnica también fue mejorada y así en 1946 se desarrolló un sistema para la extracción continua de la penicilina producida. A partir de 1947 se consiguió obtener la penicilina en forma cristalina tras precipitarla desde la fase orgánica con soluciones concentradas de acetato sódico o potásico.

En tanto en Europa, especialmente en Gran Bretaña, la publicación en 1940 del primer trabajo de Florey, Chain y colaboradores acerca de la penicilina despertó el interés por esta sustancia de algunas compañías farmacéuticas británicas.

A pesar de las difíciles condiciones impuestas por la guerra a finales de 1941 ya había cinco empresas implicadas en la producción de penicilina en el viejo continente.

1.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS, GENERO *Penicillium*.

Ecología del género *Penicillium*. Los *Penicillium* son muy comunes y son llamados los mohos verdes o azules, frecuentemente se encuentran en los cítricos, en los quesos y en otros alimentos. Los conidios de *Penicillium*, están por todas partes, en el aire y en el suelo. Varias especies de *Penicillium* atacan y destruyen los frutos. Algunas especies de *Penicillium* están asociados a enfermedades de animales y humanos. Son capaces de producir ácidos cítrico, fumárico, oxálico, glucónico y gálico. Industrialmente son importantes en la fabricación de quesos y antibióticos.

Los bioquímicos han encontrado que los hongos son importantes en el estudio de procesos biológicos fundamentales, debido a la rapidez con que crecen y se reproducen. Además se cultivan en tubos de ensayo, por lo tanto requieren menos espacio, equipo y cuidados. Se sabe que especies como *Penicillium chrysogenum* son excelentes organismos de experimentación para el estudio de la morfología, fisiología, genética y bioquímica de los hongos [15].

El estudio de la **Morfología** del hongo es muy extensa, por lo que solo se mencionará algunos aspectos más importantes: **Estructura somática.** En los hongos como en el genero *Penicillium*, el talo esta constituido por filamentos que se denomina hifa, formada por una pared delgada, transparente, tubular, tapizada de grosor variable. Las hifas que crecen vigorosamente son cecíticas es decir, aseptadas. Existen septos primarios, se forman en relación con la división nuclear y quedan ubicados entre los núcleos hijos; los adventicios, se forman independientes de la división nuclear. Los Deuteromicetes producen hifas desarrolladas, septadas y ramificadas. Los compartimentos o células son plurinucleados.

En relación a la **Estructura subcelular**. *Penicillium* al igual que la mayoría de los hongos son eucariontes; como tales, las células micóticas poseen por lo menos un núcleo, nucleolo, una membrana celular, retículo endoplásmico, vacuolas, vesículas, ribosomas, microcuerpos, microtúbulos, cristales, glucógeno, lomasomas, dictosomas y mitocondrias.

En cuanto a la **Pared celular**. Esta es un componente esencial y constituye del 15 al 30% del peso seco de un hongo. Proporciona rigidez, protege a la membrana del choque osmótico, su grosor es de 200 nm, forma una ultraestructura fibrilar en múltiples capas estrechamente entrelazadas, es muy refráctil. La **Composición** de la pared celular es la siguiente: El 80% consiste en hidratos de carbono. Los polisacáridos más prevalentes son quitina, quitosano, celulosa, β -, α -glucano y manano. Quizás el 10% de la pared consista en proteínas y glicoproteínas, enzimas involucradas en su crecimiento.

La **Membrana celular** de los hongos es de doble capa lipídica, que protege el citoplasma, regula la entrada y salida de solutos, y facilita la síntesis de la pared celular y material capsular. Contiene diversos fosfolípidos, dependiendo de la especie y de la cepa, abundan la fosfatidilcolina, y fosfatidiletanolamina, en menor cantidad la fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y fosfatidilglicerol. También contiene esteroides, como el ergosterol y zosterol.

Las células de hongos, como es el caso del género *Penicillium*, a menudo contienen diversos núcleos en el **citoplasma**. Todas las hifas se consideran multicelulares, mantienen la continuidad citoplasmática. Los filamentos de hifas con tabiques tienen poros que permiten el flujo del contenido citoplasmático y la migración de organelos, incluyendo núcleos. El número de mitocondrias varía según el nivel respiratorio de la célula, la esporulación requiere un gran gasto de energía; La germinación de las esporas se acompaña de un aumento de la actividad respiratoria. Muchos hongos poseen vacuolas características. Se han descrito virus, plásmidos y otros sistemas genéticos extracromosómicos en las especies de *Penicillium*.

Cabe mencionar que en los hongos las **estructuras reproductoras** son muy variadas, por ejemplo, los Deuteromicetes, como *Penicillium*, se reproducen por medio de esporas especiales: conidios, spora asexual no flagelada, que se forma en el ápice. Los conidios pueden ser esféricos, ovoides, alargados, cilíndricos, filamentosos, curvados, etc. Pueden ser uni o multicelulares. Los producidos en cadena son catenulados. Si el conidio más viejo está en el ápice y el nuevo en la base se dice que son de la forma basípeta. Si sucede lo contrario es acrópeta. La célula a partir de la cual se forma el conidio se llama célula conidiógena. El término conidiófero hace referencia a una hifa que sostiene células conidiógenas. Los conidióforos se forman aislados o en grupos dando lugar a estructuras como los sinemas y los esporodoquios; o bien se producen en el interior de fructificaciones denominadas picnidios o acérvulos. Un picnidio es un cuerpo esférico, con el interior tapizado de conidióforos.

Las especies en la que los conidios son producidos en estructuras como picnidios, la **esporulación** es más lenta en comparación con las que los producen en conidióforos.

Los factores que desencadenan y favorecen la esporulación son la temperatura, la nutrición, la luz (longitud de onda), el pH, etc. La esporulación en *Penicillium chrysogenum* es un proceso asexual [16].

En la **reproducción asexual**, somática o vegetativa no hay unión de núcleos, es el caso del género *Penicillium*. Esta es más importante para la propagación de especies. Las formas asexuales de reproducción son: 1) fragmentación del soma, que se transforma en un nuevo individuo; 2) fisión de células somáticas para dar células hijas; 3) gemación de esporas, que producen un nuevo individuo, y 4) producción de esporas y germinación hasta micelio. El método más común de reproducción asexual en los hongos consiste en la formación de esporas, estas varían, en cuanto a color, tamaño, forma, número, disposición, etc. Las esporas asexuales están situadas en esporangios y entonces se llaman esporangiósporas, o son producidas en el ápice y se denominan conidios.

La reproducción asexual hace referencia a la producción de esporas, que son resistentes a situaciones adversas. Las esporas están secas y son transportadas por el aire, algunas tienen una estructura rugosa para adherirse a fomites. Los conidios son las principales esporas asexuales.

Referente a la **Reproducción parasexual**, algunos hongos como los Deuteromicetes, tal es el caso de *P. chrysogenum*, no atraviesan un ciclo sexual verdadero, sino que obtienen muchos de los beneficios de la sexualidad mediante la parasexualidad. Se refiere a la secuencia de eventos que culminan con el intercambio genético vía recombinación mitótica. Es una herramienta de laboratorio para el análisis genético de muchos hongos imperfectos, incluyendo a *P. chrysogenum*.

La parasexualidad se inicia con la formación de un heterocarión, un tallo que contiene núcleos haploides de dos genotipos diferentes. Los heterocariontes se forman más comúnmente por anastomosis de hifas e intercambio nuclear entre cepas genéticamente diferentes de la misma especie. El proceso parasexual, o recombinación mitótica, proporciona un mecanismo natural para intercambio genético entre hongos imperfectos. En el caso de *Penicillium chrysogenum*, como un Deuteromicete, sólo presenta un ciclo asexual o ciclo parasexual [17].

Los hongos parecen tener dos **Formas básicas de crecimiento**: como levaduras y como mohos. La forma de moho de proliferación, característica en *Penicillium chrysogenum*, se refiere a la producción de colonias filamentosas multicelulares. Que consisten en túbulos ramificados de diámetro 2 a 10 μm llamados hifas. El crecimiento de las hifas se produce por elongación apical (extensión de la longitud desde su extremo).

La masa de hifas entrelazadas se denomina micelio. Algunas hifas están divididas en células por tabiques; aún así, la continuidad citoplasmática se mantiene en estos micelios. Los mohos proliferan en la superficie de su sustrato. Las hifas que penetran el medio y absorben los nutrientes se denominan vegetativas. Estas sirven para anclar el micelio al sustrato natural o al agar. Otras se proyectan, y este micelio aéreo posee las estructuras reproductoras.

El examen macroscópico de un moho, en este caso *Penicillium chrysogenum*, debe incluir observación de características como la velocidad de proliferación, topografía, textura y pigmentación. En el microscópico, los tipos de esporas y su ontogenia son característicos de cada especie.

En este sentido, **la morfología y ciclo vital de *Penicillium chrysogenum***, presenta los siguientes aspectos: el micelio produce conidióforos, simples, largos, erectos, que se ramifican hacia el ápice, de manera simétrica o asimétrica, en forma de escoba. El conidióforo se denomina penicilo o pincel. La ramificación de este termina en un grupo de fiálides que sostienen largas cadenas de conidios. Los conidios son esféricos u ovoides y, parecen cuentas de cristal al microscopio. En gran cantidad toman colores verde, azul o amarillos. Germinan fácilmente, dando tubos de germinación y micelios.

La **Identificación Macroscópica del genero *Penicillium***, se hace observando las colonias típicas de las especies de *Penicillium*, que muestran la superficie con tonalidades verdes, azul-verde o verde marrón, pero también pueden verse colonias amarillas y marrones. La superficie de la colonia es aterciopelada a pulverulenta por la densa producción de conidias y a menudo se forman pliegues radiales.

También, puede llevarse a cabo una **identificación Microscópica del genero *Penicillium***, donde el aspecto característico es la ramificación en forma de cepillo de los conidióforos que semejan los dedos de una mano. Largas cadenas de pequeños conidios esféricas se originan en fiálides con forma de botella en la parte superior de las métulas ramificadas.

El aspecto aserrado como de las porciones terminales de las fiálides es una característica útil para diferenciar al *Penicillium* del *Paecilomyces*. Las especies de *Penicillium* sólo rara vez causan infecciones humanas [18].

En cuanto a la **Fisiología del hongo**, se mencionan aspectos como las características de **nutrición**. En este renglón, los hongos obtienen su alimento infectando organismos, parásitos o atacando materia orgánica, sobrobios. Otros establecen relaciones simbióticas con líquenes y micorrizas.

Crecen sobre medios sintéticos, a los que se le suministran glúcidos como la glucosa o maltosa. Ellos, como *Penicillium*, pueden sintetizar sus propias proteínas, utilizando fuentes inorgánicas u orgánicas de nitrógeno y varios elementos minerales. Todos los hongos requieren C, O, H, N, P, K, Na, Ca, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe y Zn. Por lo general la glucosa es la mejor fuente de carbono y los compuestos orgánicos nitrogenados la de nitrógeno, seguidos del amonio y nitratos. Muchos sintetizan vitaminas para otros organismos. Algunos son deficientes en tiamina o biotina, por lo tanto se incluyen en el sustrato. Los hongos almacenan sus alimentos en forma de glucógeno o de lípidos. Algunos hongos como *Penicillium* son omnívoros y pueden subsistir en cualquier materia orgánica, siempre que exista un poco de humedad. Para tomar sus nutrientes segregan enzimas extracelulares que actúan sobre el sustrato digiriéndolo fuera del hongo. De las enzimas que un hongo es capaz de producir depende en gran manera su capacidad para utilizar ciertas sustancias como alimento.

Los hongos presentan una gran variedad de **condiciones de crecimiento**. La mayor parte de los hongos crecen entre 0 y 35 °C, pero la temperatura óptima varía de 20 a 30 °C. La capacidad de los hongos para soportar temperaturas extremadamente bajas, en fase de reposo, se utiliza para su almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido a -19° C. Prefieren medios ácidos para su crecimiento, siendo un pH de 6 el idóneo aproximado. En condiciones favorables las hifas pueden mantener un crecimiento indefinido. En medio líquido crecen de una forma uniforme en todas direcciones desde un punto central y dan una colonia casi esférica. Las colonias tienden a presentar un contorno circular en medios sólidos.

Los principales **Factores ambientales** que afectan el crecimiento de los hongos podrían ordenarse como sigue: En una fermentación algunos de los principales factores a controlar son los siguientes: a) el medio de cultivo, que contenga los ingredientes básicos más los compuestos secundarios; b) la temperatura; c) el grado y tipo de aireación y mezclado, el cual determina la actividad del cultivo y la velocidad del suministro de oxígeno; d) la concentración celular y el tipo de crecimiento, el cual determina la viscosidad del cultivo que puede reducir la efectividad del sistema de agitación; y e) la acumulación de sustancias tóxicas e inhibitorias, las cuales afectan al producto.

Otro factor de suma importancia en el crecimiento de los hongos es el **pH**. La morfología de las hifas de los hongos filamentosos de *Penicillium chrysogenum* es pH dependiente. A pH 6 se forman hifas largas y delgadas, y a pH menores la hifa se hace pequeña, delgada y vacuolada. Estos resultados sugieren que la composición de la pared celular cambia con el pH.

El crecimiento total de los hongos, como *Penicillium chrysogenum*, se divide en cinco fases. Después de la fase de adaptación hay una fase de crecimiento balanceado (exponencial) en la que existe un exceso de nutrientes y la composición y morfología de la hifa se mantienen constantes. En esta fase la rapidez de reproducción celular alcanza su valor máximo. Se termina al agotarse los nutrientes principales o por la acumulación de inhibidores. Durante la fase de almacenamiento, el peso seco del micelio aumenta, pero el nivel de DNA permanece constante. En la fase de mantenimiento o estacionaria el peso seco permanece constante, y se detiene el crecimiento. En la fase de declinación se agotan las reservas del hongo y entonces el número de células viables disminuye, la tasa de mortalidad aumenta debido a una autólisis [19, 20].

1.4.1. FUNCIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS EN LOS HONGOS FILAMENTOSOS.

La adquisición de la capacidad de síntesis de penicilina proporciona a los hongos filamentosos una ventaja evolutiva muy clara. Pueden competir con las bacterias de su entorno usando un arma a la que ellos mismos no son sensibles, debido a que la penicilina posee una gran actividad antibacteriana. Sin embargo, si tenemos en cuenta la gran versatilidad metabólica que presentan los hongos y el amplio rango de pH que toleran es difícil imaginar que las bacterias del suelo pueden representar un serio competidor ecológico para ellos.

En este punto, es más lógico pensar que los hongos usan estas nuevas armas en condiciones de ausencia de nutrientes. En ausencia de nutrientes los antibióticos pueden ser utilizados para lisar las bacterias del entorno y los productos derivados de la lisis bacteriana pueden ser incorporados al metabolismo fúngico [21].

Otra ventaja adicional de la adquisición de la capacidad de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos puede derivarse de su utilización en la detoxificación de ciertos metabolitos nocivos para el hongo. El ácido fenilacético puede ser uno de ellos ya que es un compuesto tóxico cuando su concentración es elevada y la detoxificación consiste en su incorporación a la molécula de penicilina G, molécula que posteriormente es excretada.

1.5. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE PENICILINA POR *Penicillium chrysogenum*.

La fabricación de penicilina es un ejemplo del proceso típico de obtención de antibióticos.

El hongo utilizado industrialmente pertenece a la especie de *Penicillium chrysogenum* y es muy activo sobre estafilococos, estreptococos y neumococos, así como sobre la mayor parte de los microorganismos gram positivos, presentando escasa acción sobre los gram negativos. A la penicilina producida comercialmente se la llama penicilina G (bencil penicilina), aunque el mismo hongo produce varios tipos más. Estos compuestos son ácidos fuertes muy inestables, razón por la que los productos que se encuentran en el mercado son las sales de sodio, de calcio, de aluminio, de potasio o de procaína.

1.5.1. OBTENCIÓN DE PENICILINA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA.

El inóculo o "simiente" para los grandes tanques de fermentación de 20 000 a 115 000 litros de capacidad se prepara por el desarrollo de un cultivo madre del hongo a partir de esporas liofilizadas que se encuentran en un sustrato de agar nutritivo. Varios litros del medio de cultivo, generalmente constituyendo del 5 al 10 % del contenido total del tanque, se preparan en una serie de depósitos de siembra y servirán para sembrar una gran cuba de fermentación.

Las cuatro fases principales de la fabricación de la penicilina son:

- Fermentación
- Separación del micelio del caldo fermentado y extracción de la penicilina por medio de disolventes.
- Purificación con disolventes y formación de la sal sódica de la penicilina.
- Ensayos de control, almacenamiento y venta.

El caldo de cultivo para la fermentación se obtiene por infusión acuosa de maíz, añadiendo de un 2 a un 3 % de lactosa, y también compuestos inorgánicos que contienen hidrogeno, oxígeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, nitrógeno y trazas de hierro, cobre y zinc.

Después de ajustar el pH a 4.5-5.0, el medio de cultivo se pasa al fermentador, que esta equipado con un agitador vertical, con un sistema de introducción de aire esterilizado por filtración y con serpentines para mantener la temperatura deseada. El hongo se introduce por medio de conducciones estériles y con ayuda de aire a presión. El medio se esteriliza con vapor a presión, y la temperatura se mantiene entre 23 y 25 °C. El aire estéril permite el crecimiento del hongo aeróbico y la agitación facilita su uniforme distribución en el seno del líquido. Se requiere un volumen de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo. El proceso se controla a intervalos que oscilan entre 3 y 6 horas; al cabo de unas 50 a 90 horas el crecimiento se va haciendo mas lento, lo que indica que el hongo se ha desarrollado por completo. La masa se enfría a 5 °C, a causa de la inestabilidad de la penicilina a la temperatura ambiente, y se separa el micelio en un filtro de tambor rotatorio.

En el procedimiento antiguo, la penicilina se extraía del filtrado por adsorción sobre carbón vegetal. Se eluía con acetato de amilo, una vez concentrado el eluido se enfriaba a 0 °C y se acidificaba hasta pH 2.0 con un ácido orgánico.

En el proceso de extracción por disolvente, se omite el paso de adsorción con carbón activo y el líquido filtrado se ajusta a pH 2.5 con ácido fosfórico en la misma conducción. Se efectúa una extracción continua a contracorriente con acetato de amilo y luego con cloroformo, concentrándose en sucesivos extractores centrífugos, y el líquido final se trata con tampón de fosfato y bicarbonato sódico para formar la sal sódica. Este producto se esteriliza por filtración y se elimina asépticamente del agua y demás disolventes por cristalización, con lo cual se obtiene penicilina cristalina, que una vez seca puede envasarse en bolsas de polieteno, o en recipientes de vidrio o de acero inoxidable [22].

1.5.2. PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACIÓN.

Hay varios factores que determinan la eficacia, y por lo tanto la rentabilidad o viabilidad económica, del proceso de fermentación encaminado a la obtención de penicilina:

1. La productividad media por unidad de volumen de fermentador y unidad de tiempo.
2. Por los elevados costos que suponen las materias primas para el proceso, es la eficiencia de conversión de los sustratos a productos.
3. La eficiencia de los procesos de separación y de purificación del compuesto de interés.

Los dos primeros factores dependen de la capacidad de producción de penicilina, determinada de forma genética por la cepa industrial utilizada, y por la composición del medio de cultivo. La presencia de compuestos que aumenten, limiten o inhiban el crecimiento del microorganismo o la capacidad de producción de penicilina del hongo afectan de forma negativa al proceso. Ciertos parámetros de desarrollo de la fermentación, como el valor del pH o la temperatura, por ejemplo. Además hay otras variables importantes, en principio de carácter técnico, que influyen en la productividad de la fermentación: la transferencia de oxígeno al medio o la refrigeración del tanque, por ejemplo. Estas características contribuyen al control de la cantidad de biomasa que puede crecer y ser mantenida en el tanque.

El tercero de los factores ha sido muy mejorado, desde los antiguos procesos de recuperación de penicilina, en los que se utilizaba la adsorción sobre carbón activo, hasta los modernos métodos en los que se alcanzan rendimientos superiores al 90 % con una duración del proceso de aproximadamente 15 horas. Los nuevos métodos se basan en la extracción con solventes orgánicos, que posteriormente son reciclados en unidades de destilación y reutilizados para nuevos procesos de extracción.

La mejora en la productividad total se puede conseguir mejorando cada uno de los factores mencionados. La investigación sobre la optimización de los procesos de fermentación y el desarrollo de programas de mejora de cepas por parte de las compañías farmacéuticas ha permitido un espectacular crecimiento de la rentabilidad de tales procesos.

1.6. SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

La Fermentación Sólida (FS) es un sistema de cultivo microbiano antiguo que esta siendo transformado para nuevos propósitos, usando nuevos enfoques de microbiología, bioquímica e ingeniería bioquímica. Tiene ventajas el emplear los procesos de FS, al menos para ciertas aplicaciones sobre algunos procesos convencionales de la Fermentación Líquida (FL). Sin embargo, la última, usualmente es seleccionada, debido al gran éxito comercial de sus instalaciones a gran escala en muchos campos de la biotecnología. Tales unidades son un ejemplo excelente de cómo los fundamentos del conocimiento microbiano y bioquímico se aplican a los principios de la bioingeniería, la cual selecciona el procedimiento, el diseño y el control de aquellas.

Muchos de los procesos donde se aplican las técnicas de la FS son comercializados en los países orientales, principalmente en Japón. No obstante, ha resurgido un gran interés en los países occidentales en los últimos 10-15 años en respuesta a la siempre creciente demanda de procesos económicos [23]. Es una tendencia bien justificada que últimamente puede permitir una extensa industrialización en todo el mundo de los sistemas de FS [24].

1.6.1. FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.

La fermentación sólida se ha usado desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados, ensilados y composteo. El uso del koji para la salsa de soya en China, Japón y Sureste de Asia desde hace mil años antes de Cristo, pueden considerarse como un prototipo de la FS. Consistió en el cultivo de *Aspergillus oryzae* sobre grano de soya y otros granos para producir proteasas y amilasas, las cuales degradan proteínas y transforman los almidones a azúcares. En este sentido el material fermentado se usó para la producción de salsa de soya o, en una segunda etapa, vino de arroz o saké. Aunque las primeras producciones comerciales de enzimas dependieron de la tecnología de FS desarrolladas en China y Japón, el advenimiento de las técnicas en cultivos sumergidos estériles en los años 40's desplazó los métodos en estado sólido en las ciudades occidentales [25].

El trabajo realizado por Hesseltine et al. [26] que estudiaron y describieron los procesos tradicionales de FS en el oriente, informaron acerca de la gran importancia tecnológica de estos sistemas de cultivo. Tales reportes son probablemente responsables, en gran parte, del renovado interés observado en la FS durante los últimos 10 o 15 años. Como consecuencia, la FS ha comenzado a transformarse para nuevos propósitos, usando nuevos enfoques de microbiología, bioquímica e ingeniería bioquímica, y frecuentemente presenta varias ventajas sobre la FL.

1.6.2. MODERNOS SISTEMAS DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.

Además de los sistemas tipo koji, los cultivos de FS ahora se realizan en otros sustratos de almidón como raíces (flor de cazabe o de papa), plátanos, etc., o materiales de linocelulosa como paja o pulpa de madera. Estos sistemas de FS son referidos como no tradicionales. Un nuevo tipo de FS usa un soporte inerte con medio líquido absorbido. El soporte puede ser de origen natural como el bagazo de caña de azúcar, o artificial (sintético) como poliuretano, amberlita o verniculita.

Este tipo de FS es muy útil para estudios básicos debido a que el medio líquido, puede ser usado con la composición deseada, y el caldo de fermentación puede extraerse y analizarse al mismo tiempo. Algunos de ellos, como el bagazo de caña de azúcar, han observado gran productividad [27].

Los sistemas de fermentación sólida fueron definidos por Hesseltine [28] como una fermentación en la cual el sustrato no esta presente en fase líquida. Sin embargo, una posterior definición propuesta por Lonsane et al. [29], nos dice que es un cultivo microbiano que se desarrolla sobre la superficie y en el interior de una matriz sólida en ausencia de agua libre. La matriz porosa puede ser un sustrato humedecido o un soporte inerte capaz de absorber nutrientes disueltos en la solución.

En este sentido dos clases de FS pueden distinguirse, en función de la naturaleza de la fase sólida empleada:

Cultivo sólido de una fase soporte-sustrato: La fase sólida esta constituida por materiales que asumen, simultáneamente, las funciones de soporte y fuente de nutrientes. Este material es generalmente de almidón o lignocelulosa. Varias aplicaciones en FS usan este tipo de sistema.

Fermentación en estado sólido de dos fases soporte-sustrato: Son cultivos sólidos de un soporte inerte impregnado con un medio líquido. En este tipo de fermentación, la fase sólida se considera como un soporte inerte que sirve de reservorio para una solución nutritiva. En este tipo de FS la capacidad de retención del agua es un parámetro importante en la selección del soporte.

1.6.3. NUEVAS APLICACIONES.

En el oriente, principalmente en Japón [30], los procesos de fermentación en estado sólido se usan a escala comercial para la producción de diferentes tipos de alimentos fermentados tradicionales, metabolitos fúngicos y para la bioconversión de residuos orgánicos. Sin embargo, este sistema de cultivo puede ser significativamente ventajoso en relación a los métodos de FL para la manufactura de productos no tradicionales de interés. Estas ventajas y su versatilidad de tales sistemas de cultivo han provocado la aparición de un gran número de nuevos campos de aplicación [31]. Algunos ejemplos de nuevas aplicaciones son: alimentos fermentados, como queso, koji, pozol y cacao; producción de enzimas, como amilasas, proteasas, celulasas y pectinasas; metabolitos secundarios como las micotoxinas y producción de alcohol; entre otros.

1.6.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

Los sistemas de FS y FL han sido comparados por varios autores [32].

Las ventajas de la FS incluyen:

- Frecuentemente no se necesitan condiciones estériles. Los procesos se llevan a cabo como cultivos puros debido a que las condiciones del sólido (similar al hábitat natural) ecológicamente favorecen a los hongos.
- La morfología miceliar del hongo (microorganismo más asociado con la formación de metabolitos secundarios) esta bien adaptada para un crecimiento invasivo sobre un medio sólido.
- Los requerimientos de energía en FS son relativamente menores debido a que el oxígeno se transfiere directamente al microorganismo.
- Los metabolitos frecuentemente se producen en altas cantidades [33]. Este es un importante punto que contrarresta algunas desventajas.
- Frecuentemente los productos fermentados en estado sólido se usan tal cual, en consecuencia el proceso es relativamente más económico que los cultivos líquidos. En algunas instancias el producto final se requiere en forma sólida por ejemplo antibióticos en forrajes.
- La extracción de productos solubles del estado sólido se realiza humedeciéndolos con un pequeño volumen de solvente y frecuentemente pueden obtenerse soluciones concentradas del producto, los cuales, de este modo están listos para su purificación por métodos simples. Esto implica una reducción en los efluentes líquidos.
- Los costos de capital son significativamente menores.
- Pueden usarse medios de cultivo muy concentrados sin afectar la formación del producto.
- Algunos cambios de utilidad en las características de las enzimas se pueden observar en la FS. Como la secreción de pigmentos en el medio sólido (intracelular en FL).

A pesar de las ventajas, el uso comercial a gran escala de FS requiere solución a varios problemas.

Las desventajas de la FS incluyen:

- Problemas de disipación de calor.

- Carencia de sensores y métodos eficientes para manejar sólidos.
- Dificultad para añadir nutrientes y agentes de control.
- Inexperiencia de ingenieros en las naciones occidentales para diseñar y escalar los fermentadores en estado sólido; y la no existencia de fermentadores estándar para estos procesos.
- Una desventaja muy importante es la información relativamente limitada sobre la fisiología y genética de las cepas en FS que posibiliten la optimización en la producción.

1.6.5. ASPECTOS FISIOLÓGICOS.

Los efectos fisiológicos de un ambiente líquido sobre la biomasa y formación del producto por hongos filamentosos han sido ampliamente estudiados en cultivos líquidos [34]. Sin embargo en FS hay poca información disponible de los efectos de un ambiente sólido sobre los microorganismos.

Puede pensarse que algunos efectos sean similares a los observados en cultivos líquidos, modificación de la composición química, estructura física de los sustratos y variaciones locales de temperatura, pH, concentración de nutrientes y gases disueltos.

No obstante, recientemente llegó a ser evidente que la respuesta bioquímica y fisiológica de ciertos microorganismos en cultivos en estado sólido puede diferir enormemente a aquellos cultivos en estado líquido, lo cual conlleva a una reducción o pérdida eventual, de la productividad de las enzimas deseadas o metabolitos. La fisiología en un medio sólido puede ser tan diferente que los microorganismos producen enzimas con diferentes características de tamaño, K_m , estabilidad, pH y temperatura óptimas, y diferente sensibilidad a la inhibición por sustrato [35]. Se ha reportado que las enzimas intracelulares llegan a ser extracelulares cuando se producen en FS [36].

1.7. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

Aunque algunos trabajos sugieren que altas concentraciones de metabolitos secundarios pueden producirse en cultivos sólidos, no se intentó producir metabolitos secundarios por este sistema (a excepción de pigmentos), hasta el final de los 80's. En 1987 Kumar y Lonsane [37] reportaron la producción de ácido giberílico por FS sobre salvado de trigo en matraces. Un año después el grupo de Barrios y colaboradores publicaron el primer artículo sobre la producción de penicilina por FS sobre un soporte inerte, usando fermentadores en columna tipo Raimbault con aireación forzada. Esto marcó el comienzo de una nueva fase de investigación sobre la producción de metabolitos secundarios por FS. Después de esto, varios autores han estudiado la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios de utilidad por diferentes sistemas de FS.

Estos trabajos constituyeron una segunda etapa de estudio e interés sobre la materia, que se caracterizaron por la diversidad de metabolitos secundarios producidos y por el uso de sistemas nuevos no tradicionales de FS. También, estos estudios no solo causaron la optimización de las variables del proceso más usadas sino que también profundizó el estudio básico de su funcionamiento.

1.7.1. LOS SISTEMAS DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.

Los sistemas de FS se realizan sobre granos. El trabajo de Barrios y colaboradores sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos sólidos comenzó usando como soporte sólido flor de cañabe (constituida principalmente por almidón), y estudiando la síntesis de aflatoxinas y ácido giberílico. En tal periodo se observó que cuando la fuente de carbón era parte constituyente de la estructura, las características físicas del medio sólido se deterioraban progresivamente durante el cultivo reduciendo la transferencia de masa y energía. Aunque la síntesis del metabolito fue muy rápida, el cultivo no podía proceder por largos periodos. Ellos tuvieron la idea de usar un soporte inerte con medio líquido impregnado el cual resolvió el problema, debido a que la estructura física fue más o menos constante por todo el tiempo de cultivo.

Varios soportes se probaron y el bagazo de caña de azúcar se escogió debido a que se obtuvo un buen crecimiento y producción, no solo para los metabolitos secundarios sino para diferentes enzimas [38]. Los estudios sobre el metabolismo secundario en FS también se impulsaron por el uso de la penicilina como un modelo conveniente de metabolito secundario.

Varios estudios sobre la formación de productos secundarios, publicados durante los últimos 15 años, se han realizado en diferentes sistemas de FS. Algunos ejemplos de estos recientes sistemas son: la producción de ácido giberílico sobre salvado de trigo; la producción de penicilina sobre bagazo de caña de azúcar; de tetraciclina sobre residuos de papa; de cefamicina sobre cebada; de pigmentos sobre harina de Mantou; entre otros.

1.7.2. LOS MICROORGANISMOS Y SUS PRODUCTOS.

La FS se define como un método general para la producción no solo de micotoxinas, sino de antibióticos y otros metabolitos secundarios de utilidad, como estimulantes del crecimiento en plantas, alcaloides y pigmentos. El panorama es también optimista debido al rango de microorganismos que pueden usarse exitosamente para la producción de estos compuestos. Además de diferentes especies de hongos, se ha reportado el uso de actinomicetos y de bacterias no filamentosas en este proceso.

1.8. CEPAS PRODUCTORAS Y NIVELES DE PRODUCCION.

El desarrollo de cepas microbianas de alta productividad es un prerrequisito para la eficiencia en los procesos biotecnológicos. Hasta el presente, el mejoramiento de cepas se basó principalmente sobre la mutagénesis inducida. La mutación y selección es responsable de un gran incremento en los títulos de la penicilina, mientras que durante los últimos años la recombinación genética se ha basado en la cruce parasexual y la fusión de protoplastos que se convirtieron en estrategias adicionales [39]. Aunque las técnicas de ADN recombinante (ingeniería genética) proporcionan un enorme potencial para el mejoramiento de cepas industriales, su impacto comienza a sentirse. Sistemas de clonación básicos se han desarrollado para varios microorganismos usados en procesos industriales [40].

1.8.1. CEPAS ESPECIALES PARA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.

Uno de los mayores aspectos positivos en FS es que los metabolitos son, en muchos casos, producidos con rendimientos más altos que en FL [41]. Sin embargo, hay pocos reportes sobre estudios comparativos, y los pocos trabajos se han llevado a cabo sobre cepas de baja producción, las cuales son más cercanas a las cepas silvestres que a los mutantes sobreproductores usados en las modernas industrias de FL.

En efecto existe una carencia de información de que tipo de cepas se necesitan para los procesos en FS. Las cepas sobreproductoras, desarrolladas para medios líquidos, pueden no tener el rendimiento esperado en los procesos de FS. Esto puede causar no solo una subestimación del potencial de la FS para ciertas aplicaciones sino que también puede ser un serio obstáculo para estos métodos de cultivo, debido a que muchas o todas las cepas sobreproductoras se han desarrollado para FL.

Un estudio del grupo de Barrios y colaboradores [42] mostró que, como en FL, las cepas son un elemento fundamental en los niveles de producción que pueden obtenerse en FS. Se encontró que las cepas de alto rendimiento, desarrolladas para FL, tienden a ser de alta producción en FS también. Esto concuerda con los resultados que obtuvieron sobre la regulación de la biosíntesis de penicilina en FS, debido a que ello implica que los mutantes que permiten una alta producción en medio líquido también se pueden usar para sobreproducir en medio sólido.

1.8.2. EFICIENCIA DE LAS CEPAS EN FS.

En el mismo trabajo [42] se definieron parámetros que permitieron una evaluación cuantitativa de la eficiencia de diferentes cepas que producen en FS. En este sentido, fue posible determinar que cepas de alta producción (para FL) tienden a ser menos eficientes en FS, mientras que las cepas de baja producción muestran producciones relativas muy altas.

Esto implica la existencia de una o varias características, probablemente no relacionadas a la ruta biosintética, que permiten una alta producción en FS (además necesarias para la producción en medio líquido), las cuales frecuentemente se encuentran más en las cepas de baja producción. Estas características se desconocen pero se expresan como producciones relativas altas. Debido a que estos valores de producción fueron más altos en las cepas de bajo rendimiento, es posible que estas características se hayan perdido durante los programas de mejoramiento genético.

1.8.3. MEJORAMIENTO DE CEPAS PARA FS.

Aunque las cepas de alta producción (para FL) tienden a ser menos eficientes en cultivos sólidos, algunos mutantes derivados de estas cepas desplegaron rendimientos muy buenos en medios sólidos. Esta es la base de los métodos descritos para seleccionar mutantes de alta producción particularmente adaptados para FS. En el trabajo referido, las cepas mutantes generadas que produjeron más de 10 500 microgramos de penicilina por gramo de materia seca representaron incrementos muy importantes en la producción, en relación a la cepa parental [42]. Esto significa que el proceso de aislamiento de mutantes de cepas de alta producción en FL, y selección como se indica en ese trabajo, es un método eficiente y rápido de generación de sobreproductores de penicilina (y probablemente de otros metabolitos secundarios) particularmente adaptados para FS.

Puede especularse que en FS los microorganismos sienten el ambiente sólido y reaccionan produciendo enzimas especiales que son más eficientes en un medio con difusión restringida. Es posible que la estructura de su membrana varíe también para adaptarse al medio en una interface de aire-agua-soporte, con diferentes condiciones para tomar los nutrientes y secretar los productos. La protección constante contra una presión osmótica y una toxicidad iónica puede ser otra característica particular de FS. Todo esto sugiere la existencia de algunos mecanismos de regulación y adaptación de genes en medio sólido.

1.9. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS.

Una vez conocida la estructura química de las penicilinas se observó la presencia de un denominador común entre ellas. La presencia del anillo β -lactámico daría lugar a la creación del denominado, desde entonces, grupo de los antibióticos β -lactámicos.

El núcleo central de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), formado por el anillo β -lactámico asociado a un anillo tiazolidínico.

En las cefalosporinas y cefamicinas, el anillo β -lactámico aparece asociado a un anillo dihidrotiazínico, formando un núcleo central denominado ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA).

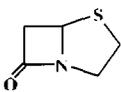
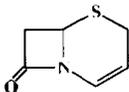
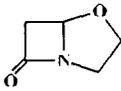
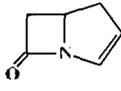
Núcleo β -lactámico	Estructura	Hongos	Bacterias	
			Gram-positivas	Gram-negativas
Penam		<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Trichophyton</i> <i>Polypaecilum</i> <i>Malbranchea</i> <i>Sartorya</i> <i>Pleurophormopsis</i>		
Cefem		<i>Cephalosporium</i> <i>Anixiopsis</i> <i>Arachnomycetes</i> <i>Spiroidium</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Diheterospora</i> <i>Paecilomyces</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Nocardia</i>	<i>Flavobacterium</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Lysobacter</i>
Clavam			<i>Streptomyces</i>	
Carbapenem			<i>Streptomyces</i>	<i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>
Monobactam			<i>Nocardia</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Chromobacter</i> <i>Agrobacter</i> <i>Acetobacter</i>

Tabla 1.1. Especies productoras y principales grupos de antibióticos β -lactámicos.

