



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**Evaluación de la expresión de proteínas extracelulares en una cepa de
STREPTOMYCES LIVIDANS con crecimiento disperso**

TESIS

Que para obtener el título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

Presenta

ROSA NIZAIBÁ MARÍN LÓPEZ

Director de tesis: Dr. Luis Servín González

Asesores de tesis : Dra. Raquel Retana Ugalde y Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Realizada en

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

CDMX

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer profundamente al doctor Luis Servín González por recibirme en su laboratorio, por la paciencia, el tiempo, por guiarme y apoyarme en la terminación de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por el apoyo técnico y consejos en el área experimental.

A los compañeros de laboratorio que me brindaron su ayuda y conocimientos.

Al programa del Instituto de Investigaciones Biomédicas “La producción de biomoléculas de interés biomédico en microorganismos” por el apoyo financiero a este proyecto, lo que permitió abrirme las puertas al conocimiento en diferentes áreas.

A los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por compartir sus conocimientos para mi formación profesional.

A mis amigos que siempre me dan ánimos para continuar.

A mi madre y a mi padre que siempre me han apoyado en todas mis decisiones, que han dado todo de sí mismos para brindarme a construir mi camino.



1.	<i>Introducción</i>	5
2.	<i>Marco Teórico</i>	7
	2.1 Características.....	7
	2.2 Mecanismos de secreción/excreción.....	7
	2.3 Características de <i>S. coelicolor</i>	8
	2.4 Características de <i>S. lividans</i>	9
	2.5 Relación filogenética entre <i>S.coelicolor</i> y <i>S.lividans</i>	10
	2.6 Ciclo de vida en medio solido y líquido.....	10
	2.7 Problemática de cultivos líquidos en la industria.....	11
	2.8 Genes involucrados en los fenotipos dispersos.....	12
3.	<i>Planteamiento del problema</i>	14
4.	<i>Hipótesis</i>	15
5.	<i>Objetivos</i>	15
	5.1 Objetivo general.....	15
	5.2 Objetivos particulares.....	16
6.	<i>Diseño experimental</i>	16
	6.1 Tipo de estudio.....	16
	6.2 Universo de estudio.....	16
	6.3 Criterios de inclusión:.....	16
	6.4 Criterios de exclusión:.....	17
	6.5 Variables.....	17
	6.6 Análisis estadístico.....	17
7.	<i>Material</i>	18
	7.1 Material biológico.....	18
	7.2 Reactivos.....	20
	7.3 Materiales.....	21
	7.4 Equipos.....	22
7.	<i>Métodos</i>	23
	8.1 Obtención de esporas de <i>S. lividans</i>	25
	8.2 Transformación de células competentes por electroporación.....	25



8.3	Conjugación	26
8.4	Réplica	27
8.5	Confluentes y cultivo de esporas	28
8.6	Minipreparaciones de DNA	29
8.7	Digestión	32
8.8	PCR punto final	33
8.9	Comparación del fenotipo entre la cepa de <i>S. lividans</i> silvestre y la cepa mutante <i>S. lividans D125G</i>	34
8.9.1	Transformación por protoplastos	35
8.9.2	Medición de actividad de lipasa extracelular	36
9.	Resultados	38
9.1	Construcción de una cepa de <i>S. lividans</i> con la mutación D125G.....	38
9.2	Fenotipo de sedimentación de <i>S. lividans</i> silvestre y <i>S. lividans D125G</i>	40
9.3	Actividad de lipasa extracelular en <i>S. lividans</i> TK24 silvestre y <i>S. lividans</i> TK24D125G	41
10.	Discusión de Resultados.....	46
11.	Conclusión.....	51
12.	Perspectivas.....	51
13.	Referencias	52
14.	Anexos	55



1. Introducción

Streptomyces es un actinomiceto o actinobacteria con un ciclo de vida complejo. Los miembros de este género son bacterias miceliales, Gram-positivas y aerobias estrictas ¹. Este género es considerado uno de los grupos más importantes en la industria ya que son responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos utilizados tanto en clínica como en agricultura².

