



Herramientas y estrategias de biología molecular para la ingeniería de la biosíntesis de ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064

July Tatiana Ramírez Herrera

Trabajo de grado presentado para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesora

Luisa Fernanda Patiño Cervantes, Magíster (MSc) en Ingeniería Química

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2021

Cita	Ramírez Herrera [1]
Referencia	[1] J. T. Ramírez Herrera, “Herramientas y estrategias de biología molecular para la ingeniería de la biosíntesis de ácido clavulánico en <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC27064”, Trabajo de grado profesional, Ingeniería Bioquímica, Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia, 2021.
Estilo IEEE (2020)	



Grupo de Investigación Bioprocesos.

Asesora: Luisa Fernanda Patiño Cervantes



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla

Jefe departamento: Lina María González Rodríguez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mi familia por su apoyo y amor incondicional.
Ustedes son el motor que me impulsa a seguir a pesar de las adversidades.

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia por haberme permitido formarme en sus instalaciones.
A mis padres quienes fueron mis principales promotores durante este proceso y especial agradecimiento a mi asesora Luisa Patiño por su guía y acompañamiento durante este trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS	8
3. MARCO TEÓRICO	9
4. METODOLOGÍA	12
4.1. Cepas bacterianas y plásmidos	12
4.2. Condiciones de los medios y el cultivo.....	12
4.3. Extracción de ADN genómico de <i>S. clavuligerus</i>	13
4.4. Amplificación y purificación del gen de interés.....	13
4.5. Clonación en el vector TOPO-TA, clonación del gen de interés en el vector de expresión (pIB139) usando enzimas de restricción.....	13
4.6. Transformación de <i>S. clavuligerus</i> con el plásmido recombinante	14
4.7. Evaluación de la transformación de <i>S. clavuligerus</i> con pIB139/bldD	14
4.8. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del gen de interés en la producción del metabolito secundario y en el fenotipo morfológico de la bacteria	15
4.8.1. Determinación de AC	15
4.8.2. Determinación de la biomasa	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5.1. Amplificación del gen <i>bldD</i> por PCR.....	17
5.2. Transformación de <i>S. clavuligerus</i> con pIB139/ <i>bldD</i>	18
5.3. Efecto del gen de interés en la producción de ácido clavulánico	19
5.4. Efecto en la morfología	21
5.5. Efecto en el crecimiento de la biomasa.....	22
6. CONCLUSIONES	26
7. REFERENCIAS	27

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es actualmente una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo socioeconómico, según la OMS al menos 700.000 personas mueren cada año por esta causa. Un número creciente de bacterias se han vuelto resistentes a los antibióticos, por ejemplo, a través de la producción de β -lactamasas. El ácido clavulánico (AC) es uno de los compuestos capaces de inhibir las β -lactamasas, sin embargo, este tiene un alto costo en el mercado, en parte debido a los bajos niveles de producción obtenidos con la cepa de tipo salvaje, *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*). Con el fin de generar estrategias que permitan mejorar la producción del AC, en el presente trabajo de investigación, se aplicaron herramientas de biología molecular para generar un organismo recombinante de *S. clavuligerus* ATCC27064 con el gen *bldD* sobreexpresado.

El gen *bldD*, es un regulador global asociado con la formación de hifas aéreas y la esporulación durante el crecimiento en algunas especies de *Streptomyces*, sin embargo, se desconoce su efecto regulador sobre la producción del AC en *S. clavuligerus*. La sobreexpresión del gen *bldD* en el plásmido integrativo pIB139, permitió evaluar su efecto sobre la biosíntesis del compuesto de interés (AC), el crecimiento de la biomasa y el efecto fisiológico sobre el fenotipo morfológico. La medición del AC se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC) y los datos obtenidos mostraron una mayor producción del AC en las bacterias recombinantes con el gen *bldD* sobreexpresado cuando se comparó con el control durante las primeras fases de crecimiento. Así mismo, la sobreexpresión del gen *bldD* afectó la morfología de la bacteria, favoreciendo la formación de hifas aéreas asociadas con la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces spp.*

Palabras clave — **Ácido clavulánico, sobreexpresión génica, *Streptomyces clavuligerus*, gen *bldD***

ABSTRACT

Antibiotic resistance is currently one of the greatest threats to global health, food security and socioeconomic development, according to the WHO at least 700,000 people die each year from this cause. An increasing number of bacteria have become resistant to antibiotics, for example, through the production of β -lactamases. Clavulanic acid (CA) is one of the compounds capable of inhibiting β -lactamases, however, it has a high cost in the market, partly due to the low production levels obtained with wild-type strain, *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*). In order to generate strategies to improve CA production, in the present research work, molecular biology tools were applied to generate a recombinant organism of *S. clavuligerus* ATCC27064 with the *bldD* gene overexpressed.

The *bldD* gene is a global regulator associated with formation of aerial hyphae and sporulation during growth in some species of *Streptomyces*, however, its regulatory effect on CA production by *S. clavuligerus* is unknown. The *bldD* overexpression in the integrative plasmid pIB139, allowed to evaluate its effect on the biosynthesis of the compound of interest (CA), the growth of the biomass and the physiological effect on the morphological phenotype. Measurement of CA was carried out by liquid chromatography (HPLC) and the data obtained showed a higher CA production by the recombinant strain with the *bldD* gene overexpressed compared the control strain during the first growth phases. Likewise, the overexpression of the *bldD* gene affected the bacteria morphology, favoring the formation of aerial hyphae associated with production of secondary metabolites in *Streptomyces* spp.

Keywords — Clavulanic acid, gene overexpression, *Streptomyces clavuligerus*, *bldD* gen

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las infecciones representan una causa común de morbilidad y mortalidad en todo el mundo [1], según un informe de la OMS sobre el consumo de antibióticos entre 2016 y 2018, los antibióticos β -lactámicos son los más consumidos en América [1]. Desafortunadamente, un número creciente de bacterias se ha vuelto resistente a los antibióticos, por ejemplo, a través de la producción de β -lactamasas, lo que hace que la resistencia bacteriana sea uno de los problemas de salud pública más urgentes del mundo [2].

El ácido clavulánico (AC) es uno de los compuestos capaces de inhibir las β -lactamasas, sin embargo, este tiene una disponibilidad de mercado limitada debido a su complejo proceso de producción, tanto en lo que respecta a la tecnología como a los derechos de propiedad intelectual [3]. El AC es un metabolito secundario con interés farmacéutico, cuya complejidad química actualmente no permite que la síntesis química reemplace a la fermentación para su producción, y aun así los rendimientos de producción mediante la cepa de tipo salvaje de *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) es bajo (aproximadamente 1g/L) [4]. Considerando la baja producción de este ácido y su importancia social y económica, la mejora genética es una de las estrategias que mejores resultados ha mostrado para aumentar su producción [4]. Sin embargo, los mecanismos de regulación que controlan su producción aún no se han elucidado por completo, por lo que un mejor entendimiento de estos podría ayudar a generar nuevas cepas recombinantes con mayores rendimientos de AC y a un menor costo.

El gen *bldD*, es un regulador global que controla la expresión de múltiples genes involucrados en la diferenciación morfológica y biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces* spp. No obstante, su papel sobre la producción del AC no ha sido estudiado previamente. El presente proyecto busca contribuir al entendimiento de la biosíntesis del AC mediante el uso de diferentes técnicas y herramientas de biología molecular para generar un organismo recombinante de *S. clavuligerus* ATCC27064, en el cual se sobreexpresa el gen *bldD*. Así mismo, se busca evaluar el efecto de la sobreexpresión en la formación de hifas aéreas y esporas, con el fin de establecer una relación entre el gen *bldD* y la diferenciación morfológica de *S. clavuligerus*.

2. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Aplicar herramientas de biología molecular para generar una estrategia que permita evaluar el papel biosintético de un gen, sobre la producción de un metabolito secundario con potencial farmacéutico.

B. Objetivos específicos

- Generar un organismo recombinante que permita estudiar el rol del gen de interés en la biosíntesis del metabolito secundario.
- Determinar el efecto biosintético del gen de interés sobre la producción del metabolito secundario en la célula huésped.
- Evaluar el posible efecto fisiológico del gen de interés sobre el fenotipo morfológico y/o crecimiento celular de la célula huésped.

3. MARCO TEÓRICO

bld incluido el inhibidor de β -lactamasas, AC [5]. El AC, inhibe eficazmente la actividad de las enzimas β -lactamasas, que son responsables de gran parte de la resistencia a la penicilina [3] [6]. Este metabolito secundario parece ser activo contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; sin embargo, en relación con otros antibióticos de amplio espectro como la tienamicina, su actividad antibiótica es relativamente baja [7]. Como resultado, no ha sido posible utilizar AC como un producto antibacteriano administrado únicamente. Más bien está co-formulado con otros antibióticos de amplio espectro, que son susceptibles a las β -lactamasas [7].

A nivel celular los metabolitos secundarios son regulados para conectar el metabolismo secundario con el entorno celular, entendiéndose como metabolismo secundario a aquel conjunto de reacciones bioquímicas que no son imprescindibles para la supervivencia de un organismo. Existen varios niveles de regulación que involucran diferentes tipos de genes reguladores funcionando de diferentes formas. Están los genes que codifican para reguladores pleiotrópicos (o globales) y los que codifican para reguladores específicos de las rutas metabólicas [8]. El rendimiento en la producción de metabolitos secundarios está estrechamente relacionado con las condiciones de la fermentación y las características genéticas de los organismos productores. El estudio de genes reguladores que influyen en la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, no solo proporciona una base teórica para su biosíntesis, sino que también ayuda a diseñar estrategias para aumentar el rendimiento de los antibióticos mediante la manipulación molecular de estos genes reguladores [8].

La regulación genética involucra el proceso de activar y desactivar genes, asegurando que los genes apropiados se expresen en los momentos adecuados. Un gen regulador global es aquel que regula simultáneamente numerosos operones a través de sistemas reguladores y puede ayudar a un organismo a adaptarse a cambios importantes en el medio ambiente o entorno; mientras que la expresión de los genes estructurales es controlada por un gen regulador específico que codifica para una proteína [9].

En *Streptomyces*, los genes tipo *bld* son necesarios para la formación de hifas aéreas y esporas [10], se ha encontrado que los mutantes de *bld* en *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) bloqueados en

una etapa temprana del desarrollo, no pueden erigir hifas aéreas, exhibiendo un aspecto “calvo”, sin la morfología característica de la cepa de tipo salvaje [11]. Algunos genes tipo *bld* han sido evaluados en *S. clavuligerus*; en un estudio se realizó un análisis proteómico comparando la cepa de tipo salvaje de *S. clavuligerus* y dos mutantes que carecen de los reguladores globales *bldA* y *bldG* (el *bldA* regula el desarrollo morfológico y *bldG* regula la producción de AC y cefamicina) [12] [13]. Los autores demostraron que el mutante *bldA* redujo la producción de AC en un 80%, mientras que en el mutante *bldG* no se detectaron niveles de AC en comparación con la cepa de tipo salvaje [12] [13].

El gen *bldD* no ha sido estudiado en *S. clavuligerus*, pero si en *S. coelicolor* (organismo modelo), donde se demostró que *bldD* es un regulador transcripcional importante para el desarrollo morfológico y la producción de antibióticos [14]. Los reguladores *bld* se denominan bold (calvos en español), porque las mutaciones en los genes correspondientes impiden la formación de hifas aéreas reproductoras que imparten una apariencia “borrosa” a las colonias de tipo salvaje [15] [16]. Estudios han mostrado que el regulador *bldD* en *S. coelicolor* se encuentra en la parte superior de la jerarquía de desarrollo, reprimiendo la transcripción de ~170 genes de esporulación durante el crecimiento vegetativo [14] [15].

Para estudiar el rol del gen *bldD* en *S. clavuligerus* se plantea su sobreexpresión génica, la cual se puede llevar a cabo por un proceso de amplificación genética, que conduce posteriormente al aumento de la proteína diana. La sobreexpresión génica es un enfoque genético poderoso para el descubrimiento de vías metabólicas y fenotipos [17], el cual imita mutaciones de ganancia de función, complementa fenotipos de pérdida de función y permite investigar la función de genes esenciales y no esenciales [18]. Para llevar a cabo lo anterior, primero es necesario realizar una transformación, la cual consiste en la introducción de alguna molécula de ADN dentro de una célula viva [19].

La mayoría de las bacterias son capaces de tomar el ADN del medio en el que crecen, aunque, a menudo una molécula de ADN absorbida de esta manera se degrada, ocasionalmente puede sobrevivir y replicarse en la célula huésped, en particular, esto sucede si la molécula de ADN es un plásmido con un origen de replicación conocido por el huésped [19]. Sin embargo, no todas las

especies de bacterias son igualmente eficientes en la captación de ADN. Por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), es especialmente utilizada en los procesos de transformación, al tornarse competente mediante la adición de una solución salina (CaCl_2) y la elevación de la temperatura a 42°C . De esta manera, el ADN es fácilmente absorbido hacia el interior del citoplasma de *E. coli* [19].

El ciclo de vida del género filamentoso, *Streptomyces*, comienza con la germinación de una spora y el crecimiento del micelio sustrato vegetativo que luego pasa por diferenciación fisiológica a un estado productor de antibióticos y diferenciación morfológica para erigir hifas aéreas que finalmente terminaran dando paso a la formación de esporas [20]. En *S. coelicolor*, la producción de antibióticos está relacionado con la formación del micelio aéreo [20]. Por tanto, el estudio y la modificación genética de genes reguladores involucrados con la biosíntesis de metabolitos secundarios y desarrollo morfológico, como el caso del AC en *S. clavuligerus*, podría ser una estrategia efectiva para contribuir a elucidar los complejos mecanismos de regulación que gobiernan los metabolitos secundarios, así como una estrategia para mejorar su producción.

4. METODOLOGÍA

4.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Escherichia coli DH5-alfa fue facilitada por la colección general de cultivos del grupo Bioprocesos de la Universidad de Antioquia. Se compró *Escherichia coli* DSM 11539 a la colección alemana de microorganismos DSMZ del Instituto Leibniz. *S. clavuligerus* ATCC 27064 y el vector pIB139 fueron amablemente proporcionados por el instituto INBIOTEC de la Universidad de León (España). El kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen®) se utilizó para clonar productos de PCR con colas de adeninas. El plásmido integrativo, pIB139 se utilizó para sobreexpresar el gen de interés en *S. clavuligerus*.

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5-alfa para mantener el vector TOPO-TA. El vector se propagó en *E. coli* DSM 11539 para obtener ADN no metilado y transformar la cepa de *S. clavuligerus*. El plásmido TOPO-TA se aisló de *E. coli* DSM 11539 usando el kit QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los transformantes de las cepas de *S. clavuligerus* y *E. coli* se seleccionaron con apramicina (40 µg / ml) y ampicilina (40 µg / ml) de acuerdo con las características del vector. El producto del gen previamente purificado se clonó primero en el vector de clonación TOPO-TA (Invitrogen®) para facilitar la clonación con colas poli(A) y luego se clonó en el vector pIB139 usando enzimas de restricción y una ligasa.