Es la naturaleza de la cadena lateral que se une al núcleo central la responsable de conferir a estos antibióticos características hidrofílicas o hidrofóbicas: algunas penicilinas son de carácter hidrofóbico porque sus cadenas laterales las constituyen el ácido fenilacético (penicilina G) o el ácido fenoxiacético (penicilina V), de características hidrofóbicas, mientras que otras presentan una cadena lateral hidrofílica de ácido L- α -aminoadípico (isopenicilina N). Las cefalosporinas y cefamicinas poseen siempre una cadena lateral de ácido D- α -aminoadípico, por lo que siempre presentan características hidrofílicas.

Las penicilinas con cadena lateral hidrofóbica son exclusivamente sintetizadas por ciertas especies de hongos filamentosos [43] y las cefalosporinas y cefamicinas pueden ser producidas, como se puede observar en la Tabla 1.1, por diferentes especies de hongos filamentosos, muchos actinomicetos (microorganismos gram-positivos) y unas pocas especies de bacterias unicelulares gram-negativas [44].

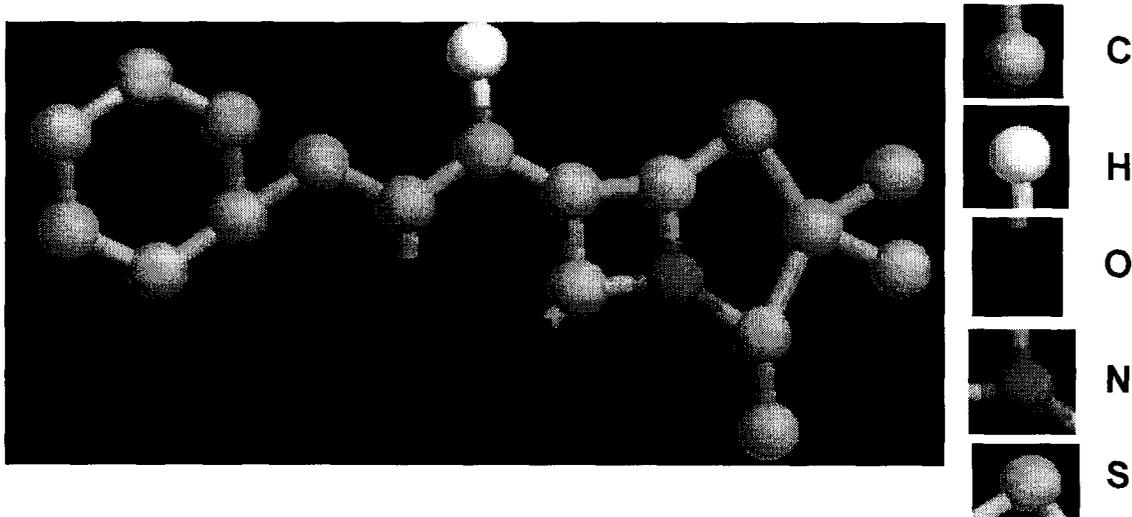
Otros compuestos β -lactámicos con actividad antibacteriana son las carbapenemas, las cefamicinas y las monobactamas: todos ellos producidos por diferentes especies de microorganismos. Estos compuestos están adquiriendo cada vez mayor importancia en el mercado farmacéutico.

1.9.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PENICILINA.

En 1941, cuando comenzaron los primeros ensayos clínicos con la penicilina, prácticamente no se conocía nada acerca de la naturaleza química de este compuesto, excepto que se trataba de una molécula relativamente pequeña, que se extraía en su forma ácida con solventes orgánicos y que podía reextraerse en forma de sal en soluciones acuosas. Dos años después, Edward Abraham y Ernst Chain consiguieron cristalizar la penicilina F obtenida en Oxford en forma de sal sódica y fueron capaces de compararla con el compuesto producido en Estados Unidos, la penicilina G. Difería en que poseía un grupo bencilo en lugar de un grupo 2-pentenilo, lo que se debía a que el medio usado en las fermentaciones por las compañías americanas contenía líquido de maceración del maíz, este componente del medio de cultivo aportaba un precursor de la cadena de fenilacetilo. Posteriormente consiguieron degradar la molécula en tres componentes: un aminoácido (la penicilamina), un aldehído y CO₂. En octubre de 1943 ya se empezaba a valorar la posibilidad de que la estructura química de la penicilina contuviera una β-lactama, lo que fue motivo de una seria polémica entre los que defendían esta estructura y los que encontraban a esta estructura como inaceptable y sugerían una estructura bicíclica tiazolidina-oxazolona. Dos años más tarde la polémica quedó resuelta, tras el análisis de cristalografía de rayos X de la molécula [45]. Figura 1.1.

Más de diez años después se conseguiría la primera síntesis racional de penicilina por métodos químicos, en el Massachusetts Institute of Technology [46].

Sin embargo, este sistema (de indudable valor académico) y otros desarrollados posteriormente [47] no han resultado ser lo suficientemente rentables desde el punto de vista económico como para ser capaces de competir con las técnicas de fermentación en la producción de penicilina a escala comercial.



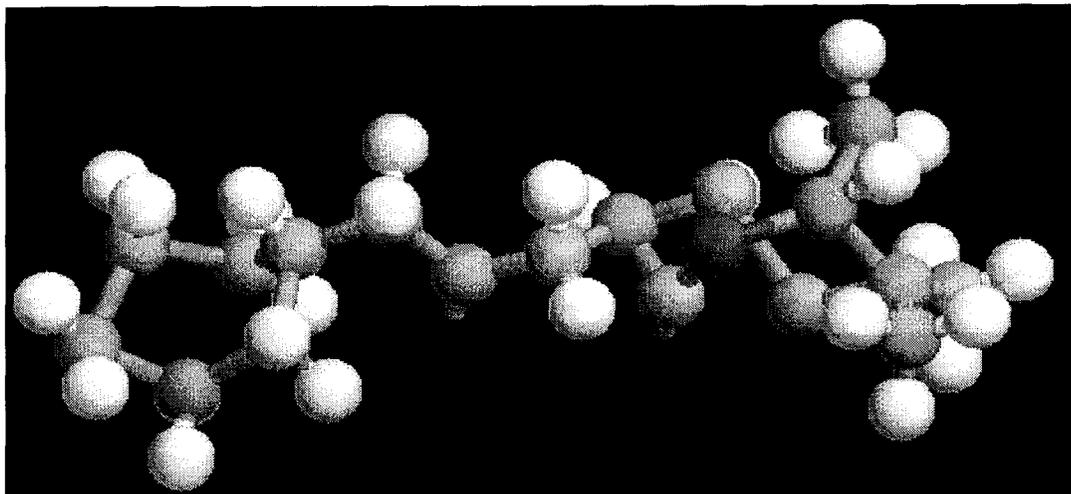


Figura 1.1. Estructura química básica de penicilinas. La imagen superior es la estructura básica de las penicilinas, representada en dos dimensiones. A la derecha de la imagen se indica el tipo de átomos que conforman la molécula de la penicilina. La imagen inferior es la molécula en tercera dimensión.

1.10. GENES Y ENZIMAS INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINAS.

Las penicilinas son miembros del grupo de los antibióticos de tipo β -lactámico y contienen modificaciones estructurales de los antibióticos de tipo peptídico, con los que se podrían relacionar [48]. Todos estos antibióticos contienen un anillo β -lactámico unido a un segundo anillo de cinco miembros. La presencia de un átomo de azufre en este segundo anillo proporciona características diferenciales a penicilinas con respecto a las otras clases de antibióticos β -lactámicos. La biosíntesis de antibióticos β -lactámicos es un proceso que requiere de una serie de precursores, como aminoácidos o compuestos que van a dar lugar a la cadena lateral y cofactores. El estudio de las “rutas accesorias” de los mecanismos básicos de biosíntesis de β -lactamas es muy importante en la actualidad, con el objetivo de la mejora global en la producción de tales antibióticos. Sin embargo, sólo se hará referencia a los pasos directamente implicados en la biosíntesis y, se llamará *genes estructurales* de biosíntesis de penicilinas a aquellos genes que codifiquen para proteínas directamente implicadas en la ruta biosintética.

1.10.1. VÍA BIOSINTÉTICA DE LAS PENICILINAS.

La mayoría de los pasos implicados en la biosíntesis de las penicilinas han sido caracterizados a nivel bioquímico [21, 49] aunque los mecanismos relacionados con las reacciones llevadas a cabo por las diferentes enzimas se mantienen dentro del campo de las hipótesis (a pesar de su gran interés desde los puntos de vista médico e industrial).

Los primeros estudios realizados acerca de la biosíntesis de β -lactamas fúngicas en los que se utilizaron extractos acelulares condujeron a la observación de un tripéptido que contiene cisteína: el δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina o ACV, como el precursor directo en la biosíntesis de penicilina por parte de *P. chrysogenum* [50] y por bacterias productoras de β -lactamas [51]. El tripéptido ACV es posteriormente ciclado para formar isopenicilina N, primer intermediario de la ruta con actividad antibiótica y que posee una cadena lateral de α -aminoadipilo unida al anillo β -lactámico, en una reacción que fue descrita por primera vez en *P. chrysogenum* [52]. En este microorganismo, la isopenicilina N es convertida en penicilina tras el intercambio de la cadena lateral de α -aminoadipilo por otra de fenilacetilo (penicilina G) o fenoxiacetilo (penicilina V). Esta reacción de transacilación es característica solamente en los microorganismos productores de penicilina. Figura 1.2.

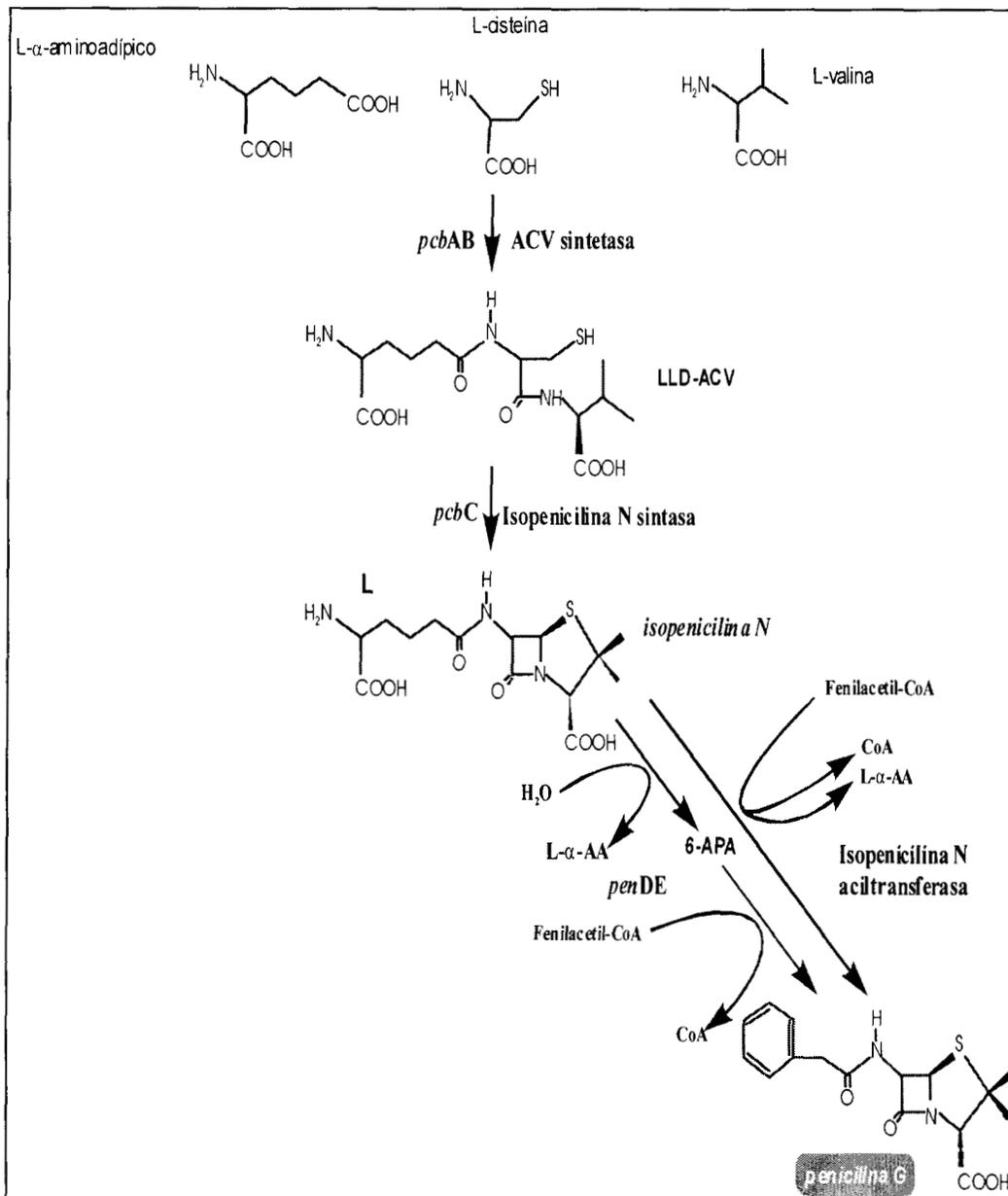


Figura 1.2. Ruta de biosíntesis de penicilinas.

1.10.2. EL GEN *pcbAB* CODIFICA PARA LA ACV SINTETASA.

El tripéptido ACV constituye el primero de los pasos comunes en la biosíntesis de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas.

Este compuesto, cuya formación aún no se conoce en todos sus detalles, ha sido aislado a partir de caldos de cultivo de *P. chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*, *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* y otros más [53]. La formación del tripéptido ACV es estimulada cuando se inhibe la síntesis proteica con cicloheximida o anisomicina [54], lo que confirma la hipótesis de que el péptido se forma por condensación no ribosómica de los tres aminoácidos que lo componen. Parece ser que la condensación comienza con la activación del grupo δ -carboxilo del ácido α -aminoadípico, seguida de la reacción con el grupo α -amino de la cisteína (o una forma activada de ésta) para constituir el dipéptido L- α -aminoadipil-L-cisteína (o una forma activada de éste). Esta teoría, propuesta por Queener y Neuss en 1982 [55], podría explicar la existencia del dipéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteína (AC) aislado a partir de caldos de cultivo de *A. chrysogenum* [56]. El dipéptido LL-AC es convertido en el tripéptido LLD-ACV al reaccionar el grupo α -amino de la valina con una forma activada del dipéptido, la valina es epimerizada a su configuración D mientras está unida a la enzima responsable de la condensación.

El orden en que se incorporan los tres aminoácidos fue examinado en primer lugar por Fawcett *y col.*, en 1976 [52]: este grupo de investigación observó que extractos acelulares de *P. chrysogenum* eran capaces de convertir una mezcla de δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteína y valina en ACV radiactivo, en presencia de ATP. Los mismos extractos no eran capaces de formar el tripéptido a partir de ácido α -aminoadípico marcado con ^{14}C y de cisteinil-valina.

Posteriormente se describió que la velocidad de formación del tripéptido ACV era mucho mayor cuando se añadían los tres precursores por separado que cuando se utilizaba LL-AC y L-valina, lo que sugería que era una única enzima la que llevaba a cabo la síntesis de ACV, que esta enzima requería la unión de los tres aminoácidos para su máxima actividad y que el intermediario LL-AC permanecía unido a la enzima durante este proceso [57]. La sustitución de la L-valina por la D-valina no permitía la formación del tripéptido.

La enzima encargada de la formación del tripéptido ACV se denomina **δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa** (ACV sintetasa, ACVS o tripéptido sintetasa), requiere para su actividad ATP e iones Mg^{2+} o Mn^{2+} y agrupa un buen número de actividades distintas [57]. Entre ellas cabe destacar el reconocimiento de los sustratos, la activación de los mismos por adenilación, la condensación de los precursores activados, la epimerización de la L-valina a su configuración D y la liberación del tripéptido, siendo el tamaño de la enzima lo suficientemente grande como para englobar todas las actividades descritas. Mediante el empleo de algunas técnicas, se estimó el tamaño molecular en unos 420-460 kDa, valor muy acorde con la capacidad codificante del gen *pcbAB* [58].

La ACV sintetasa posee tres dominios distintos, con secuencias muy conservadas entre sí, separados por regiones de baja similitud.

Estos dominios conservados, de más de 500 aminoácidos, parecen corresponder a los centros de activación de cada uno de los aminoácidos precursores del tripéptido [59], sugiriéndose un tipo de organización similar al que aparece en otras enzimas formadoras de adenilatos y en otras multienzimas formadoras de péptidos. Se ha detectado en esta enzima la existencia de una secuencia consenso típica de tioesterasas, secuencia que en la ACV sintetasa podría ser responsable de la hidrólisis de la unión enzima-producto y de la posterior liberación del tripéptido.

En el presente trabajo se usará la nomenclatura que precede a los genes comunes de penicilina y cefalosporina con *pcb* y a los específicos de penicilina con *pen*, [60].

El gen *pcbAB* de *P. chrysogenum* codifica para la ACV sintetasa y fue clonado por complementación de dos mutantes de este microorganismo defectivos en la actividad ACV sintetásica [58]. Los estudios transcripcionales realizados con este gen llevaron a la observación de un gran transcrito, de aproximadamente 11.5 kpb y se determinó la secuencia de la región codificante: 11 376 pares de bases, que codificarían para una proteína de 3 792 aminoácidos y una masa molecular de 425 971 Da.

En la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *pcbAB* se encontraron tres dominios con una amplia similitud entre sí, con un gran parecido también con péptido sintetasa de *Bacillus* y con otras enzimas en las que se dan procesos de activación con requerimiento de ATP. El gen, a pesar de su gran tamaño, no poseía intrones, además en *P. chrysogenum*, se expresaba en sentido contrario a los demás genes de la ruta. Figura 1.3. Al mismo tiempo, se determinó que el gen se encontraba formando parte de un grupo (“cluster”) en el que se incluían también los otros dos genes implicados en la biosíntesis de penicilina [61, 62].

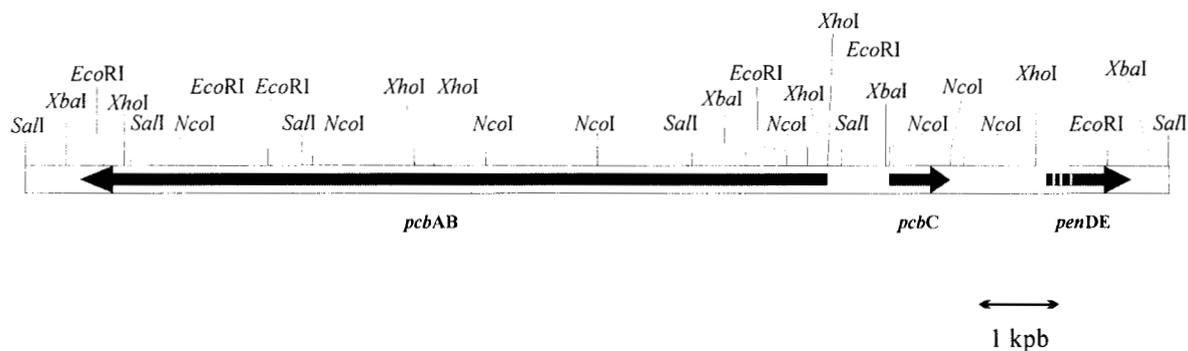


Figura 1.3. Agrupamiento de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos en *Penicillium chrysogenum*.

1.10.3. EL GEN *pcbC* CODIFICA PARA LA ISOPENICILINA N SINTASA.

La enzima que lleva a cabo el siguiente paso catalítico: ciclación del tripéptido ACV y formación de la isopenicilina N, se denomina **isopenicilina N sintasa** (IPNS). Fue detectada por primera vez en *A. chrysogenum* [63] y ha sido purificada a partir de extractos de *P. chrysogenum* [64], entre otros.

La enzima de *P. chrysogenum* presenta una masa molecular, estimada por cromatografía de filtración en gel y por electroforesis en gel de poliacrilamida, de aproximadamente 39 000 Da, similar a la descrita para las enzimas de los demás microorganismos analizados. Requiere ditioneitol (DTT) para su actividad y es estimulada por ascorbato e iones Fe^{2+} . La reacción enzimática requiere oxígeno y es estimulada por la concentración de oxígeno disuelta en la mezcla de reacción. De hecho, la ciclación tiene lugar mediante la eliminación, mediada por oxígeno, de cuatro átomos de hidrógeno de la molécula del tripéptido.

El gen que codifica para la síntesis de la isopenicilina N sintasa se denomina *pcbC*. El gen *pcbC* de *A. chrysogenum* fue el primero de los genes biosintéticos de antibióticos β -lactámicos estudiado a nivel molecular [65]. Desde entonces, el gen *pcbC* ha sido clonado a partir de otros muchos microorganismos productores de antibióticos β -lactámicos: como *P. chrysogenum* [66]. Los genes que codifican para la isopenicilina N sintasa en procariotas son muy parecidos entre ellos y también lo son a los genes fúngicos. El porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos oscila entre el 62 y el 80 % y a nivel de aminoácidos entre el 54 y el 79 %.

El gen *pcbC* de *P. chrysogenum* carece de intrones, se transcribe en un ARNm de 1.1 kpb y codifica para un polipéptido de 37 900 Da de masa molecular, lo que se aproxima bastante al tamaño de la proteína purificada. Se encuentra localizado aguas arriba del gen *pcbAB*, encontrándose sus respectivas regiones promotoras en una región intergénica de 1 503 pares de bases de longitud, en la que se localizan las secuencias promotoras de los dos genes, Figura 1.4. Esta misma orientación es la que aparece en los demás hongos filamentosos productores de β -lactamas, pero es diferente de la que se encuentra en los productores de tipo bacteriano, donde el gen *pcbC* se localiza aguas abajo del gen *pcbAB*.

1.10.4. EL GEN *penDE* CODIFICA PARA LA ISOPENICILINA N ACILTRANSFERASA.

Esta última parte de la vía, se trata del único paso específico en aquellos hongos con capacidad para originar penicilinas de carácter hidrofóbico, como es el caso de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. Estos microorganismos son capaces de sintetizar penicilinas con cadenas laterales procedentes de una gran variedad de ácidos carboxílicos presentes en el interior de la célula o aportados de forma exógena. La biosíntesis de las penicilinas ocurre por la sustitución de la cadena lateral de α -aminoadipilo de la isopenicilina N por un radical fenilacetilo (o fenoxiacetilo, en el caso de la penicilina V) procedente del fenilacetil-CoA.

Esta reacción es llevada a cabo por la **acil-CoA:isopenicilina N aciltransferasa** (también denominada IPN aciltransferasa, transacilasa o IAT).

La ausencia de isopenicilina N aciltransferasa, debida a la carencia del correspondiente gen [67], en microorganismos productores de penicilinas es la responsable de la incapacidad de estos microorganismos para producir penicilina G o cualquier otra penicilina con cadena lateral hidrofóbica.

La naturaleza del último paso enzimático de la vía biosintética de penicilina ha sido objeto de un amplio estudio. Queener y Neuss [55] propusieron en 1982 un modelo para la reacción que seguiría dos pasos y requeriría dos actividades enzimáticas:

1. La formación de 6-APA a partir de la isopenicilina N, liberándose ácido α -aminoadípico (actividad isopenicilina N amidohidrolásica).
2. La transferencia de la cadena lateral desde un precursor en forma activada (actividad acil-CoA:6-APA aciltransferásica).

La presencia de estas dos actividades fue demostrada posteriormente [68], encontrándose asociadas en el mismo polipéptido junto con otras tres actividades:

3. Actividad acil CoA:isopenicilina N aciltransferásica: Sustituye la cadena lateral sin liberar 6-APA como intermediario. Esta actividad es mucho mayor en *P. chrysogenum* que la actividad amidohidrolásica lo que sugiere que en la reacción normalmente no hay liberación de 6-APA y que este es directamente convertido en penicilina.
4. Actividad penicilina amidásica: Convierte la penicilina en 6-APA y probablemente sea la actividad reversa de la acil-CoA:6-APA aciltransferásica.
5. Actividad penicilina transacilásica: Intercambia cadenas laterales entre dos moléculas de penicilinas hidrofóbicas o entre una molécula de penicilina y 6-APA.

La isopenicilina N aciltransferasa de *P. chrysogenum* ha sido purificada hasta su homogeneidad electroforética [69]. La enzima pura presenta un pH óptimo entre 8 y 8.2 y una temperatura óptima de 25 °C (temperatura óptima en la producción de penicilina). Muestra una mayor especificidad de sustrato.

La preparación purificada de esta enzima mostraba, tras su análisis electroforético, tres bandas proteicas de 40, 29 y 11 kDa de masa molecular. La proteína mayor (40 kDa) era realmente un heterodímero formado por las subunidades de 11 y 29 kDa. La separación de las dos subunidades por medio de la modificación de la secuencia de nucleótidos del gen llevaba consigo la pérdida casi completa de la actividad acil CoA:isopenicilina N aciltransferásica y la mezcla de las subunidades estimulaba unas 15 veces la actividad residual, lo que sugería que la forma activa era el heterodímero (29 + 11 kDa) o que una de las subunidades aportaba información necesaria para que la otra fuese activa [70]. Estas subunidades de 11 y 29 kDa se formarían mediante el procesamiento de la proteína precursora de 40 kDa codificada por el gen *penDE* [71].

1.11. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA AL MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS.

La utilización de las técnicas de Ingeniería Genética ha permitido dar un nuevo impulso al desarrollo de cepas con mayor producción de antibióticos, pero también ha servido para conocer en detalle la naturaleza de los cambios ocurridos durante los procesos de mutagénesis al azar (tanto en los casos en los que se consigue aumentar la producción como en los que ésta resulta disminuida) y la localización específica de tales cambios en el genoma del microorganismo.

Una vez clonados los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos, los primeros intentos de mejora de las cepas de producción realizados se basaron en la idea de que si la producción dependía de la expresión de unos genes, todo cambio capaz de afectar positivamente a dicha expresión podría traducirse en un incremento de la producción.

La forma más inmediata de aumentar la producción consistió en el incremento de la dosis génica es decir, el aumento del número de copias de los genes que codifican para una proteína determinada dentro del microorganismo. A ello contribuyó el desarrollo de técnicas más eficientes para la transformación de los hongos: como en *P. chrysogenum* [75]. Los métodos utilizados se basaban en modificaciones del método desarrollado para *Saccharomyces cerevisiae* y constaban de tres pasos fundamentales: obtención de protoplastos a partir del micelio, transformación de los protoplastos y regeneración de los mismos.

1.11.1. AUMENTO EN LA DOSIS DE LOS GENES PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

Muy pronto, con la utilización del aumento en la dosis génica, se pudo observar el efecto que originaba sobre la producción de antibióticos la integración en el genoma fúngico de un mayor número de copias de los genes estructurales de biosíntesis de penicilina.

La primera aplicación de esta técnica con éxito fue la que tuvo lugar con el gen *cefEF* en *A. chrysogenum* [1]. La amplificación del gen que codifica para la expandasahidroxilasa provocaba un aumento en la actividad enzimática debida a esta enzima, una disminución en la cantidad de penicilina N acumulada y un incremento en la producción de cefalosporina C de la cepa estudiada.

En cuanto a los genes de biosíntesis de penicilina, la sobreexpresión del gen *pcbAB* en *A. nidulans* ha llevado a la aparición de producciones de penicilina 30 veces superiores a las normales. Aunque, cabe aclarar que los valores obtenidos siguen siendo muchos órdenes de magnitud inferiores a los de las cepas de *Penicillium chrysogenum* utilizadas a nivel industrial [2].

La introducción de copias adicionales del gen *pcbC* en la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 no es capaz de originar un incremento notable en la producción de penicilina G, si bien aceleraba ligeramente su biosíntesis entre las 30 y las 80 horas de la fermentación [76]. Este resultado se justifica argumentando que posiblemente la actividad isopenicilina N sintásica no constituya (por sí sola) un “cuello de botella” en la producción de penicilina y que el aumento observado para esta actividad enzimática no sea suficiente para favorecer la biosíntesis de este compuesto.

La realización de un experimento similar con el gen *pcbC* en una cepa silvestre de *A. chrysogenum* y en la cepa mutante N2 [77] condujo a la aparición de resultados similares. La mayoría de los transformantes de la cepa N2 recuperaban la actividad isopenicilina N sintásica. En ningún caso, sin embargo, se superaban los niveles de producción que se conseguían mediante la utilización de microorganismos obtenidos a partir de la cepa silvestre por selección al azar [78].

El gen *penDE* de *P. chrysogenum* también ha sido utilizado en este tipo de experimentos [3], y de *A. nidulans* [4]. En ambos trabajos, los resultados no condujeron a la aparición de resultados satisfactorios.

En otros experimentos de amplificación de la dosis génica [5], no se ha usado sólo este gen en la transformación, sino que se ha utilizado el fragmento de ADN, de 5.1 kpb de longitud y delimitado por sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *SaII*, fragmento que contiene los genes *pcbC* y *penDE* (Figura 1.4). El valor medio de la producción de penicilina G obtenida por 26 transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en los que se había integrado el fragmento de ADN descrito resultó ser significativamente mayor que el valor de producción de aquellos transformantes en los que se había integrado solamente el plásmido sin inserto. Los dos transformantes de mayor producción alcanzaban un incremento del 40 % con respecto a la producción de los transformantes utilizados como control, aunque la variabilidad existente entre los distintos transformantes era bastante elevada. Las diferencias encontradas a nivel individual podrían ser explicadas por la integración de los plásmidos en diferentes localizaciones cromosómicas o por la existencia de un número diferente de copias integradas del plásmido. Pero este último paso de biosíntesis de penicilina sí parecería ser limitante en el desarrollo de la ruta (al menos en la cepa utilizada). Los autores sugieren finalmente que tal vez fuese necesario incrementar de forma homogénea la expresión de los genes *pcbC* y *penDE* para conseguir una mejora en la producción de penicilina.

1.11.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES.

En muchas ocasiones interesa expresar un gen clonado a partir de un microorganismo en microorganismos distintos que se muestren más eficientes que el portador original. Esta técnica es útil para producir una enzima en grandes cantidades o bien para conseguir que el microorganismo traduzca la incorporación de una nueva actividad enzimática en la formación de nuevos productos de interés industrial (productos que, en algunos casos, sólo se podrían obtener a través de una larga y costosa síntesis química). La producción de enzimas puede conseguirse de forma más sencilla mediante la expresión de los genes en bacterias.

Sin embargo, en muchos casos las proteínas eucarióticas deben sufrir modificaciones postraduccionales (glicosilación, acetilación, etc.) para alcanzar su correcta funcionalidad y los organismos procarióticos no son capaces de realizarlas.

A continuación se cita dos ejemplos de la aplicación de estas técnicas al campo de la producción de antibióticos β -lactámicos:

1. La introducción del gen *penDE* de *P. chrysogenum* en *A. chrysogenum* permitió la producción de penicilina G en este último microorganismo (Gutiérrez y col., 1991b).
2. Solamente, se ha logrado integrar todo el conjunto de los genes para la vía de penicilina (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*), en *Neurospora crassa* y *Aspergillus niger* que son hongos no productores de antibióticos beta-lactámicos. Los genes se han expresado heterológicamente confiriendo así la capacidad productora de penicilina a estos organismos [6].

1.11.3. MODIFICACIÓN DE PROMOTORES.

La existencia dentro de la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos de genes cuya expresión parece disminuida respecto del resto, como por ejemplo el gen *penDE* de *P. chrysogenum*, proporciona una base para creer que el cambio de sus regiones promotores por otras más eficientes, por ejemplo, las regiones promotoras de genes del metabolismo primario con un alto nivel de expresión o menos reguladas puede dar lugar a un aumento en la producción del compuesto de interés.

En este sentido, los avances en ingeniería genética están dando forma a un nuevo estilo de mejoramiento genético, en el cual se utilizan estrategias como el incremento de dosis génica, el cambio de promotores (ya mencionadas anteriormente), la interrupción de genes reguladores negativos y la amplificación de genes reguladores positivos.

HIPÓTESIS:

La síntesis de penicilina G se verá aumentada al incrementar la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* de cepas de *Penicillium chrysogenum* de alta y baja producción, llevada a cabo tanto en fermentaciones en medio líquido como en sólido. El porcentaje de incremento en la producción será mayor en medio sólido.

OBJETIVO GENERAL:

Aplicar la estrategia del aumento en la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* a cepas de *Penicillium chrysogenum* para mejorar la producción de penicilina G en sistemas de fermentación líquida y sólida.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Construcción del plásmido integrativo pUAMJC1 que porta los genes *pcbC* y *penDE*.
- b) Generación de transformantes de *Penicillium chrysogenum* con el plásmido pUAMJC1.
- c) Selección de transformantes con mayor número de copias de los genes.
- d) Evaluación de la producción de penicilina G por los transformantes en FL y FS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. MICROORGANISMOS.

2.1.1. CEPAS BACTERIANAS.

Bacillus subtilis ATCC 6633 [79]: Cepa sensible a la acción de antibióticos β -lactámicos, utilizada para la valoración de la penicilina G mediante bioensayos por el método de cobertera y por el método de cilindros de agar.

Escherichia coli DH5 α [80]: Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación, debido a su eficiencia de hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN.

2.1.2. CEPAS FÚNGICAS.

Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255: Cepa de baja producción de penicilina (entre 400 y 600 $\mu\text{g/mL}$). Entre los estudios realizados con esta cepa se pueden destacar los de Cantoral y col., 1993 [72].

Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 *npe6*: Cepa obtenida a partir de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 por mutación con nitrosoguanidina y posterior selección [73]. Carece de la capacidad de producción de penicilina, al haber sufrido alteraciones a nivel del último paso de la ruta biosintética de penicilina.

Penicillium chrysogenum P2-32: Cepa de alta producción de penicilina (1-2 mg/mL). Obtenida por mutación a partir de cepas derivadas de *P. chrysogenum* ASP-78. Aislada por Barrios y col., 1993 .

2.2. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

Bacterias: Las cepas bacterianas se conservaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ en placas de Petri selladas con Parafilm[®], como máximo durante un mes, congeladas a -20 $^{\circ}\text{C}$ en suspensiones dentro de tubos Eppendorf sellados con Parafilm[®], con una concentración final de glicerol del 20 % (v/v), o liofilizadas para periodos más largos de tiempo.

Hongos: Se utilizaron básicamente los dos métodos descritos anteriormente para el mantenimiento de bacterias. En este caso la concentración final de glicerol en las suspensiones es del 40 % (v/v). Hay un método adicional, para el mantenimiento de las cepas fúngicas, que consiste en la liofilización de suspensiones de esporas y su conservación a 4 $^{\circ}\text{C}$.

225561

2.3. VECTORES DE CLONACIÓN.

2.3.1. PLÁSMIDOS.

pC43: 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, también, la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae* y un gen de resistencia a cloranfenicol. Donado por el Dr. S. Gutiérrez (Universidad de León, España). Figura 2.5.

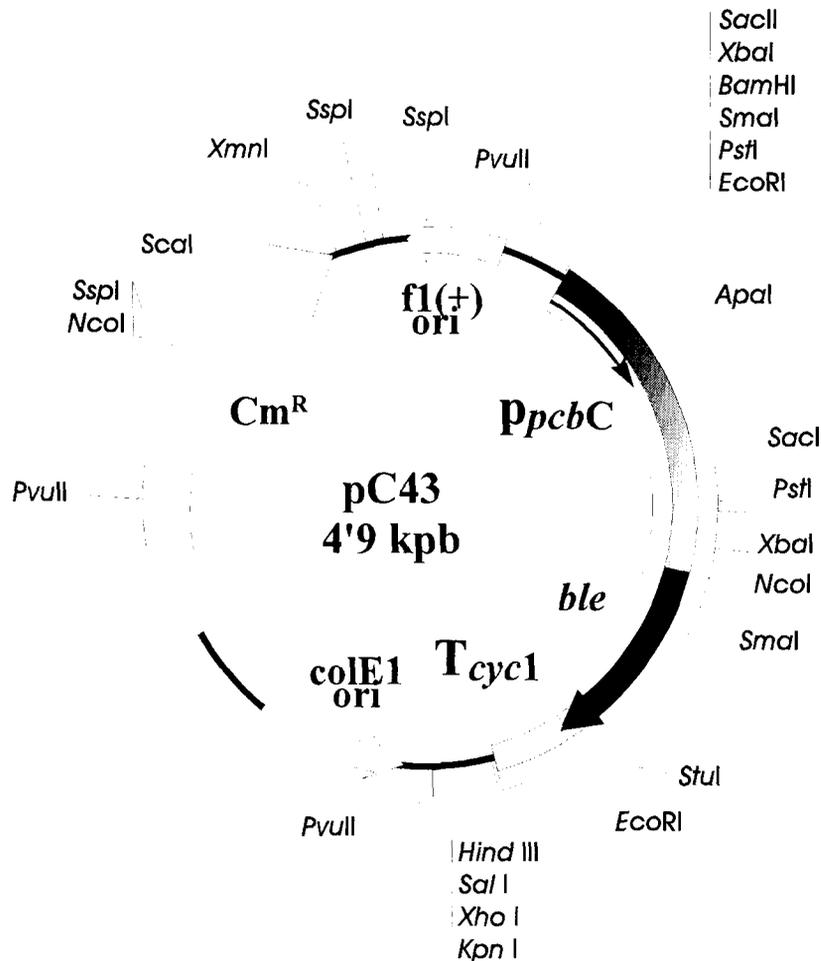


Figura 2.5. Esquema del plásmido pC43.

pJL33 [76]: Plásmido de 8 kpb derivado de pBluescrip^R KS+, al que se le insertó un fragmento de ADN que contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* con sus respectivas regiones promotoras y la secuencia de ADN comprendida entre dichos genes. El inserto se encuentra en forma de un fragmento de 5.1 kpb con sitios de reconocimiento y corte en sus extremos para la endonucleasa *SalI*. Donado por el Dr. Juan F. Martín (Universidad de León, España). Figura 2.6.