Se ha estudiado ampliamente a la especie *Streptomyces coelicolor*, que es el estreptomiceto modelo y el miembro genéticamente mejor estudiado del género. Sin embargo, su crecimiento micelar representa un obstáculo para su cultivo en medio líquido, debido a la formación de cúmulos comprimidos (conocidos en inglés como “pellets”) originados por el enredo de las hifas, limitando la entrada de nutrientes en el interior. La formación de estos cúmulos afecta la producción de enzimas extracelulares puesto que disminuye el área expuesta de las hifas al medio de cultivo ³.

Así mismo, el crecimiento micelar ha sido el principal impedimento para los estudios fisiológicos de *Streptomyces*, debido a su inestabilidad o variabilidad de los caracteres morfológicos y fisiológicos relacionados con la diferenciación en cultivos sumergidos ^{2,4}. Dando paso con esto, al desarrollo de métodos experimentales que permitieran examinar la influencia de diferentes condiciones de cultivos para *Streptomyces*, tomando como modelo los procesos empleados en diferentes microorganismos igualmente filamentosos como las especies fúngicas ². De la misma forma se ha demostrado que los parámetros de crecimiento de los estreptomicetos filamentosos son similares a los microorganismos unicelulares ⁴. Entre las diversas técnicas que se han empleado se tienen evidencias



que, bajo la limitación de nutrientes el micelio en crecimiento se fracciona continuamente⁵, el uso de resortes de acero inoxidable en el matraz permite el crecimiento difuso⁶, la selección prolongada en cultivos continuos en quimiostato⁴, procesamiento por lotes que implica una pregerminación en medio rico⁷, el efecto del empleo de polianiones de alto peso molecular en los medios de crecimiento como Carbopol y Junlon PW110 para promover el crecimiento disperso, debido a que estos polímeros inducen un impulso electrostático entre las células, evitando de esa forma la agregación de esporas y el posterior agrupamiento de micelios en cultivos sumergidos². De esta forma, el compromiso de lograr una mejora para el estudio de esta especie ha ido evolucionando, empleando estrategias diversas como el control genético, diversos inductores químicos, entre otros.

En el presente trabajo se desea introducir a la especie *Streptomyces lividans* una mutación obtenida en *S. coelicolor* aprovechando su estrecha relación filogenética⁸. En un trabajo previo se obtuvo en *S. coelicolor* una mutación en la región codificante del gen sco5282, ocasionando una sustitución del ácido aspártico en la posición 125 de la secuencia de la proteína por una glicina (D125G). Esto se realizó por un método de selección empleado en una técnica de sedimentación anteriormente aplicada de forma contraria en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁹.

El amplio estudio del genoma de *S. coelicolor* reveló que todas las especies estudiadas de esta bacteria, comparten un sólo cromosoma lineal, dando paso a la construcción de una enciclopedia ordenada de clones de cósmidos superpuestos para todo el cromosoma¹⁰. Este hecho es de gran importancia debido a que la mutación D125G se



encuentra en el gen sco5282 que a su vez forma parte del cósmido StCB12, el cual se encuentra en la librería de clones de *S. coelicolor*². Esta mutación se verá reflejada en la morfología y fisiología de *S. lividans* en cultivos líquidos.

2. Marco Teórico.

2.1 Características.

Streptomyces es un género perteneciente a las Actinobacterias. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, sobre todo en el suelo. Produce compuestos que son responsables del olor característico a tierra húmeda, atribuido a la producción de geosmina terpenoide aromática. Son bacterias miceliares Gram-positivas aerobias estrictas¹. Se utilizan comercialmente en la producción de productos naturales como antibióticos, agentes anticancerígenos, inmunosupresores, así como enzimas industriales¹¹.