4.2. Condiciones de los medios y el cultivo

E. coli se cultivó en el medio Luria Bertani (LB) con antibiótico cuando fue necesario. Los cultivos se realizaron a 250 rpm y 37°C, entre 12-16h. La cepa silvestre de *S. clavuligerus* ATCC27064 y las cepas mutantes relacionadas se cultivaron en caldo de soja tripticaseína (TSB) a 28°C y 220 rpm, entre 24-36h. Para la producción de AC se usaron erlenmeyers de 250 mL y 50 mL del medio de producción de AC descrito por Ramírez-Malule (2018) [21]; se aplicó apramicina (40 µg/mL) cuando fue necesario. El medio R2YEG se usó para la transformación genética de *S. clavuligerus* [22], mientras que el medio GYM se usó para su esporulación, este último se preparó con una concentración de glucosa 4 g/l, extracto de levadura 4g/l, extracto de malta 10 g/l, CaCO₃ 2 g/l y agar 15 g/l ajustado a pH 7,3.

4.3. Extracción de ADN genómico de *S. clavuligerus*

S. clavuligerus ATCC27064 fue cultivada en medio TSA, a 28°C durante 24-36 horas. Posteriormente, se tomó una colonia y se adicionó a 50 µl de H₂Odd. Para la lisis celular, la muestra se calentó por 30 min a 95°C. Finalmente, 5 µl de la solución anterior se usó como ADN plantilla para la PCR.

4.4. Amplificación y purificación del gen de interés.

El gen de interés (*bldD*) se amplificó mediante PCR utilizando ADN cromosómico de *S. clavuligerus* como plantilla. Para la PCR, en un tubo eppendorf se adicionó 5µl de ADN, los componentes del Kit Smobio®: 4µl de PCR Mix (Tag polimerasa, dNTPs, el cofactor Mg), dos cebadores específicos (0,6µl FW y 0,6µl RV), 1µl de DMSO 5% y 8,8µl de agua milliQ, para un total de 20 µl de reacción. El tiempo y la temperatura en la técnica de PCR se estandarizaron de acuerdo con la temperatura de hibridación de cada cebador, en 7 pasos: 1. Calentar a 95°C durante 12 min, 2. Mantener a 95°C durante 20 segundos, 3. Bajar a 55°C durante 30 segundos, 4. Subir a 72°C durante 1 min, 5. Repetir pasos del 1-4 por 30 veces, 6. A 72°C durante 20 min (para la cola poli(A)), 7. Mantener a 4°C. Los cebadores específicos al gen *bldD* (501 pb) fueron amablemente proporcionados por el Grupo de Bioprocesos de la UdeA; las secuencias de cebadores para el gen se obtuvieron de bases de datos, por ejemplo, NCBI [23]. La visualización del ADN amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Todos los productos de PCR se purificaron utilizando el kit E.Z.N.A Cycle pure (OMEGA). Los plásmidos se recuperaron utilizando el mini kit de ADN plásmido E.Z.N.A (OMEGA).

4.5. Clonación en el vector TOPO-TA, clonación del gen de interés en el vector de expresión (pIB139) usando enzimas de restricción

El producto de PCR extraído correspondiente al gen *bldD* se ligó con el vector TOPO-TA mediante clonación TA usando el kit de clonación TOPO-TA (Thermo). La composición de la mezcla de ligación fue: 1 µL de vector TOPO, 4 µL de producto de PCR fresco y 1 µL de solución salina. La ligación se realizó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, la reacción se colocó en hielo

mientras se procedía con la transformación de *E. coli*. Después de la escisión del TOPO-TA con enzimas de restricción (*NdeI* y *XbaI*), el gen *bldD* se ligó con el vector diana pIB139 de la siguiente manera: 1 μL de 1-3 u / μL de ADN ligasa de T4 (Promega), 4 μL de tampón de reacción 2X, 50 ng de ADN de vector, 150 ng de inserto del gen y dH_2O hasta completar 20 μL de mezcla. Se proporcionó incubación durante la noche a 4 ° C para que tuviera lugar la reacción de ligación. Posteriormente, células de *E. coli* se transformaron con el producto de ligación y se evaluaron las colonias transformadas. La inserción de *bldD* en el plásmido se confirmó mediante gel de electroforesis de agarosa al 1% (p / v) y secuenciación.

4.6. Transformación de *S. clavuligerus* con el plásmido recombinante

➤ *Transformación de E. coli*

E. coli DH5-alfa, se usó inicialmente para el mantenimiento de plásmidos. *E. coli* DSM 11539 se transformó con las construcciones para desmetilar el ADN. Se obtuvo *E. coli* DSM 11539 competente utilizando cloruro de calcio y usando el protocolo estándar de choque térmico [18].

➤ *Transformación de Streptomyces clavuligerus*

S. clavuligerus se transformó por separado con el plásmido pIB139 y pIB139/*bldD* mediante protoplastos. Para la preparación de los protoplastos, *S. clavuligerus* se cultivó en 50 ml de medio YEMEG (extracto de levadura al 3%, peptona al 5%, extracto de malta al 3%, sacarosa al 15% y glicerol al 1%) durante 60 horas, a 28°C y 220 rpm. El medio se centrifugó y el sedimento se trató con sacarosa al 10,3% y 50 μl de lisozima. Para la transformación, 1 μg del plásmido recombinante se mezcló con 100 μl de la suspensión de protoplastos y 100 μl de polietilenglicol (PEG) al 40%. Los protoplastos se regeneraron en medio R2YEG (sacarosa al 10,3%, K_2SO_4 al 0,025%, glicerol al 1%, extracto de levadura al 2%). Finalmente, las colonias potencialmente transformadas se seleccionaron utilizando 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de apramicina [24] [25].

4.7. Evaluación de la transformación de *S. clavuligerus* con pIB139/*bldD*

Los plásmidos recombinantes de pIB139 con el gen *bldD* clonado (pIB139/*bldD*) se enviaron a secuenciar a Macrogen Corea para verificar la integridad de *bldD*. Asimismo, la integración del

plásmido pIB139/bldD en el cromosoma de la cepa silvestre de *S. clavuligerus* se validó mediante la amplificación por PCR del gen *aac(3) IV* y su posterior visualización por electroforesis.

4.8. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del gen de interés en la producción del metabolito secundario y en el fenotipo morfológico de la bacteria

Para la producción de AC, la cepa de *S. clavuligerus* transformada con el plásmido pIB139 y la cepa con la sobreexpresión del gen *bldD* se cultivaron de acuerdo con lo establecido por Ramírez-Malule (2018) [21]. Se tomaron muestras de 1 ml aproximadamente cada 24h, durante 6 días. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 12 min a 4°C. Los pellets se utilizaron para determinar la concentración de biomasa, mientras que 300 µL del sobrenadante de cada muestra se mezclaron con 100 µL de imidazol para la derivatización del AC. La mezcla se dejó reaccionar por 15 min (100 rpm y 28°C) y la reacción se detuvo congelando la mezcla por 15 min a -20°C. Posteriormente, la mezcla se filtró a través de una membrana de PTFE de 0,2 µm antes de analizar el AC por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando la cepa silvestre de *S. clavuligerus* transformada con el vector de expresión pIB139 como control.

Se evaluó el fenotipo morfológico al sembrar en medio GYM la cepa de control *S. clavuligerus* pIB139 con la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* durante 13 días. De manera cualitativa se comparó la formación de hifas aéreas y la esporulación de cada cepa.

4.8.1. Determinación de AC

El ácido clavulánico se cuantificó mediante cromatografía líquida (HPLC Agilent 1200), con las siguientes características: columna C18 XDB ZORBAX ECLIPSE - fase inversa agua milliQ, fase móvil compuesta por una solución de 94% v/v de KH₂PO₄ (50 mM, pH 3,2) y 6% v/v de metanol, flujo 0,7mL/min y una matriz de diodos detectores. El AC derivatizado se detectó a 311 nm [26].