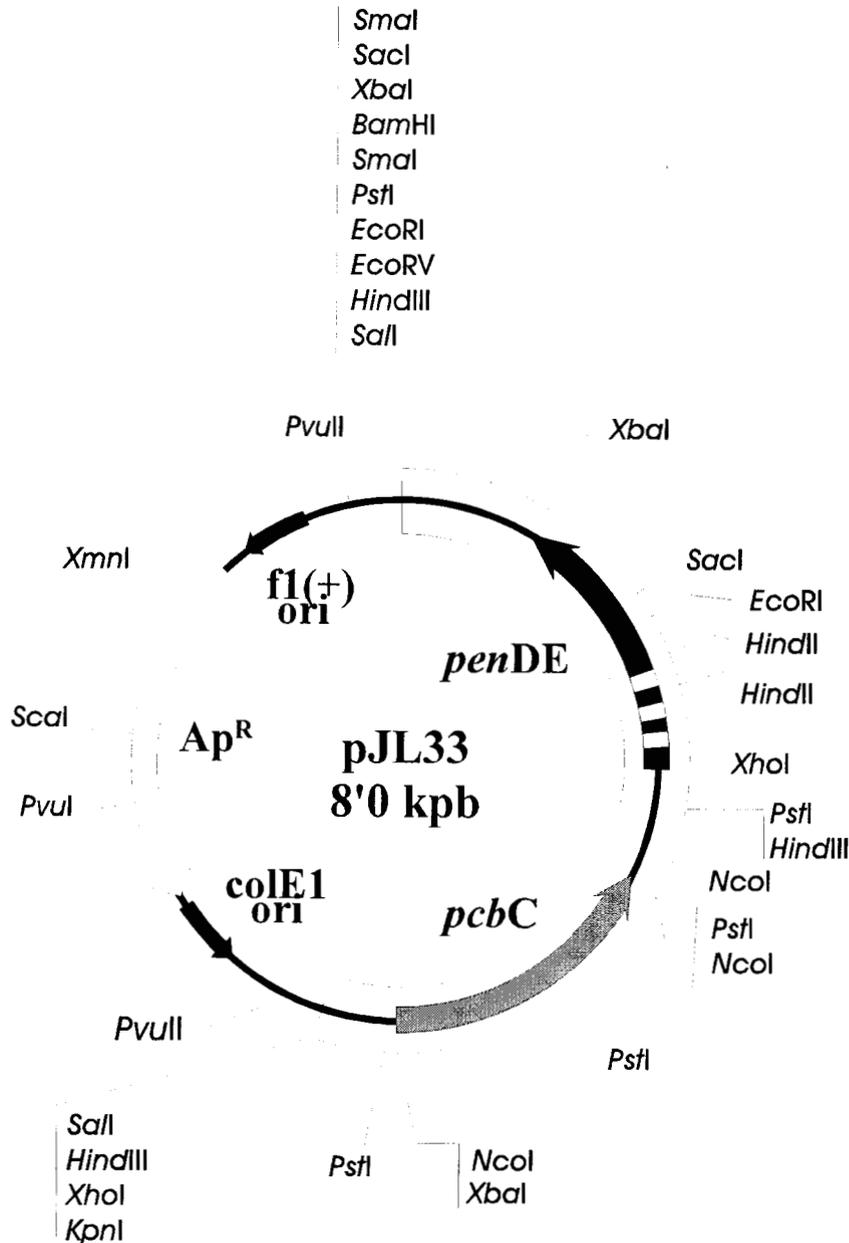


Figura 2.6. Esquema del plásmido pJL33.

2.4. REACTIVOS.

Ácido acético glacial, Baker

Ácido fenilacético, Fersin Gist-Brocades S.A. de C.V.

Acetato potásico, Baker

ADN del bacteriófago lambda, Gibco BRL. Usado como marcador de tamaños en los geles de electroforesis tras su digestión con las endonucleasas *HindIII* o *PstI*.

ADN de esperma de salmón, Sigma. Se utilizó para la hibridación de ácidos nucleicos.

Agar, BIOXON

Agua destilada y MilliQ (Millipore)

Agarosa, Sigma

Alcohol absoluto, Baker

Alcohol isoamílico, Baker

Antibióticos:

Penicilina G potásica 1 580 000 UI/g, Producto de desarrollo Dippec, usada para los bioensayos.

Ampicilina y cloranfenicol, Sigma, se utilizaron para el proceso de selección de transformantes de *E. coli*

Fleomicina, CAYLA, se empleó para la selección de transformantes fúngicos.

Azul de Bromofenol, Sigma

Bacto peptona, Bioxon

Bacto triptona, Bioxon

Bagazo de caña. Se utilizó como soporte en los ensayos de producción de penicilina por fermentación sólida.

Bromuro de etidio, Sigma

CaCl₂, Baker

CaCO₃, Baker

Citrato trisódico, Sigma

Cloroformo, Baker

Cloruro de sodio, Baker

CoSO₄, Sigma

CuSO₄, Baker

Dextrosa, Baker

DNA Clean-Up System, Wizard^R

EDTA, Gibco BRL

Enzimas:

Las enzimas de restricción que se utilizaron fueron las siguientes: *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI*, *SacI*, *SalI*, *Sau3AI*, *SmaI*, *XbaI*, y *XhoI* de Gibco BRL.

Se emplearon las siguientes enzimas de modificación: la ADNasa I de páncreas bovino, BionickTM Labeling System, Sigma; ARNasa de páncreas de bovino, Sigma; ADN ligasa del fago T4 y la ADN polimerasa I de *E. coli*, Sigma.

Para la obtención de protoplastos fueron usadas enzimas líticas de la compañía Sigma.

Extracto de levadura, Bioxon

Fenol, Gibco BRL

FeCl₃, Sigma

FeSO₄, Baker

Formamida, Sigma
Glicerol, Sigma
HCl, Baker
KH₂PO₄, Baker
Hidróxido de potasio, Baker
Hidróxido de sodio, Merck
Isótopo radiactivo:
[α-³²P]dCTP (>3.000 Ci/mmol; 10 mCi/mL; 370 MBq/mL) empleado para el marcaje por desplazamiento de mella de fragmentos de ADN de doble cadena.
KCl, Baker
KH₂PO₄, Baker
K₂HPO₄, Baker
Lactosa, Baker
Membrana de Nylon, HybondTM-N, Amersham Life Science
MES, Sigma
MgSO₄, Baker
MnCl₂, Baker
MnSO₄, Baker
MOPS, Sigma
NaNO₃, Baker
(NH₄)SO₄, Baker
Nitrógeno líquido
Nucleósidos: dATP, dGTP y dTTP
PEG, Sigma
Pharmamedia, Proflo. Southern Cotton Oil Company
Papel Whatman^R, 3 MM Chr
Quiaex II, QIAGEN. Para la recuperación del ADN a partir de geles de agarosa.
RbCl, Sigma
Sacarosa, Baker
SDS, Sigma
Sólidos de maceración de maíz, Fersina Gist-Brocades S.A. de C.V.
Sorbitol, Baker
Tris-Base, Gibco BRL
Tris-HCl, Gibco BRL
Tritón X-100, Sigma
Xileno cianol, Sigma

2.5. EQUIPO.

Air clean 600, Workstation-Systemens
Balanza Ohyo Jupiter SDT-200, Kyoto Japan Corporation
Balanza GalaxyTM 400, OHAUS
Cámara de Neubauer, Boeco
Campana de flujo laminar, VECO
CENTRIFUGE 5415 C eppendorf

CENTRIFUGE BECKMAN, AVANTI™ 30
Contador Geiger, NDS PRODUCTS
DUO-VAC OVEN, Lab-Line^R
Electrophoretic Gel System E-C Minicell^R EC 370 M
Electroporator 2510, Eppendorf
ENVIRONMENTAL-INCUBATOR SHAKER G24, NEW BRUSWICK SCIENTIFIC
ENVIRON-SHAKER 3597, Lab-Line^R
Finnpipette, LabSystems
Fotodocumentación Molecular Imager^R System BIO-RAD
FREEZE DRYSYSTEM, LABCONCO
FREEZER BIO-FREZER, Forma Scientific
GEL DOC 2000, BIO-RAD
GS-525 Sample Loading Dock
Horno de hibridación, HYBAID
Horno de microondas, SANYO
Horno, WTB-binder
IEC Centra-Mcentrifuge, International Equipment Company
INCUBATOR S.I. 600, STUART SCIENTIFIC
Microcomputer pH-vision 6071, Jenco Electronics
Microscopio Olympus CH30
(Millipore), RiOs
MILLI-Q, (Millipore)
ORBIMIX 1010, BRICKMANN
ORBIT ENVIRON-SHAKER 3597, Lab-Line^R
Pantalla intensificadora 6S-525, BIO-RAD
Pipetman, GILSON
Power Pac 3000, BIO-RAD
REFRIGERATOR AND/OR FREEZER, REVCO
SHAK-R-BATH, Lab-Line^R
Sistema para Fermentación Sólida
SPECTROPHOTOMETER UV-VIS, UV-1201, SHIMADZU
Stir Plate Type 1000, Thermolyne
SUPER-MIXER, LAB-LINE INSTRUMENTS
Thermomixer, 5436, Eppendorf
Ultraviolet Transilluminator, UVP

2.6. MEDIOS DE CULTIVO.

2.6.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

Medio Luria-Bertani (LB) [82]: Medio de cultivo para *E. coli*.
Bacto-triptona 10 g, NaCl 10 g y Extracto de levadura 5 g. Se ajustó el pH a 7.5 con una solución concentrada de NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro.

Para su utilización como medio sólido (**LA**) se añadieron 20 gramos de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120 °C.

Medio SOB [80]: Medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli*.

Bacto-triptona 20 g, Extracto de levadura 5 g y NaCl 0.5 g. Se ajustó el pH a 7.5 con una solución concentrada de KOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 gramos de agar por litro. Se esterilizó en una olla a presión durante 20 minutos. Antes de ser utilizado se añadieron 20 mL de una solución de MgSO₄ 1M esterilizada a través de un filtro estéril de 0.22 µm de diámetro de poro.

Medio TB [83]: Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli*, con el fin de obtener el ADN plasmídico.

Extracto de levadura 24 g, Bacto-triptona 12 g y Glicerol 4 mL. Se añadió agua destilada hasta 900 mL y, después de esterilizar en autoclave, se añadieron 100 mL de una solución estéril de KH₂PO₄ 170 mM y K₂HPO₄ 720 mM.

Medio TSB [83]: Medio para el crecimiento de bacterias y para la valoración de antibióticos por bioensayo.

Peptona de caseína 16 g, NaCl 6 g, Peptona de soya 3 g, Glucosa 2.5 g y K₂HPO₄ 2.5 g. Se ajustó a pH 7.0 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Para su uso como medio sólido (**TSA**) se añadieron 20 gramos de agar por litro y cuando se utilizó para la realización de bioensayos se añadieron 10 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos.

Medio de esporulación para *Bacillus subtilis*.

Peptona 8 g, Extracto de carne 3 g y MnCl₂ 10⁻⁵ M. Se ajustó a pH 7.2 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos.

2.6.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA *Penicillium chrysogenum*.

MCFP [84]: Medio Complejo de Fermentación de *Penicillium*.

Lactosa 55 g, Sólidos de maceración de maíz 35 g, CaCO₃, 10 g, KH₂PO₄ 7 g, MgSO₄.7H₂O 3 g y Fenilacetato potásico al 40 % (p/v) 10 mL. Se ajustó el pH a 6.8 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Se distribuyó en alícuotas de 100 mL y se esterilizó en autoclave. Puede utilizarse como medio sólido añadiéndose 20 gramos de agar por litro.

Fenilacetato potásico al 40 % (p/v): Ácido fenilacético 20 g, KOH al 40 % 25 mL, Agua destilada hasta 50 mL, pH resultante: 8.0-8.2.

MCIP [84]: Medio Complejo de Inóculo de *Penicillium*.

Sacarosa 20 g, Sólidos de maceración de maíz 20 g, Extracto de levadura 10 g y CaCO₃ 5 g. Se ajustó a pH 5.7 con una solución de NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se distribuyó en alícuotas de 100 mL y se esterilizó en autoclave.

Medio Czapek: Medio de esporulación y mantenimiento.

Sacarosa 30 g, NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g y FeSO₄.7H₂O 0.01 g. Se añadió agua destilada hasta 1 litro y agar al 2.0 % (p/v). Cuando se usó este medio para la regeneración de protoplastos de *P. chrysogenum* se añadieron sorbitol en una concentración de 1 M ó KCl a una concentración de 0.7 M como estabilizadores osmóticos.

Se esterilizó en una olla a presión durante 20 minutos. El medio con sorbitol fue usado en transformaciones en las que se integraba el gen de resistencia a fleomicina, debido a la interferencia de las altas concentraciones de sales con el patrón de sensibilidad del hongo receptor a la fleomicina.

Medio PMI [54]: Medio de esporulación y mantenimiento.

Bacto-peptona 5 g, Lactosa 5 g, NaCl 4 g, Sólidos de maceración de maíz 1 g, KH_2PO_4 60 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 mg y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg. Se ajustó el pH a 5.5 con una solución concentrada de H_3PO_4 y se añadió agua destilada hasta 1 litro, y agar al 2 % (p/v), si se requiere en forma sólida. Se esterilizó en autoclave.

Medio PMY: Medio de crecimiento y esporulación.

Glucosa 40 g, NaNO_3 3 g, Extracto de levadura 2 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g. Se ajustó a pH 6.0 y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave.

Medio PW: Medio de esporulación y mantenimiento.

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

MCFP 2x [84]: Medio Complejo de Fermentación de *Penicillium* 2x.

Lactosa 110 g, Glucosa 14 g, Sólidos de maceración de maíz 70 g, CaCO_3 , 20 g, KH_2PO_4 6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 g y Fenilacetato potásico al 40 % (p/v) 10 mL. Se ajustó el pH a 6.5 y se completó con agua destilada hasta 1 litro.

Todos los medios de cultivo se distribuyeron en botellas de vidrio de 250 mL de volumen con 100 mL de medio, para facilitar su posterior esterilización y la conservación del contenido a temperatura ambiente.

2.6.3. SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES ESPECÍFICOS PARA BIOLOGÍA MOLECULAR.

¹RF1:

Acetato potásico 30 mM, CaCl_2 10 mM, glicerol al 15 % (p/v), MnCl_2 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajusta el pH a un valor de 5.8 con ácido acético 0.2 M. Se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0.22 μm de diámetro de poro. Se utiliza agua de calidad MilliQ (Millipore) para preparar todas las soluciones y medios de cultivo, así como para el lavado del material utilizado en la preparación y almacenamiento de soluciones y medios y en el procesamiento de las células.

²RF2:

CaCl_2 75 mM, glicerol al 15 % (p/v), MOPS 10 mM pH 7.0 y RbCl 10 mM. Se ajusta el pH a 6.8 con una solución de NaOH y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0.22 μm de diámetro de poro.

³STET:

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

⁴TE:

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

⁵Solución GTE:

EDTA 10 mM pH 8.0 (ajustado con NaOH sólido), Glucosa 50 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8.0.

⁶Solución NS:

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

⁷Acetato potásico para lisis alcalina:

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

⁸ARNasa:

Se disuelve la ARNasa, a una concentración de 10 mg/mL, en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5. La mezcla se hierve durante 15 minutos y se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C .

⁹Fenol neutro:

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

Para la preparación de **fenol ácido** se mezclan 500 mL de fenol sólido (previamente licuado en un baño de agua a 50°C) con 500 mL de H_2O , se agita, se deja reposar y se retira parte de la fase superior acuosa. Se guarda a 4°C en un recipiente oscuro. En este estado se puede mantener hasta 3 meses.

¹⁰Fenol-CIA:

Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.

¹¹CIA:

Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

¹²TAE 50x:

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

¹³Tampón de carga 6x:

Azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), Sacarosa al 40 % (p/v) y Xileno cianol al 0.25 % (p/v). Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos. Se conserva a 4°C para evitar el crecimiento de microorganismos.

¹⁴Bromuro 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.

¹⁵Tampón de reacción 10x para la ADN ligasa del bacteriófago T4:

ATP 10 mM, BSA 500 µg/mL, DTT 200 mM, MgCl₂ 100 mM y Tris-HCl 500 mM pH 7.8.

¹⁶Tampón TPP:

KCl 0.7 M y Tampón de fosfato potásico 50 mM pH 5.8.

¹⁷Tampón KCM:

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

¹⁸Tampón PCM:

CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH 5.8 y PEG 8 000 al 50 % (p/v).

¹⁹Amortiguador de fosfatos:

KH₂PO₄ 6.41 g, K₂HPO₄ 0.25 g, se disuelven en 100 mL de agua destilada, se ajusta a pH 5.5 con H₃PO₄ y se completa hasta un litro con agua destilada.

²⁰Tampón A:

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

²¹Tampón de rotura I:

EDTA 100 mM pH 8.0, SDS al 1 % (p/v) y Tris-HCl 0.2 M. Se ajusta el pH a 8.2 con HCl.

²²Solución desnaturalizante:

NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M.

²³Solución neutralizante:

NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5.

²⁴Tampón de transferencia:

SSC 10x. El tampón SSC 20x está compuesto por Citrato trisódico 0.3 M y NaCl 3 M. El pH se ajusta a un valor de 7.0 con NaOH y se esteriliza en autoclave.

²⁵Mezcla de enzimas:

ADNasa I (0.5 pg/µL) y ADN polimerasa I (0.025 U/µL).

²⁶Tampón de hibridación I:

Denhardt's 1x, Formamida al 40 % (v/v), Glicina al 1 % (p/v), SSC 5x y Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.5.

Denhardt's 100x: BSA (fracción V) al 2 % (p/v), Ficoll al 2 % (p/v) y Polivinilpirrolidona al 2 % (p/v). Se disuelven en este orden en agua destilada estéril, sin calentar. Se conserva en alícuotas a -20 °C ó -70 °C.

²⁷ADN de esperma de salmón:

Se disuelve 1 gramo de ADN de esperma de salmón tipo III en 50 mL de NaOH 0.3 N, agitando durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se calienta la solución a 80 °C durante 2 horas para disminuir su viscosidad y se añaden 0.5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0, 1 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 50 mL de TE y, se ajusta el pH a 7.0 con HCl concentrado. Se fenoliza y se precipita con etanol enfriado a -20 °C. Se centrifuga y se resuspende el precipitado en el volumen de TE necesario para conseguir una concentración final del ADN de 10 mg/mL.

²⁸Tampón de lavado I:

SDS al 0.1 % (p/v) y SSC 2x.

²⁹Tampón de lavado II:

SDS al 0.1 % (p/v) y SSC 0.1x.

2.7. CONDICIONES Y DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

2.7.1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Como medios sólidos para el crecimiento de las bacterias se utilizaron normalmente los medios LA o TSA con una concentración de agar del 2 % (p/v), mientras que para su uso como medio líquido se utilizaron LB o TSB. La temperatura y tiempo de incubación para el crecimiento de las cepas bacterianas fue de 37 °C y de 14 a 18 horas, respectivamente. En medios líquidos fue necesaria la agitación a una velocidad de 200 r.p.m.

2.7.2. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO EN LAS CEPAS BACTERIANAS.

Cuando fue necesario, el crecimiento de las bacterias se determinó calculando la turbidez del cultivo, valorándose la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

2.7.3. CONDICIONES PARA LA ESPORULACIÓN DE *Penicillium*.

Para la obtención de esporas, tanto de cepas parentales como de transformantes de *Penicillium chrysogenum*, se sembraron, por cespel, los microorganismos en medio PW y se incubaron a 25 °C durante 10-15 días. Estas esporas, que previamente se cuantificaron en la cámara de Neubauer, se emplearon para los estudios posteriores de producción de penicilina, tanto en bioensayos por los métodos de cobertera y cilindros de agar, como en los sistemas de fermentación líquida y sólida.

2.7.4. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE *Penicillium* EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

La determinación del crecimiento de los hongos presentó una problemática mayor: la determinación del peso seco fue la mejor opción, pero la composición del medio complejo de fermentación, que presentó partículas insolubles en suspensión, distorsionó en gran manera los resultados. Cuando este parámetro se determinó (cinéticas de crecimiento en la producción de penicilina por fermentación líquida) se utilizó una variante de la técnica habitual para la valoración del peso seco. En primer lugar se tomaron muestras (por triplicado en tubos previamente pesados) de 1 mL del micelio incubado y se precipitó por centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 15 minutos, se tomó el sobrenadante para cuantificar la penicilina. Posteriormente, se disolvió el carbonato de calcio presente en el medio con una solución de HCl al 5 % y se repitió la centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 15 minutos, se tiró el sobrenadante con cuidado, y por último, el precipitado se secó a 80 °C, durante un día.

2.7.5. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE *Penicillium* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Cuando este parámetro se determinó para las cinéticas de crecimiento en la producción de penicilina por fermentación sólida, también se utilizó una variante de la técnica habitual para la valoración del peso seco. En primer lugar, se tomaron dos columnas completas por cada transformante y parental, se desempacó totalmente cada columna; se pesó su contenido y se añadieron 72 mL de amortiguador de fosfatos. Posteriormente, se mezcló perfectamente y se ajustó el pH entre 5 y 5.15, con ácido fosfórico diluido. Esta mezcla se centrifugó a 2 700 r.p.m. durante 20 minutos, un volumen de 5 mL del sobrenadante se separó y colocó en un tubo estéril. 70 µL de este sobrenadante es suficiente para realizar los bioensayos correspondientes. El precipitado formado se lavó primero con 50 mL de una solución de HCl al 5 % y después con 50 mL de NaCl al 0.9 %, para eliminar restos de carbonato de calcio. Por último, el precipitado se secó a 80 °C durante un día para cuantificar biomasa y porcentaje de humedad.

La determinación del crecimiento en fermentación sólida presenta una peculiaridad adicional: es muy difícil separar el bagazo, porque el micelio presenta un crecimiento invasivo en todo el bagazo. Sin embargo, el bagazo es inerte por lo que permanece casi constante a lo largo del proceso y además se conoce su peso. De esta forma, por cálculo del peso seco y restando el peso de bagazo seco sin crecimiento puede calcularse en forma aproximada la cantidad de biomasa producida.

2.8. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli* POR EL MÉTODO DEL CLORURO DE RUBIDIO.

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

El método seguido fue el descrito por Hanahan [85] y se utilizó en todos aquellos casos en los que se requería una eficiencia de transformación elevada. La cepa *E. coli* DH5 α , normalmente utilizada como receptora de mezclas de ligación proporciona eficiencias de transformación de hasta 5×10^8 transformantes por μg de ADN cuando se prepara siguiendo este protocolo. Básicamente los pasos fueron los siguientes:

1. Se sembró una placa de medio SOB sólido con la cepa de *E. coli* (en conservación a -70°C) que se desea hacer competente, para obtener colonias aisladas, y se incubó a 37°C durante 14 horas.
2. Se preinoculó con una colonia aislada un tubo con 1 mL de medio SOB. Se incubó a 37°C con agitación de 200 r.p.m. durante 2 horas.
3. Se inoculó con 250 μL del preinóculo 100 mL de medio SOB en un matraz de 500 mL. Se incubó a 37°C con agitación de 200 r.p.m., hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.5 (aproximadamente a las 5 horas), manteniéndose posteriormente el matraz a 4°C durante 20 minutos.
4. Se recogieron las células por centrifugación a 3 500 r.p.m. durante 10 minutos, a una temperatura de 4°C .
5. A continuación se resuspendieron las células con suavidad en 1/3 del volumen inicial de solución RF1¹, la suspensión se mantuvo durante 20 minutos en hielo.
6. Se concentraron las células por centrifugación a 3 500 r.p.m. durante 10 minutos y 4°C de temperatura.
7. Se resuspendieron las células en 1/12.5 del volumen inicial de solución RF2² y la suspensión se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Finalmente se repartió la suspensión en alícuotas de 220 μL .
8. Las células competentes así preparadas se pueden usar inmediatamente o bien se pueden conservar a -70°C , previa congelación en nitrógeno líquido.

2.9. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* DH5 α .

El protocolo de transformación de las células competentes de *E. coli* fue básicamente el descrito por Hanahan [80]. Se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1. Se prepararon, inicialmente, las placas con medio LA más el antibiótico indicado para cada transformación. La concentración inicial de los antibióticos ampicilina, fue de 100 mg/mL disuelta en etanol y, cloranfenicol, fue de 50 mg/mL en agua destilada.
2. Se descongelaron las células competentes en un baño de hielo y agua durante 5 minutos y se mezclaron el ADN plasmídico con 100 μL de la suspensión de bacterias descongeladas, manteniéndose en hielo durante 20 minutos.
El volumen de la solución con el ADN que se agregó fue de 3 μL cuando se trato de plásmidos y 10 μL cuando se trato de ligaciones.
3. A continuación se sometió la mezcla a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos, seguida de un rápido enfriamiento en hielo con agua durante 3 minutos.
4. Se añadieron a esta suspensión, 500 μL de medio LB con antibiótico y se incubó a 37°C y 200 r.p.m. durante 1 hora con el fin de que las células que incorporaron el plásmido expresaran la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

5. Se sembró por extensión una alícuota de 300 μL en placas de LA más antibiótico. Debe añadirse al medio de cultivo el antibiótico utilizado en la selección de los transformantes. En nuestro caso se añadió ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando el plásmido utilizado fue el pJL33 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol cuando se transformó con el pC43.
6. Finalmente se incubaron las placas a 30 °C durante 18 horas.

2.10. EXTRACCIÓN DE ADN PLÁSMIDICO DE *E. coli*.

2.10.1. MINIPREPARACIONES. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A PEQUEÑA ESCALA.

El método seguido para obtener ADN plasmídico a pequeña escala fue una modificación del descrito por Holmes y Quigley [86]. El ADN obtenido por este método generalmente se utiliza para la comprobación de identidad por medio de un análisis electroforético.

1. En primer lugar se inocularon colonias con un palillo estéril en tubos Eppendorf estériles con 1 mL de medio TB (al que se le añade el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido). Es recomendable realizar una replica de este inóculo en una placa a la que se ha enumerado por la base, para tener las colonias identificadas y completamente aisladas. Posteriormente, se incubó el tubo a 37 °C con agitación de 200 r.p.m. durante 14-18 horas, con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria. Las placas se incubaron en las mismas condiciones, pero sin agitación, y después se conservaron a 4 °C.
2. Tras este tiempo se recogieron las células del tubo mediante centrifugación a 5 000 r.p.m., durante 3 minutos. Se desechó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se resuspendió en 350 μL de STET³, y se añadieron 10 μL de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua. La solución de lisozima se agregó en la tapa del tubo, para asegurar una mezcla homogénea en todos los tubos.
3. Se tapó el tubo y se mezcló durante 40 segundos, la mezcla se hirvió durante 60 segundos. Rápidamente, las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14 000 r.p.m. 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, mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. El ADN plasmídico se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70 % (v/v). Posteriormente se repitió el paso de centrifugación anteriormente descrito. Se tiró el alcohol y se procedió a evaporar el exceso utilizando una secadora de pelo. El precipitado se resuspendió en 30 μL de TE⁴. 2 μL de esta solución son suficientes para llevar a cabo cada uno de los ensayos de digestión con endonucleasas de restricción necesarios para el análisis de los plásmidos recuperados.

2.10.2. LÍISIS ALCALINA. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA.

Esta técnica se utilizó para aquellos experimentos en los que se requería una gran cantidad de ADN. El método fue el descrito por Maniatis *y col.* [83]:

1. Con ayuda de un palillo estéril, se inocularon en 100 mL de medio TB más antibiótico, células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretendió amplificar. Se vació el contenido a un matraz de 500 mL y se cultivaron las células bacterianas durante 14-18 horas a 37 °C, con agitación de 250 r.p.m.
2. Tras este tiempo se recogieron las células mediante centrifugación a 3 500 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Se tiró el sobrenadante y el precipitado obtenido de cada tubo se resuspendió con agua destilada y se concentró en un solo tubo. Se repitió el paso de centrifugación anteriormente descrito.
3. El precipitado obtenido se resuspendió en 3 mL de solución GTE⁵ con una concentración de lisozima de 5 mg/mL. Se mezcló suavemente y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añadieron 6 mL de la solución NS⁶, preparada en el momento. Se agitó suavemente (una agitación vigorosa origina la ruptura mecánica del ADN genómico de la bacteria hospedera, lo que se traduciría en una contaminación del ADN plasmídico con el ADN genómico de la bacteria) y se mantuvo esta suspensión en hielo con agua durante 10 minutos.
5. Posteriormente se añadieron 4.5 mL de una solución para lisis alcalina⁷, previamente enfriada a 4 °C. Se mezcló vigorosamente y se llevó a un baño de hielo a 4 °C durante 10 minutos.
6. Se centrifugó a 15 000 r.p.m. a 4 °C durante 30 minutos. Con mucho cuidado, se recuperó el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Se pasó a un tubo estéril y el ADN plasmídico se precipitó añadiendo 0.6 volúmenes de isopropanol, agitando suavemente y dejando en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Finalmente, se centrifugó a 8 000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 5 mL de etanol al 70 % (v/v). Se repitió el paso de centrifugación durante 5 minutos. Se tiró el alcohol (cuidando de no tirar el precipitado) y se procedió a evaporar el exceso utilizando una secadora de pelo. Posteriormente el precipitado se resuspendió en 500 µL de TE.

Si no se utilizan en el momento estas soluciones con ADN pueden conservarse a 4 °C ó -20 °C.

2.10.3. MEGAPREPARACIONES. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA.

En algunos casos el ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina ofrece problemas a la hora de realizar digestiones con endonucleasas de restricción. La gran cantidad de sales que acompañan al ADN aislado por esta técnica es la responsable del mal funcionamiento de las enzimas, pudiendo afectar también a la actividad de la exonucleasa III o la ADN ligasa. El ADN de plásmidos obtenido por medio de minipreparaciones no presenta este problema y por ello se ha optado por una variante de esta técnica que permita el procesamiento de volúmenes de cultivo bacteriano mayores de lo habitual [3].

Este procedimiento fue seguido para la obtención de ADN plasmídico a gran escala fácilmente digerible. Los pasos necesarios fueron los siguientes:

1. Los pasos de inoculación, cultivo y precipitación de las células bacterianas transformadas fueron los mismos que los mencionados en el número 1 y 2 de la técnica descrita en el apartado 2.10.2. El precipitado obtenido se resuspendió en 7 mL de STET y la suspensión de bacterias se repartió en alícuotas de 350 μ L. Los pasos que se siguieron son ligeras modificaciones de los realizados en el protocolo de la minipreparación. A cada tubo se le añadieron 20 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.
2. Se mezclaron durante 1.5 minutos y se hirvió su contenido durante el mismo tiempo. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminaron con la ayuda de un palillo estéril. El precipitado blando que se obtiene en este caso ocupa gran parte del tubo y es muy importante eliminarlo completamente. El ADN plasmídico se precipitó tras añadir 40 μ L de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. El ADN se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70 % (v/v). Se repitió el paso de centrifugación anteriormente descrito. Se tiró el alcohol (cuidando de no tirar el precipitado) y se procedió a evaporar el exceso utilizando una secadora de pelo. Posteriormente, el precipitado correspondiente a cada alícuota se resuspendió en 100 μ L de TE. Tras la resuspensión del ADN se reunieron todas las fracciones en un mismo tubo y se limpiaron las soluciones de ADN mediante fenolización. Finalmente, se precipitaron de acuerdo a los métodos habituales y se resuspendieron en un volumen adecuado de TE o de agua destilada estéril.

2.11. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.

Una vez extraído el ADN por cualquiera de los métodos que se describieron anteriormente fue necesario someterlo a un proceso de limpieza antes de utilizarlo en otros ensayos.

1. A 500 μ L de solución que contenía el ADN obtenido, se le agregaron 10 μ L de ARNasa⁸, y se incubó la mezcla a 37 °C durante 90 minutos. Este paso eliminó las moléculas de ARN contenidas en la solución.
2. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la desproteínización o fenolización de la solución de ADN. Se añadió un volumen de fenol neutro⁹, se mezcló suavemente durante 5 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente y 14 000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Se recogió la fase acuosa con una pipeta y con mucho cuidado de no mezclar las fases.
4. Esta fase se pasó a otro tubo limpio y se homogeneizó con un volumen de fenol-CIA¹⁰, se agitó, centrifugó y recogió la fase superior en las mismas condiciones citadas en el paso anterior. Se repitió este paso hasta la obtención de una interfase limpia (en la interfase se concentran las proteínas ya desnaturalizadas).
5. Llegados a este punto, se realizó un último tratamiento con un volumen de CIA¹¹. Se precipitó el ADN agregándole 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C.

Inmediatamente, la solución se llevó a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas, y finalmente, se precipitó el ADN de acuerdo a los métodos habituales y se resuspendió en un volumen adecuado de TE o de agua destilada estéril.

2.12. COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DE LOS PLÁSMIDOS.

Para estar seguros que efectivamente se habían obtenido y amplificado los plásmidos pC43 y pJL33 requeridos para la construcción del pUAMJC1, fue necesario comprobar la identidad de cada uno de ellos: primeramente, digiriendolos con enzimas de restricción que reconocieran sitios específicos de su secuencia y posteriormente observando los fragmentos de ADN generados como un patrón de bandas característico en un análisis de migración electroforética.

2.12.1. DIGESTIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.

Cada enzima de restricción tiene condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condiciones de pH (estas dos últimas características las proporciona el tampón de digestión). El volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas, concentraciones que podrían inhibir por completo la actividad enzimática. El esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción que se aplicó fue el siguiente:

1. En un tubo Eppendorf se mezcló los siguientes componentes de la reacción (2 μL de la solución de TE o agua destilada que contiene el ADN más 18 μL de la mezcla de reacción):
 - agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión. 15.25 μL en el caso cuando no se haya tratado con ARNasa o 15.75 μL cuando previamente se haya eliminado el ARN (en este caso se agregó 0.5 μL de ARNasa).
 - tampón de digestión. Se requirió 1/10 del volumen final de la mezcla (2 μL), debido a que su concentración inicial es de 10X.
 - n μg de ADN disuelto en H_2O o en tampón TE (en este último caso, no superar la décima parte del total del volumen de la reacción). 2 μL son suficientes.
 - $2n$ unidades de enzima. Basta con 0.25 μL , para completar un volumen final de la mezcla de reacción de 20 μL .
2. Se agitó la mezcla con un pulso en el vortex y se centrifugó brevemente para concentrar la mezcla en el fondo del tubo. Finalmente, se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2-3 horas. El ADN digerido se utilizó para su análisis por migración electroforética en geles de agarosa o se limpió mediante fenolización para un posterior uso. Si no se utiliza la digestión en el momento esta debe conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.12.2. ELECTROFORESIS DE ADN PLASMÍDICO EN GELES DE AGAROSA.

Para este estudio, se siguió el método descrito por Sambrook *y col.* [87]. Se utilizó agarosa en concentraciones de 0.7 % (p/v) y disuelta por calentamiento con microondas en tampón TAE¹² (50 o 100 mL). La concentración de agarosa utilizada depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar: 0.3 %, para la resolución de tamaños grandes que van de 5 a 60 kpb; hasta 2 % para tamaños pequeños de 0.05 a 2 kpb. Antes de agregar la agarosa al sistema de cámara electroforética se dejó enfriar unos 10 minutos, ya en la cámara la agarosa se solidificó en 5 minutos.

Las muestras de ADN se mezclaron con un décimo del volumen final de tampón de carga concentrado¹³ (2 μ L). Se calentaron durante 10 minutos a 65 °C, se enfriaron posteriormente en un baño de hielo y agua durante 3 minutos. El ADN se cargó en el gel y la electroforesis se desarrolló en tampón TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 90 voltios con duración de 2 horas para geles grandes y 1 hora para geles pequeños (o 20 voltios con duración de 18 horas). La tinción del ADN se realizó sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio¹⁴ (EtBr) en una concentración final de 0.5 μ g/mL, durante 15 minutos (el EtBr se intercala en la doble cadena de ADN y permite su visualización tras iluminarse el gel con luz ultravioleta). Los geles se visualizaron mediante el sistema GelDoc, y las imágenes en pantalla se guardaron en un programa de computación.

Los marcadores de tamaño usados y la longitud aproximada (en kilopares de bases) de los fragmentos de ADN del fago lambda generados tras la digestión con las siguientes endonucleasas de restricción fueron:

- a.- ADN del fago λ digerido con *HindIII* (λ /*HindIII*): 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03, 0.56 y 0.125 kpb.
- b.- ADN del fago λ digerido con *PstI* (λ /*PstI*): 11.51, 5.08, 4.65, 4.51, 2.84, 2.58, 2.45, 2.44, 2.14, 1.98, 1.70, 0.805, 0.52, 0.47, 0.45, 0.34, 0.265, 0.25 y 0.21 kpb. La imagen de los diferentes patrones de bandas generados se puede apreciar en cualquiera de los geles mostrados en el apartado de resultados.

2.13. PROCESO DE CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pUAMJC1.

Para lograr la construcción del plásmido nombrado pUAMJC1, empleado en la generación de transformantes de *Penicillium chrysogenum*; primero el pC43 fue abierto en su único sitio de reconocimiento para la enzima *SalI*, después en este sitio, se insertó el fragmento de ADN de 5.1 kpb del pJL33 que porta los dos genes de interés flanqueados por la misma enzima y, finalmente estos dos fragmentos de ADN fueron ligados.

El fragmento de ADN de 5.1 kpb se extrajo llevando a cabo cualquiera de los procesos que a continuación se detallan:

2.13.1. EXTRACCIÓN DEL ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Se usaron fundamentalmente dos métodos: la extracción por congelación y centrifugación a través de lana de vidrio y la extracción mediante el uso del sistema Quiaex.