2.2 Mecanismos de secreción/excreción

Streptomyces cuenta con dos mecanismos de secreción de proteínas. La primera es la ruta Sec, una vía esencial empleada por la gran mayoría de las proteínas que van a ser translocadas a través de la membrana citoplasmática¹². Es caracterizada por ser una vía que transporta proteínas no plegadas por medio de un poro de tamaño fijo para lograr el transporte a través de la membrana. Estas proteínas contienen un péptido señal en su extremo amino terminal, el cual ayuda a dirigir las proteínas para su posterior secreción. Se encuentra mediada por dos procesos de secreción, el primero se encuentra acoplado



a la traducción (cotraduccional) y el segundo es independiente de ésta (postraduccional)
13,14 .

El segundo sistema de secreción es denominado Tat, del inglés Twin arginine translocation. Es una vía de secreción de proteínas sumamente importante en bacterias Gram positivas con un alto contenido de G+C, como *Streptomyces*¹⁵. Se caracteriza por transportar proteínas ya plegadas a través de la membrana citoplasmática¹⁵. En su extremo amino terminal éstas proteínas contienen un péptido señal con una región N más larga de lo común (una de las tres regiones que constituyen la estructura de un péptido señal N, H y C), además contiene una región H menos hidrofóbica y la presencia de dos argininas consecutivas en la unión de las regiones N y H del péptido señal Tat, las cuales se ha comprobado que son indispensables para el transporte del sustrato Tat¹⁶.

2.3 Características de *S. coelicolor*.

Se ha estudiado ampliamente a la especie *S. coelicolor*, siendo el estreptomiceto modelo y la especie genéticamente mejor estudiada del género³. Posee un sólo cromosoma lineal de 8.7 Mpb, dando paso a la construcción de una enciclopedia ordenada de clones de cósmidos superpuestos para todo el cromosoma^{10, 17}. Tiene un alto contenido, (72.12%) de guanina y citosina (G+C) en su ADN genómico³; su cromosoma se encuentra presente en múltiples copias en los compartimentos de los micelios vegetativos y aéreos. Sin embargo, se encuentra como una sola copia en las esporas¹⁸. La secuencia de su genoma se encuentra disponible desde el año 2001, está compuesto



por un cromosoma lineal grande con un origen de replicación localizado en el centro (*oriC*) y en ambos extremos largas regiones invertidas. En la región central del cromosoma se localizan los genes esenciales y de mantenimiento implicados en la biosíntesis de macromoléculas (el metabolismo primario y la división celular) mientras que en los extremos del cromosoma se encuentran genes de mayor variabilidad relacionados con el metabolismo secundario y la síntesis de enzimas hidrolíticas, albergando genes característicos de cada especie. El mapa del genoma muestra 7,825 posibles genes que probablemente se encuentren relacionados con la reacción de supervivencia y la competencia con el ambiente del suelo^{17,18,19}.

2.4 Características de *S. lividans*.

Dentro de las especies de *Streptomyces*, el genoma de *S. lividans* es muy similar al de *S. coelicolor*, ya que son especies muy cercanas. *S. lividans* no es considerada una especie patógena para los humanos y no se ha descrito la formación de cuerpos de inclusión en su citoplasma, lo que quiere decir que las proteínas expresadas no se acumulan en el citoplasma. Una ventaja que presenta *S. lividans* es que posee un sistema relativamente ineficiente de restricción-modificación y una actividad de proteasas endógenas limitada, permitiendo que sea más fácil su manipulación genética en su empleo como bacteria anfitriona en la producción de proteínas citoplasmáticas y de secreción tanto homólogas y heterólogas. Por lo anterior se considera importante a nivel industrial por su habilidad natural para secretar altos niveles de proteínas activas directamente al caldo de cultivo^{19, 20}.



2.5 Relación filogenética entre *S.coelicolor* y *S.lividans*.

S. coelicolor es el modelo de estreptomiceto preferido para estudiar la síntesis y diferenciación de antibióticos, mientras que *S. lividans* se considera casi exclusivamente como el huésped preferido, entre los actinomicetos, para la clonación y expresión de ADN exógeno ²¹.