4.8.2. Determinación de la biomasa

La medición de la biomasa se realizó por dos técnicas diferentes para la comparación de sus resultados:

- **Peso seco:** Los tubos eppendorf con los pellets se secaron a 105°C durante 24 horas antes de medir el peso seco de las células. Posteriormente, se lavaron los tubos eppendorf con agua destilada retirando la biomasa, y se secaron en las mismas condiciones para ser pesados y restar su peso.
- **Determinación de ADN en medio de cultivo:** Se calculó la concentración de la biomasa mediante la técnica de espectrometría para la determinación del ADN presente en el medio de cultivo, tomando como base una curva de calibración estándar de esperma de salmón. Se mezclaron 0,5 ml de cada una de las muestras de sobrenadante de caldo de cultivo de *S. clavuligerus* o de la solución de calibración con 0,5 ml de ácido perclórico 1 N, luego se sonicaron durante 15 minutos y se incubaron a 70°C durante 45 minutos, posteriormente se enfriaron en baño de hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 1500g durante 5 minutos a 4°C, después se mezclaron las muestras con 1 ml de reactivo de difenilamina (1,5g de difenilamina y 1,5ml de H₂SO₄ en 100ml de ácido acético glacial, antes de usar se adicionó 0,5 ml de acetaldehído al 1,96%). Finalmente, se incubaron las mezclas a 30°C durante 18 h y se midió su absorbancia a 599 nm [27].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Amplificación del gen *bldD* por PCR

Se usaron cebadores específicos para amplificar el gen *bldD* a partir del ADN genómico de *S. clavuligerus* ATCC27064. La Figura 1, muestra una banda de aproximadamente 500 pb obtenida por amplificación por PCR, que es consistente con el tamaño esperado (tamaño del gen 501 pb). El producto de PCR eluido, que exhibió el tamaño predicho, se ligó luego al vector de clonación TOPO-TA y se transfirió a células *E. coli* DH5 α mediante transformación. Después de la selección en medio LB sólido que contenía kanamicina (50 μ g / ml), se realizó la PCR de colonias usando cebadores específicos para *bldD*. Posteriormente, se extrajo el plásmido recombinante a partir de las colonias transformadas. El plásmido recombinante se denominó TOPO-*bldD*.

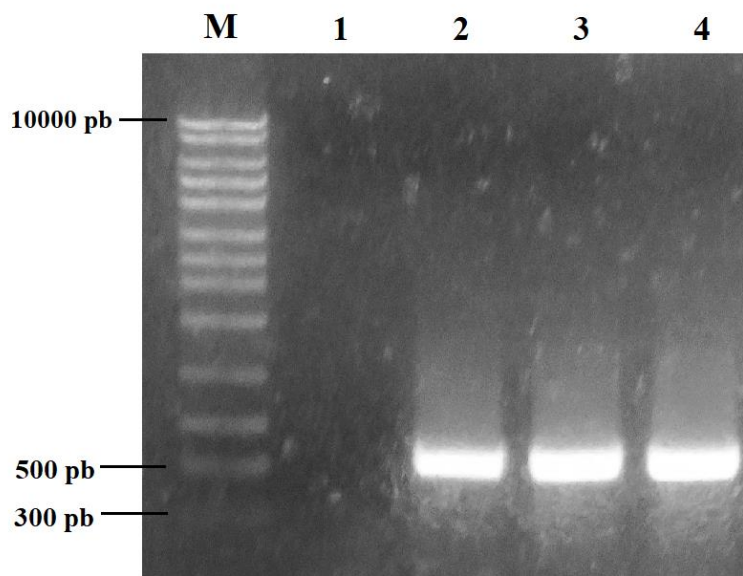


Figura 1. Visualización del gen *bldD* a partir de ADN genómico de *S. clavuligerus* ATCC27064 por electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador DM3100 Smobio®; Carril 1: Control negativo; Carril 2-4: Producto de PCR del gen *bldD* (501 pb).

La doble digestión con *NdeI* y *XbaI*, liberó el gen *bldD* de TOPO-*bldD* y linealizó el vector pIB139. Ambos fragmentos se purificaron en gel y se ligaron. Posteriormente, la ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron algunas posibles células recombinantes de placas de LB sólido que contenían 50 μ g / ml de apramicina. La verificación de la clonación del

gen *bldD* en pIB139 se realizó mediante PCR de colonia usando cebadores específicos para *bldD*. En la figura 2 se observa que se logró amplificar una banda de aproximadamente 500 pb para 7 colonias de *E. coli* evaluadas, lo cual concuerda con el tamaño del gen reportado para *bldD* (501 pb). Finalmente, al recibirse los resultados de la secuenciación del plásmido pIB139/*bldD*, se evidenció que la secuencia del gen *bldD* se mantuvo intacta.

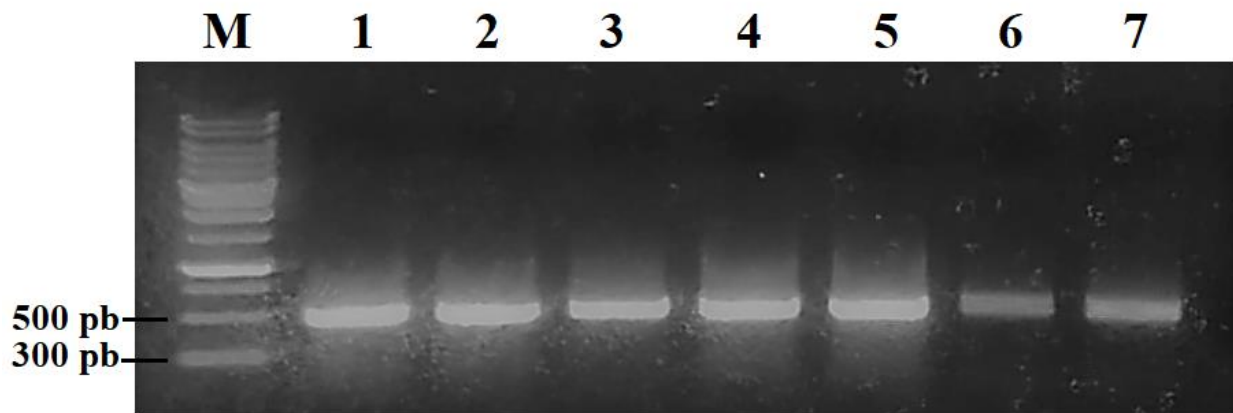


Figura 2. Visualización del gen *bldD* que se clonó en pIB139 en gel de agarosa al 1%. M: DM3100 Smobio®, Carril 1-7: fragmento de 501 pb del gen *bldD*

5.2. Transformación de *S. clavuligerus* con pIB139/*bldD*

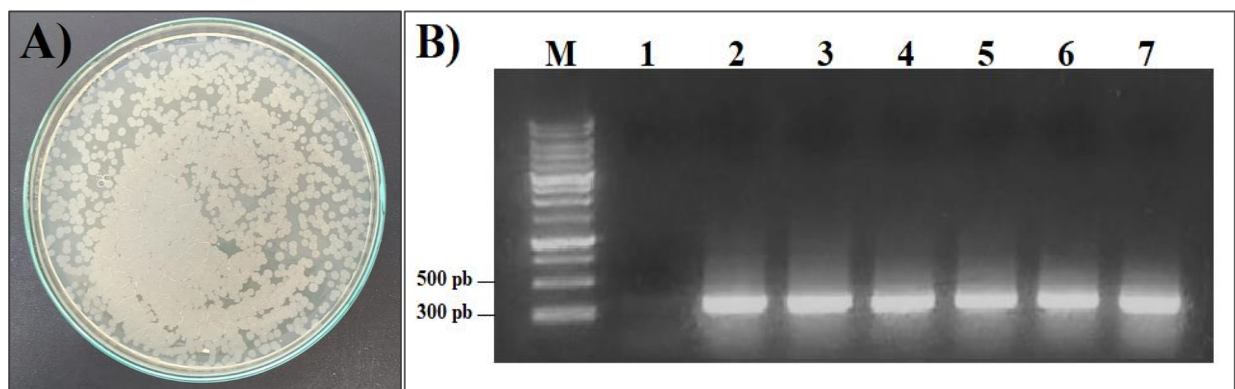


Figura 3. A) Protoplastos regenerados creciendo en medio R2YEG con 40 µ/ml de apramicina. B) Visualización del gen de resistencia a apramicina (*aac* (3) IV) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: DM3100 Smobio®; Carril 1: control negativo; Carril 2-7: fragmento de 310 pb del gen (*aac* (3) IV).