2.13.1.1. EXTRACCIÓN POR CONGELACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN A TRAVÉS DE LANA DE VIDRIO.

Este método es rápido y sencillo y no requiere del uso de agarosa de bajo punto de fusión, aunque el porcentaje de recuperación no supere el 70 % del ADN cargado en el gel [88]:

1. Se practicó un orificio en el fondo de un tubo Eppendorf y se bloqueó desde el interior con lana de vidrio estéril. Una vez realizada la migración electroforética y la tinción del gel, se cortó el trozo de agarosa en el que se encuentra el fragmento de ADN de interés (5.1 kpb de tamaño, en nuestro caso), se introdujo en el tubo preparado anteriormente. Cabe señalar que en el proceso de electroforesis se utilizaron muestras de digestión a gran escala de ADN (de 100 a 200 μ L), por lo tanto el tamaño de los pozos del gel se hicieron más grandes de lo habitual, ya sea utilizando un peine de mayor tamaño o uniendo los dientes del peine con cinta adhesiva transparente.
2. Se llevó el tubo con el trozo de agarosa a -20°C durante 30-60 minutos. A continuación se colocó debajo del tubo Eppendorf perforado uno sin perforar y se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos. El tampón atravesó la lana de vidrio junto con el ADN disuelto y se recogió en el tubo inferior, mientras que la agarosa quedó retenida en la lana de vidrio. Se añadieron 100 μ L adicionales de tampón TE y se repitió la centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 1 minuto.
3. La solución obtenida se limpió con fenol-CIA y CIA y el ADN se precipitó a -20°C con 1/10 del volumen final de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta solución se conserva a -20°C y cuando se requirió, se precipitó de acuerdo a los métodos habituales y se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada estéril.

2.13.1. 2. EXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA QUIAEX.

Es un método más rápido que el anterior. Se basa en la unión, específica y reversible, del ADN a partículas de silica-gel. El protocolo fue el siguiente:

1. Una vez que se realizó la electroforesis y la tinción del gel, se cortó el trozo de agarosa donde está el ADN de interés (digerido a gran escala), se depositó en un tubo de peso conocido y se pesó el conjunto tubo-agarosa.
2. En concreto, se agregaron al tubo 3 volúmenes del tampón QX1 y dos volúmenes de agua destilada estéril por volumen de gel. (Se consideraron 100 mg de peso de gel equivalentes a 100 μ L de volumen).
3. Posteriormente se añadieron 10 μ L de acetato sódico 3 M con un pH de 5.0. Se resuspendió la emulsión Quiaex II con un agitador durante 30 segundos. Al tubo con el trozo de agarosa y el tampón QX1 se le añadieron 10 μ L de esta suspensión.
4. Se mezcló bien y se incubó a 50°C durante 10 minutos en el termomixer con agitación constante.

5. A continuación se centrifugó la muestra durante 30 segundos a 14 000 r.p.m., se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. El precipitado se lavó con 500 μ L del tampón QX1 para eliminar los contaminantes de agarosa restantes.
6. Se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 30 segundos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 μ L de tampón PE. Se repitió la centrifugación y el lavado con este tampón y el precipitado obtenido al final se dejó secar, tras eliminar el sobrenadante con una pipeta, durante 10-15 minutos o hasta que adquirió un color blanquecino.
7. El ADN se eluyó con 20 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8.5 o H₂O_d estériles y se incubó, tras mezclar en un agitador, a 50 °C durante 5 minutos.
8. Se centrifuga a 14 000 r.p.m. durante 30 segundos y se recoge el sobrenadante en un tubo limpio estéril. Este sobrenadante contiene el ADN de interés, listo para su uso. Se puede lograr un 25 % adicional de eficiencia de extracción si se repite una vez más desde el paso número 7.

2.13.2. ENSAMBLAJE DEL FRAGMENTO DE 5.1 kpb CON EL pC43.

Se concentraron por separado los fragmentos obtenidos de los dos plásmidos.

1. Se centrifugó la solución que los contenía a 14 000 r.p.m. durante 30 minutos. Se tiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con un volumen de etanol al 70 % (500 μ L) con una agitación suave durante 2 minutos. Se repitió la centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante con cuidado de no tirar el precipitado. Por último, éste se resuspendió con 5 μ L de agua estéril, si se trataba del fragmento de 5.1 kpb del pJL33, y con 20 μ L para el pC43 vector, esperando aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.
2. A una cantidad de ADN vector de entre 10 y 40 ng (en este caso 1 μ L del pC43) se le añadió una cantidad cinco veces mayor de ADN inserto (5 μ L del fragmento de 5.1 kpb).
3. Se añadió el H₂O_d necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 μ L (2 μ L), y se calentó la mezcla a 65 °C durante 15 segundos con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes en la mezcla.
4. Inmediatamente, se enfrió en hielo y se añadió 1 μ L de tampón de reacción 10x para la ADN ligasa¹⁵ y 1 μ L (5 unidades) de ADN ligasa del fago T4.
5. Se agitó con un pulso en el vortex y se centrifugó brevemente, se incubó la reacción a 15 °C durante 12 horas.

Las nuevas moléculas generadas durante este proceso se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 α . Los transformantes se analizaron por el método de minipreparaciones, seleccionándose el clon que contiene el patrón electroforético correcto correspondiente a la nueva construcción.

2.14. TRANSFORMACIÓN DE *Penicillium chrysogenum*.

Se transformaron cepas parentales de *Penicillium chrysogenum* de alta y baja producción de penicilina, utilizando el plásmido recientemente construido que porta los dos últimos genes de la vía de biosíntesis de penicilina.

El proceso de transformación de hongos requiere de un marcador para la selección de los transformantes generados. Esto puede conseguirse con la introducción de un marcador que confiera resistencia al efecto de un compuesto tóxico, como es el caso del antibiótico fleomicina.

El único requisito para la realización de esta técnica es la necesidad de un estudio preliminar para determinar el nivel basal de resistencia a fleomicina de la cepa parental.

La fleomicina pertenece al grupo de los antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina [89]. Es un antibiótico de amplio espectro producido por una cepa mutante de *Streptomyces verticillus*, activo sobre la mayor parte 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 de ADN, originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario.

La resistencia se produce por inactivación o bloqueo físico de la fleomicina por parte de una proteína codificada por el gen *ble*, gen de resistencia a bleomicina-fleomicina, localizado en el ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptoalloteichus hindustanus* [90].

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

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

El gen *ble* esta integrado en el “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). El conjunto se encuentra insertado en el plásmido pC43 [76].

En los experimentos de transformación, se empleó el método descrito por Cantoral y col. [75] con alguna modificación. El protocolo se describe a continuación:

2.14.1. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BASAL A FLEOMICINA.

Antes de la transformación propiamente dicha, se determinó el nivel basal de resistencia al antibiótico de las cepas parentales de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y P2-32, como sigue:

Se sembraron en forma extendida o de cespel ambas cepas, receptoras del plásmido, sobre placas con medio Czapek-Sorbitol más concentraciones crecientes de fleomicina de: 0, 10, 20, 30, 40, 50, hasta 60 µg/mL. Se incubaron a 25 °C durante 10 a 15 días. Ambas cepas presentaron una resistencia natural al antibiótico a una concentración menor de 30 µg/mL.

2.14.2. CRECIMIENTO DEL MICELIO.

1. El procedimiento es el mismo para ambas cepas parentales. Se inocularon 100 mL de medio PMY con esporas procedentes de la cepa a transformar. Se incubó a 25 °C durante 48 y 60 horas (Wisconsin 54-1255 y P2-32 respectivamente) con agitación de 200 r.p.m.
2. Se recuperó el micelio por filtración a través de un filtro de nylon Nylal estéril de 30 µm de diámetro de poro y se lavó sobre el filtro con 100 mL de NaCl al 0.9 % (p/v). El micelio se secó, al aplicarle presión, sobre papel filtro Wattman.

2.14.3. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.

3. Se pesó y resuspendió 1 gramo de micelio en 10 mL de tampón TPP¹⁶ y se mezcló en un matraz de 250 mL con otros 10 mL de tampón TPP que llevan disueltos 25 mg (la concentración final es de 1.25 mg/mL) de una mezcla de enzimas líticas. La suspensión se incubó a 25 °C, aproximadamente 3 horas, con agitación suave de 125 r.p.m. Cada hora se controló la liberación de los protoplastos observándolos al microscopio.
4. La suspensión anterior se filtró a través de un filtro de nylon Nylal estéril de 30 µm de diámetro de poro. Se centrifugó durante 3 minutos a 2 500 r.p.m. y se lavaron los protoplastos sedimentados con 10 mL de tampón KCM¹⁷. Se centrifugó en las mismas condiciones descritas y se repitió el lavado dos veces más.
5. Los protoplastos precipitados en la última centrifugación se resuspendieron en KCM en una concentración final de aproximadamente 1×10^8 protoplastos/mL (tras añadir casi 5 veces el volumen del precipitado de KCM). A continuación se añadió 1/10 del volumen total de tampón PCM¹⁸. Se mantuvo la suspensión en un baño de hielo y agua hasta el momento en que se realizó la mezcla de transformación.

2.14.4. TRANSFORMACIÓN.

6. Se depositaron en un tubo estéril de 10 mL, 100 µL de suspensión de protoplastos y 10 µL de ADN del plásmido pUAMJC1 purificado. Se mezcló con la pipeta, evitando la formación de burbujas, y se mantuvo esta mezcla en un baño de hielo y agua durante 20 minutos.
7. Se añadieron 500 µL de tampón PCM, se mezcló sin formar burbujas y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos.
8. Con el fin de diluir el polietilenglicol contenido en el tampón PCM, se agregaron 600 µL de KCM, se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente. Los anteriores pasos deben de llevarse a cabo respetando los tiempos especificados.

2.14.5. EXTENSIÓN EN PLACA.

9. Se preparó la base de las placas de transformación (placas de 60 mm de diámetro) extendiendo 5 mL de medio Czapek/sorbitol más fleomicina en una concentración final de 30 µg/mL (15 µL) Una vez que el medio solidificó, se extendió sobre él la transformación, en forma de cobertera. Esta se preparó en un tubo estéril de 10 mL, en la forma siguiente:

300 μL de la mezcla de transformación; 15 μL de fleomicina, de una solución inicial de 10 mg/mL en H_2O y 5 mL de medio Czapek/sorbitol fundido a 48 $^{\circ}\text{C}$. Por último, se dejó solidificar y las placas se incubaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 10 días.

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

2.15. PROCESO DE SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE *Penicillium chrysogenum*.

Después de obtener los transformantes, de *P. chrysogenum* se corroboró su identidad, resembrando por picadura cada uno de ellos en placas con medio Czapek más fleomicina. Los que nuevamente presentaron la capacidad de crecer en este medio con el antibiótico se resembraron en placas con concentraciones crecientes de fleomicina, seleccionándose todos aquellos que presentaron alta resistencia. Finalmente, estos transformantes se analizaron en cuanto a su capacidad para producir penicilina, primero con bioensayo por el método de cobertera y después con bioensayo por el método de cilindros de agar. Estos procesos de selección semicuantitativos se realizaron con el propósito de obtener transformantes aumentados en el número de copias de los genes estudiados y por lo tanto, mejorados en su capacidad para producir penicilina. Estos transformantes se emplearían posteriormente en estudios de producción de penicilina sobre medio líquido y medio sólido.

2.15.1. CONFIRMACIÓN DE TRANSFORMANTES GENERADOS.

Con el fin de confirmar la transformación y la identidad de los transformantes generados, cada una de las colonias resistentes a fleomicina que fueron capaces de crecer en las placas de transformación, se replicaron en medio Czapek con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina, se incubaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 7 días. Los transformantes que confirmaron nuevamente su resistencia al antibiótico se seleccionaron y se inocularon por extensión en placas con medio PW para la obtención de esporas (estas se conservaron hasta las posteriores etapas del estudio).

2.15.2. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE ALTA RESISTENCIA A FLEOMICINA.

Con la premisa de que los transformantes que presentaron una mayor resistencia a fleomicina son también los que fueron capaces de integrar un mayor número de copias del plásmido (y por lo tanto los que aumentaron la dosis de los genes *pcbC* y *penDE*), se llevó a cabo una primer etapa de selección como sigue:

Los clones obtenidos, del paso anterior, se resembraron en placas con medio Czapek más 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina, y se incubaron a 25 °C durante 15 días. Se contó el número de transformantes que crecieron en cada una de las diferentes placas, se midió el diámetro de cada colonia y se seleccionaron todos aquellos que presentaron resistencia a mayores concentraciones de fleomicina.

2.15.3. BIOENSAYO POR EL MÉTODO DE COBERTERA.

Este método se utilizó como una herramienta semicuantitativa de selección de transformantes que presentaron mejoras en la producción de penicilina con respecto a la cepa parental.

Esta técnica se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana sensible a la penicilina, como el *Bacillus subtilis* ATCC 6633. El diámetro de inhibición es proporcional al logaritmo de la concentración de penicilina. Básicamente, se empleó el protocolo ajustado y validado por Pérez [91], el cual se llevó a cabo como sigue:

1. En primer lugar, fue necesario obtener una suspensión de esporas de *B. subtilis*, como sigue: Se inoculó en un matraz de 250 mL, 100 mL de medio ME con una colonia de bacilos aislada previamente en medio agar nutritivo. El inóculo, se incubó a 30 °C durante 16-18 horas con agitación de 200 r.p.m. Cuando se obtuvo la suspensión, se determinó su densidad óptica (DO) a 340 nm.
2. También fue necesario preparar placas de 90 mm con 20 mL de medio MCFP y 2 % de agar, perfectamente niveladas.
3. Se inocularon por triplicado 10^3 esporas en un microlitro, procedentes de los transformantes y cepas parentales de *P. chrysogenum* (las esporas se cosecharon de una placa con medio Power recientemente sembrada), en placas con el medio preparado en el paso 2 y se dejaron incubando a 25 °C durante 48 a 72 horas.
4. Una vez transcurrido este tiempo y que se observó claramente la zona de crecimiento de cada una de las colonias, se cubrió el medio base de cada placa con 5 mL de medio TSA al 1 % inoculado con 100 μL de *Bacillus subtilis*, siempre cuidando de que todas las placas estén niveladas. Se dejó solidificar durante 10-15 minutos y se incubaron a 30 °C durante 14 a 18 horas.
5. Para que los datos fueran cuantitativos se usaron también concentraciones conocidas de penicilina G. Sobre la superficie del medio sólido se colocaron, por triplicado, círculos de papel filtro estéril de diámetro de 8 mm, se le agregaron en el centro de cada uno de ellos 70 μL de diferentes diluciones de una solución de penicilina G patrón. Posteriormente, se dejaron reposar a 4 °C durante una hora para que la penicilina pudiera difundir sobre la superficie del medio base. Finalmente, éste se cubrió como en el paso número cuatro.
6. Al cabo de este tiempo, se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* en cada placa (la producción de penicilina está determinada por el tamaño del halo de inhibición generado). Se realizó un análisis estadístico (promedio, desviación estándar y coeficiente de variación) de los datos del tamaño de halo y de la producción de penicilina.

En función de los resultados estadísticos, se seleccionaron aquellos transformantes que presentaron una mejora en la producción en comparación con la cepa parental de la cual derivan.

2.15.4. BIOENSAYO POR EL MÉTODO DE CILINDROS DE AGAR.

Para tener otra herramienta (más cuantitativa) que permitiera una selección de los transformantes mejorados, se utilizó el bioensayo por el método de cilindros de agar. Esta técnica se basa igualmente en la formación de un halo de inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana sensible a la penicilina. El procedimiento a seguir se detalla a continuación:

1. En primer lugar, fue necesario obtener cilindros de agar con medio complejo de producción, como a continuación se explica: Se prepararon placas de 90 mm con medio MCFP y 2 % de agar perfectamente niveladas y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se sacaron cilindros de este medio con ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro. Cada uno de los cilindros se colocaron en la superficie de una placa estéril y, por triplicado se inocularon en el centro 10^3 esporas en un microlitro, procedentes de los transformantes y cepas parentales de *P. chrysogenum* (las esporas se cosecharon de una placa con medio Power recientemente sembrada). Finalmente se dejaron incubando a 25 °C durante 72 a 96 horas.
2. Posteriormente, se utilizaron cajas de acrílico de 30 X 30 cm² o placas de 15 cm, apoyadas en una superficie perfectamente niveladas se les agregaron 200 mL o 50 mL de TSA respectivamente a una temperatura no mayor de 50 °C, inoculado con *B. subtilis* (100 µL de una suspensión de esporas de una DO de 1 por 100 mL de medio). Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente y a 4 °C.
3. Una vez solidificado, se depositaron sobre el medio cada uno de los cilindros de agar con el crecimiento (también cilindros limpios, a los que se les agregó en el centro 70 µL de diferentes diluciones de penicilina). Las placas se mantuvieron durante 60 minutos a 4 °C para permitir la difusión del antibiótico y posteriormente se incubaron a 30 °C durante 16-18 horas para la formación de los halos de inhibición.
4. Al cabo de este tiempo, se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* en cada caja de acrílico (la producción de penicilina está determinada por el tamaño del halo generado). Se realizó un análisis estadístico (promedio, desviación estándar y coeficiente de variación) de los datos del tamaño de halo y de la producción de penicilina

En base a los resultados estadísticos, se seleccionaron aquellos transformantes que presentaron un aumento en la producción de penicilina en comparación con la cepa parental de la cual se originaron.

Con el fin de determinar la producción de penicilina en las diferentes fermentaciones, también se empleó el mismo método, pero con algunas variantes:

1. Una vez inoculado y solidificado el medio contenido en las cajas de acrílico, se hicieron pozos con un sacabocado de 8 mm y se llenaron con 70 μL de muestra o soluciones patrón de penicilina. Las placas se mantuvieron durante 60 minutos a 4 °C para permitir la difusión del antibiótico y posteriormente se incubaron a 30 °C durante 16-18 horas para la formación de los halos de inhibición.
2. Para la cuantificación de la penicilina se siguieron esencialmente las mismas indicaciones que se describieron en el paso número cinco del apartado anterior. Cabe aclarar que para determinar la producción de penicilina en medio líquido y sólido se tomó en cuenta el factor de dilución correspondiente.

2.16. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO.

Una vez que se seleccionaron los transformantes mejorados de ambas cepas, se procedió a la valoración de la producción de penicilina, tanto en fermentación líquida como en sólida. Para la fermentación en medio líquido los pasos que se siguieron fueron:

2.16.1. COSECHA DE ESPORAS DE *Penicillium*.

Para la obtención de esporas, tanto de cepas parentales como de transformantes de *Penicillium chrysogenum*, se sembraron por extensión, los microorganismos en medio PW y se incubaron a 25 °C durante 10-15 días o hasta el momento en que aparecieron las esporas en forma de césped. Las esporas se recogieron en H₂O_d estéril con Tween 80 al 0.1%, raspando la superficie de la placa con un asa bacteriológica, cuidando de no desprender micelio. La suspensión se homogenizó, se filtró a través de una gasa estéril y se cuantificó la concentración de esporas en una cámara Neubauer.

2.16.2. OBTENCIÓN DEL INÓCULO.

Se inocularon matraces de 250 mL que contienen 50 mL de medio MCIP con 5×10^8 esporas cosechadas en las condiciones mencionadas anteriormente. Se incubaron los matraces a 25 °C con agitación de 200 r.p.m. durante 36 horas.

2.16.3. CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA G POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

Una vez transcurrido este tiempo se inocularon, por triplicado, matraces de 250 mL que contienen 45 mL de medio MCFP con 5 mL del microorganismo crecido en medio MCIP. Se incubaron durante 120 horas a 25 °C con agitación de 250 r.p.m.

2.16.3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS EN MEDIO LÍQUIDO.

Se tomaron muestras de 1 mL, en tubos Eppendorf previamente pesados, cada 24 horas con el objeto de determinar la producción de penicilina a lo largo de la fermentación y para cuantificar la producción de biomasa por peso seco. Se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 15 minutos y se recogieron 200 μ L del sobrenadante. 70 μ L de este sobrenadante se utilizaron para los bioensayos correspondientes. El precipitado formado corresponde al micelio y los restos de carbonato de calcio del medio de cultivo (este se disolvió agregando 200 μ L de HCl al 5%). Una vez disuelto el carbonato de calcio se repitió la centrifugación y se desechó el sobrenadante; el precipitado restante se llevo a peso constante para cuantificar la biomasa.

2.16.4. CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA G POR FERMENTACIÓN SÓLIDA.

A diferencia de la fermentación líquida, la producción de penicilina en fermentación sólida no necesita de un medio de inculo, pero si requiere de una serie de condiciones que a continuación se detallan:

2.16.4.1. PRETRATAMIENTO DEL SOPORTE SÓLIDO.

Se empleó como soporte bagazo de caña de azúcar. El bagazo se tamizó en mallas No. 30 y 50 utilizando únicamente las partículas retenidas entre estas dos mallas (correspondiendo a un tamaño de entre 0.297 y 0.59 mm).

Para el pretratamiento del bagazo, se mezcló éste con el 50 % del agua total que se iba a utilizar en el medio de producción y se llevó a 3 libras/pulgada² de presión (101 °C) en un autoclave, durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento, se esterilizó a 15 libras/pulgada² de presión (121 °C) durante 15 minutos. Para llevar a cabo el proceso de pretratamiento y esterilización, la mezcla del bagazo y agua se colocó en un vaso que se tapó perfectamente con celofán para impedir la pérdida o ganancia de agua, de lo contrario la humedad final del medio se vería afectada.

2.16.4.2. OBTENCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO.

Al bagazo de caña así tratado se le adicionó la cantidad de medio complejo de producción 2x.

Inmediatamente se inoculó con 2×10^6 esporas por mililitro de medio de cultivo cosechadas en las condiciones mencionadas anteriormente. Este medio de cultivo sólido con una humedad inicial del 70 % y un 30 % de sólidos se empleó como soporte para llevar a cabo la producción de penicilina en medio sólido.

2.16.4.3. PRODUCCIÓN.

La producción de penicilina se realizó empacando, por duplicado, columnas de vidrio con 12 g del bagazo con medio y esporas a una densidad de empaque de 0.26 g/mL. Posteriormente las columnas empacadas se sumergieron dentro de una pecera con agua a una temperatura controlada de 25 °C, y con un flujo de aire húmedo de 2.4 L/h, durante 130 horas aproximadamente. En un humidificador conectado en la parte inferior de cada columna, el aire se hizo burbujear en agua antes de pasar por cada una de ellas.

2.16.4.4. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS EN MEDIO SÓLIDO.

Se tomaron dos columnas completas por cada transformante y parental cada 24 horas para determinar la producción de penicilina a lo largo de la fermentación, para cuantificar la producción de biomasa por peso seco y para determinar la humedad del medio.

Se desempacó totalmente cada columna; se pesó su contenido y se añadieron 72 mL de amortiguador de fosfatos¹⁸ a un pH de 5.5. Posteriormente, se mezcló perfectamente y se ajustó el pH entre 5 y 5.15, con ácido fosfórico diluido (se midió el volumen utilizado para considerarlo en los cálculos de dilución). Esta mezcla se centrifugó a 2 700 r.p.m. durante 20 minutos, y un volumen de 5 mL del sobrenadante se separó y se colocó en un tubo estéril. 70 µL de este sobrenadante son suficientes para realizar los bioensayos correspondientes. El precipitado formado se lavó primero con 50 mL de una solución de HCl al 5 % y después con 50 mL de NaCl al 0.9 %, para eliminar restos de carbonato de calcio. El precipitado limpio se llevó a peso constante, para cuantificar biomasa y porcentaje de humedad.

2.17. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE *Penicillium chrysogenum*.

Este método se utilizó cuando se requería ADN total de los distintos hongos, normalmente para la hibridación con sondas específicas. Básicamente se utilizó el método descrito por Fernández [3]. Consiste en lo siguiente:

1. Se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio PMY con esporas procedentes de una placa de medio PW. Se incubó a 25 °C y 200 r.p.m. durante 48 horas.
2. El micelio resultante se recogió por filtración a través de un filtro de nylon Nytal estéril de 30 µm de diámetro de poro. El micelio retenido primero se lavó con 100 mL de NaCl al 0.9 % (p/v), con el objeto de eliminar los componentes del medio de cultivo y posteriormente con 100 mL de tampón A²⁰. Se recogió el micelio, se secó con papel filtro, se congeló y finalmente se liofilizó.
3. Con la ayuda de un mortero se pulverizó un gramo de micelio liofilizado y se distribuyó el polvo obtenido en varios tubos Eppendorf de 1.5 mL (sin superar los 350 µL de volumen por tubo, aproximadamente 75 mg de micelio pulverizado). A continuación se añadieron 350 µL de tampón de rotura I²¹, se homogeneizó muy bien la mezcla y se añadieron 350 µL de fenol y 350 µL de CIA. Se mezcló bien, pero con suavidad, y se incubó a 50 °C durante 20 minutos, con agitación suave a los 10 minutos.

4. Transcurrido este tiempo se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente y 14 000 r.p.m. durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa superior. La mezcla se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con 350 μ L de fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (son necesarias 6 ó 7 extracciones). Se realizó una nueva extracción con un volumen de CIA (350 μ L) y se precipitó el ADN a 4 $^{\circ}$ C durante 2-4 horas con 0.7 volúmenes de isopropanol (245 μ L). Tras centrifugar a 4 $^{\circ}$ C y 14 000 r.p.m. durante 20 minutos se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ L de etanol al 70 % (v/v). Finalmente el precipitado se secó y se resuspendió en 20 μ L de TE.

Con este proceso se obtiene una cantidad de 30-50 μ g de ADN, lo que permite realizar varios experimentos de hibridación (suficientes, para determinar la existencia de integración del plásmido en los transformantes).

2.18. TRANSFERENCIA DE SOUTHERN.

La transferencia a un soporte sólido, como una membrana de nylon, de fragmentos de ADN obtenidos por digestión y sometidos a migración electroforética en un gel de agarosa se ha denominado “ Southern blotting” o transferencia de Southern. Los métodos empleados, fueron fundamentalmente los descritos por Sambrook *y col.* [87].

Se analizó electroforéticamente la calidad del ADN genómico de las cepas parentales y el de los transformantes seleccionados. Se realizaron diluciones y se llevó a cabo la digestión de este ADN total y del pUAMJC1 con la endonucleasa *Sall*. El producto de la digestión del pUAMJC1 se empleó como un control positivo en la hibridación. El procedimiento para llevar a cabo la transferencia de ADN fue el siguiente:

1. Una vez realizada la electroforesis se llevó a cabo la tinción del gel y se fotografió por los procedimientos mencionados anteriormente. Es importante colocar una regla como referencia, a partir de los pocillos del gel donde se aplicó la muestra.
2. A continuación se trató el gel con 100 mL de una solución de HCl 0.25 N durante 15 minutos, manteniéndose con una agitación moderada. Posteriormente, se lavó el gel con agua destilada.
3. Se sumergió el gel en 100 mL de solución desnaturalizante²² durante 30 minutos con agitación lenta y nuevamente se lavó con agua destilada. A continuación el gel se sumergió en 100 mL de solución neutralizante²³ durante 30 minutos, con agitación moderada y finalmente se realizó el último lavado con agua destilada. Al mismo tiempo, se cortó cantidad suficiente de papeles absorbentes y 4 papeles de filtro Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel, también se cortó la membrana de nylon de un tamaño un centímetro mayor de largo y ancho que el gel.
4. Se colocó una pila de papeles absorbentes de unos 5 centímetros de grosor sobre una bandeja y sobre ella se colocaron dos papeles previamente humedecidos en el tampón de transferencia²⁴.
5. A continuación se colocó el gel, siempre tomando en cuenta la posición de las muestras de ADN, sobre el papel Whatman 3MM. Sobre él se depositó la membrana de nylon (previamente humedecida en agua destilada y después en el tampón de transferencia) teniendo cuidado de no formar burbujas. Se marca con un lapicero la parte de la membrana opuesta a la que unirá el ADN.

6. Sobre el filtro se colocaron humedecidos en el tampón de transferencia, dos papeles Whatman 3MM. Encima de los papeles de filtro se acomodó una nueva pila de papeles absorbentes de unos 10 cm de grosor, cuidando de eliminar las burbujas formadas. En la parte superior del sistema se depositó, cuidando de conservar el equilibrio, un objeto de unos 500 gramos de peso. Se añadió tampón de transferencia a la bandeja hasta un volumen suficiente para que en el transcurso de la transferencia el tampón no se consumiera totalmente y que éste no rebasara el límite de la pila inferior de papeles. Normalmente la transferencia se dejó 16 a 20 horas, tiempo suficiente para que el ADN se transfiriera a la membrana de nylon.
7. Transcurrido este tiempo se desmontó el sistema, se marcó la situación de los pocillos en la membrana y ésta se lavó con cuidado en una solución de SSC 5x. Posteriormente se dejó secar la membrana, se colocó dentro de una bolsa transparente y se fijaron covalentemente los ácidos nucleicos mediante irradiación con luz ultravioleta durante 5 minutos. Si la membrana no se usó en el momento se guardó en una bolsa de plástico, se cubrió con papel aluminio y se conservó a 4 °C, debidamente etiquetada.

2.19. MARCAJE DE LAS SONDAS.

Una de las dos sondas que se utilizaron en este trabajo se obtuvo del fragmento de ADN del pUAMJC1 delimitado por la endonucleasa *Sall*, fragmento de un tamaño de 5.1 kpb que porta los dos últimos genes de la vía de penicilina. La otra sonda derivó del pC43 que se digirió con la enzima *XbaI*, el producto de la digestión fueron dos fragmentos uno de 0.8 kpb que es la región correspondiente al promotor del gen *pcbC*, y el otro de 4.1 kbp. Esta sonda estaría constituida por, básicamente, el vector usado en la construcción del plásmido pUAMJC1 y su uso tiene como objeto evitar las interferencias con regiones de ADN ya presentes en las cepas parentales. El proceso de extracción del gel de estos fragmentos de ADN se mencionaron en el apartado correspondiente.

Una vez extraído y purificado el ADN a usar como sonda en las hibridaciones debe ser marcado de forma que sea posible su detección. Con este fin se utilizaron técnicas de marcaje con el isótopo ^{32}P . Este isótopo emite partículas β y posee una vida media de 14 días y una elevada actividad específica, que permite una rápida detección. Además, las enzimas utilizadas en el marcaje de sondas de ADN no resultan inhibidas por la utilización de nucleósidos trifosfato marcados con ^{32}P .

Para el marcaje de las sondas se empleó la técnica del desplazamiento de mellas (“nick translation”). En este método [92] se aprovechó la acción combinada de la ADNasa I y la ADN polimerasa I de *E. coli*.

La ADNasa I rompe de modo inespecífico las dos cadenas de la molécula de ADN generando extremos 3'-OH libres y la ADN polimerasa I puede desplazar esas roturas o mellas (“nicks”) debido a las dos actividades enzimáticas que presenta: una exonucleásica en dirección 5'-3' y una polimerásica en dirección 3'-5'. En virtud de esta última, la ADN polimerasa I introduce en la cadena de ADN el nucleótido marcado radiactivamente añadido en la mezcla de reacción. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se incubó a 16 °C durante 30 minutos la mezcla de marcaje y posteriormente se enfrió en un baño de hielo y agua. Los componentes en orden de agregación fueron los siguientes: H₂O_d estéril, 9 µL; dATP 0.5 mM, 1 µL; dGTP 0.5 mM, 1 µL; dTTP 0.5 mM, 1 µL; Tampón 10x (tampón de digestión, reactivo 2), 2 µL; ADN de la sonda, 2 µL; Mezcla de enzimas²⁵, 2 µL y [α^{32} P]dCTP (3.000 Ci/mmol), 2 µL.
2. Se separó la sonda de ADN marcada del exceso de isótopo radiactivo, empleando el sistema "Magic-clean" (Promega). Primero se añadió a la reacción de marcaje 1 mL de la resina "Clean-Up" y se cargó la mezcla en una columna comercial con la ayuda de una jeringa de 3 mL. El líquido se desechó en una botella reservada para el almacenamiento de compuestos radiactivos y la resina con la sonda quedó retenida en la columna. A continuación se lavó la columna con 2 mL de isopropanol al 80 % (v/v), utilizando la misma jeringa. Después, se insertó la columna en la parte superior de un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 15 segundos para eliminar el isopropanol residual de la resina. Se dejó 1 minuto a temperatura ambiente para que el isopropanol se evaporara completamente, se encajó la columna en otro tubo Eppendorf y se añadieron 100 µL de H₂O_d estéril (previamente calentada a 80 °C), se dejó en reposo durante 30 segundos y se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 30 segundos.
3. Una vez purificada la sonda se añadió 1 mL de agua destilada estéril y se pasó a un recipiente con agua en ebullición durante 10 minutos, con el fin de separar las dos cadenas de ADN de la sonda. Por último, se enfrió inmediatamente durante cinco minutos en un baño de hielo y agua.

2.20. HIBRIDACIÓN Y AUTORRADIOGRAFÍA.

La hibridación con una sonda correspondiente al plásmido empleado en el proceso de transformación, nos permitió comprobar la integración del plásmido pUAMJC1 en los transformantes. La sonda radiactiva se unió de manera específica a la membrana, en las zonas donde se encontró el plásmido integrado. La unión se detectó por autorradiografía tras la emisión de radiación por parte de la sonda marcada.

La hibridación consta de tres procesos distintos:

- a) Prehibridación, consiste en bloquear los sitios activos de la membrana donde no se unen ácidos nucleicos durante la transferencia (sitios que podrían unir inespecíficamente el ADN de la sonda).
- b) Hibridación, permite la unión específica de la sonda marcada con los ácidos nucleicos fijados en la membrana. Para esto fue necesario proporcionar las condiciones de temperatura (42 °C), concentración de formamida (40 %), sales y detergentes en el tampón de hibridación durante la incubación y las utilizadas en los lavados posteriores. En nuestro caso, se llevó a cabo una hibridación homóloga, pues la sonda y el ADN a rastrear contienen elementos idénticos.
- c) Lavados, que permiten la eliminación selectiva de la unión inespecífica que haya podido producirse entre la sonda marcada y los ácidos nucleicos.

2.20.1. PREHIBRIDACIÓN.

Se preparó tampón de hibridación I²⁶, que se suplementó con ADN de esperma de salmón desnaturalizado²⁷ (éste previamente se colocó durante 10 minutos en un recipiente con agua en ebullición y rápidamente, se pasó a un baño con hielo y agua durante 5 minutos). El volumen empleado de tampón de hibridación depende del área superficial de la membrana (0.25 mL por cada cm²) y la cantidad de esperma de salmón depende del volumen empleado de tampón de hibridación (20 µL por cada 1 mL). Paralelamente, se estabilizó el horno de hibridación a 42 °C y la mezcla de prehibridación a la misma temperatura. Esta mezcla se vació dentro del tubo de hibridación y se colocó la membrana en él, introduciéndolo en un horno de hibridación durante 18 horas, con rotación suave a 42 °C.

2.20.2. HIBRIDACIÓN.

Se destapó el tubo con la prehibridación y se desechó la mezcla utilizada. A continuación se añadió nuevo tampón de hibridación a una temperatura de 42 °C (0.1 mL por cada cm²), suplementado con ADN de esperma de salmón desnaturalizado, en las condiciones ya mencionadas anteriormente (20 µL por cada 1 mL). A este nuevo tampón se le añade la sonda de ADN marcada, purificada y desnaturalizada. Finalmente, se agregó la anterior mezcla de marcaje al mismo tubo con la membrana dentro y se incubó a 42 °C con rotación suave durante 18 horas.

2.20.3. LAVADO.

Se destapó el tubo con la hibridación y se vertió la mezcla de marcaje radiactiva en una botella reservada para el almacenamiento de residuos radiactivos (puede recogerse en un tubo y reutilizarse, si es necesario).

Se realizaron dos lavados, en el primero se sumergió la membrana en una bandeja con 500 mL de tampón de lavado I²⁸ a 42 °C, durante 15 minutos con agitación suave. Se desechó el líquido y en el segundo lavado se utilizó el tampón de lavado II²⁹, en las mismas condiciones mencionadas para el primer lavado. La progresión del lavado se valoró con un contador Geiger.

2.20.4. AUTORRADIOGRAFÍA.

Se colocó una película sensible a la radiación junto con la membrana, en una pantalla intensificadora 6S-525 Sample Exposure Platform. La impresión de la película se visualizó con el sistema de Fotodocumentación Molecular Imager^R System (BIO-RAD).

Si es necesario reutilizar la membrana en un nuevo proceso de hibridación, la sonda puede eliminarse agitando la membrana en una solución de NaOH 0.1 N durante 15 minutos, lavándola con agua destilada y finalmente tratándola con SSC 2x durante otros 15 minutos más.

3. RESULTADOS.

3.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pUAMJC1.

Para alcanzar el objetivo propuesto fue necesario construir un plásmido integrativo que entre otras características portara los genes de interés y marcadores de selección tanto para *E. coli* como para *P. chrysogenum*.

3.1.1. AMPLIFICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DE LOS PLÁSMIDOS pC43 y pJL33.

Con el objeto de contar con cantidad suficiente de ellos. Los plásmidos pC43 y pJL33 se amplificaron en células competentes de *E. coli* DH5 α , preparadas como se indica en el apartado de metodología. Tras la extracción y purificación de los plásmidos se comprobó su identidad por medio de un análisis electroforético como se muestra en la Figura 3.7.