La secuencia de los genomas de *S. coelicolor* A3 y de *S. lividans* muestra que tienen una relación filogenética muy estrecha ⁸. La homología de su secuencia se debe a que presentan un mismo origen evolutivo ²². Por lo tanto, el análisis informático de NCBI (National Center for Biotechnology Information) determina una similitud de las secuencias de nucleótidos entre los genes *sli5577* y *sco5282* de un 99.91% y para la región del cósmido StCB12 un 99.57%.

2.6 Ciclo de vida en medio sólido y líquido.

El género *Streptomyces* cuenta con un ciclo de vida complejo en donde muestra un crecimiento filamentosos a partir de esporas individuales, dando lugar a una red de hifas multinucleadas ramificadas. Su crecimiento es diferente en medio líquido y en sólido, en éste último al germinar las esporas desarrollan un micelio vegetativo compartimentado (MI), éste sufre de una muerte celular programada (PDC), los segmentos viables restantes crecen como un micelio multinucleado (MII) al que le sigue una segunda PDC, diferenciándose en micelio aéreo, finalmente parte de estas hifas forman cadenas de esporas unigenómicas. En cultivos sumergidos, la espora después de germinar desarrolla también un MI, dando lugar a hifas ramificadas que producen grandes



agregados o cúmulos. Sufren de una PCD en el centro del cúmulo y en la periferia de los cúmulos se hace presente el desarrollo del MII, el cual se encarga de la producción de metabolitos secundarios ²³.

2.7 Problemática de cultivos líquidos en la industria.

Desde la perspectiva industrial el crecimiento de pellets no es deseable, debido a problemas de transferencia de masa, crecimiento lento y heterogeneidad del cultivo ²⁴. Debido a que los pellets restringen la transferencia eficiente de nutrientes y gases al centro, se ve reducido el rendimiento máximo obtenible del producto ²⁵

Los cultivos líquidos se emplean para la producción de diversos metabolitos bioactivos, sin embargo, los agregados heterogéneos que se encuentran presentes, desde partículas fragmentadas hasta pellets de varios milímetros de diámetro, así como también los pellets de estructuras grandes que dan como resultado caldos muy viscosos, son indeseables desde el punto de vista de la producción ^{26, 27}. La morfología varía de una especie a otra según la composición genética ya que muchos genes y mecanismos fisiológicos se encuentran involucrados en su desarrollo morfológico particular. Además, en las diferentes condiciones en el cultivo, la tasa de crecimiento y la morfología se ven afectadas según la composición del medio de crecimiento, el pH, la temperatura, la intensidad de la mezcla, la concentración de oxígeno disuelto y el inóculo. Por lo tanto, el control de la morfología es un elemento clave para la optimización de las fermentaciones industriales ^{28, 29}.



Como la productividad y los costos de fermentación se ven fuertemente afectados por la morfología, se han elaborado modelos para el crecimiento micelial de hongos filamentosos. En el caso de *Streptomyces* su morfología se determina por la eficiencia de la germinación, la tasa de extensión de la punta de las hifas, el grado de ramificación y en especial la fragmentación de las hifas ^{27, 30}.

2.8 Genes involucrados en los fenotipos dispersos.

Desde la secuenciación del genoma se ha discutido si la formación de pellets y cúmulos son fundamentales o no para la producción de metabolitos secundarios y la producción de antibióticos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la clave de la activación, para la producción de metabolitos secundarios en cultivos líquidos de *Streptomyces*, es la diferenciación del MII ²³. Es de suma importancia analizar los efectos de los cambios morfológicos de los cultivos ya que el proceso suele variar dependiendo de los productos que se deseen obtener. Como el caso de la undecilprodigiosina, antibiótico beneficiado por un crecimiento fragmentado, mientras que por otro lado existen productos como la actinorrodina, la cual su producción es más eficiente cuando el cultivo presenta formaciones de grupos ^{27, 31}. El crecimiento de cúmulos se utiliza en la producción de antibióticos, sin embargo, para una producción eficiente de enzimas se hace uso de las estelas miceliales ya que es más fácil para los nutrientes acceder a todas las hifas ³².