En la figura 3A, los protoplastos regenerados que lograron crecer en este medio fueron los que probablemente se transformaron con el plásmido pIB139/*bldD* cuyo ADN contiene el gen de resistencia a apramicina (*aac* (3) IV). Para verificar la integración del plásmido recombinante (pIB139 o pIB139/*bldD*) en el cromosoma de *S. clavuligerus*, se tomaron 6 colonias diferentes (ver Figura 3), a todas estas se le amplificó el gen *aac*(3) IV mediante PCR de colonia; en la Figura 3B se observan los resultados de la PCR por electroforesis, teniendo en cuenta que el fragmento de gen de resistencia a la apramicina contiene 310 bp, se puede validar que se obtuvo la cepa recombinante, *S. clavuligerus*/pIB139/*bldD*. *S. clavuligerus* / pIB139 se utilizará como cepa de control para evaluar el efecto del gen clonado (*bldD*) en la producción de AC sin considerar los efectos causados por la presencia de pIB139.

5.3. Efecto del gen de interés en la producción de ácido clavulánico

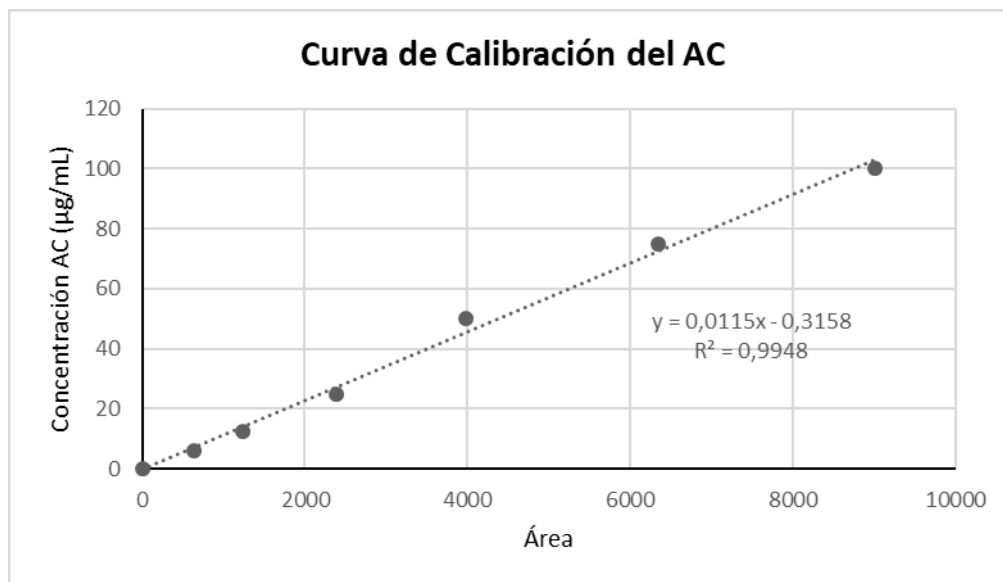


Figura 4. Curva de calibración del ácido clavulánico.

Con concentraciones conocidas de AC se creó una curva de calibración y se obtuvo su respectiva ecuación. Con base en la ecuación lineal, se calcularon las concentraciones de AC de las muestras tomadas para las cepas *S. clavuligerus* /pIB139 y *S. clavuligerus*/ pIB139/*bldD*. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de ácido clavulánico de la cepa de control *S. clavuligerus* /pIB139 y la cepa *S. clavuligerus*/ pIB139/*bldD*.

Tiempo (h)	Conc <i>S. clavuligerus</i> pIB139 (µg/mL)	Conc <i>S. clavuligerus</i> pIB139/ <i>bldD</i> (µg/mL)
48	0,530	2,254
72	0,350	57,261
93	89,050	187,505
117	126,011	174,833
139	150,151	133,608

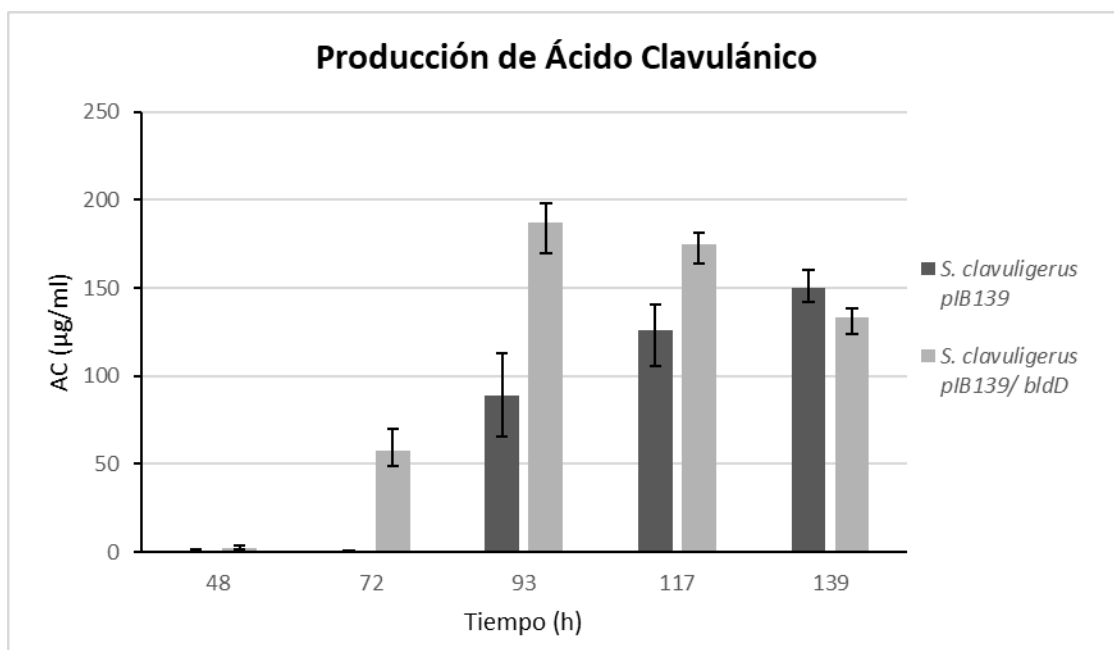


Figura 5. Comparación en el tiempo de la producción de AC entre la cepa de control *S. clavuligerus* pIB139 y la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD*.