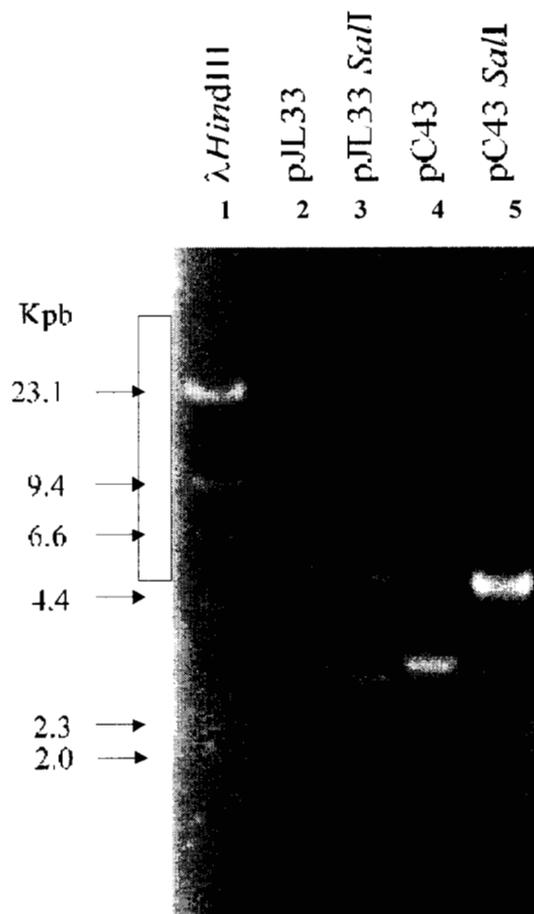


Figura 3.7. Análisis electroforético. Imagen de un gel que muestra el patrón de bandas correspondientes a la digestión del ADN de los plásmidos pJL33 y pC43 con la enzima *SalI*, carriles 3 y 5, y sin digestión, carriles 2 y 4. El carril 1 es ADN del bacteriófago lambda digerido con *HindIII*, que es utilizado como marcador de tamaño. Se puede apreciar las diferentes formas del plásmido sin digerir en el carril 4.

3.1.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pUAMJC1.

Se construyó ligando al vector pC43 un fragmento de ADN de 5.1 kpb con extremos *SalI* proveniente del plásmido pJL33. Este fragmento contiene los dos últimos genes de la ruta biosintética de la penicilina: *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*. Figura 3.8.

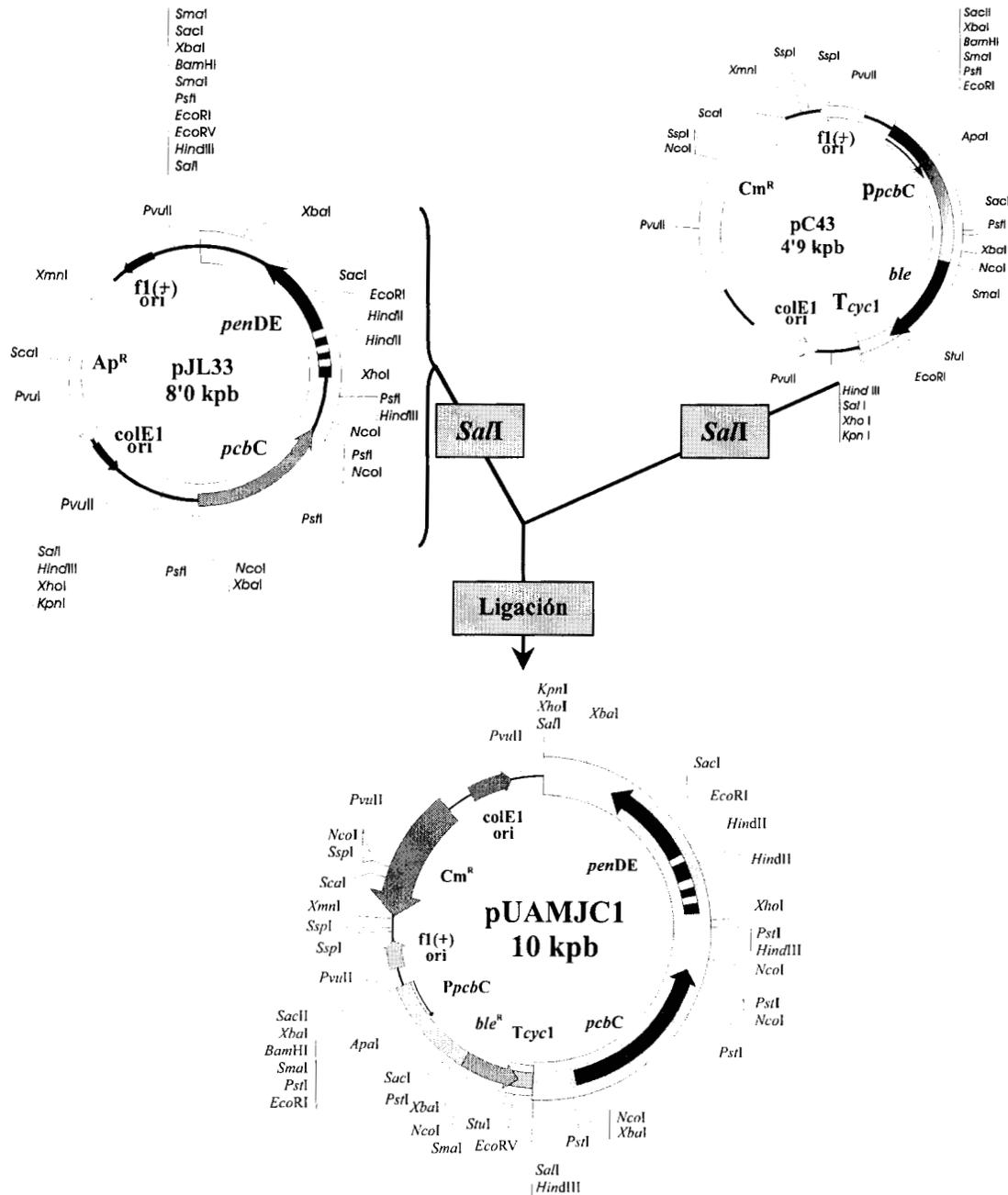


Figura 3.8. Esquema de construcción del plásmido integrativo pUAMJC1. Construido a partir del plásmido pC43 (imagen derecha) y un fragmento de ADN de 5.1 kpb del pJL33 (indicado con una llave en la imagen de la izquierda). Tiene un tamaño de 10 kpb, contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*, un marcador de selección en hongos *ble^R*, en bacterias *Cm^R* y un origen de replicación en bacterias *colE1 ori*.

3.1.3. AMPLIFICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE IDENTIDAD DEL VECTOR pUAMJC1.

Tras la digestión, se transformó la mezcla en células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente se comprobó la identidad del plásmido nuevo, en un análisis electroforético, mostrado en la Figura 3. 9.

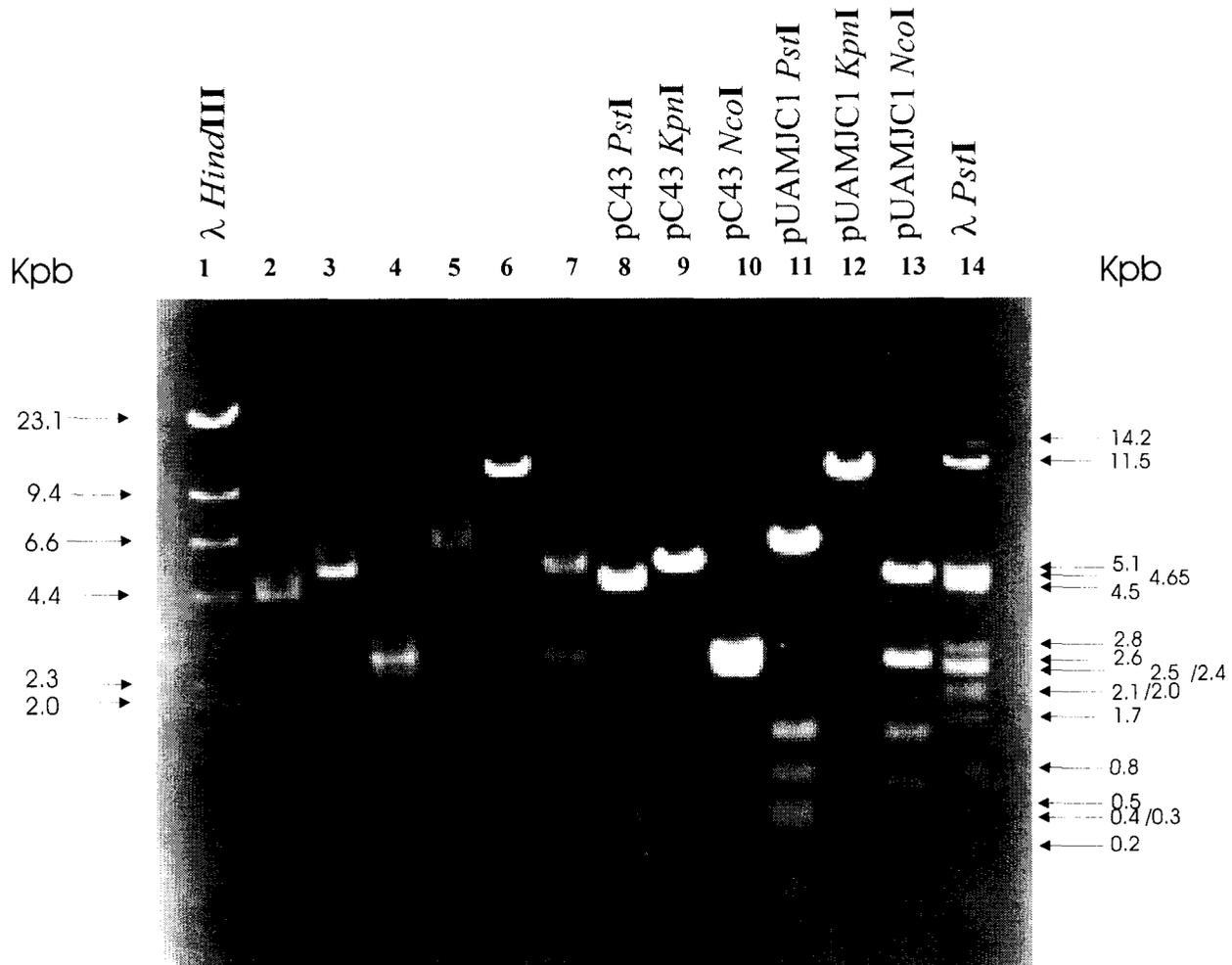


Figura 3.9. Análisis de migración electroforética en gel de agarosa. Imagen que muestra el patrón de bandas correspondientes a las digestiones con las enzimas de restricción *PstI*, *KpnI* y *NcoI*, del ADN de los plásmidos pC43, como control y pUAMJC1. Los carriles del 8 al 10 indican el patrón de bandas de las digestiones del pC43 y los del 11 al 13 el patrón para el pUAMJC1. Los carriles del 2 al 7 son un duplicado. Los carriles 1 y 14 muestran dos patrones de bandas características generados del ADN del bacteriófago lambda digerido con *HindIII* y *PstI*, que comúnmente son utilizados como marcadores de tamaño. El tamaño de las bandas generadas en las digestiones de ambos plásmidos coinciden al tamaño teórico según sus respectivos mapas de restricción.

Antes de iniciar los trabajos para la construcción del vector de clonación fue necesario obtener cantidades suficientes de ADN de los plásmidos progenitores (pC43 y pJL33) y confirmar su identidad de cada uno de ellos con estudios de digestión y migración electroforética, que se relacionan con los mapas de restricción correspondientes.

La Figura 3.7 muestra el patrón de bandas generadas por la digestión de ADN de ambos plásmidos con la enzima *SalI*. Es claro que las dos bandas, una de tamaño 2.9 y la otra de 5.1 kpb producidas por el corte en dos sitios del ADN con la endonucleasa mencionada, corresponden al pJL33 (carril 3) y, que la banda de 4.9 kpb se genera por el corte único con *SalI* presente en el pC43 (carril 5). Controles de cada uno de los plásmidos sin digerir sobre el mismo gel revelan diferentes bandas, que corresponden al monómero de cada plásmido en sus formas circular cerrada y abierta (carriles 2 y 4)

La Figura 3.8 ilustra gráficamente la construcción del plásmido bifuncional. Fueron incluidas en el vector de clonación secuencias de ADN que permitieran la transformación de *E. coli* -el origen *colE1* de la replicación de ADN y el gen *Cm* para la cloranfenicol acetiltransferasa- esto, para amplificar en cantidad las moléculas de ADN plasmídico. Tales elementos derivaron del plásmido pC43, así como el módulo para la resistencia a fleomicina. Este módulo contiene un promotor (*PpcbC*) del gen para la isopenicilina N sintasa de *P. chrysogenum*, y también presenta un elemento terminador de la transcripción (*Tcyc1*) de levadura.

El ADN del plásmido pUAMJC1 que tiene un tamaño de 10 kpb, se propagó en *E. coli* con la intención de obtener cantidad suficiente para los experimentos de comprobación de identidad y de transformación.

La Figura 3.9 ilustra diferentes patrones de bandas generadas por la digestión del pUAMJC1 con varias endonucleasas (carriles 2 al 7 y como una repetición, del 8 al 13), que corresponderían a los diferentes sitios de corte presentes en el mapa de restricción y al tamaño del nuevo plásmido.

3.2. ESTUDIO DE RESISTENCIA A LA FLEOMICINA.

Se realizó un estudio preliminar de resistencia a la fleomicina en las cepas Wisconsin 54-1255 y P2-32 previo a la transformación, con la intención de identificar la concentración mínima letal de este antibiótico en las cepas. Se encontró que a concentraciones de 30 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina en el medio empleado se impedía totalmente el crecimiento de ambas cepas, de tal manera que esta fue la cantidad de fleomicina que se utilizó como criterio de selección (Ver la Tabla 3.2), y en los posteriores análisis de alta resistencia esta cantidad se incrementó gradualmente hasta 80 $\mu\text{g/mL}$.

CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS		
Fleomicina ($\mu\text{g/mL}$)	Wisconsin 54- 1255	P2-32
0	+++	+++
10	++-	+++
20	+--	++-
30	---	---
40	---	---
50	---	---
60	---	---

Tabla 3.2. Crecimiento cualitativo de las colonias de los distintos microorganismos incubados sobre medio Czapek-fleomicina. Parece que la cepa silvestre P2-32 es ligeramente más resistente a la fleomicina que la Wisconsin 54-1255 pero, a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ en ambas se inhibe su crecimiento normal. Las placas con el medio y las colonias se incubaron a 25 °C durante 10-15 días.

3.3 OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES.

Empleando la técnica de generación de protoplastos, para permitir la introducción del vector, se obtuvieron 13 transformantes derivados de la cepa Wisconsin 54-1255 y 28 de la cepa P2-32. A continuación, por resiembras en medio Power con fleomicina como marcador de selección, se recomprobaron los transformantes generados.

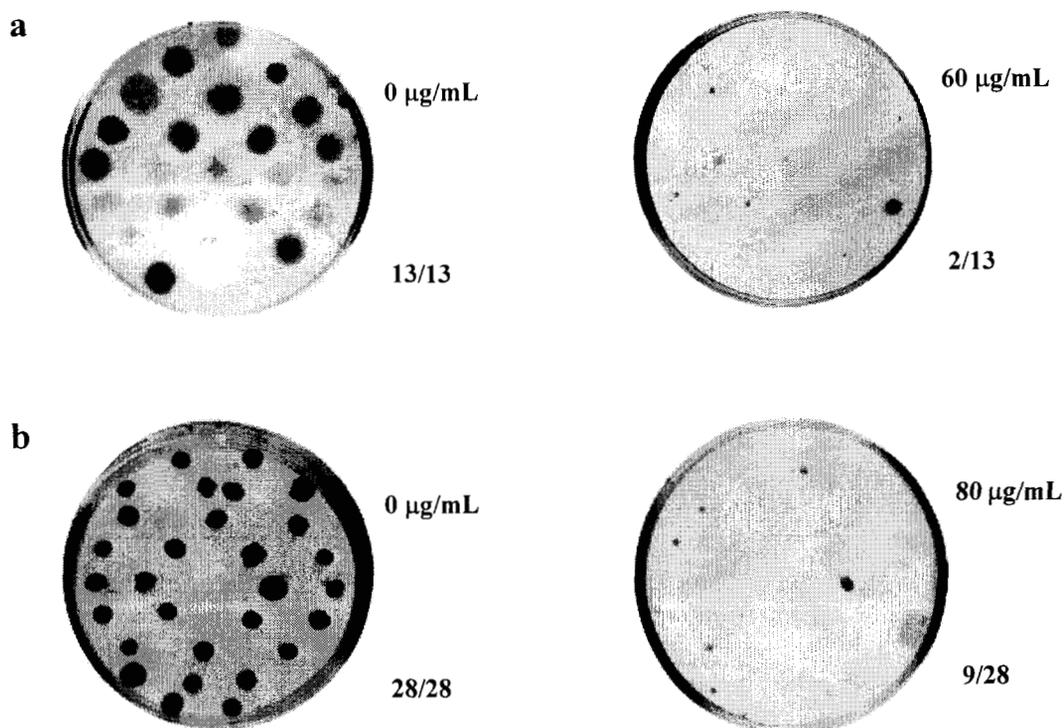
3.3.1. TRANSFORMANTES DE ALTA RESISTENCIA.

Debido a que el crecimiento con concentraciones crecientes de fleomicina en el medio es indicativo de un número mayor de copias del plásmido integradas, el crecimiento en dichas condiciones también nos da información del aumento de la dosis génica de los dos últimos genes de la vía biosintética de la penicilina. Por tales motivos se resembraron los transformantes obtenidos en placas con medio Czapek con concentraciones mayores de fleomicina y se incubaron a 25 °C durante 15 días. El crecimiento de las colonias en las placas se ilustra en las Figuras 3.10a y 3.10b.

El sistema de transformación resultó ser más favorable para la cepa de alta producción, de la cual 28 transformantes de P2-32 fueron corroborados del medio selectivo fresco, mientras que para la Wisconsin 54-1255, de baja producción, se ratificaron 13 clones resistentes (Figuras 3.10a y 3.10b).

Posteriormente, al ser transferidos de nuevo al medio fresco con fleomicina a concentraciones crecientes, 24 transformantes de P2-32 y 10 de Wisconsin 54-1255 fueron resistentes. Gráfica 3.1a y 3.1b. Se desconoce la causa del por qué 4 y 3 de los clones de P2-32 y Wisconsin 54-1255 respectivamente, no crecieron nuevamente en medio selectivo fresco, aunque no perdieron su capacidad productora de penicilina.

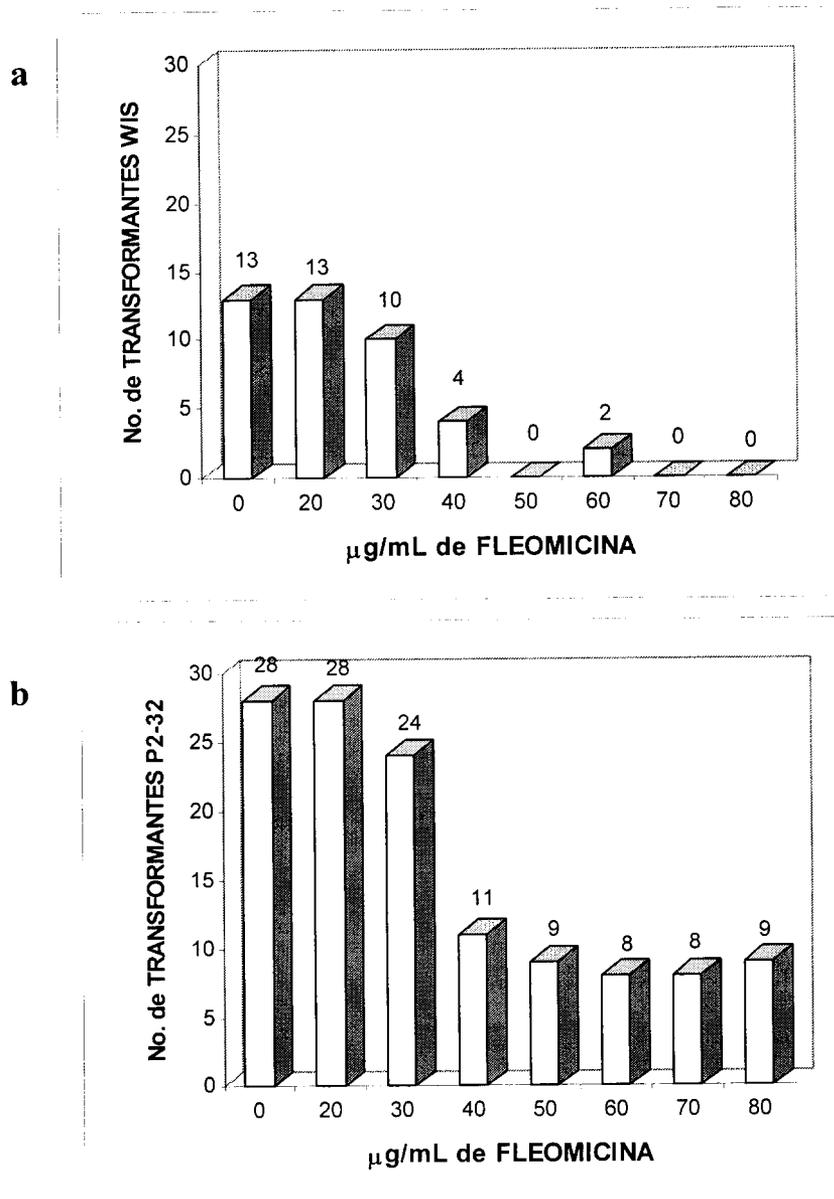
Los transformantes derivados de la cepa Wisconsin 54-1255 se designaron con las iniciales TW y los procedentes de la P2-32 con la clave TP.



Figuras 3.10a y 3.10b. Ensayo de resistencia a fleomicina de los transformantes de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). La intensidad diferente de los puntos en cada una de las anteriores imágenes de las placas, indican el crecimiento variado de los transformantes inoculados en medio Czapek con diferentes concentraciones de fleomicina, incubados a 25 °C durante 15 días. Los números de la parte superior derecha en cada placa son las concentraciones de fleomicina utilizadas. Los coeficientes que están en la parte inferior derecha indican el número de transformantes capaces de crecer en tales condiciones.

Los resultados del número de transformantes resistentes a concentraciones crecientes de fleomicina derivados de ambas cepas se muestran en las Gráficas 3.1a y 3.1b. Los números indican la totalidad de transformantes que tuvieron la capacidad de crecer a las diferentes concentraciones de fleomicina suministradas en el medio. La Gráfica 3.1a se construyó tomando en cuenta sólo aquellos transformantes que no perdieron la capacidad de producir penicilina o que no fueron considerados como contaminantes.

Ambas gráficas revelan que 4 transformantes derivados de la cepa Wisconsin 54-1255 presentaron una resistencia a 40 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina y dos a 60 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que para la cepa P2-32, los transformantes adquirieron resistencias mayores, esto es, 8-9 clones crecieron a concentraciones de fleomicina tanto de 50 como a 80 $\mu\text{g/mL}$.



Gráficas 3.1a y 3.1b. No. de transformantes de las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) resistentes a fleomicina. Las barras indican el número de transformantes derivados de las cepas Wisconsin y P2-32 que presentaron mayor resistencia a concentraciones crecientes de fleomicina en el medio, incubados a 25 °C durante 15 días.

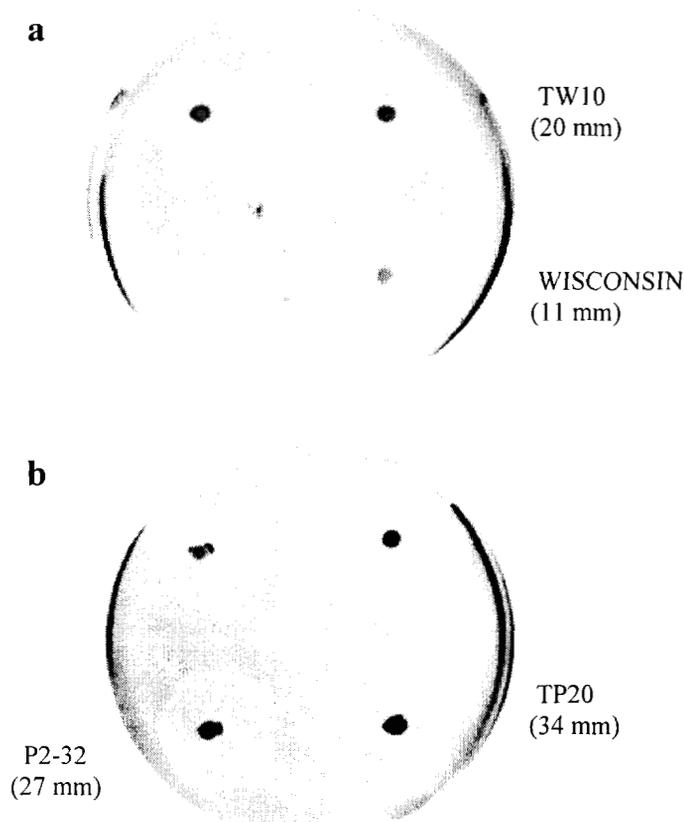
3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES PARA PRODUCCIÓN DE PENICILINA.

A parte de la evaluación de la resistencia a concentraciones crecientes de fleomicina en el medio y con el fin de escoger los transformantes de mejor producción de penicilina para ser utilizados en los posteriores estudios de fermentación líquida (FL) y fermentación sólida (FS).

Se analizó la capacidad de los diferentes transformantes para producir este antibiótico, inicialmente en bioensayos por el método de cobertera y, finalmente se analizaron en bioensayos por cilindros de agar.

3.4.1 BIOENSAYOS POR EL MÉTODO DE COBERTERA.

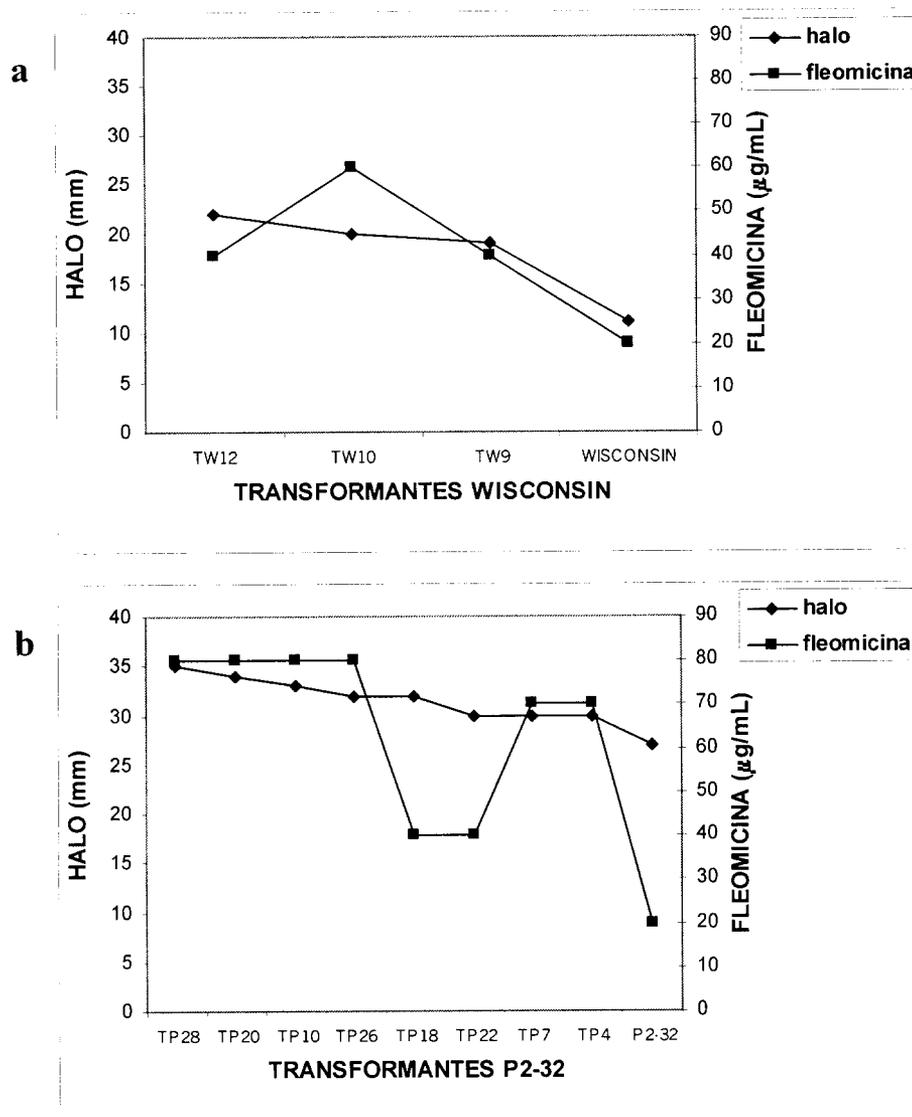
Este ensayo biológico se basa en la generación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano, debido a la difusión de antibiótico a partir del punto donde crece la colonia fúngica. El diámetro de la zona que aparece de un color claro en la superficie del medio de cultivo, está directamente relacionado con la producción de penicilina fúngica, que se ha difundido y ha propiciado la inhibición del crecimiento de colonias bacterianas agregadas a la placa en forma de cobertera. Esto puede apreciarse en las Figuras 3.11a y 3.11b.



Figuras 3.11a y 3.11b. Placas de bioensayo por cobertera: (a) Transformantes y cepa parental Wisconsin 54-1255 y (b) P2-32. TW y TP son claves que representan los diferentes tipos de transformantes; los números encerrados en paréntesis indican el diámetro del halo formado.

La alta resistencia de los transformantes a la fleomicina indica un aumento en el número de copias integradas del plásmido, y a su vez un incremento en la dosis génica de los genes de interés. Pero este criterio de selección preliminar debe de correlacionarse con la producción de penicilina. En este sentido, se necesitó de un criterio de análisis preliminar de los transformantes, que proporcionara información al respecto.

El método lo dio el bioensayo por cobertera, las Gráficas 3.2a y 3.2b señalan el tamaño del halo formado por los mejores productores de penicilina junto con el nivel de resistencia a fleomicina de cada uno.



Gráficas 3.2a y 3.2b. Diámetro del halo de inhibición (mm) y nivel de resistencia a la fleomicina ($\mu\text{g/mL}$) de los mejores transformantes derivados de *P. chrysogenum* (a) Wisconsin 54-1255 y (b) P2-32.

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran de una manera resumida y clara en la Tabla 3.3. Solo se indican los valores de tamaño de halo de inhibición para aquellos transformantes que presentaron mejoras en la producción de penicilina en bioensayos por cobertera, así como el porcentaje de incremento con relación a sus respectivos microorganismos parentales.

Cepa Parental	Transformantes	Halo (mm ± DE)	% de Incremento
WIS 54-1255	TW12	22 ± 1.4	100.0
	TW10	20 ± 0.7	81.8
		11 ± 0.7	0.0
P2-32	TP28	35 ± 2.1	29.6
	TP20	34 ± 0.7	25.9
		27 ± 0.7	0.0

Tabla 3.3. Producción de penicilina en bioensayos por cobertera de los dos mejores transformantes de cada cepa. La clave DE significa la desviación estándar de las mediciones del halo de inhibición.

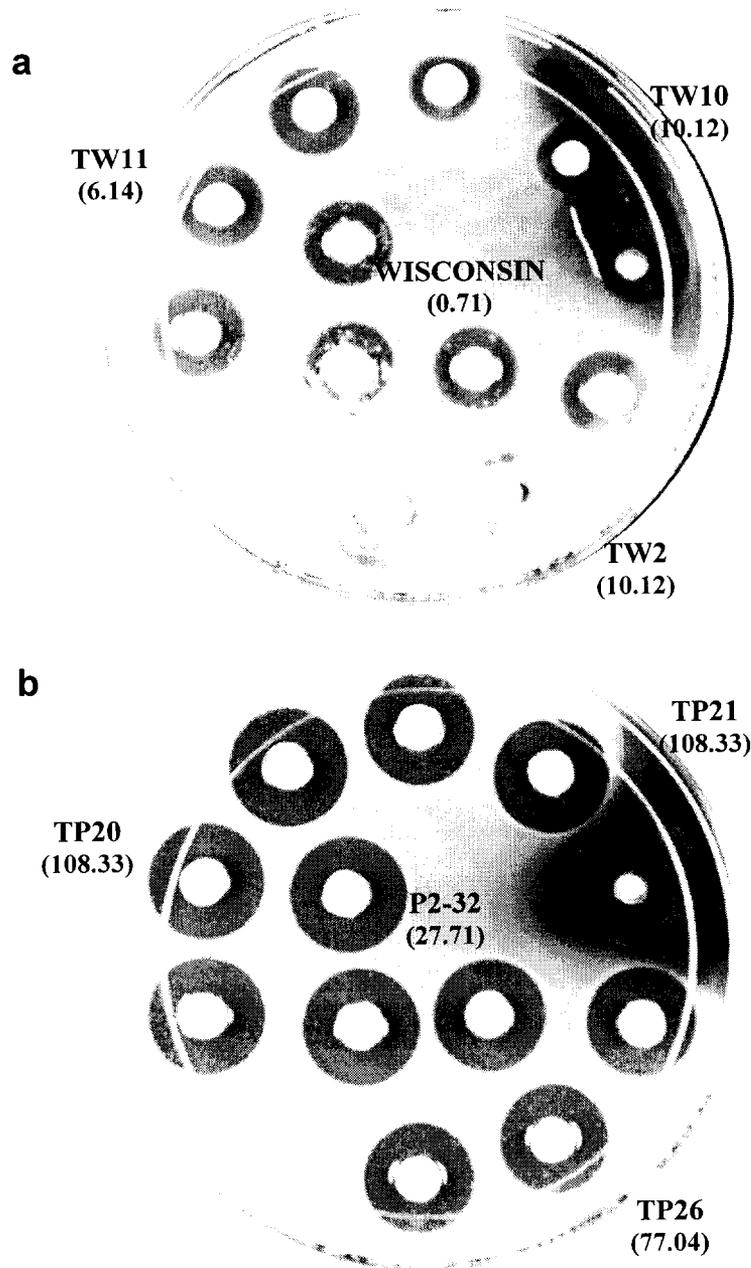
La Figura 3.11a muestra las placas, donde se observan los halos formados por los mejores clones productores de penicilina derivados de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, junto con el diámetro de halo y nivel de resistencia a fleomicina de uno de ellos. Es claro, que el transformante TW10 formó una zona de inhibición de 20 mm con respecto a la parental que obtuvo un halo de 11 mm. Además (ver Gráfica 3.2a), los clones TW10 y TW12 fueron los que presentaron una mayor capacidad de resistencia a fleomicina (60 y 40 µg/mL, respectivamente).

Asimismo, La Figura 3.11b y la Gráfica 3.2b representan los transformantes TP (TP28, TP20, TP10 y TP26) que generaron halos de inhibición un poco mayores que la cepa parental P2-32 y presentaron resistencias altas a fleomicina (80 µg/mL). El clon TP20 generó zonas claras con un diámetro de 34 mm en comparación con el tamaño de halo de la cepa P2-32 de 27 mm.

En las Gráficas 3.2a y 3.2b se puede apreciar una correlación directa entre el tamaño de halo y el grado de resistencia adquirida a fleomicina, correlación más definida para los transformantes TW.

3.4.2 BIOENSAYOS POR CILINDRO DE AGAR.

El ensayo por el método de cilindros de agar es una técnica más cuantitativa que la anterior y es útil para determinar la producción de penicilina, en base a la aparición de halos de inhibición del crecimiento de colonias bacterianas. Las Figuras 3.12a y 3.12b muestran las imágenes de solamente dos de las placas realizadas; en ellas se aprecian claramente las zonas de inhibición generadas por la difusión de la penicilina, producida por tres de los mejores transformantes y sus parentales en cilindros de agar.



Figuras 3.12a y 3.12b. Placas de bioensayo por cilindros de agar. Transformantes y parental de *P. chrysogenum* (a) Wisconsin 54-1255 y (b) P2-32. TW y TP son los diferentes tipos de transformantes; los números encerrados en paréntesis indican la producción promedio de penicilina en $\mu\text{g/mL}$. Los ensayos para cada transformante se hicieron por triplicado.

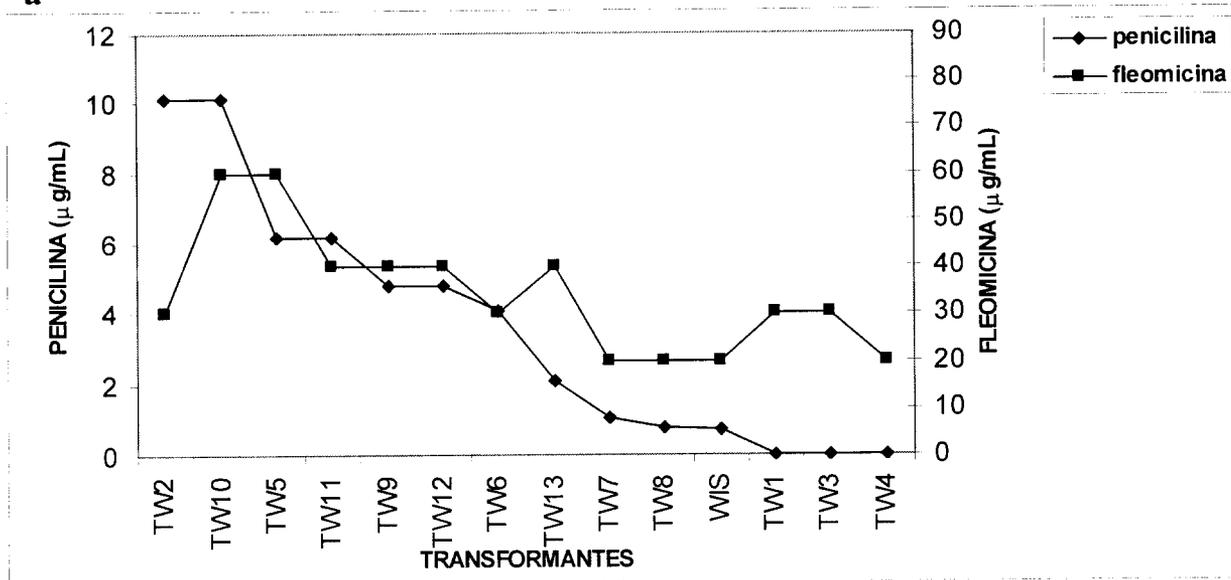
La producción de penicilina obtenida por todos los transformantes analizados se refleja en la Tabla 3.4.