Entre los estudios se encuentra que la fragmentación de las hifas determina el tamaño del cúmulo micelial, siendo directamente proporcional a la frecuencia de la separación



de las hifas vegetativas, lo cual demuestra que la morfología del micelio en cultivo líquido es determinada por el nivel de expresión de SsgA. Su sobreexpresión da como resultado un crecimiento fragmentado y un aumento en la producción de enzimas extracelulares demostrado mediante ensayos de actividad de tirosinasa ^{27, 30, 31}.

Otro estudio de fenotipo disperso se encuentra asociado con un tipo de mutación designado Mat (agregación miceliar), donde los genes *matA* y *matB* se encuentran involucrados en la formación de cúmulos. Entre sus actividades se encuentra que codifican la síntesis de polisacáridos, cumplen con una función similar a la de las enzimas encargadas de la adherencia y la formación de biopelículas en otras bacterias. Las mutantes obtenidas de la delección de estos genes mostraron una mayor dispersión y una disminución tanto de tamaño como de agregación, así como también la tasa de crecimiento y la productividad enzimática de la mutante Δ matAB se observó incrementada en más del 60% en comparación con la cepa silvestre ^{24, 26}.

También se ha estudiado el gen *csIA* que codifica una proteína similar a la celulosa sintasa, responsable de la síntesis de β -glucano que contiene polisacáridos, los cuales conforman la matriz extracelular y por lo tanto confiere integridad a la punta de las hifas. La delección del gen *csIA* produce una ausencia de esta proteína, este hecho genera que el micelio tenga una morfología de crecimiento más disperso en medio líquido ^{33, 34}.

Se ha descrito otro fenotipo disperso en *S. coelicolor* que consta de una mutación puntual que sustituye un aspartato por glicina en el dominio HAMP de una cinasa en un sistema de dos componentes, sco5282-sco5283 (sco5282 D125G). Muestra modificaciones en



el metabolismo además de encontrarse genes reprimidos, involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, como *matB*, *clsA* y *glxA*⁹. Sin embargo, se desconoce si los niveles de expresión de este sistema de dos componentes son eficientes ya que la presencia de proteínas plegadas incorrectamente puede interferir considerablemente con la maquinaria de secreción que exporta las proteínas secretoras maduras fuera de la célula debido a que únicamente las proteínas plegadas adecuadamente que lleguen al espacio extracelular tienen una conformación completamente activa³⁵.

3. Planteamiento del problema

S. lividans es empleada como bacteria anfitriona en la producción de proteínas citoplasmáticas y de secreción tanto homólogas como heterólogas, por lo que se considera importante a nivel industrial por su habilidad natural para secretar altos niveles de proteínas activas directamente al caldo de cultivo.

Desde la perspectiva industrial el crecimiento del micelio en forma de pellets no es atractivo, debido a problemas de transferencia de masa, crecimiento lento y heterogeneidad del cultivo. Esta formación de cúmulos en crecimiento sumergido afecta la producción de enzimas extracelulares, puesto que disminuye el área expuesta de las hifas al medio de cultivo restringiendo la transferencia de nutrientes y gases. Además, las diferentes condiciones en el cultivo, la tasa de crecimiento y la morfología se ve afectada según la composición del medio de crecimiento, el pH, temperatura, intensidad de la mezcla, concentración de oxígeno disuelto y el inóculo.



Por lo que el control de la morfología es un elemento clave para la optimización de las fermentaciones industriales.

El rendimiento de productos extracelulares en cultivos sumergidos se podría aumentar con la regulación en la formación de cúmulos. Estudios han demostrado que un crecimiento disperso y fragmentado intensifica la producción de enzimas extracelulares. Por lo que la obtención de una cepa mutante de *S. lividans* TK24 con sustitución del gen sli5577 por sco5282-D125G demostrará un cambio más disperso en los cúmulos de este género, esta morfología dispersa beneficiará la producción de enzimas extracelulares.