En la Figura 5 se observa que la producción de AC durante las primeras 117 horas fue mayor en la cepa recombinada *bldD*, cuyo mayor pico de concentración de este metabolito secundario se presentó a las 93 h. Si se comparan los picos máximos de producción de la cepa de control y la de interés se puede observar que la producción de AC aumentó en 1,25 veces para la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD*, es decir, se observa un pico máximo aproximadamente un 25% mayor que el pico máximo de la cepa *S. clavuligerus* pIB139. Se tienen evidencias de que el gen *bldD*

activa la producción de antibióticos en otras especies de *Streptomyces* [29], lo cual es coherente con los resultados obtenidos al sobreexpresarse el gen *bldD* en *S. clavuligerus*.

A nivel cualitativo se observó un oscurecimiento de los cultivos de la cepa de control como de la cepa con sobreexpresión del gen, esto indica que las cepas se encontraban en una fase de muerte celular o estacionaria, debido a ello se detuvo la toma y medición de muestras a las 139 horas (día 6).

5.4. Efecto en la morfología

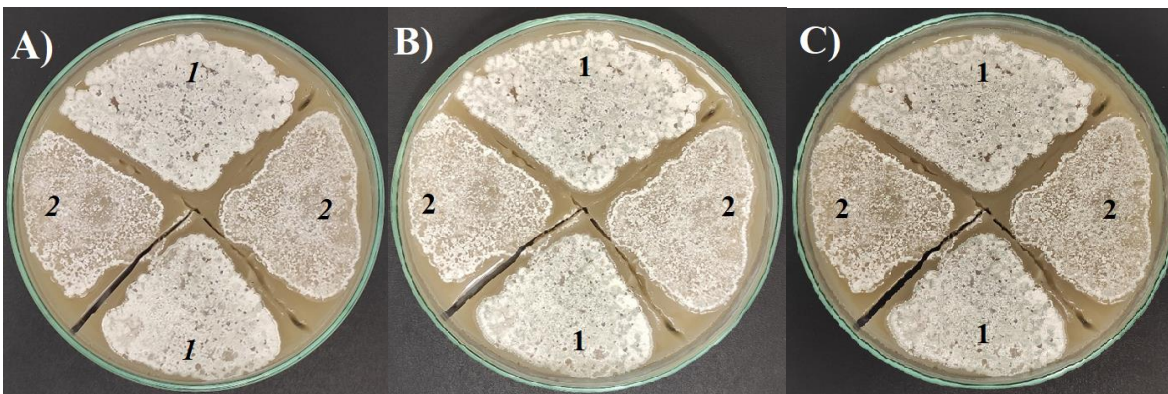


Figura 6. Comparación entre la morfología en medio TSA de la cepa de control (1) *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* y la cepa (2) *S. clavuligerus* pIB139 **A)** Después de 8 días de crecimiento. **B)** Después de 12 días de crecimiento. **C)** Después de 13 días de crecimiento.

En la figura 6 e imagen A) se observa que se presentó un color más blanco y/o una densidad mayor que se asocia a una mayor cantidad de micelio secundario en la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* que en la cepa *S. clavuligerus* pIB139; lo anteriormente mencionado coincide con la información que se tiene respecto a la funcionalidad del conjunto de genes *bld* en otras especies de *Streptomyces*, en la cual se indica que estos están asociados con la formación de hifas aéreas reproductoras que imparten una apariencia blanca borrosa a las colonias que lo contienen [30].

En las imágenes B) y C) se observa un color verdoso en las muestras, para ambas cepas, lo cual está relacionado a la esporulación. Se ha encontrado que en *S. roseosporus* la delección de *bldD* redujo notablemente la producción del antibiótico daptomicina, pero aumentó la esporulación [31];

esto podría indicar que, si se sobreexpresa este gen la esporulación sería menor en la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* respecto a la cepa de control, sin embargo, a nivel cualitativo no se observó una diferencia significativa entre la esporulación de las dos cepas cultivadas en el presente estudio.

En otro estudio, se evaluó la relación entre la diferenciación del micelio y la producción de antibióticos en otra especie de *Streptomyces*, en *S. coelicolor*; en esta se observó que la presencia de un micelio secundario, es decir, un micelio multinucleado con septos esporádicos que se desarrolla dentro de gránulos y a lo largo de la periferia, da lugar a una segunda fase de crecimiento, en la cual se produjeron dos antibióticos: undecilprodigiosina y actinorrodina, mientras que en el micelio primario estos dos no se produjeron [32]; este micelio secundario comprende el micelio aéreo y/o hifas aéreas. Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos en este estudio, puesto que con la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* se observó un mayor desarrollo de micelio aéreo y también se observó una mayor producción de ácido clavulánico respecto a la cepa de control *S. clavuligerus* pIB139.

5.5. Efecto en el crecimiento de la biomasa

➤ Por técnica de Determinación de ADN

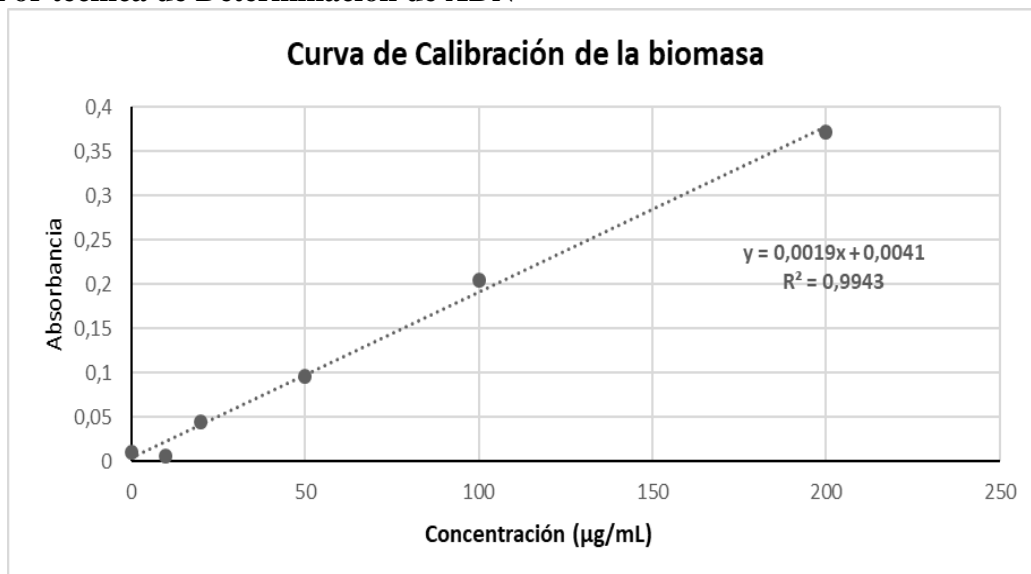


Figura 7. Curva de calibración para la determinación de ADN en muestras de esperma de salmón.