Transformantes Wisconsin 54-1255	Resistencia Máxima Fleomicina (µg/mL)	Diametro Crecimiento Colonia (mm)	Producción Máxima Penicilina (µg/mL)	% incred	Transformantes P2-32	Resistencia Máxima Fleomicina (µg/mL)	Diametro Crecimiento Colonia (mm)	Producción Máxima Penicilina (µg/mL)	% incred
TW2	30	1	10.12	1333.59	TP20	80	1	108.33	290.98
TW10	60	1	10.12	1333.59	TP21	30	1	108.33	290.98
TW5	60	2	6.14	770.15	TP17	80	5	91.35	229.71
TW11	40	1	6.14	770.15	TP23	80	1	91.35	229.71
TW9	40	1	4.79	577.92	TP26	80	1	77.04	178.05
TW12	40	2	4.79	577.92	TP27	40	1	64.96	134.48
TW6	30	1	4.05	473.99	TP18	30	1	54.78	97.73
TW13	40	1	2.08	194.98	TP22	30	1	54.78	97.73
TW7	20	2	1.07	51.60	TP29	80	1	54.78	97.73
TW8	20	2	0.77	8.68	TP3	40	1	46.20	66.75
WIS	20	3	0.71	0.00	TP28	80	1	46.20	66.75
TW1	30	4	0.01	-99.26	TP13	20	1	38.96	40.62
TW3	30	1	0.01	-99.26	TP9	50	1	32.85	18.58
TW4	20	1	0.01	-99.26	TP11	70	4	32.85	18.58
					TP15	20	1	32.85	18.58
					TP25	70	1	27.71	0.00
					P2-32	20	1	27.71	0.00
					TP4	70	1	23.36	-15.67
					TP5	80	2	23.36	-15.67
					TP8	60	1	23.36	-15.67
					TP19	20	1	23.36	-15.67
					TP24	30	1	23.36	-15.67
					TP10	80	1	19.70	-28.89
					TP12	50	1	19.70	-28.89
					TP7	80	1	14.01	-49.43
					TP14	70	1	14.01	-49.43
					TP2	20	1	7.09	-74.42
					TP6	70	1	7.09	-74.42
					TP1	30	1	1.53	-94.48

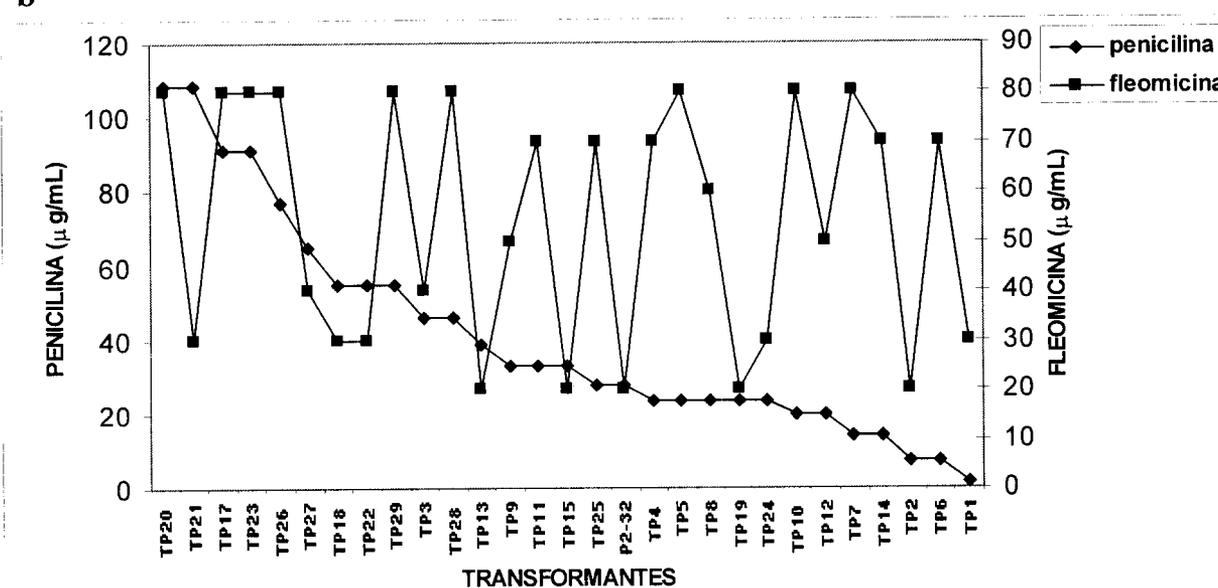
Tabla 3.4. Producción de penicilina por el método de bioensayo en cilindros de agar de todos los transformantes de cada cepa parental. Se aprecia el porcentaje de incremento de cada transformante con respecto a sus parentales (no se han omitido los valores negativos de % de incremento de penicilina), la intención es tener una idea de la efectividad del método de mejoramiento en ambas cepas fúngicas. También, se muestra el nivel máximo de resistencia a la fleomicina y, el diámetro de crecimiento de cada transformante sembrados en medio Czapek con cantidades crecientes del antibiótico, incubados a 25 °C durante 15 días. Este resultado es indicativo de la capacidad productora de penicilina adquirida por los transformantes. Los estudios de producción y porcentaje de incremento se realizaron por triplicado.

En las Gráficas 3.3a y 3.3b se observan los valores de producción de penicilina en cilindros de agar, junto con el nivel de resistencia a fleomicina de cada uno de los transformantes. La intención de este estudio es hacer un análisis de la eficiencia del método para obtener transformantes mejorados en cuanto a la producción de penicilina; así como también, tener un criterio para la selección de los transformantes que se utilizarán en la FL y en la FS.

a

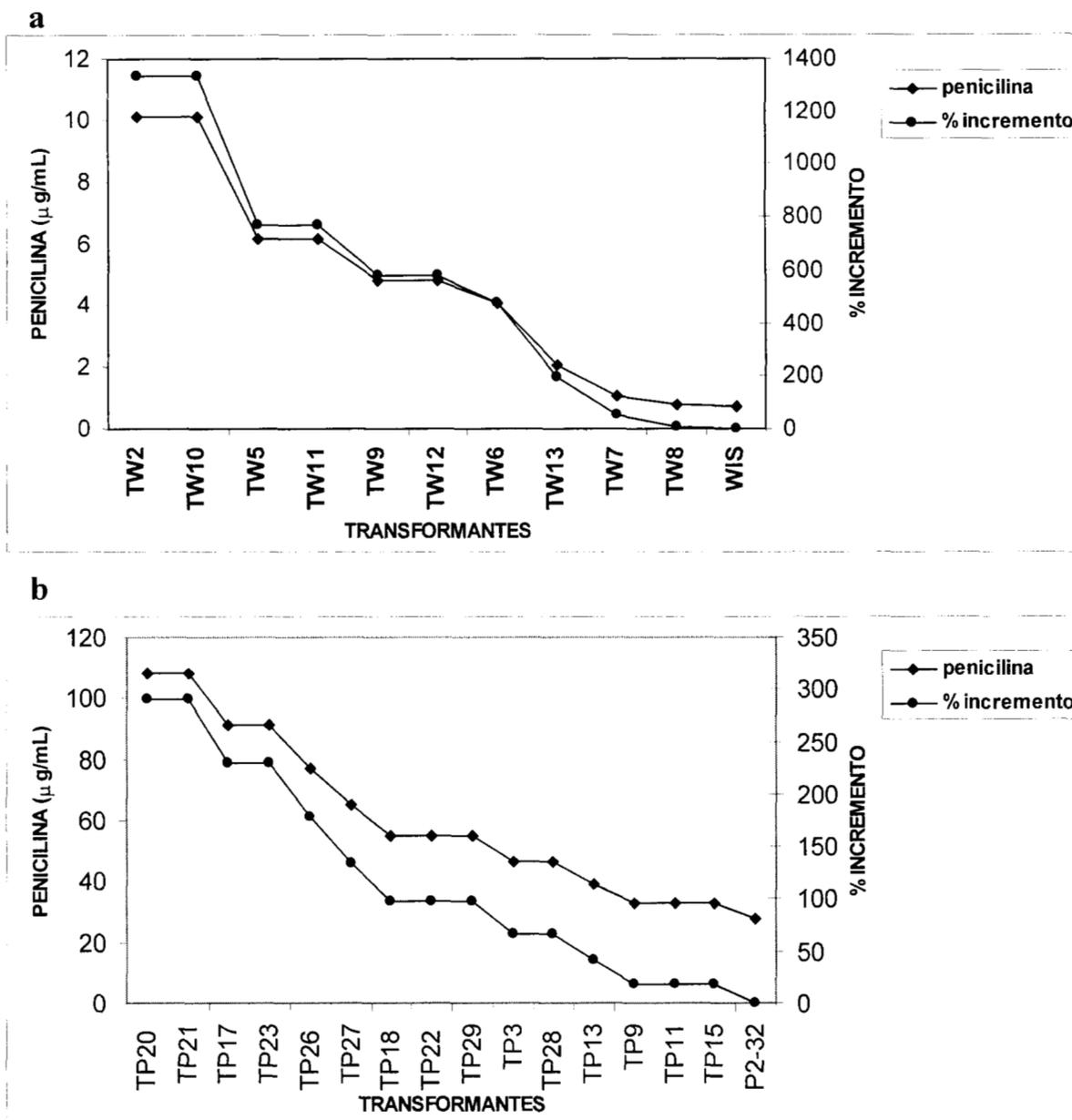


b



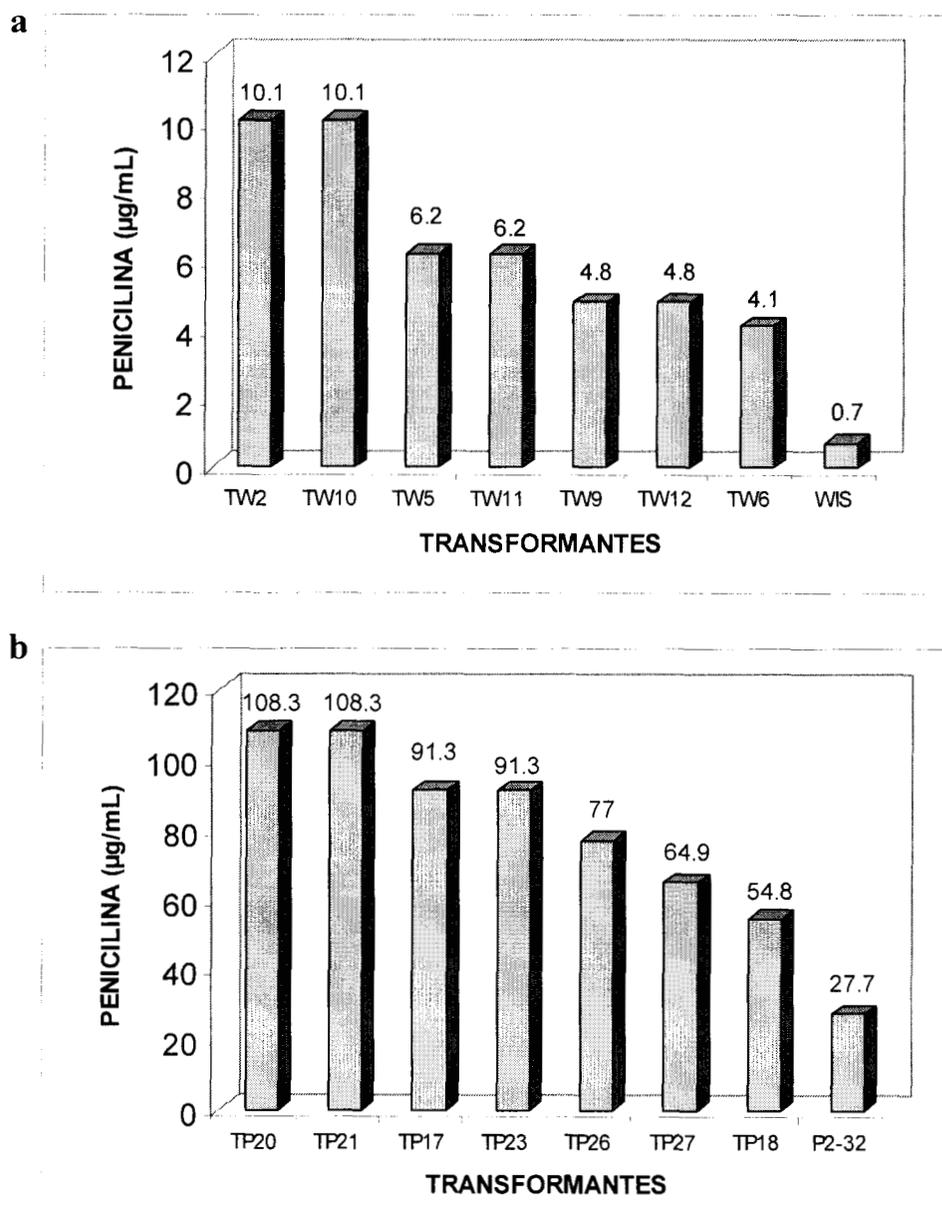
Gráficas 3.3a y 3.3b. Grado de producción de penicilina de los transformantes y parentales de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). Se observa la relación del nivel máximo de resistencia a fleomicina obtenida por cada uno de ellos y su nivel de producción de penicilina en bioensayo por el método de cilindros de agar. En las gráficas WIS y P2-32 corresponden a las cepas parentales utilizadas.

Las Gráficas 3.4a y 3.4b, indican los niveles de producción de penicilina en cilindros de agar de los transformantes preseleccionados que presentaron porcentajes de incremento más altos. En este sentido algunos de ellos serán candidatos para los estudios de producción en fermentación líquida y sólida.



Gráficas 3.4a y 3.4b. Transformantes Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). Las curvas indican la producción de penicilina en cilindros de agar y los valores de % de incremento con respecto a las parentales de cada uno de los transformantes preseleccionados. WIS y P2-32 en las gráficas indican las cepas parentales de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y P2-32 respectivamente.

Asimismo, las Gráficas 3.5a y 3.5b señalan a los transformantes que en estos bioensayos presentaron un mayor nivel de producción de penicilina y por lo tanto un porcentaje de incremento más alto, junto con coeficientes de variación menores. Ambos criterios se tomaron en cuenta para seleccionar a los mejores productores y utilizarlos en la FL y FS.



Gráfica 3.5a y 3.5b. Transformantes Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. Ambos tipos de transformantes fueron los que presentaron mayor capacidad de producción de penicilina en cilindros de agar. Las barras indican los valores de producción de penicilina de cada uno de los transformantes seleccionados y de la cepa parental como comparación.

Después del proceso de selección, y aplicando los diferentes criterios ya mencionados, de 13 transformantes generados a partir de la cepa Wisconsin 54-1255 sólo quedaron 7 de mayor producción de penicilina y, de 28 transformantes de la cepa P2-32 se escogieron 7 para los posteriores estudios de FL y FS. Ver Tablas 3.5a y 3.5b. Sin embargo, de cada conjunto sólo se seleccionaron 3 y la parental para la FL y 2 y la parental para la FS, debido a carencias de espacio en los sistemas donde se llevaron a cabo tales estudios.

a

TRANSFORMANTES	PENICILINA µg/mL	% INCREMENTO	COEFICIENTE VARIACIÓN
TW2	10.1	1333.6	41.5
TW10	10.1	1333.6	41.5
TW5	6.2	770.2	107.8
TW11	6.2	770.2	15.1
TW9	4.8	577.9	15.1
TW12	4.8	577.9	26.8
TW6	4.1	473.9	31.6
WISCONSIN 54-1255	0.7	0	36.9

b

TRANSFORMANTES	PENICILINA µg/mL	% INCREMENTO	COEFICIENTE VARIACIÓN
TP20	108.3	291	32.5
TP21	108.3	291	97.9
TP17	91.3	229.7	53.9
TP23	91.3	229.7	53.9
TP26	77	178	27.4
TP27	64.9	134.5	32.5
TP18	54.8	97.7	0
P2-32	27.7	0	27.4

Tablas 3.5a y 3.5b. Valores de producción de penicilina en cilindros de agar preparados con medio Somerson, % de incremento y coeficiente de variación, obtenidos por los transformantes de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. También se señalan los valores de producción de las cepas parentales correspondientes.

Las figuras 3.12a y 3.12b muestran las imágenes de las placas realizadas; en ellas se aprecian las zonas de inhibición producidas en cilindros de agar por tres de los mejores transformantes TW y TP, junto con sus respectivas parentales. Los transformantes TW10, TW2 y TW11 presentaron producciones de penicilina de 10 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en general, en comparación con los 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la cepa progenitora. A este respecto, los clones TP20, TP21 y TP26 fabricaron cantidades de penicilina que van de 108 a 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en relación con los 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la cepa precursora.

La Tabla 3.4 resume los datos obtenidos en los experimentos de selección. Los transformantes TW10 y TW2 fueron los que exhibieron incrementos más notables en la producción de penicilina (efectuado en bioensayo por cilindros de agar) con relación al microorganismo progenitor. No obstante, los que presentaron mayor resistencia a fleomicina fueron las células TW10 y TW5.

En este orden de ideas, los transformantes TP20 y TP21 mostraron mejorías más importantes en la capacidad productora comparada con la cepa precursora. Sin embargo, de los que demostraron mayor resistencia a fleomicina, clones TP20, TP17, TP23, TP26, TP29, TP28, TP5, TP10 y TP7, el clon TP21 no coincide con ambas capacidades adquiridas (como en el caso del transformante TW2). Esto es, los transformantes TP21 y TW2 adquirieron mejor capacidad productora de penicilina pero no mayor resistencia a fleomicina como los demás clones.

La Gráfica.3.3a señala a cuatro de los recombinantes de Wisconsin 54-1255 (TW2, TW10, TW5 y TW11) que incrementaron su capacidad productora (6 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y adquirieron las mayores resistencias a fleomicina (40 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a excepción de la TW2 que sólo resiste 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se aprecia en la gráfica una cierta relación directa entre la resistencia a fleomicina y la cantidad de penicilina generada. A medida que la resistencia a fleomicina disminuye, la producción de penicilina es menor.

Correlación que no se observó en la Gráfica 3.3b, con los transformantes TP. Sin embargo, los clones TP20, TP21, TP17, TP23 y TP26 que son los que adquirieron mayores incrementos en la cantidad de penicilina producida sobre cilindros de agar (65 y 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$), exhibieron resistencias superiores a fleomicina (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), excepto el TP21 que sólo es resistente a la fleomicina en concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No necesariamente las células transformadas que producen menos penicilina son las de menor resistencia, algunas de ellas son de alta resistencia a fleomicina.

Los transformantes TW2, TW10, TW5 y TW11 alcanzaron aumentos en la producción de penicilina G, 14 a 9 veces mayores en comparación con la parental, como se aprecia en la Gráfica 3.4a. En el caso de los transformantes TP20, TP21, TP17, TP23 y TP26 (Gráfica 3.4b) lograron incrementos en la producción 3 a 4 veces mayores en relación a la cepa precursora.

Como se indica en la Tabla 3.5a, el porcentaje de incremento logrado por los recombinantes TW2, TW10 y TW11 fue de 1300 y 770%, y el coeficiente de variación fue de 41 y 15 respectivamente. Del mismo modo (Tabla 3.5b), los transformantes TP20, TP21 y TP26 alcanzaron valores de incremento de 290, 230 y 170%, y de variación de 32, 97 y 27 respectivamente.

Después de aplicar los criterios de selección, como alta resistencia a fleomicina, porcentaje de incremento en la producción y coeficiente de variación menor, de 13 transformantes derivados de Wisconsin 54-1255 se escogieron 7: TW2, TW10, TW5, TW11, TW9, TW12 y TW6. De igual forma, de 28 transformantes de la cepa P2-32 se eligieron 7: TP20, TP21, TP17, TP23, TP26, TP27 y TP18 para los posteriores estudios de FL y FS. Gráficas 3.5a y 3.5b y Tablas 3.5a y 3.5b.

No obstante, debido a carencias de espacio en los sistemas donde se llevaron a cabo los estudios de fermentación líquida y sólida. Sólo se seleccionaron los transformantes TW2, TW10, TW11, TP20, TP21 y TP26, y las cepas parentales correspondientes para la FL, y los clones TW10, TW11, TP20 y TP26, y las parentales respectivas para la FS.

Además, los recombinantes TW2 y TP21 se excluyeron de este último estudio (FS), porque a pesar de que presentaron porcentajes de incremento importantes, sus coeficientes de variación fueron significativamente mayores, de 41 y 97 respectivamente, en comparación con los demás.

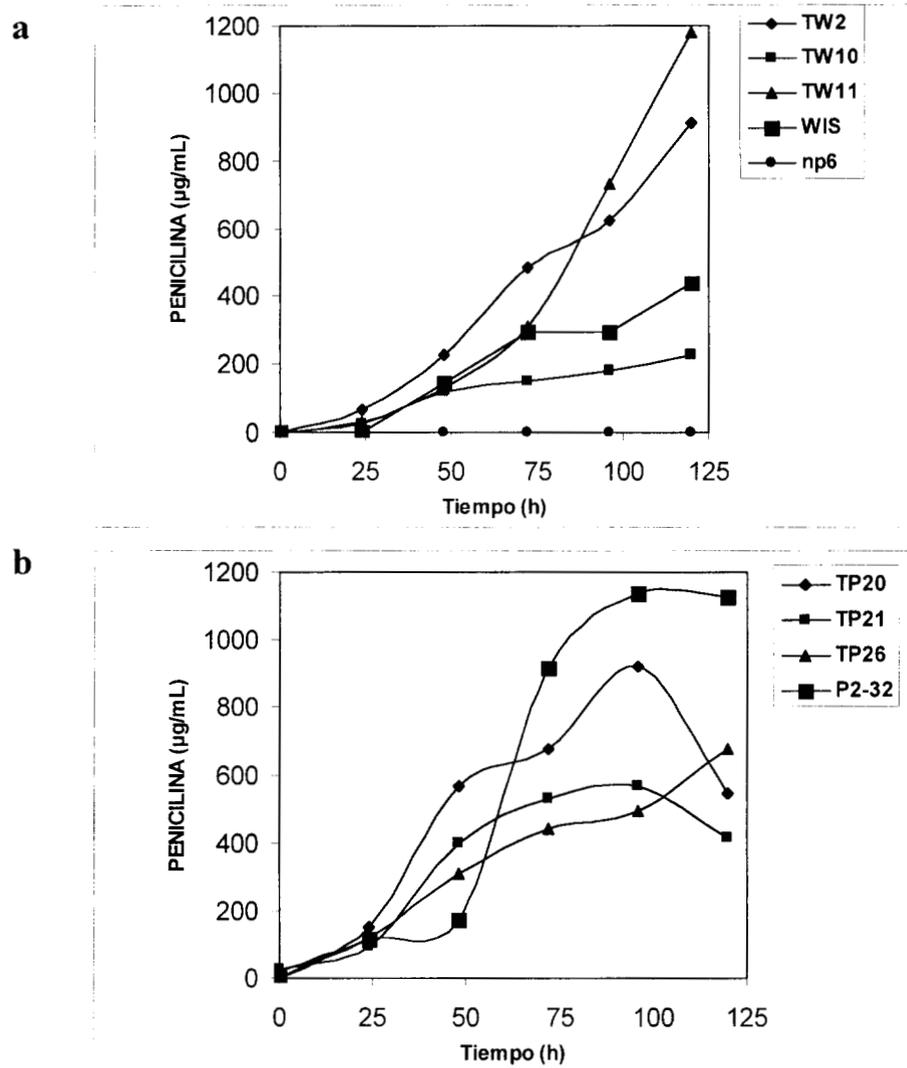
3.5. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

Después de llevar a cabo el proceso de selección de los transformantes idóneos para su análisis, se utilizaron para llevar a cabo los estudios de producción de penicilina en sistema de fermentación líquida, los transformantes ya mencionados anteriormente. También se utilizó como control la cepa mutante *npe6* que carece de la capacidad de producir penicilina [72, 3]. Se evaluaron los parámetros de producción de penicilina, producción específica y crecimiento micelial (como peso seco).

Las Gráficas 3.6a y 3.6b reflejan la cinética de producción de penicilina en FL llevada a cabo por los transformantes seleccionados y las cepas parentales Wisconsin 54-1255 y P2-32 respectivamente, a 25 °C y 250 r.p.m. en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de producción complejo, por triplicado.

En la Gráfica 3.6a se observa que el transformante TW11 alcanzó una producción de penicilina G mayor que los demás (TW2 y TW10) incluyendo a la cepa progenitora Wisconsin. La concentración de penicilina excretada al medio de producción líquido para el TW11 fue 3 veces mayor que la excretada por la parental. El clon TW10 fue el que obtuvo una producción menor de penicilina y el mutante *npe6* no sintetizó nada del antibiótico.

El pico de producción de penicilina se alcanzó alrededor de las 120 horas de fermentación para todas las colonias analizadas y esta empezó aproximadamente a las 25 horas, excepto para la cepa precursora que empieza a producir después de este tiempo.



Gráficas 3.6a y 3.6b. Cinética de producción de penicilina en FL por los transformantes y la parental de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). WIS y P2-32 representan las cepas parentales empleadas y np6 la cepa mutante.

En el mismo orden de ideas, la Gráfica 3.6b revela que la cepa parental P2-32 fue la de mayor producción que los recombinantes TP20, TP21 y TP26. En este sentido, el transformante TP21 obtuvo una menor concentración de penicilina liberada al medio de cultivo. Para todas las colonias, la máxima fabricación de penicilina se logró alrededor de las 100 horas de fermentación a excepción de la TP26 que la alcanzó aproximadamente a las 120 horas. Cabe agregar que la producción inició mucho antes de las 25 horas de cultivo.

Los resultados de la producción máxima promedio de penicilina en FL se observan de manera resumida y clara en las Tablas 3.6a y 3.6b.

a

PARENTAL	TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN MÁXIMA PENICILINA	
		($\mu\text{g}/\text{mL}$ +/- DE)	% INCREMENTO
	TW2	912.54 +/- 0.0	108.86
	TW10	225.82 +/- 39.0	-48.32
	TW11	1178.35 +/- 83.1	169.69
WISCONSIN		436.92 +/- 0.0	0.00

b

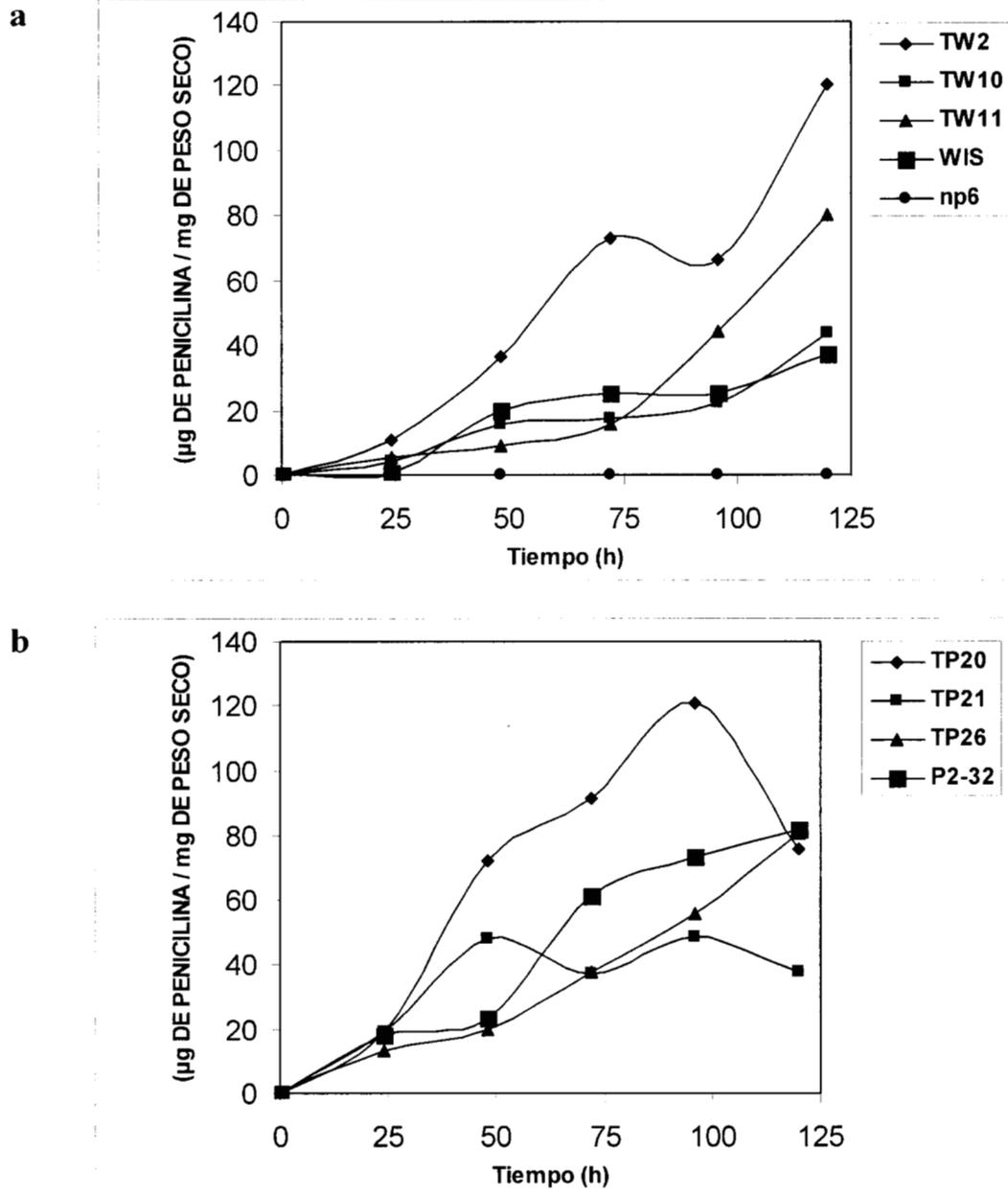
PARENTAL	TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN MÁXIMA PENICILINA	
		($\mu\text{g}/\text{mL}$ +/- DE)	% INCREMENTO
	TP20	920.13 +/- 171.6	-19.17
	TP21	567.41 +/- 10.7	-50.15
	TP26	678.43 +/- 128.7	-40.40
P2-32		1138.29 +/- 263.7	0.00

Tablas 3.6a y 3.6b. Valores de producción máxima de penicilina y % de incremento en la producción en FL de los transformantes procedentes de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. Se incubaron, por triplicado, a 25 °C, 250 r.p.m. durante 5 días, en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Somerson. DE significa la desviación estándar de la producción.

Según se indica en la Tabla 3.6a, el transformante TW11 logró una producción máxima de 1178 μg de penicilina G por mL de medio de cultivo, en relación con los 436 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la cepa sin transformar. Esto corresponde casi a un 170 % de incremento en la producción de penicilina en FL. También, la Tabla 3.6b manifiesta que la cepa P2-32 logró una producción máxima de penicilina de 1138 μg por mL de medio de fermentación líquida. Además, ningún transformante TP probado mostró porcentajes de aumento sustanciales.

3.5.1. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

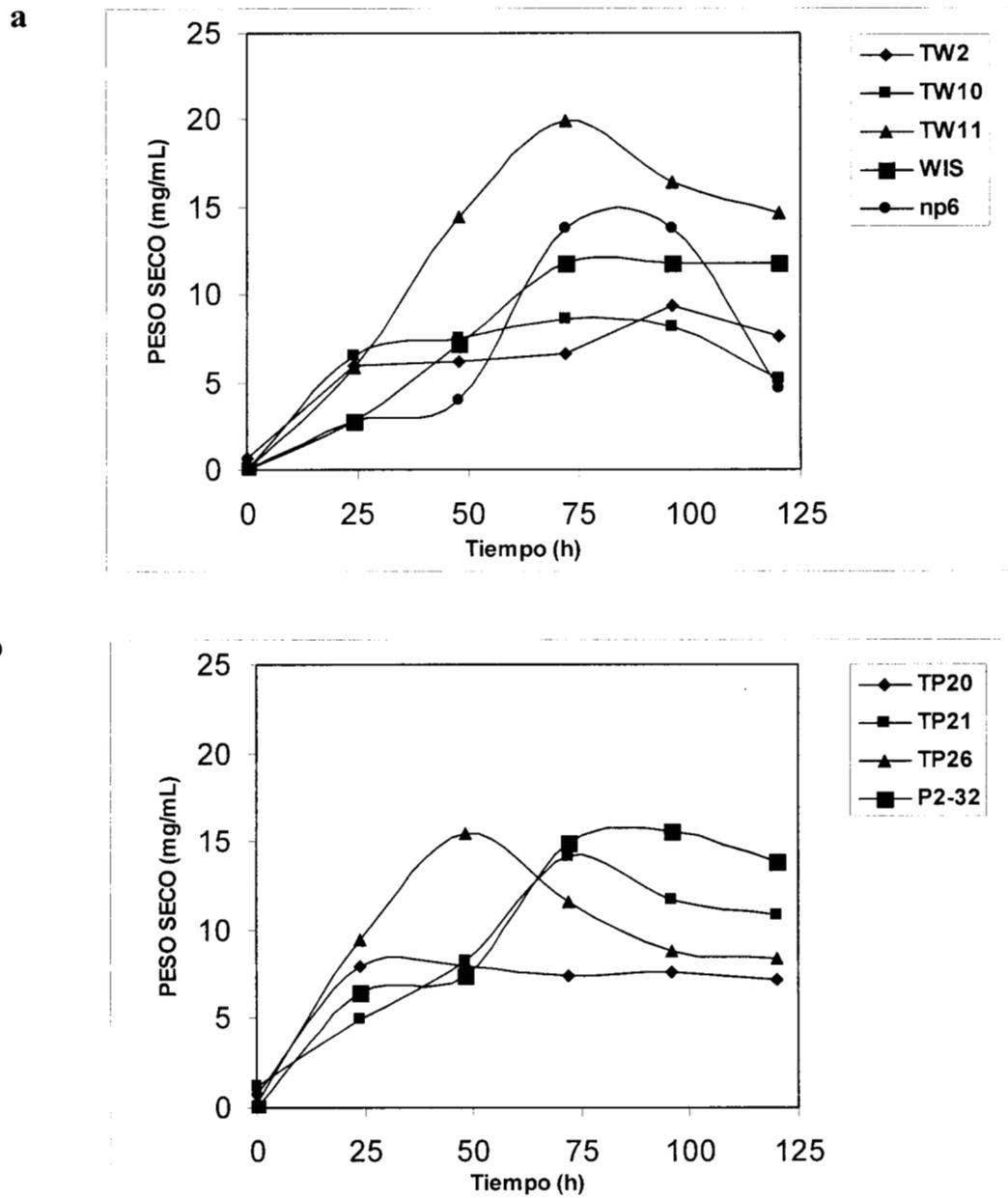
Se determinó la producción específica de penicilina por los transformantes y la cepa parental Wisconsin 54-1255 y P2-32 en la FL, para que la comparación entre dichos transformantes tenga validez absoluta. También se analizó la cepa mutante npe6 como control. Los resultados de las diferentes cinéticas de producción específica de penicilina se observan en las Gráficas 3.7a y 3.7b.



Gráficas 3.7a y 3.7b. Cinética de producción específica de penicilina por los transformantes y parental Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). La FL se llevo a cabo a 25 °C y 250 r.p.m. durante 5 días en matraces de 250 mL con medio Somerson, por triplicado. Los resultados se expresan como µg de penicilina producida sobre biomasa (calculada por peso seco).

3.5.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

Se determinó la biomasa generada por los transformantes y parental Wisconsin 54-1255 y P2-32 en la FL. Con la intención de determinar las características de crecimiento para cada uno de ellos y relacionarlo con la producción de penicilina en el mencionado sistema. Los resultados de las diferentes cinéticas de crecimiento de los transformantes y parentales se observan en las Gráficas 3.8a y 3.8b.



Gráficas 3.8a y 3.8b. Cinética de producción de biomasa de los transformantes y parental Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). La FL se llevó a cabo a 25 °C y 250 r.p.m. durante 5 días en matraces de 250 mL con medio Somerson, por triplicado. La producción de biomasa se expresa como peso seco sobre mililitros de medio.

Los resultados de la producción específica máxima promedio de penicilina en FL, se observan de manera resumida y ordenada en las Tablas 3.7a y 3.7b.

a

PARENTAL	TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN ESPECÍFICA MÁXIMA PENICILINA	
		($\mu\text{g}/\text{mg}$ +/- DE)	% INCREMENTO
	TW2	120.07 +/- 18.1	224.28
	TW10	43.43 +/- 11.1	17.28
	TW11	80.34 +/- 25.8	116.98
WISCONSIN		37.03 +/- 1.1	0.00

b

PARENTAL	TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN ESPECÍFICA MÁXIMA PENICILINA	
		($\mu\text{g}/\text{mg}$ +/- DE)	% INCREMENTO
	TP20	121.07 +/- 32.2	48.45
	TP21	48.50 +/- 9.3	-53.23
	TP26	80.77 +/- 14.5	-0.97
P2-32		81.55 +/- 9.8	0.00

Tablas 3.7a y 3.7b. Valores máximos de producción específica de penicilina y % de incremento en la producción específica en FL por los transformantes de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. Se incubaron, por triplicado, a 25 °C, 250 r.p.m. durante 5 días, en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Somerson. DE es la desviación estándar calculada para los valores de producción específica.

En este orden de ideas, la Gráfica 3.7a ilustra el perfil de producción específica de penicilina G por los transformantes TW, la cepa Wisconsin 54-1255 y el mutante *npe6*.

Todas las colonias consiguieron su mayor producción específica alrededor de las 120 horas de fermentación y empezaron dicho proceso antes de las 25 horas, excepto la parental que inició su producción específica casi después de este tiempo. Justamente, las colonias TW2 y TW11 fueron los transformantes que alcanzaron mayores producciones específicas que todas las demás, 3 y 2 veces superiores a la cepa Wisconsin 54-1255 (la de menor valor), respectivamente. Como era de esperarse, la mutante *npe6* no presentó perfil de producción específica, a pesar de haber crecido durante la fermentación líquida. Gráfica 3.8a.

Continuando con la Gráfica 3.7b, los transformantes TP20 y TP21 obtuvieron su punto máximo de producción específica en torno a las 100 horas de iniciada la fermentación, mientras tanto, la cepa P2-32 y el clon TP26 lo lograron a las 125 horas. Es claro que la colonia TP20 alcanzó producciones específicas 1.5 veces mayores que la cepa parental. Cabe señalar que el transformante TP21 presentó los valores más pequeños de producción específica.

Si se observa la cinética de producción de biomasa en la Gráfica 3.8a junto con las Gráficas 3.6a (de producción) y 3.7a (producción específica), se notara que los puntos donde aumenta la biomasa o disminuye la producción, se traducen en un descenso de la producción específica de penicilina, el efecto contrario también es válido. Dichas gráficas ilustran el comportamiento de los transformantes TW en la fermentación líquida. Si se analizan las gráficas de los transformantes TP, se advertirá el mismo efecto anteriormente descrito.

Sin embargo, cabe aclarar que el método de peso seco para cuantificar biomasa contempla tanto micelio viable como inviable. Este aspecto indudablemente introduciría cierto margen de error en los experimentos.

Continuando con los perfiles de crecimiento, la gráfica citada revela el nivel de biomasa generada en la FL (medida como miligramos de peso seco por mililitros de medio de cultivo). Dicho nivel osciló entre los 5 y 20 mg/mL, siendo el transformante TW11 el que más creció (20 mg/mL) y el TW2 el de menor crecimiento miceliar (5 mg/mL). De tal suerte, que todas las colonias alcanzaron su máximo crecimiento a las 75 horas aproximadamente. Excepto para el clon TW2, que lo hizo a las 100 horas de fermentación.

En cuanto a la Gráfica 3.8b, los clones TP y la parental P2-32 desarrollaron biomasa en un rango de 5 a 15 mg/mL (5 mg/mL menos que los anteriores). De este modo, el transformante TP26 alcanzó su punto máximo a las 50 horas, el TP20 a las 25 horas (permaneció casi constante hasta el final de la fermentación,) y la cepa P2-32 y el clon TP21, lograron llegar a su pico de crecimiento en torno de las 75 horas de cultivo.

En sí, todos los recombinantes y cepas receptoras iniciaron la producción de micelio antes de las 25 horas y la mayoría declinó al final de la fermentación. Estos periodos coinciden con los periodos de producción de penicilina.

Finalmente, el clon TW2 presentó producciones específicas máximas de 120 µg de penicilina por mg de micelio (como peso seco), seguido del TW11 con 80 µg/mg, en contraste con los 37 µg/mg de la cepa Wisconsin. Tabla 3.7a. Quiere decir que la colonia TW2 adquirió un porcentaje de incremento en la producción específica de penicilina G del orden de 224 % y la TW11 de 116 %.

Con respecto a los clones TP, sólo el TP20 generó un porcentaje de incremento del 48 % al haber conseguido una producción específica de 121 µg/mg en comparación con los 81 µg/mg de la cepa P2-32. Tabla 3.7b.

3.6. PRODUCCIÓN DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Los transformantes TW10 y TW11 derivados de la cepa Wisconsin 54-1255, y los TP20 y TP26 procedentes de la P2-32 fueron los que se utilizaron para llevar a cabo los estudios comparativos de FS. En este caso no se utilizaron los transformantes TW2, TP20 y la cepa mutante npe6, por lo anteriormente mencionado.

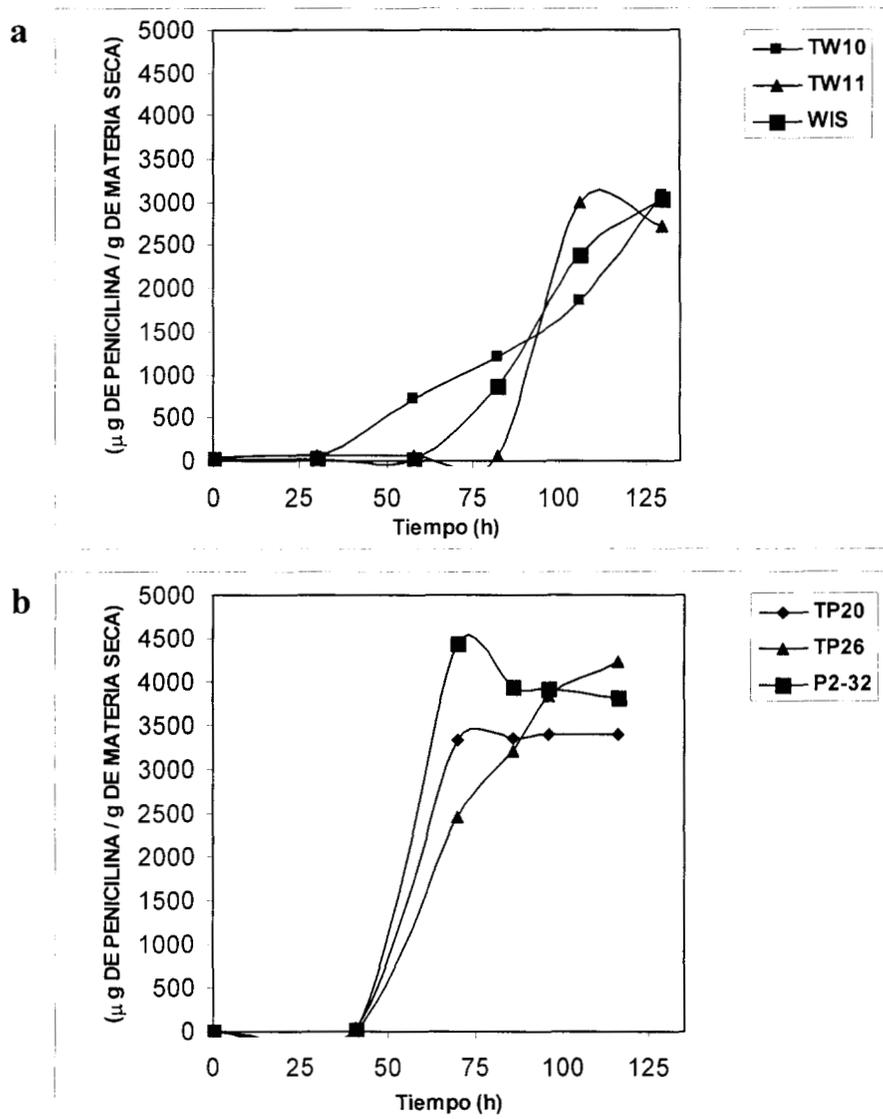
Se evaluaron los parámetros de producción de penicilina, producción específica y crecimiento miceliar (como peso seco). Además se midieron valores de pH y humedad del medio de cultivo (resultados no mostrados).

Las Gráficas 3.9a y 3.9b señalan la cinética de producción de penicilina en FS llevada a cabo por los transformantes seleccionados y las cepas parentales Wisconsin 54-1255 y P2-32 respectivamente, a 25 °C y con un flujo de aire de 2.4 L/h en columnas empacadas con bagazo de caña tamizado y pretratado, impregnado con medio Somerson modificado, durante 130 horas, por duplicado.

La Gráfica 3.9a muestra la cinética de producción de penicilina por los transformantes TW10 y TW11 y la cepa parental en FS, expresada como microgramos de penicilina sintetizada sobre gramos de materia seca de medio sólido. Se observa que las colonias TW10, Wisconsin y TW11 iniciaron la producción después de las 25, 50 y 75 horas, respectivamente, de arrancada la fermentación. Asimismo, el clon TW11 alcanzó su pico en la producción a las 100 horas aproximadamente y el TW10 y la parental poco después de las 125 horas de fermentación.

Los títulos máximos de antibiótico sintetizado por tales colonias fúngicas, a nivel laboratorio, alcanzaron, alrededor, los 3000 µg de penicilina/g de materia seca. Como se indica en la Tabla 3.8a. En ella, se puede apreciar que en ningún caso los transformantes TW10 y TW11 adjudicaron porcentajes de incremento sustanciales en la producción de penicilina G en FS, con respecto a la cepa precursora.

Referente a los transformantes TP y la parental, la Gráfica 3.9b indica como todas las colonias analizadas iniciaron la producción poco antes de las 50 horas de cultivo, para dar un repunte importante, el clon TP20 y la cepa P2-32, y llegar a la máxima producción de penicilina cerca de las 75 horas, y el clon TP26 alrededor de las 120 horas de iniciado el proceso. Es claro, como se advierte en la Tabla 3.8b, que ni el transformante TP20 (con una producción de 3390 μg de penicilina/g de materia seca) y el TP26 (4230 $\mu\text{g}/\text{g}$) lograron incrementos en la producción con relación a la cepa progenitora (4440 $\mu\text{g}/\text{g}$).



Gráficas 3.9a y 3.9b. Cinética de producción de penicilina en FS por los transformantes y la parental de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32(b). La producción de penicilina en FS se expresa como microgramos de penicilina producida sobre gramos de materia seca.

Los resultados de la producción máxima promedio de penicilina en FS, se observan de manera resumida y clara en las Tablas 3.8a y 3.8b.

a

PARENTAL TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN MÁXIMA PENICILINA	
	($\mu\text{g/g}$ +/- DE)	% INCREMENTO
TW10	3074.14 +/- 0.0	0.87
TW11	2990.85 +/- 0.0	-1.87
WISCONSIN	3047.76 +/- 0.0	0.00

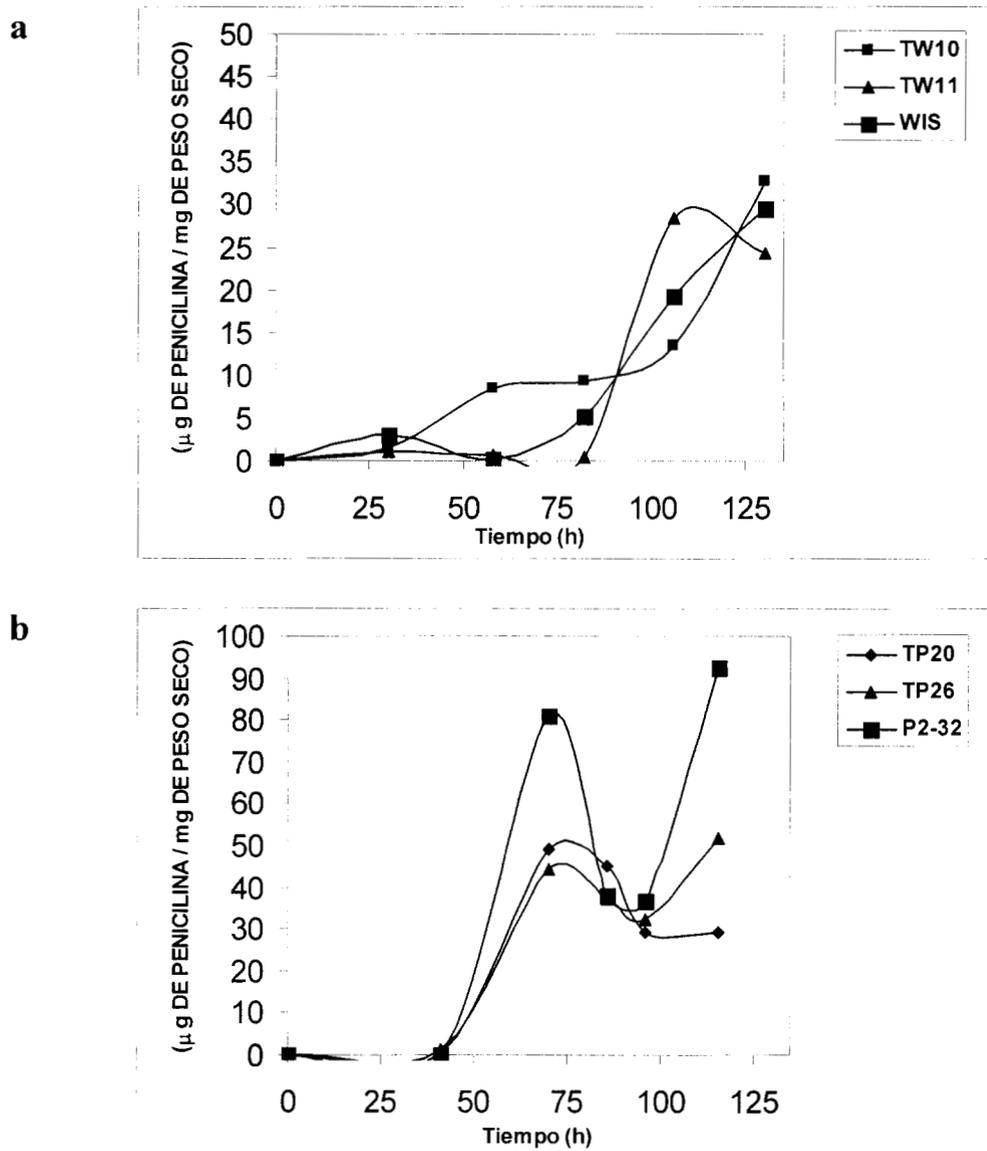
b

PARENTAL TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN MÁXIMA PENICILINA	
	($\mu\text{g/g}$ +/- DE)	% INCREMENTO
TP20	3390.17 +/- 0.0	-23.74
TP26	4233.46 +/- 599.7	-4.78
P2-32	4445.78 +/- 1191.4	0.00

Tablas 3.8a y 3.8b. Valores de producción máxima de penicilina (expresados como μg de penicilina por g de materia seca) y % de incremento en la producción en FS por los transformantes y la cepa parental de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. Se empacaron columnas, por duplicado con bagazo de caña pretratado, impregnado con medio Somerson modificado inoculado con los microorganismos, e incubado a 25 °C, con 2.4 L/h de flujo de aire, durante 130 h. La clave DE significa la desviación estándar de las mediciones.

3.6.1. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE PENICILINA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

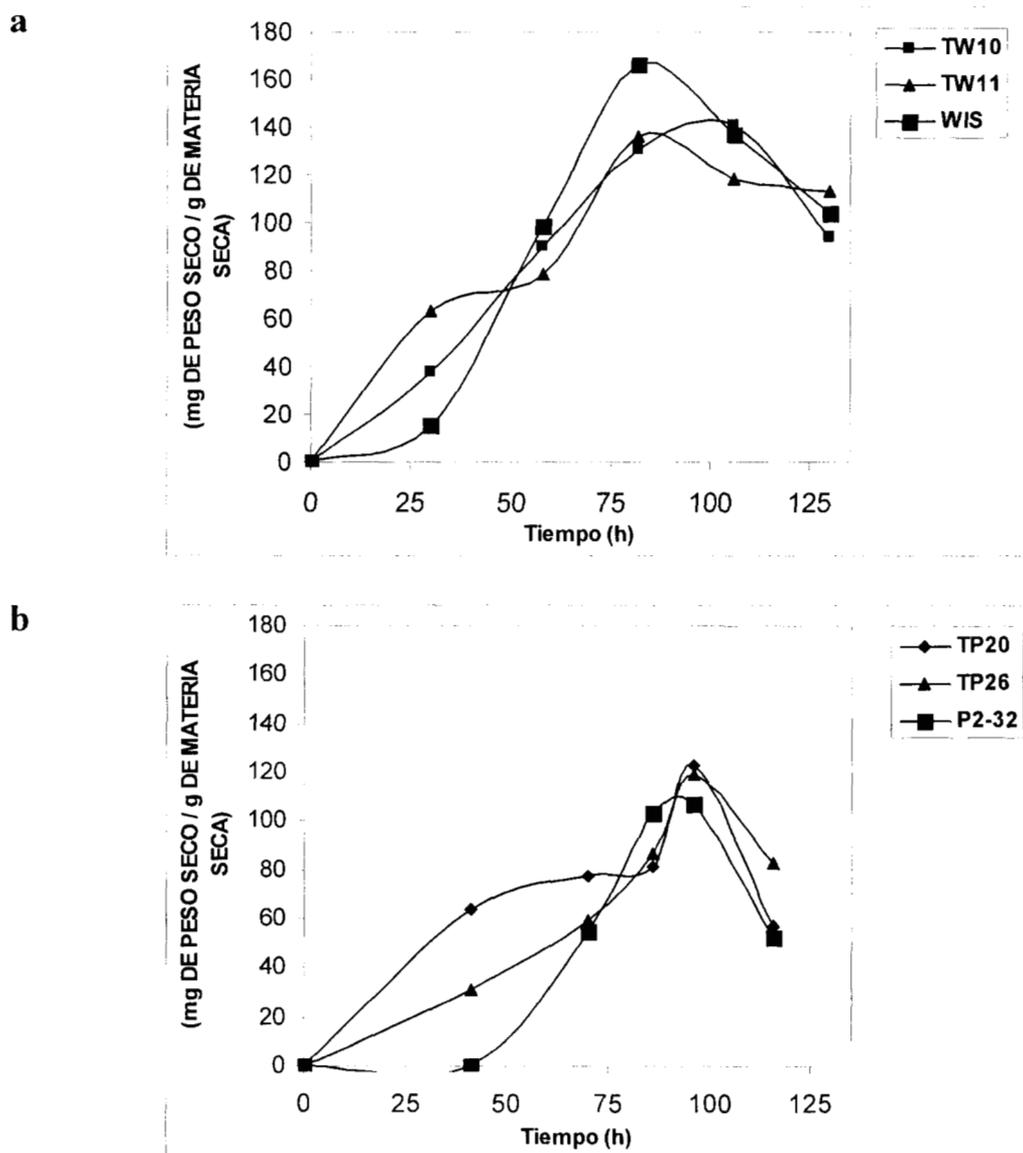
Se determinó la producción específica de penicilina por los transformantes y parentales Wisconsin 54-1255 y P2-32 en la FS. Para que la comparación de dichos transformantes tenga validez absoluta. Los resultados de las diferentes cinéticas de producción específica de penicilina en FS se observan en las Gráficas 3.10a y 3.10b.



Gráficas 3.10a y 3.10b. Cinética de producción específica de penicilina en FS por los transformantes y cepa parental de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). La FS se llevo a cabo en columnas empacadas con bagazo de caña pretratado y embebido con medio Somerson modificado a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire durante 130 h, por duplicado. Los resultados se expresan como µg de penicilina producida sobre mg de peso seco (como biomasa).

3.6.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Se determinó la biomasa generada por los transformantes y parentales Wisconsin 54-1255 y P2-32 en la FS. Con la intención de determinar las características de crecimiento para cada uno de ellos y relacionarlo con la producción de penicilina en el mencionado sistema. Los resultados de las diferentes cinéticas de crecimiento de los transformantes y parentales se observan en las Gráficas 3.11a y 3.11b.



Gráficas 3.11a y 3.11b. Cinética de producción de biomasa por los transformantes y parental Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b). La FS se llevó a cabo a 25 °C y 2.4 L/h de flujo de aire, durante 130 h en columnas empacadas con bagazo pretratado impregnado en medio Somerson modificado, por duplicado. La producción de biomasa se expresa como miligramos de peso seco sobre gramos de materia seca.

Los resultados de la producción específica máxima promedio de penicilina en FS, se observan de manera resumida y ordenada en las Tablas 3.9a y 3.9b.

a

PARENTAL TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN ESPECÍFICA MÁXIMA PENICILINA	
	($\mu\text{g}/\text{mg}$ +/- DE)	% INCREMENTO
TW10	32.77 +/- 0.0	11.71
TW11	28.35 +/- 13.4	-3.34
WISCONSIN	29.33 +/- 2.1	0.00

b

PARENTAL TRANSFORMANTES	PRODUCCIÓN ESPECÍFICA MÁXIMA PENICILINA	
	($\mu\text{g}/\text{mg}$ +/- DE)	% INCREMENTO
TP20	49.28 +/- 24.7	-46.59
TP26	51.81 +/- 5.7	-43.85
P2-32	92.27 +/- 55.4	0.00

Tablas 3.9a y 3.9b. Valores máximos de producción específica de penicilina y % de incremento en la producción específica en FS por transformantes y parental de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (a) y P2-32 (b) seleccionados. Se empacaron por duplicado columnas con bagazo de caña impregnado en medio modificado Somerson a 25 °C, con un flujo de aire de 2.4 L/h durante 130 h. La producción específica de penicilina se expresa como μg de penicilina producida por mg de peso seco. DE representa la desviación estándar de las mediciones de producción específica.

La producción específica de penicilina en FS mostró un panorama no muy distinto al detallado anteriormente. En la Gráfica 3.10a se puede distinguir el perfil de producción específica de los transformantes TW10 y TW11 y la cepa sin transformar. La cual inicia poco después de las 25, 75 y 50 horas, respectivamente, de puesta en marcha la fermentación, para dar por finalizada más allá de las 125 horas, donde las colonias TW10 y Wisconsin alcanzaron su punto máximo de producción específica a excepción de la TW11 que lo logró alrededor de las 100 horas.

Como ya se explicó en el previo apartado, la producción específica esta relacionada con el crecimiento micelial y la elaboración de penicilina. En este orden de ideas (ver Gráfica 3.11a), el periodo de crecimiento intenso de las colonias fúngicas mencionadas (mucho antes de las 25 hasta pasadas las 75 horas), intervalo donde se presentó una producción de biomasa máxima entre 130 y 170 mg de peso seco por g de materia seca; seguido del declive de la misma (de las 75 horas en adelante). Todo esto en combinación con el inicio de la producción de penicilina (posterior a las 75 horas) coinciden muy bien con el desarrollo de producción específica antes analizado .

Peculiar es el comportamiento de la producción específica en FS por los transformantes TP y la parental, con dos puntos máximos en el perfil (Gráfica 3.10b). Pero si se analiza, para cada colonia, el primer punto máximo de producción específica, poco antes de las 75 horas, se ajusta correctamente al pico de producción de penicilina en el mismo periodo de tiempo. Además, el segundo pico de producción específica posterior a una caída, corresponden muy bien al descenso (50-80 mg/g) y al punto máximo de crecimiento micelial (110 a 130 mg/g), respectivamente. Ver Gráfica 3.11b.

Por consiguiente, los transformantes TW y la cepa Wisconsin presentaron producciones específicas máximas en torno a los 30 μ g de penicilina G por mg de materia seca; y los TP y la cepa P2-32 expusieron valores entre 50 y 90 μ g de penicilina/mg. Tablas 3.9a y 3.9b. Lo anterior se traduciría en porcentajes de incremento nulos para todas las colonias, excepto para la TW10 que logró un leve incremento del 11 % en relación con la parental.

3.7. ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT PARA LA COMPROBACIÓN DE COPIAS INTEGRADAS.

Análisis de hibridación de ADN genómico digerido con la endonucleasa *SaII*, aislado de los transformantes TW y TP y de las cepas Wisconsin 54-1255 y P2-32 de *Penicillium chrysogenum*, así como de la mutante npe6 después de crecidos en medio no selectivo, revelaron la presencia de secuencias de ADN homólogas al plásmido pUAMJC1. Ver Figura 3.13.

El fragmento de ADN de 5.1 kpb del pUAMJC1 se usó como una sonda de hibridación para el ADN total de los transformantes y parentales. De igual forma, muestras de ADN del mismo plásmido digeridas con la enzima *SaII* y sin digerir se emplearon además como un control positivo en los experimentos de hibridación.

En este sentido, la altura de la señal de bandas de los diferentes ADN hibridados en la membrana (Figura 3.13, lado derecho), correspondería a la distancia de un tamaño de 5.1 kpb donde migraría el fragmento de ADN que porta los dos genes de interés. Todo hace sugerir que la integración del plásmido en el genoma de los hongos probados fue un evento homólogo. De lo contrario, si el patrón de bandas se hubiera presentado a diferentes alturas de la membrana, la integración probablemente hubiera sido heteróloga.

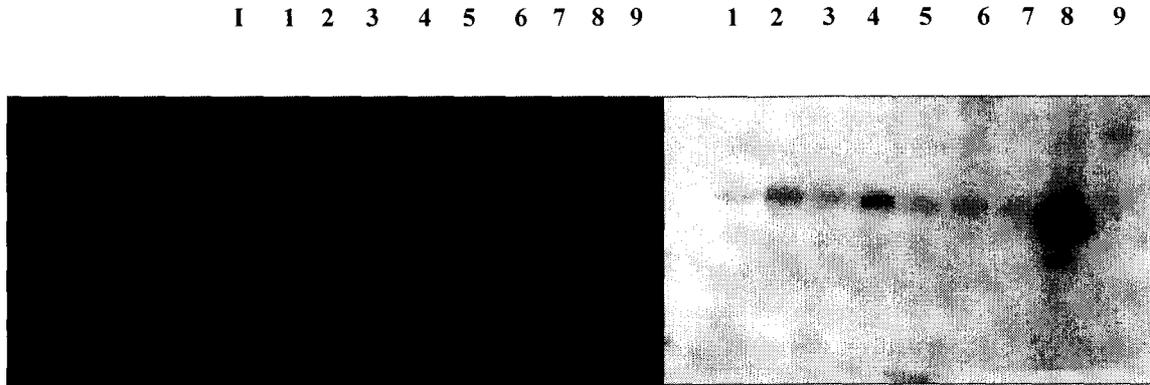


Figura 3.13. Análisis de hibridación de Southern de ADN de transformantes y parentales *P. chrysogenum* (derecha). ADN genómico de los transformantes TW10 (carril 1), TW11 (2), cepa parental Wisconsin 54-1255 (3), TP20 (4), TP26 (5), parental P2-32 (6), mutante *npe6* (7), y del plásmido pUAMJC1 como control positivo (carriles 8 digerido, y 9 sin digerir), digeridos con la enzima *SalI*, transferidos a una membrana de nylon e hibridados homológamente con el fragmento *SalI* de 5.1 kpb del pUAMJC1. que contiene a los genes *pcbC* y *penDE*. Comigración de ADN genómico de transformantes y parentales *P. chrysogenum* en un análisis electroforético (izquierda). ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa *PstI* utilizado como marcador de tamaño (carril 1), ADN de los transformantes TW10 (carril 1), TW11 (2), cepa parental Wisconsin 54-1255 (3), TP20 (4), TP26 (5), parental P2-32 (6), mutante *npe6* (7), y del plásmido pUAMJC1 (8, digerido y 9 sin digerir), digeridos con la enzima *SalI* migrados en un gel de agarosa.

Como ya se mencionó en el apartado correspondiente, el plásmido pUAMJC1 construido se utilizó como el vector de clonación para la obtención de transformantes fúngicos que han integrado copias extras de los genes *pcbC* y *penDE*.

La cantidad de ADN genómico de las distintas colonias fúngicas analizadas se estimó preliminarmente en base a la intensidad de la banda que migró en un gel de agarosa y dio forma a un barrido homogéneo observado a lo largo del gel. Ver Figura 3.13 (lado izquierdo). En ella se alcanzó a apreciar la forma uniforme de intensidad entre las diferentes bandas migradas en el gel, de las muestras de ADN ensayadas.

Esto es particularmente importante, por el hecho de que se plantea que cualquier diferencia presente en la intensidad de las bandas generadas en los estudios de hibridación se deberá al número de copias del plásmido integradas en el ADN de los transformantes.

Tal evento deseado estaría propiciando una amplificación conjunta en la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* de *Penicillium chrysogenum* que podría detectarse por la diferencia entre la intensidad de las bandas formadas por los transformantes en comparación con las bandas generadas por las parentales *Penicillium chrysogenum*

En este orden de ideas, en la Figura 3.13 se puede advertir en el carril 2 y 4 que la intensidad de las bandas de hibridación para el ADN de los clones TW11 y TP20, sugieren ser mayores que las mostradas en los carriles 3 y 6 para el ADN de las cepas Wisconsin y P2-32. La banda del carril 4 fue la que resultó ser más intensa que todas las demás, a excepción, obviamente de la banda generada por el plásmido control (carril 8).

La diferencia de intensidades, entre los transformantes TW11 y TP20 y sus parentales correspondientes, traducida como una integración de nuevas copias de los genes para la vía biosintética de la penicilina G, corresponde al nivel de mejoramiento alcanzado en la producción del antibiótico por estas colonias en relación con las cepas progenitoras.

Es favorable realizar a futuro una determinación más cuantitativa de las muestras de ADN genómico. Tal situación se puede lograr por medio del uso de un densitometro, además de utilizar la técnica de Dot Blot, y emplear diferentes diluciones de ADN que pueden cuantificarse por medio de espectrofotometría.

En este sentido, también se puede emplear una sonda que no corresponda al fragmento de 5.1 kbp (libre de secuencias homólogas al ADN del hongo recipiente). Esto con la intención de eliminar la posibilidad de que hibride en el mismo sitio del genoma donde estarían localizados los genes estructurales internos para la biosíntesis de la penicilina característicos de todas las cepas fúngicas productoras de penicilinas. Esta sonda sólo sería capaz de hibridar en las regiones homólogas del plásmido integrado al genoma receptor. La aparición de una o más señales en un posterior análisis de hibridación, estaría indicando la presencia en el genoma del transformante de una o más copias extras de los genes estudiados (experimentos en curso).

El ADN de los transformantes y parentales ensayados pueden, también, ser digeridos antes del proceso de la transferencia con una enzima de restricción diferente a la *SalI*, esto con el propósito de obtener fragmentos de ADN genómico de tamaños distintos a la sonda utilizada (fragmento de 5.1 kpb), pero con algunas regiones internas homologas a ella, situación que favorecería un número de eventos de hibridaciones en función del número de copias del plásmido integradas en el genoma y el número de cortes internos a los genes *pcbC* y *penDE*. Tales hibridaciones aparecerían como bandas sobre la membrana de nylon después del proceso de hibridación, lo que indicaría un aumento en la dosis de los genes estudiados de la vía de la penicilina.

A pesar de que se observa una banda de hibridación en el carril 7 de la Figura 3.13 (lado derecho) que correspondería al ADN de la cepa mutante *npe6*, lo cual indicaría que si porta al menos los dos últimos genes de la vía biosintética de la penicilina, esta colonia no puede sintetizar el antibiótico por que no es capaz de segregar la enzima Isopenicilina N aciltransferasa en forma activa.

4. DISCUSIÓN.

4.1. CONSTRUCCIÓN Y COMPROBACIÓN DEL PLÁSMIDO pUAMJC1.

Una de las estrategias de mejora en la producción de penicilina que se ha intentado, lo ha constituido el aumento en la dosis de los genes responsables de la vía biosintética del antibiótico [5]. Para lograr tal objetivo se ha tenido que construir vectores de expresión capaces de transformar a los microorganismos productores[93]. En nuestro trabajo, la obtención de transformantes de *Penicillium chrysogenum* derivados de cepas de alta y baja producción de penicilina se consiguió con el vector de clonación construido para probar el efecto de introducir una o más copias extras de los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* en dichas cepas recipientes.

En la construcción de este plásmido bifuncional fueron incluidas, lógicamente, secuencias de ADN que permitieron la transformación de *E. coli*: el origen *colE1* de la replicación de ADN y el gen *Cm* para la cloranfenicol acetiltransferasa, con el fin de permitirnos la amplificación del vector en *E. coli* y así tener cantidades suficientes de ADN plasmídico.

El gen *Cm* se utiliza como un marcador de selección en bacterias, codifica para una proteína diferente a las beta-lactamasas y confiere resistencia a las bacterias al cloranfenicol. Se utilizó el gen *Cm*, en lugar del habitual *Ap* porque éste codifica para una beta-lactamasa, enzima cuya hipotética expresión podría interferir de modo negativo en la valoración de la producción de penicilina por parte de los transformantes fúngicos generados.

Aparte de las secuencias funcionales en bacterias, en nuestro vector también se incluyó un módulo para resistencia al antibiótico fleomicina. Este módulo contiene al gen *ble*, aislado de *Streptoalloteichus hindustanus*, que esta bajo el control del promotor del gen *pcbC* (gen para la isopenicilina N sintasa de *P. chrysogenum*), además presenta un elemento terminador de la transcripción (*Tcyc1*) de levadura. Los componentes de este módulo aseguran una correcta expresión del gen de resistencia a fleomicina en sistemas fúngicos [94].

El módulo para la resistencia a fleomicina proporciona un marcador de selección compatible para la transformación de *P. chrysogenum*. Este sistema permite seleccionar aquellos transformantes capaces de resistir concentraciones letales de fleomicina que normalmente la cepa parental sería incapaz de tolerar. Tal propiedad es ventajosa en relación con los marcadores de complementación ya que evita la necesidad de generar auxótrofos [95], con el consiguiente riesgo de introducir mutaciones adicionales en genes de producción. Además, el módulo se ha utilizado exitosamente por que se integra de forma estable y eficiente al ADN genómico de la cepa transformada [94].

Todos los elementos mencionados hasta el momento derivan del plásmido pC43.

Un fragmento de ADN de 5.1 kpb, flanqueado por secuencias para reconocimiento de la enzima *SaII*, fue obtenido del plásmido pJL33. Este fragmento contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*, y se ligó dentro del único sitio para la enzima *SaII* del pC43, lo cual permitió crear el vector de expresión nombrado pUAMJC1.

El nuevo plásmido se utilizó para integrarlo en el genoma del hongo, por lo que los transformantes tendrían estabilidad mitótica y las copias integradas se replicarían junto con el ADN genómico del microorganismo transformado. La integración al genoma del microorganismo es una característica deseable para cualquier cepa mejorada de aplicación industrial, debido a que el plásmido se mantendría estable y con ello las propiedades que le confiere al transformante, esto es, no presentaría en las sucesivas generaciones el fenómeno muy acusado de degeneración [96].

4.2. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES MEJORADOS.

Un prerrequisito en cuanto a la capacidad de transformación de algún organismo es la disponibilidad de un buen sistema de selección, que pueda discriminar entre células transformadas y no transformadas. Varios sistemas de transformación han sido descritos en *P. chrysogenum* para llevar a cabo el proceso de selección; estos sistemas utilizan: complementación de una mutación auxotrófica [95]; marcadores de selección como la resistencia a oligomicina [97] o fleomicina [94] o crecimiento sobre acetamida, usando el gen *amdS* de *A. nidulans* [98].

Para la aplicación en cepas industriales, los sistemas de selección por resistencia a algún antibiótico aventajan al uso de marcadores auxotróficos. Estos últimos requieren de aislar al mutante correspondiente, un procedimiento que puede ser laborioso y consumir mucho tiempo. Además se ha reportado que las mutaciones auxotróficas influyen en la producción de penicilina [99]. En contraposición, cabe señalar que la utilización de la complementación de una auxotrofia proporciona mejores eficiencias de transformación. En nuestro trabajo se empleó para los transformantes de *P. chrysogenum* el sistema de selección por resistencia a fleomicina, usando al gen aislado de *Streptoalloteichus hindustanus* bajo el control del promotor del gen *pcbC*.

La transformación con selección por resistencia a fleomicina requiere un estudio inicial para determinar el nivel basal de resistencia a fleomicina de la cepa hospedera. Durante el curso de estos estudios previos se observó que las cepas de *P. chrysogenum* de mayor desarrollo para la producción de penicilina fueron menos sensibles a la fleomicina que las cepas de menor desarrollo. Al parecer la cepa P2-32 fue ligeramente más resistente a la fleomicina que la cepa Wisconsin 54-1255, mucho menos evolucionada. Este resultado podría deducirse del menor tamaño de colonia originado por la cepa Wisconsin en comparación con el tamaño de colonia producido por la P2-32 en presencia de fleomicina. Sin embargo, se puede conseguir inhibir el crecimiento en ambas utilizando las concentraciones adecuadas (30 µg/mL de fleomicina).

En nuestros experimentos se observó, asimismo, que el sistema de transformación utilizado resultó ser el doble de efectivo para la cepa de alta producción (28 transformantes fueron recuperados del medio) que para la cepa de baja producción (se lograron 13 clones resistentes).

Tras el proceso de transformación se puso en práctica un sistema de preselección de las colonias transformadas, como paso previo a la evaluación de su producción. Un primer criterio de selección fue el grado de resistencia a la fleomicina obtenido por los transformantes.

Los niveles de resistencia a la fleomicina están directamente relacionados con el nivel de expresión del gen *ble*. La expresión de este gen viene determinada tanto por la fuerza del promotor (*PpcbC*) como por el número de copias del gen *ble* integradas en el genoma del transformante. En nuestro caso, todos los clones se originaron empleando el mismo plásmido, esto es, el promotor utilizado para expresar el gen de resistencia a fleomicina fue siempre el mismo. Por lo tanto, el grado de resistencia a fleomicina de los transformantes está definido exclusivamente por el aumento en el número de copias integradas del plásmido (lo que a su vez conlleva un incremento directo en la dosis de los genes de interés contenidos en él).

En este sentido, las copias del plásmido integradas en el ADN de los transformantes estarían propiciando una amplificación conjunta en la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*. Evento que se corroboró de forma preliminar en un análisis de hibridación (en función de la diferencia de intensidades entre las bandas formadas por los transformantes y las bandas generadas por las parentales *P. chrysogenum*).

Con el propósito de preseleccionar los mejores transformantes obtenidos de ambas cepas, se sembraron en medios frescos con concentraciones crecientes de fleomicina. Con esta premisa, se esperaba que los transformantes de mayor resistencia exhibirían aumentos en la producción de penicilina.