A partir de espermatozoides de salmón se creó curva de calibración y se obtuvo su respectiva ecuación. Con base en la ecuación lineal se calcularon las concentraciones de las muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de la biomasa por determinación de ADN de la cepa control y la cepa *S. clavuligerus* pIB139/bldD

Tiempo (h)	Conc <i>S. clavuligerus</i> pIB139 (µg/mL)	Conc <i>S. clavuligerus</i>
48	12,228	30,825
72	15,737	31,000
93	59,070	32,053
117	47,316	25,912
139	43,632	29,246

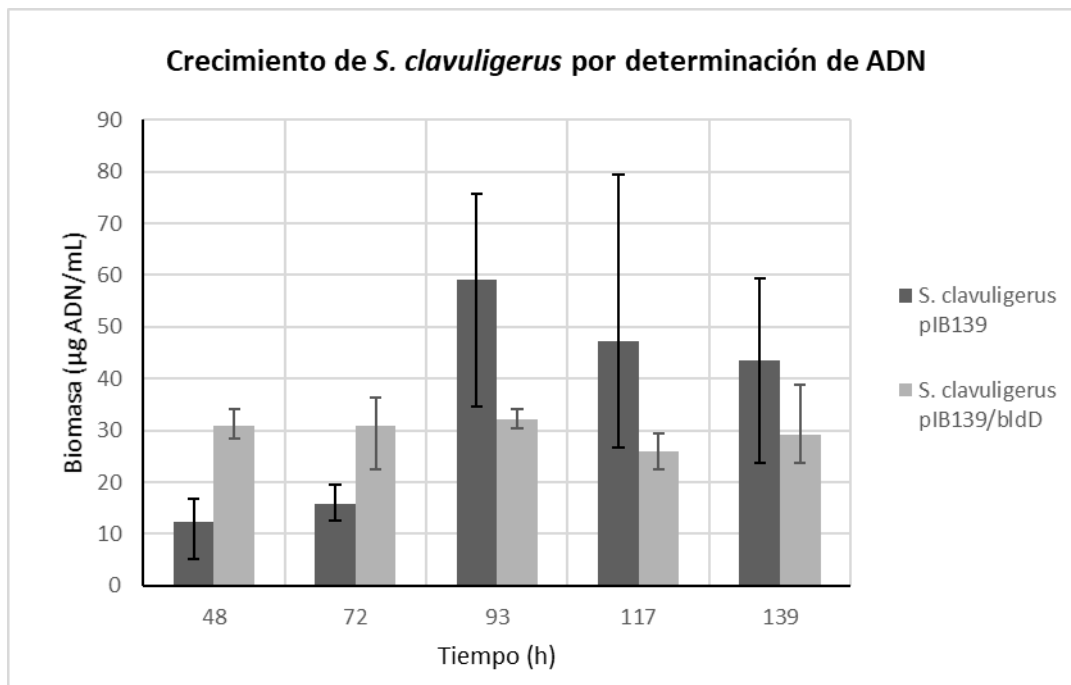


Figura 8. Gráfico de crecimiento de la biomasa por técnica de determinación de ADN por espectrometría.

Para la cepa *S. clavuligerus* pIB139/bldD no se presentó un aumento importante de la biomasa, ya que esta se mantiene a una concentración entre 22 y 32 µg/mL durante las 139 horas de medición (ver figura 8). Para la cepa de control sí se observa un crecimiento típico de la biomasa, cuya fase exponencial se logra entre las 48 y 93 horas, y cuyo pico máximo de crecimiento se obtiene a las

93 horas. Esto indica que la sobreexpresión del gen *bldD* podría dificultar el crecimiento de la bacteria y/o reproducción.

Se ha encontrado que *bldD* activa directamente dos genes reguladores globales en *Streptomyces*; *adpA* y *afsR*; esta última proteína ha actuado como activador en la producción de un antibiótico en la especie *S. roseosporus*, pero también ha actuado como represor del desarrollo [29], en este mismo estudio se encontró que el *bldD* reprime directamente nueve genes clave del desarrollo. Esto concuerda con los resultados hallados al determinar la concentración de ADN presente en cada una de las etapas de crecimiento de la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD*.

➤ Determinación por Peso Seco:

Tabla 3. Peso de la biomasa de cepas *S. clavuligerus* pIB139 y *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* por técnica de peso seco.

Tiempo (h)	Conc <i>S. clavuligerus</i> pIB139 (µg/ml)	Peso <i>S. clavuligerus</i> pIB139 / <i>bldD</i> (µg/ml)
48	26700	33933
72	26067	20500
93	33367	19933
117	30400	18533
139	20467	17033

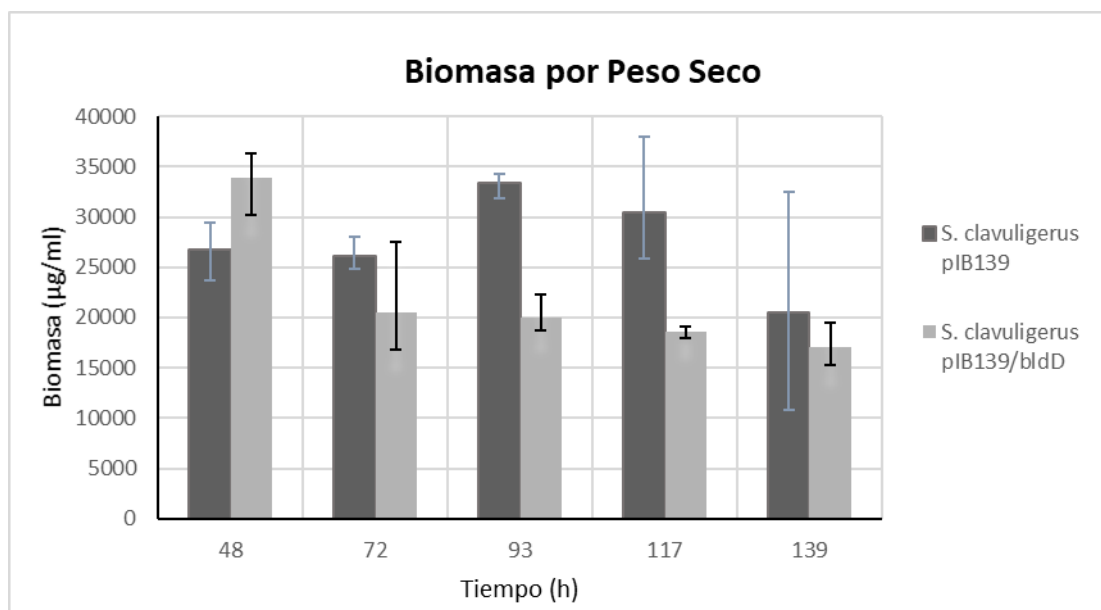


Figura 9. Gráfico de crecimiento de la biomasa por técnica de peso seco.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de peso seco no son concluyentes, puesto que no se observan las fases de crecimiento, además, la soya adicionada al medio tiende a no disolverse bien, por lo que se cree que ello pudo haber interferido con los resultados de esta prueba. Sin embargo, los valores de las concentraciones (15000-35000 $\mu\text{g/ml}$) tienen un orden de magnitud coherente al encontrado en la bibliografía, de 0-90000 $\mu\text{g/ml}$ [30]; esta diferencia de concentración se puede deber a que por el método de peso seco se determina la biomasa, mientras que por la técnica de determinación de ADN sólo se determina la concentración de esta macromolécula.

Por otro lado, las bacterias del género *Streptomyces* se caracterizan por su desarrollo multicelular complejo, en el que sus esporas en germinación forman hifas, con micelio aéreo multinuclear, que forma septos a intervalos regulares, creando una cadena de esporas no nucleadas [31]. Es por ello que el método de determinación de ADN por medición de turbidez con el espectrofotómetro es una técnica más precisa y apropiada para correlacionar los valores obtenidos con el crecimiento celular.

6. CONCLUSIONES

Se generó un organismo recombinante de la cepa salvaje *S. clavuligerus* ATCC27064 al sobreexpresarse el gen regulador global, *bldD*. La clonación se pudo validar mediante secuenciación y por métodos de ingeniería genética como la PCR y la técnica de electroforesis; la cepa *S. clavuligerus* pIB139/*bldD* permitió estudiar el efecto del gen sobre la producción del AC, donde se observó una mayor producción del AC comparado con el control durante las primeras fases de crecimiento de las células, estos resultados son promisorios y podría indicar que el gen *bldD* favorece la producción de este metabolito secundario, ejerciendo un efecto regulador en la regulación de genes relacionados con la biosíntesis del AC. Asimismo, se evaluó el efecto de *bldD* en la morfología de *S. clavuligerus*, y se observó que su sobreexpresión está asociada con la formación de hifas aéreas, debido su apariencia blancuzca y borrosa; estos resultados coincidieron con los encontrados en otras especies de *Streptomyces*, en los cuales se ha encontrado que la producción de micelio aéreo está asociada con la producción de antibióticos.