Los resultados de este estudio revelaron que el 50 % de los transformantes derivados de la cepa Wisconsin 54-1255 (designados con las iniciales TW) presentaron resistencias a la fleomicina de 40 a 60 µg/mL. Mientras que los originados de la cepa P2-32 (referidos con la clave TP), 30 % de los transformantes adquirieron resistencias mayores, esto es, 8-9 clones crecieron a concentraciones de 50 a 80 µg/mL.

La diferencia observada en nuestros resultados, tanto en el número de transformantes obtenidos como en la mayor resistencia a fleomicina (tanto en transformantes de la cepa de baja producción como en la de alta), se explicaría porque la cepa de alta producción ha sido objeto de un programa de mejoramiento basado en mutagénesis al azar, situación que pudiera haber propiciado el cambio de ciertos elementos genéticos que favoreciera tal comportamiento. Por su parte, la cepa de baja producción, que no ha sufrido grandes cambios en su genoma, conserva características propias de la cepa silvestre.

En este orden de ideas, el diámetro promedio de crecimiento de los clones derivados de Wisconsin 54-1255 fue ligeramente mayor que el de los clones de P2-32. Aunado a esto, la morfología, color y tiempo de esporulación de las células transformadas cambió en cierto grado con relación a las parentales, el cambio fue más marcado para los transformantes de la P2-32. Todo esto concuerda con lo mencionado arriba: la cepa Wisconsin 54-1255 presenta características más cercanas a la cepa natural.

Sin embargo, no necesariamente un transformante de mayor resistencia presentará mejoras en la producción de penicilina llevada a cabo a nivel laboratorio, pudiera ser que tales clones vieran disminuida su capacidad productora en relación con la cepa parental. Por tal motivo se establecieron los métodos de valoración de los transformantes resistentes obtenidos de ambas cepas en cuanto a su capacidad de secreción de penicilina G al medio, primeramente en bioensayos por cobertera y después en cilindros de agar. Los clones preseleccionados serán los únicos utilizados posteriormente en la evaluación de la capacidad productora de penicilina, tanto en sistemas de fermentación líquida como en sólida. Estos criterios van encaminados a eliminar la necesidad de probar en tales sistemas la gran cantidad de transformantes obtenidos tras el proceso de transformación.

El método de bioensayo por cobertera es un procedimiento semicuantitativo que permite determinar de una manera rápida y sencilla la capacidad elaboradora de penicilina en microorganismos productores (permite también, por lo tanto excluir a los no productores). Se basa en la aparición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano, estando el diámetro de tales zonas directamente relacionado con el grado de producción de penicilina fúngica.

Basándose en los resultados, los transformantes derivados de P2-32 generaron en promedio zonas de inhibición mayores (34 mm) que los derivados de Wisconsin (20 mm), además fueron más resistentes a la fleomicina (20 a 40 µg/mL más de concentración). Asimismo, se apreció una correlación directa entre el tamaño de halo y el grado de resistencia adquirida a fleomicina, correlación más definida para los transformantes TW. El porcentaje promedio de aumento en comparación a la cepa sin transformar de la producción de penicilina G en medio sólido por cobertera, llevada a cabo por los transformantes TW fue de 80 a 100 % y, de 25 a 29 % para los clones TP. El porcentaje de aumento en la secreción de penicilina G para las células TW fue tres veces mayor que para las células TP.

Por consiguiente, el método de cobertera aplicado para la selección preliminar de transformantes mejorados fue un sistema válido que se puso a punto, tiene un grado aceptable de fiabilidad, la variabilidad de los valores es pequeña y es un ensayo repetitivo (cuando se compararon los resultados de FL, se observó que los dos mejores productores TW en FL también lo fueron sobre cobertera).

Por otro lado, el ensayo por el método de cilindros de agar es una técnica cuantitativa y es útil para determinar la producción de penicilina, observada también por los halos de inhibición del crecimiento bacteriano presentes en el medio.

En nuestro laboratorio se ha utilizado esta técnica para seleccionar mutantes (mejorados en cuanto a producción de penicilina) y probarlos en FS y FL con buenos resultados. No obstante, se presentó gran variabilidad de los valores de producción en los distintos transformantes y la diferencia entre el mejor y el peor productor de penicilina fue de un orden de 1000 veces mayor en los TW y 70 en los TP. Aunque, los dos transformantes que exhibieron mejoras en la producción en FL también fueron mejores sobre cilindros de agar.

De los resultados, 30 % de los transformantes TW y 25 % de los TP, analizados con esta técnica, exhibieron incrementos notables en la producción de penicilina con relación al microorganismo progenitor sin que fueran los que presentaron mayor resistencia a la fleomicina. Esto es, tales transformantes (sobre todo los TW) adquirieron mejor capacidad productora asociada a una menor resistencia a la fleomicina. De igual manera, 25 % de las colonias transformadas TW y 15 % de las TP de baja resistencia a la fleomicina (inclusive 30 % de alta) presentaron producciones de penicilina G sustancialmente menores a la cepa parental y por lo tanto porcentajes de incremento nulos. No necesariamente las células transformadas que producen menos penicilina son las de menor resistencia, algunas de ellas son de alta resistencia a la fleomicina.

Tal grado de variabilidad en la producción de penicilina G entre los diferentes transformantes se puede explicar por la incorporación del plásmido en diferentes localizaciones cromosómicas o por la integración de un número de copias distintas [5].

A pesar de estas desviaciones, 45 % de los transformantes TW y 30 % de los TP exhibieron una relación directamente proporcional entre la resistencia a la fleomicina y la cantidad de penicilina producida. A medida que la resistencia a fleomicina aumentó, la producción de penicilina fue mayor.

Sobre la base de los resultados, 40 % de los transformantes TW alcanzaron producciones de penicilina G sobre cilindros entre 9 a 14 veces mayores que la cepa parental. Y 25 % de los transformantes TP, lograron producciones entre 3 a 4 veces mayores a la cepa precursora. (es decir, el porcentaje de incremento en la producción de penicilina G en cilindros de agar de 4 de los mejores transformantes de cada cepa progenitora (que integraron los dos genes estudiados) fue sustancialmente mayor: 770-1300 % para los clones TW y 230-290 % para los TP en relación con las cepas sin transformar). Si bien, cabe aclarar que en todo momento las células transformadas TP producen poco más de 10 veces penicilina que los clones TW. Esto es claro si se tiene en cuenta que los clones TP derivan de una cepa de alta producción.

En términos generales, el proceso de generación de transformantes fue más eficiente para la cepa P2-32. Y la obtención de transformantes con porcentajes de incremento altos en la producción de penicilina fue más eficaz para la cepa Wisconsin 54-1255, lo que se explica porque derivan de una cepa con menor desarrollo industrial, por lo que se esperaría que presentara mayor capacidad de incrementar la dosis de los genes de la ruta de biosíntesis de penicilina [54].

Después de aplicar los distintos criterios de selección, como alta resistencia a fleomicina, mayor porcentaje de incremento en la producción y menor coeficiente de variación entre las repeticiones, se escogieron los 3 mejores transformantes de Wisconsin y los 3 derivados de P2-32 para los posteriores estudios de FL y FS.

4.3. EVALUACIÓN DE LOS TÍTULOS DE PENICILINA ELABORADA POR LOS TRANSFORMANTES EN FL Y EN FS.

En los últimos años se ha incrementado el interés en la fermentación sólida, aumentándose y mejorándose las metodologías utilizadas en este sistema e intentándose nuevas aplicaciones en diversas áreas [32]. Además se ha visto que estos estudios tienen aplicaciones importantes en el ámbito industrial y económico [100]. Sin embargo existe el problema de contar con cepas adecuadas para la fermentación sólida, y éste es uno de los factores que limitan la explotación del potencial de tales sistemas [8].

La mayoría de los esfuerzos realizados con el propósito de obtener cepas especiales para FS se han basado hasta el momento en la idea de que las mejores cepas productoras en FL tendrán un comportamiento similar en FS. Por lo tanto, la tendencia general ha consistido en utilizar la mejores cepas para la FL y estudiar su potencial productor en FS [100]. La producción de estas cepas ya mejoradas debería aumentar al aprovechar las ventajas asociadas a la FS (como un hábitat más cercano al natural).

Sin embargo, reportes al respecto, indican que tal vez el método mencionado anteriormente no sea el más adecuado, ya que se ha encontrado que los cultivos de elevada producción de enzimas en FS producen poco en FL y viceversa. Tal situación indica aparentemente que la capacidad de una cepa para producir elevadas concentraciones de enzima está determinada por la técnica de fermentación utilizada [101].

Las cepas de elevada producción en FL parecen ser especialistas para este sistema de cultivo, por lo que no se garantiza un buen desempeño en FS. En otras palabras, estos microorganismos pudieron haber perdido durante su mejoramiento genético ciertas características o capacidades que le permitieran desarrollarse mejor en FS, favoreciendo características que les permitiera adaptarse al medio líquido [42]. Todo esto conlleva a la necesidad de diseñar una metodología específica para el desarrollo de cepas exclusivamente destinadas a la FS.

La producción mundial de penicilina se lleva a cabo en cultivos por fermentación líquida. En este sentido, los esfuerzos realizados para aumentar la producción se han canalizado casi exclusivamente a este método de cultivo. El tipo de cepas fúngicas empleadas determina considerablemente la cantidad de antibiótico elaborado. Inicialmente la sobreproducción se logró sometiendo a la cepa parental a un programa de tratamiento con agentes mutagénicos. Obteniendo así, en varios casos, cepas sobreproductoras de penicilina aplicadas para la industria [102].

Actualmente, los programas de mejora genética se complementan con el uso de las modernas técnicas de Biología Molecular, aunque nuevamente estos procesos son casi exclusivos para el sistema de FL y no se han estudiado para FS.

De cualquier forma, hay que tener en cuenta que posiblemente los transformantes generados poseerán un genotipo ligeramente diferente y que quizá requerirán de la reoptimización de las condiciones del proceso de fermentación con la finalidad de conseguir su máximo rendimiento.

En este orden de ideas, el presente trabajo abarca los principios mencionados arriba, en el sentido de generar transformantes fúngicos derivados de cepas de alta y baja capacidad productora aplicando los procedimientos de la ingeniería genética y evaluando su potencial productor en fermentación líquida y sólida con las cepas progenitoras correspondientes, en ambos sistemas de fermentación.

4.3.1. EVALUACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

Precisar la cantidad de penicilina producida por unidad de volumen del medio de cultivo líquido (o sólido), es quizá el parámetro más importante para diferenciar la capacidad productora de colonias fúngicas. No obstante, determinar la producción de penicilina por unidad de masa micelial del microorganismo (es decir, la producción específica) es sin duda un parámetro más representativo y completo de su capacidad productora. En principio, en todo proceso de fermentación, al aumentar el crecimiento celular se elevaría la producción. No siempre es así, pero lo ideal sería alcanzar un crecimiento escaso junto a una alta producción (una alta productividad o producción específica). De tal forma, se determinó el perfil de crecimiento de los transformantes y progenitores estudiados en ambos medios de cultivo, con el fin de combinar estos datos con los valores de producción y definir, de este modo, las cinéticas de producción específica de las diferentes colonias.

Analizando los resultados, el transformante TW11 alcanzó una producción de penicilina G mayor que los demás, incluyendo a la cepa control Wisconsin 54-1255. La concentración de penicilina excretada al medio líquido de producción por este transformante fue casi 3 veces mayor que la excretada por la cepa parental. Por otra parte, los resultados revelan que la cepa parental P2-32 produjo más penicilina que cualquiera de los recombinantes TP analizados. En consecuencia, todos los transformantes mostraron una producción de penicilina disminuida.

Estableciendo una comparación entre los transformantes derivados de las cepas de alta y baja producción, en cuanto a capacidad productora adquirida, se observa que el nivel de producción alcanzado por las colonias TW fue en general ligeramente menor al de los clones TP. No obstante, la cepa P2-32 sintetizó en nuestros experimentos aproximadamente 3 veces más penicilina (1138 µg/mL) que la Wisconsin 54-1255 (436 µg/mL) en FL. Esto es particularmente consistente debido a que la cepa P2-32 presenta amplificada la región donde se encuentran los genes para la síntesis de la penicilina.

En este sentido, los fenómenos de amplificación han ocurrido en un buen número de cepas industriales [61], aunque en estos casos son el resultado de la aplicación de las técnicas de mutagénesis clásica. En *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 sólo existe una copia de los genes biosintéticos [103], mientras que en cepas industriales como AS-P-78 ó P2 se ha encontrado amplificada una región de 106.5 kpb que contiene los tres genes estructurales de la vía de la penicilina.

Esta amplificación supone la aparición de múltiples copias de esta región repetidas en tandem [104]. La amplificación génica de las cepas industriales se da en *P. chrysogenum* en el cromosoma I. El mecanismo de amplificación en tandem podría ser parte de un sistema de reparación de fragmentos dañados de ADN del microorganismo, similar al que existe en *E. coli* [105].

Sin embargo, los valores de producción de ambas cepas son menores a los que normalmente se han descrito. La menor producción de penicilina por parte de la cepa P2-32 en nuestros experimentos tal vez sea debido a que las cepas industriales presentan en muchas ocasiones fenómenos de inestabilidad cromosómica (a causa de los arreglos sufridos en su ADN genómico provocados por los intensos programas de mutagénesis a los que se han sometido), razón por la cual podrían haberse presentado eventos espontáneos de deleciones de fragmentos de cromosomas que abarcaran la región entera de los tres genes de la vía [106]. Esta pérdida de genes, por lo tanto, ocasionaría a la cepa la disminución gradual de su capacidad biosintética.

Siguiendo con la discusión de resultados, 2 de los 3 transformantes TW analizados, presentaron porcentajes importantes de incremento en la producción (109 y 170 %), en relación con la cepa parental. A diferencia de los 3 transformantes TP, que presentaron niveles de producción parecidos a los de la cepa progenitora.

Tal comportamiento se explicaría porque la cepa progenitora P2-32 es una cepa de alta producción, que en su genoma tiene varias copias de los genes para la ruta de penicilina y posiblemente ha llegado al umbral de dosis de tales genes, situación que provocaría la expresión disminuida de los genes extras integrados a su genoma. Los estudios acerca de los elementos reguladores de los genes así como la sustitución de sus regiones promotoras por otras más eficientes (por ejemplo, las regiones promotoras de genes del metabolismo primario con un alto nivel de expresión) pueden aportar una nueva perspectiva a este comportamiento y traducirse en una mejora de la capacidad biosintética [107].

De tres transformantes TW analizados, dos fueron los que alcanzaron mayores producciones específicas, 3 y 2 veces superiores a la cepa Wisconsin 54-1255 (esto es, los dos transformantes adquirieron porcentajes de incremento en la producción específica de penicilina G que van del 116 al 224 %). El mutante *npe6*, no productor, se mantiene de acuerdo a su característica. Continuando, solo el transformante TP20 de los tres analizados alcanzó una producción específica de 1.5 veces mayor que la cepa parental (lo que corresponde a un porcentaje de incremento del 48 %).

En términos prácticos, el nivel de producción específica alcanzado por las colonias TW en general fue parecido al de los clones TP. En promedio, se lograron porcentajes de incremento en la producción específica 3 veces mayores en los transformantes TW que en el mejor transformante TP.

4.3.2. EVALUACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.

Según los resultados de este apartado, en ningún caso los dos transformantes de TW y TP evaluados mostraron producciones de penicilina G en FS sustancialmente mayores a la cepa precursora. Por lo tanto, a diferencia de la FL, ninguno de los transformantes TW y TP evaluados en la FS fueron capaces de obtener porcentajes de incremento importantes en los niveles de producción de penicilina G con respecto a las cepas parentales. Comparando entre ambos, las transformantes TP presentaron producciones de penicilina ligeramente mayores a los TW en FS.

Sin embargo, los niveles de producción de penicilina de los transformantes TW y TP en FS fueron, respectivamente, 2.5 y 3.5 veces superiores al alcanzado en FL. Este comportamiento pobre se debió, posiblemente, a que la FS ofrece un ambiente sólido que esta más cercano al hábitat natural, si bien donde no estarían más adaptadas las cepas desarrolladas para FL [42].

Situación que provocaría a los transformantes (derivados de cepas para FL) no desarrollar ampliamente su potencial productor en FS. Además se ha descrito que existen grandes diferencias entre estos dos ambientes de producción, diferencias que posiblemente ocasionarían en los microorganismos distintos comportamientos a nivel fisiológico, bioquímico y genético [8], y por lo consiguiente diferencias en la habilidad productora.

Por un lado en la FL se habla de μg de antibiótico por mL de medio de cultivo, mientras que en la FS se define como μg de penicilina por gramo de materia seca. De tal forma, hablar del número de veces de mayor producción en FS en comparación con FL, es hablar de cuantos mL de volumen en un medio líquido se requieren de más para sintetizar la misma cantidad de penicilina que se llevaría a cabo en un gramo de peso del medio de cultivo sólido [42]. Es por ello que se utilizó el porcentaje de incremento en la producción (un valor relativo) para hacer comparaciones entre ambos sistemas.

Según los resultados, la producción específica de penicilina en FS mostró un panorama muy distinto al de la FL. Los porcentajes de incremento fueron nulos para todos los transformantes, excepto para la TW10 que logró un leve incremento del 11 % en relación con la parental. En términos generales, las colonias TP alcanzaron niveles de producción específica de penicilina G 1.5 veces mayores que las TW en FS.

Además, confrontando con la FL, tanto los transformantes TW y TP en promedio obtuvieron niveles 2 veces mayores de producción específica en FL comparada con la obtenida en FS (contabilizando el hecho de que en FS los niveles de crecimiento micelial fueron aproximadamente 8 veces superiores a los de la FL).

Esto quiere decir que todos los transformantes analizados presentaron un crecimiento escaso en FL asociado a un alto nivel de producción de penicilina, mientras que en FS tanto el crecimiento como la producción fueron elevados.

En general, la reintroducción de los genes *pcbC* y *penDE* dentro de cepas Wisconsin 54-1255 y P2-32 da como resultado un incremento en la producción de penicilina G cuando se prueban los transformantes generados en FL a escala laboratorio, cosa que no ocurre en FS. La posible explicación sería la necesidad de cepas especiales para generar transformantes que pudieran expresar su potencial productor en FS (o bien los resultados nos estarían indicando un diferente rendimiento en cuanto a la aplicación de esta técnica de aumento de dosis génica a FL y FS).

Los resultados sugieren que los genes *pcbC* y *penDE*, por sí mismos, no son un factor limitante para la producción de penicilina llevada a cabo por la cepa *P. chrysogenum* P2-32 en fermentación líquida. Es decir si se aumenta de manera conjunta la dosis de los genes en el genoma del microorganismo no se traduciría en un aumento del nivel de producción de la penicilina. Quizás, la expresión de estos genes extras se vea disminuida porque se ha llegado al umbral de dosis génica o por la falta de ciertos elementos potenciadores para los genes en exceso.

En este orden de ideas, cuando se emplea como medio de producción el sistema de fermentación sólida, los resultados indican que los dos genes biosintéticos de cepas de alta y baja producción de *P. chrysogenum*, por sí solos, no son limitantes para la producción de la penicilina. Al parecer la expresión de ambos genes extras esta disminuida en un ambiente sólido.

De la misma forma, la disponibilidad del tercer gen biosintético permitiría una variedad de nuevos experimentos en el mejoramiento de *P. chrysogenum* probados tanto en FL como en FS.

5. CONCLUSIONES.

1. El plásmido pUAMJC1 construido es un vector de clonación capaz de transformar cepas de *Penicillium chrysogenum*. Confiere a los transformantes generados el fenotipo de resistencia al antibiótico fleomicina y causa el incremento en la dosis de los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*.
2. Los métodos de cobertera y cilindros de agar son sistemas de selección efectivos para localizar transformantes mejorados en su habilidad productora de penicilina G en FL, no así en FS. El método por cobertera es repetitivo y válido en el procedimiento de selección, además, presenta un grado de correlación aceptable con los resultados de producción en FL.
3. Sólo los transformantes derivados de la cepa de menor desarrollo presentan porcentajes de incremento importantes (110 y 220 %) en la producción específica de penicilina G en FL. Los genes *pcbC* y *penDE* de la cepa P2-32 no son limitantes para la producción de penicilina G en FL.
4. En FS estos dos genes biosintéticos no son limitantes para la producción de penicilina por parte de ninguna de las dos cepas (de baja y alta producción).
5. El nivel de producción específica en FL es dos veces mayor que el presentado en FS. Los transformantes mejorados en FL tienen, además, tendencia a no expresar su potencial de producción en FS.

6. PERSPECTIVAS.

1. Cuantificar el número de copias de los genes *pcbC* y *penDE* integrados en los transformantes analizados
2. Determinar el nivel de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* tanto de los transformantes de P2-32 como de los de Wisconsin 54-1255 en FL y FS.
3. Medir la actividad enzimática de la IPN sintasa y de la IPN aciltransferasa (producto de estos genes)..
4. Introducir los tres genes de la ruta biosintética en cepas de *P. chrysogenum* y evaluar la producción de penicilina en FL y FS.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Skatrud, P. L., Tietz, A. J., Ingolia, T.D., Cantwell, C.A., Fisher, D.L., Chapman, J.L. y Queener, S.W.** (1989). Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* **7**: 477-485.
2. **Kennedy, J. y Turner, G.** (1996). δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet.* **253**: 189-197.
3. **Fernández, F.J.**, (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León.
4. **Fernández-Cañon y Peñalva, M.A.** (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 110-118.
5. **Veenstra, A. E., van Solingen, P. Bovemberg, R.A.L. y van der Voort, L.H.M.** (1991). Strain improvement of *Penicillium chrysogenum* by recombinant DNA techniques. *J. Biotechnol.* **17**: 81-90.
6. **Smith, D.J., Burnham, M.k.R., Edwards, J., Earl, A.J. y Turner, G.** (1990b). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology*. **8**: 39-41.
7. **Barrios-González J., Tomasini A, Viniestra-González G, López L.** (1988). Penicillin production by solid-state fermentation. *Biotechnol Lett.* **10**: 793-798.
8. **Barrios-González J., y Mejía, A.** (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology annual review.* **2**: 85-121.
9. **Demain AL. In: Demain AL, Solomon NA** (eds) Antibiotics Containing the beta-Lactam Structure. Berlin: Springer Verlag, 1983; 189-228.
10. **Rose AH. In: Rose AH** (ed) Economic Microbiology Secondary Products of Metabolism. New York: Academic Press, 1979; 2-32.
11. **Fleming, A.** (1929). On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B.Influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* **10**: 226-236.

12. **Clutterbuck, P.W., Lovell, R. y Raistrick, H.** (1932). Studies in the biochemistry of microorganisms. The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkalisoluble protein and penicillin (the antibacterial substance of Fleming). *Biochem. J.* **26**: 1907-1918.
13. **Hare, R.** (1982). New light on the history of penicillin. *Med. Hist.* **26**: 1-24.
14. **Macfarlane, Gwyn.** Fleming volumen 1, Biblioteca Salvat de Grandes Biografías, Barcelona, 1985.
15. **Alexopoulos, C. J.** Introductory Mycology, 2ª. ed., Ed. J. W., 1962, pp. 387-425.
16. **Fincham, J. R. S. And Day, P. R.** Fungal Genetics, 4ª. ed. , Ed. California, 1979, pp. 17, 52-70, 125, 130.
17. **Moat, A. G.** Microbial Physiology, Ed. John Wiley & Sons, 1979, pp. 29, 158, 223, 270, 306.
18. **Smith, J. E., Berry, D. R. & Kristiansen, B.** Fungal Biotechnology, Ed. AP, 1980, pp. 1-75.
19. **Smith, J. E. And Berry, D. R.** The Filamentous Fungi, Ed. Edward Arnold, 1978, pp. 125, 129, 226, 228, 401, 427, 428, 443.
20. **Koneman, E. W. & Roberts, G. D.** Micología Práctica de Laboratorio, 3ª. ed., Ed. Panamericana, 1996, pp. 18, 117, 160.
21. **Luengo, J.M. y Peñalva, M.A.** (1993). Penicillin biosynthesis. En: "Aspergillus: 50 years on". Progress in Industrial Microbiology, Vol. **29** (pp. 603-638). S.D. Martinelli y J. R. Kinghorn, eds. Elsevier, Amsterdam.
22. **Prentis, S.** Biotecnología. Una nueva revolución industrial. *Biblioteca Científica Salvat*. Barcelona, 1989, pp. 35-84.
23. **Hahn-Hägerdal B.** (1986). Water activity: A possible external regulator in biotechnical processer. *Enzyme Microb.* **8**: 322-327.
24. **Mitchell DA, Lonsane BK.** (1992). In: Doelle HW, Mitchell DA, Rolz CE (eds) Solid Substrate Cultivation. London and New York: Elsevier, 1-16.
25. **Underkofler LA, Severson GM, Goering KJ, Christensen LM.** (1947). Commercial production and use of mold bran. *Cereal Chem.* **24**: 1-22.
26. **Hesseltine CW.** (1997). Solid-state fermentation. Part 2. *Proc Biochem.* **12**: 29-32.

27. **Raimbault M, Roussos S, Barrios- González J, Gutiérrez M, Viniegra G.** Procédé de culture de microorganismes sur un milieu solide constituée de dun support solide absorbant, compressible et non fermentable, French patent No. 2647119. 1989.
28. **Hesseltine CW.** (1972). Solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng.* **14:** 517-532.
29. **Lonsane BK, Ghildyal NP, Budiartman S, Ramakrishna SV.** (1985). Engineering aspects of solid- state fermentation. *Enzyme Microbiol Technol.* **7:**258-265.
30. **Fukushima D.** (1982). Koji as an important source of enzymes in the orient and its unique composite systems of proteinases and peptidases. Use of enzymes in food technology. Versailles: C.N.E.R.N.A. (C.N.R.S.).
31. **Pandey A.** (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Proc Biochem.* **27:** 109-117.
32. **Mudgett RE. In: Demain AL, Solomon NA** (eds). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington: *American Society For Microbiology*, 1986; 66-84.
33. **Barrios-González J.** (1994) Producción de metabolitos secundarios por fermentación sólida. Tesis de Doctorado, UNAM.
34. **Smith JE, Berry DR.** (1976). An Introduction to Biochemistry of Fungal Development. London, New York: *Academic Press*.
35. **Alazard D, Raimbault M.** (1981). Comparative study of amyolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Euro J Appl Microbiol.* **12:** 113-117.
36. **Smiley KL, Hensley DE, Gasdorf HJ.** (1976). Alpha-galactosidase production and use in a hollow-fibre reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **31:** 615.
37. **Kumar PKR, Lonsane BK.** (1987). Gibberellic acid by solid-state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnol Bioeng.* **30:** 267-271.
38. **Acuña-Arguelles M, Gutierrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E.** (1993). Effect of water activity on exopectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid-state fermentation. *Biotechnol Lett.* **16:** 23-28.
39. **Ball C. In: Hüter R, Leisinger T, Nüesch J, Wehrli W.** (1987). (eds). Antibiotics and Other Secondary Metabolites; Biosynthesis and Production. FEMS Symp. No. 5. London: *Academic. Press.* 165-176.
40. **Schwab H.** (1988). Strain improvement in industrial microorganisms by recombinant DNA techniques. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **37:** 129-164.

41. **Ghildyal NP, Lonsane BK, Sreekantiah KR, Murty VS.** (1985). Economics of submerged and solid-state fermentation for the production of amyloglucosidase. *J. Food Sci Technol.* **22**: 171-176.
42. **Barrios-González J, Castillo T.E., Mejía A.** (1993). Development of high penicillin producing strains for solid-state fermentation. *Biotechnol Adv.* **11**: 525-537.
43. **Elander, R.P. y Aoki, H.** (1982). β -lactam- producing microorganisms: Their biology and fermentation behavior. En: Chemistry and Biology of β -lactam Antibiotics, Vol III (pp. 84-183). R. B. Morin and M. Gorman, eds. Academic Press, Nueva York.
44. **Aharonowitz, Y., Cohen, G. y Martín, J.F.** (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: Structure, organization, regulation, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 461-495.
45. **Abraham, E.P., Chain, E., Florey, H.W., Florey, M.E., Heatley, N.G., Jennings, M.A. y Sanders, A.G.** (1949). En Antibiotics, Vol. 2 (pp. 631-671), E.P. Abraham, E. Chain, H.W. Florey, N.G. Heatley, M.A. Jennings y A.G. Sanders, eds. Oxford University Press, Londres.
46. **Sheehan, J.C. y Henery-Logan, K.R.** (1959). The total synthesis of penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 3089-3094.
47. **Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Crawford, K., Burton, H.S. y Hale, C.W.** (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature* **171**: 343.
48. **Martín, J.F. y Gutiérrez, S.** (1992). Molecular genetics of fungal secondary metabolites. En: Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi (pp. 214-252). J.R. Kinghorn y G. Turner, eds. Blackie and Son Ltd; Glasgow, Reino Unido.
49. **Martín, J.F. y Liras, P.** (1989b). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206.
50. **Arnstein, H.R.V. y Morris, D.** (1960). The structure of a peptide containing α -aminoadipic acid, cysteine, and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J.* **76**: 357-361.
51. **Jensen, S.E., Westlake, D.W.S. y Wolfe, S.** (1982). Cyclization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to penicillin by cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* **35**: 483-490.
52. **Fawcett, P.A., Usher, J.J., Huddleston, J.A., Bleaney, R.C., Nisbet, J.J y Abraham, E.P.** (1976). Synthesis of δ -(L- α -aminoadipyl)-cysteinyl-valine and its role in penicillin biosynthesis. *Biochem J.* **157**: 651-660.

53. **Enriquez, L. y Pisano, M.A.** (1979). Isolation and nature of intracellular alpha-aminoadipic acid-containing peptides from *Paecilomyces persicinus* P-10. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 392-397.
54. **López-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M. y Martín, J.F.** (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 343-351.
55. **Queener, S.W. y Neuss, N.** (1982). The biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *The Chemistry and Biology of β -lactam Antibiotics*, Vol. 3 (pp. 1-81). E.B. Morin y M. Morgan, eds. Academic Press, Londres.
56. **Ramos, F.R., López-Nieto, M.J. y Martín, J.F.** (1985). Isopenicillin N Synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 380-387.
57. **Banko, G., Demain, A.L. y Wolfe, S.** (1987). δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACV synthetase): a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillins and cephalosporins precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 2858-2860.
58. **Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H.M. y Martín, J.F.** (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* **265**: 16358-16365.
59. **MacCabe, A., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles S.E., Riach M.B., Pfeifer E., von Döhren H. y Kinghorn J.R.** (1991). δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12646-12654.
60. **Martín, J.F., Ingolia, T.D. y Queener, S.W.** (1991). Molecular genetics of penicillin and cephalosporin antibiotic biosynthesis. En: *Molecular Industrial Mycology: Systems and Applications for Filamentous Fungi* (pp. 149-196). S.A. Leong y R.M. Berka, eds. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
61. **Barredo, J.L., Díez, B., Alvarez, E. y Martín, J.F.** (1989a). Large amplification of a 35-kb fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **16**: 453-459.
62. **Smith, D.J., Burnham, M.K.R., Bull, J.H., Hodgson, J.E., Ward, J.M., Brown, P., Brown, J., Barton, B., Earl, A.J. y Turner, G.** (1990a) β -Lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *EMBO J.* **9**: 741-747.

63. **Konomi, T., Herchen, S., Baldwin, J.E., Yoshida, M., Hunt, N.A. y Demain, A.L.** (1979). Cell-free conversion of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to an antibiotic with properties of isopenicillin N in *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. J.* **184**: 427-430.
64. **Carr, L.G., Skatrud, P.L., Scheetz III, M.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D.** (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **48**: 257-266.
65. **Samson, S.M., Belagaje, R., Blankenship, D.T., Chapman, J.L., Perry, D., Skatrud, P.L., Frank, R.M., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D.** (1985). Isolation, sequence determination and expression in *E. coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* **318**: 191-194.
66. **Barredo, J.L., Cantoral, J.M., Alvarez, E., Díez, B. Y Martín, J.F.** (1989b). Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 91-98.
67. **Gutiérrez, S., Díez, B., Alvarez, E., Barredo, J.L. y Martín, J.F.** (1991b). Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N. Acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 56-64.
68. **Alvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Díez, B., Barredo, J.L. y Martín, J.F.** (1993). The isopenicillin N acyltransferase of *P. chrysogenum* has isopenicillin N. amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. *Eur. J. Biochem.* **215**: 323-332.
69. **Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Díez, B. Y Martín, J.F.** (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *P. chrysogenum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1675-1682.
70. **Tobin, M.B., Baldwin, J.E., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Skatrud, P.L. y Sutherland, J.D.** (1993). The requirement for subunit interaction in the production of *Penicillium chrysogenum* acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase in *Escherichia coli*. *Gene* **132**: 199-206.
71. **Barredo, J.L.; van Solingen, P., Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Kattavilder, A., Smaal, E.B., Groenen, M.A.M., Veenstra, A.E. y Martín, J.F.** (1989c). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A-6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **83**: 291-300.

72. **Cantoral, J.M., Gutiérrez, S., Fierro, F., Gil-Espinosa, S., van Liempt, H. y Martín, J.F.** (1993). Biochemical characterization and molecular genetics of nine mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 737-744.
73. **Fernández, F.J., Gutiérrez, S., Velasco, J., Montenegro, E., Marcos, A.T. y Martín, J.F.** (1994). Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (*penDE*) of *Penicillium chrysogenum* *J. Bacteriol.* **176**: 4941-4948.
74. **Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B. Y Martín, J.F.** (1993). Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 573-579.
75. **Cantoral, J.M., Díez, B., Barredo, J.L., Alvarez, E. y Martín, J.F.** (1987). High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology* **5**: 494-497.
76. **Barredo, J.L.** (1990). Análisis de una región del genoma de *Penicillium chrysogenum* que contiene los genes de *pcbC* y *penDE*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
77. **Skatrud, P.L., Queener, S.W., Carr, L.G. y Fisher, D.L.** (1987). Efficient integrative transformation of *C. acremonium*. *Curr. Genet.* **12**: 337-348.
78. **Chapman, J.L., Skatrud, P.L., Ignolia, T.D., Samson, S.M., Kaster, K.R. y Queener, S.W.** (1987). Recombinant DNA studies in *Cephalosporium acremonium*. *Devel. Ind. Microbiol.* **27**: 165-174.
79. **Lode, H., Janish, P., Kupper, G. y Weuta, H.** (1974). Comparative clinical pharmacology of three ampicillins and amoxicillin administered orally. *J. Infect. Dis.* **129** (supl.): S156-S169.
80. **Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
81. **Barrios-González, J., Montenegro, E. y Martín, J.F.** (1993). Penicillin production by mutants resistant to phenylacetic acid. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 455-458.
82. **Miller, J.H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics (pp.352-355). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
83. **Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

84. **Somerson, N.L., Demain, A.L. y Nunheimer, T.D.** (1961). Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -amino adipic acid. *Arch. Biochem.* **93**: 238-241.
85. **Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning: a practical approach (pp. 109-135). D.M. Glover, ed. IRL Press, Oxford.
86. **Holmes, D.S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
87. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
88. **Polman, J.K. y Larkin, J.M.** (1989). Purification of DNA from agarosa gels. *Biotechnol. Techn.* **3**: 329-332.
89. **Berdy, J.** (1980). Bleomycin type antibiotics. Handbook of antibiotic compounds, vol. IV (pp. 459-491). CRC Press, Boca Ratón, E.U.A.
90. **Drocourt, D., Camels, T., Reynes, J.P., Baron, M. Y Tiraby, G.** (1990). Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **18**: 4009.
91. **Pérez-Godínez, E.A.** (2000). Efecto del gen *hxx2* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la regulación en la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum* DogR5. Tesis de Maestría. UAM-I.
92. **Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. Y Berg, P.** (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.
93. **Sánchez, F., Lozano, M., Rubio, V. y Peñalva, M.A.** (1987). Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **51**: 97-102.
94. **Kolar, M., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Schwab, H.** (1988). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli* LacZ fusion gene. *Gene* **62**: 127-134.
95. **Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L. y Martín, J.F.** (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **12**: 277-282.
96. **Gems, D., Johnston, I.L. y Clutterbuck, A.J.** (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**: 61-67.

97. **Bull, J.H., Smith, D.J., Turner, G.** (1988). Transformation of *Penicillium chrysogenum* with a dominant selectable marker. *Curr. Genet.* **13**: 377-382.
98. **Beri, R.K. y Turner, G.** (1987). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene as a dominant selective marker. *Curr. Genet.* **11**: 6390-6411.
99. **MacDonald, K.D., Hutchinson, J.M. and Gillet, W.A.** (1963) Isolation of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* and their penicillin yields. *J. Gen. Microbiol.* **33**: 365-374.
100. **Shankaranand, M.V., Ramesh, B.K., Lonsane.** (1992). Idiosyncrasies of solid-state-fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochemistry*, **27**: 33-36.
101. **Antier, P., Raimbault, M., Viniegra, G. y Minjares, A.** (1991). Obtención de mutantes hiperproductoras de hidrolasas en fermentación en medio sólido: Importancia de la Aw. *IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. 8-12 de septiembre. Mérida, Yucatán, México. GBM17C.
102. **Pirt, S.J.** (1983). The role of microbial Physiology in Biotechnology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **33B**: 137-138.
103. **Fierro, F.** (1996). Localización cromosomal y estudio de la región genómica amplificada que contiene los genes biosintéticos de penicilina en *Penicillium chrysogenum*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
104. **Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutiérrez, S., Fernández, F. J. y Martín, J.F.** (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 6200-6204.
105. **Walker, G.C.** (1985). Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 425-457.
106. **Künkel, W., Berger, D., Risch, S. y Wittmann-Bresinsky B.** (1992). Genetic instability of industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 499-502.
107. **Gutiérrez, S., velasco, J., Marcos, A.T., Fernández F.J., Fierro F., Barredo, J.L., Díez, B. y Martín, J.F.** (1997) Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* En prensa.