Al estudiar el crecimiento de la biomasa, se encontró que de los dos métodos elegidos para su evaluación, el método de peso seco a pesar de ser el más usado, este no fue adecuado para esta especie en el medio usado, por lo que no se obtuvieron resultados concluyentes. Por el método de determinación de ADN se encontró un mayor crecimiento celular en la cepa control *S. clavuligerus* pIB139, ello podría sugerir que el gen *bldD* puede tener un efecto negativo en el crecimiento de la bacteria.

Finalmente, a pesar de que los resultados son promisorios, se requiere realizar más estudios que evalúen la producción de AC durante un periodo más largo, así como el crecimiento de la biomasa de la bacteria recombinante.

7. REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, WHO Report on Surveillance. (2018).
- [2] SALVO, Francisco; DE SARRO, Angelina; CAPUTI, Achille y POLIMENI, Giovanni. “Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate: a safety review,” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 8, no. 1, (2009) pp. 111–118.
- [3] SAUDAGAR, Parag; SURVASE, Shrikant y SINGHAL, Rekha. “Clavulanic acid: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 4, (2008); pp. 335–351.
- [4] COSTA, Cecilia y BADINO, Alberto. “Overproduction of clavulanic acid by extractive fermentation,” *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 3. (2015) pp. 154–160.
- [5] AHARONOWITZ, Yair y DEMAINE, Arnold. “Carbon Catabolite Regulation of Cephalosporin Production in *Streptomyces clavuligerus*,” vol. 14, no. 2, (1978); pp. 159–164.
- [6] LEITE, Carla; CAVALLIERI, André; BAPTISTA, Amanda y ARAUJO, Maria. “Dissociation of cephamycin C and clavulanic acid biosynthesis by 1,3-diaminopropane in *Streptomyces clavuligerus*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 363, no. 1, (2015) pp. 1–7.
- [7] OZCENGIZ, Gulay y DEMAINE, Arnold. “Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, (2013). pp. 287–311.
- [8] FENGJUAN, Lu; YANYAN, Hou; HEMING, Zhang; YOWEN, Chu; HAIYANG, Xia y YONGQIANG, Tian. Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *3 Biotech*, 7(4). (2017). doi:10.1007/s13205-017-0875-6.
- [9] SAMBROOK, Joseph y RUSSELL, David William. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd. ed). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, (2001).

[10] ELLIOT, Marie y TALBOT, Nicholas. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr Opin Microbiol*, 7 (2004), pp. 594-601.

[11] ROMERO-RODRÍGUEZ, Alba; ROBLEDO-CASADOS, Ivonne y SÁNCHEZ, Sergio. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8). (2015). Pp. 1017–1039. doi:10.1016/j.bbagrm.2015.06.007.

[12] LÓPEZ-AGUDELO, Victor; GÓMEZ-RÍOS, David y RAMIREZ-MALULE, Howard. Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*: Insights from Systems Biology, Strain Engineering, and Downstream Processing. *Antibiotics (Basel)*. (2021) Jan 18;10(1):84. doi: 10.3390/antibiotics10010084. PMID: 33477401; PMCID: PMC7830376.

[13] FERGUSON, Nicole.; PEÑA-CASTILLO, Lourdes.; MOORE, Marcus; BIGNELL, Dawn y TAHLAN, Kapil. Proteomics analysis of global regulatory cascades involved in clavulanic acid production and morphological development in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2016), 43, pp. 537–555. [CrossRef] [PubMed].

[14] DEN HENGST, Chris; TRAN, Ngat; BIBB, Maureen; CHANDRA, Govind; LESKIW, Brenda y BUTTNER, Mark. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of *BldD* during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 78(2). (2010). pp. 361–379. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07338.x.

[15] Schumacher, M. A., Zeng, W., Findlay, K. C., Buttner, M. J., Brennan, R. G., & Tschowri, N. (2017). The *Streptomyces* master regulator BldD binds c-di-GMP sequentially to create a functional BldD2-(c-di-GMP)₄ complex. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6923–6933. doi:10.1093/nar/gkx287

[16] MARTIN, Juan; SANTOS-BENEIT, Fernando; SOLA-LANDA, Alberto y Liras, “Cross-talk of global regulators in *Streptomyces actinobacteria* in soil and other habitats ; the,” in Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria, (2016) pp. 257–267.

[17] Douglas, A. C. , Smith, A. M. , Sharifpoor, S. , Yan, Z. , Durbic, T. , Heisler, L. E. , ... Andrews, B. J. (2012). Functional analysis with a barcoder yeast gene overexpression system. *G3* (Bethesda), 2, 1279–1289

[18] Prelich, G. Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, (2012). 190, 841–854.

[19] Brown, T. A. Gene cloning and DNA analysis: An introduction. Hoboken: Wiley-Blackwell. Chicago. (2010). (6th ed.).

[20] ELLIOT, Marie ; LOCKE, Troy ; GALIBOIS, Claire y LESKIW, Brenda. BldD from *Streptomyces coelicoloris* a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1). (2003). pp. 35–40. doi:10.1016/s0378-1097(03)00474-9.

[21] RAMIREZ-MALULE, Howard; JUNNE, Stefan; CRUZ-BOURNAZOU, Nicolás; NEUBAUER, Peter y RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. “*Streptomyces clavuligerus* shows a strong association between TCA cycle intermediate accumulation and clavulanic acid biosynthesis,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 9. (2018). pp. 4009–4023.

[22] ÁVILA, Nuria. Efecto de reguladores específicos y reguladores globales en la biosíntesis de antibióticos de *Streptomyces clavuligerus*. Universidad de León (2016)

[23] The National Center for Biotechnology Information. En línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

[24] Britain, G. Formation and Reversion of Streptomyces Protoplasts : Cultural Condition and Morphological Study. 389–400 (1974).

[25] By, G. T. I. L. L. I. N. G., Peberdy, I. D. N. A. N. D. J. F., Sussex, W. & Sqt, B. N. Protoplast Isolation and Regeneration in *Streptomyces clavuligerus*. 2289–2291 (1989).

[26] LIRAS, Paloma y MARTIN, Juan. “Assay Methods for Detection and Quantification of Antimicrobial Metabolites Produced by *Streptomyces clavuligerus*,” vol. 18, no. 1. (2005). pp. 149–163.

[27] Zhao, Y., Xiang, S., Dai, X., & Yang, K. (2013). A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 5069–5077. doi:10.1007/s00253-013-4893-y

[28] Schumacher, M. A., Zeng, W., Findlay, K. C., Buttner, M. J., Brennan, R. G., & Tschowri, N. (2017). The *Streptomyces* master regulator BldD binds c-di-GMP sequentially to create a functional BldD2-(c-di-GMP)₄ complex. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6923–6933. doi:10.1093/nar/gkx287

[29] Yan, H., Lu, X., Sun, D., Zhuang, S., Chen, Q., Chen, Z., ... Wen, Y. (2019). BldD, a Master Developmental Repressor, Activates Antibiotic Production in Two *Streptomyces* Species. *Molecular Microbiology*. doi:10.1111/mmi.14405

[30] Carneiro-da-Cunha, M. das G., Lima Filho, J. L. de, & Campos-Takaki, G. M. de. (2002). Protoplast formation and regeneration from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 and clavulanic acid production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4), 347–351. doi:10.1590/s1517-83822002000400014

[31] De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. doi:10.1016/j.bjid.2012.08.014

[32] Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P., & Sanchez, J. (2008). Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3877–3886. doi:10.1128/aem.02715-07