4. Hipótesis

Si la mutante D125G en el gen sco5282 de *S. coelicolor* produce un fenotipo disperso entonces se podrá utilizar su estrecha relación filogenética para introducir la mutación D125G en *S. lividans* TK24. Si en *S. lividans* D125G se observa un fenotipo disperso, las hifas tendrán mayor área expuesta en cultivos sumergidos y por lo tanto un mayor rendimiento en la producción de enzimas extracelulares.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la mutación D125G en la cinasa codificada en el gen sli5577, sobre la productividad de lipasa extracelular por *S. lividans*.



5.2 Objetivos particulares

- Comparación del cromosoma de *S. lividans* con el de *S. coelicolor* en la región comprendida en el cósmido StCB12 así como los genes homólogos sco5282 y sli5577.
- Utilización del cósmido StCB12 con la mutación sco5282-D125G para obtener derivados de *S. lividans* TK24 con la mutación D125G.
- Comprobar que el crecimiento en medio líquido de las mutantes D125G de las cepas TK24 es disperso con respecto a *S. lividans* silvestre TK24.
- Utilización del plásmido pB104 derivado de pIJ6021, con un alto número de copias, para sobre expresar una lipasa extracelular en ambas cepas.

6. Diseño experimental

6.1 Tipo de estudio

Estudio: comparativo

6.2 Universo de estudio

Cepas de *S. lividans* silvestres, cepas de *S. lividans* D125G

6.3 Criterios de inclusión:

Cepas de *S. lividans* TK24 silvestres

Cepas de *S. lividans* TK24 con mutación D125G

Cepas de *S. lividans* TK24 con mutación D125G y plásmido pB104



6.4 Criterios de exclusión:

Cepas de *S. lividans* silvestres y mutantes contaminadas

Cepas de *S. lividans* silvestres y mutantes con pB104 con mala replicación.

6.5 Variables

Variables	Escala de medición
Dependiente (variable de respuesta): producción de lipasa extracelular	Cuantitativa continua
Independientes (factor de estudio): presencia de la mutación D125G	Cualitativa nominal

6.6 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizará una comparación entre las cepas silvestres y mutantes en la producción de lipasa extracelular respecto al tiempo (la actividad se medirá cada 12 horas hasta un total de 96 horas). Se realizará el análisis estadístico t de Student para observar si existen diferencias entre las dos cepas.

- Planteamiento de las hipótesis para evaluar la expresión de lipasa extracelular:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$; sig ≥ 0.05

Las actividades de lipasa extracelular son iguales entre la cepa silvestre (μ_1) y mutante (μ_2).

Hi: $\mu_1 \neq \mu_2$; sig < 0.05



Las actividades de lipasa extracelular son diferentes entre la cepa silvestre ($\mu 1$) y mutante ($\mu 2$).

7. Material

7.1 Material biológico

- **Tabla 1. Cepas bacterianas**

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> (ET12567/pUZ8002) ET12567/pUZ8002	Cepa deficiente de metilación de DNA con plásmido de conjugación "helper"	36
<i>S.lividans</i> TK24	<i>str-6</i> SLP2-SLP3 ⁻ derivado de <i>S. lividans</i> 66	37
<i>S. lividans</i> TK24-D125G	TK24 <i>sco5282-D125G</i>	En este trabajo
<i>S.coelicolor</i> M145	Silvestre SCP1-SCP2 ⁻ derivado de <i>S. coelicolor</i> A3(2)	37
<i>S.coelicolor</i> M145	M145 <i>sco5282-D125G</i>	9



- **Tabla 2. Plásmidos**

Plásmidos	Descripción	Referencia
StCB12Δ5282::apra	Cósmido derivado de superCos 1, Kan ^R Ap ^R , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) con delección del gen sco5282 e inclusión del marcador de resistencia aac(3)IV	9
StCB12D125GΔbla: :apra	Cósmido derivado de superCos 1, Kan ^R Ap ^R , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) con el gen sco5282 con la mutación D125G	9
pB104	Derivado del pIJ6021 con <i>lipA</i> clonado bajo el control del promotor <i>tipA</i>	4
pIJ6021	Vector de expresión inducible de alto número de copias, Kan ^R para <i>Streptomyces</i> , derivado del	38



	replicón pIJ101, con promotor tipA inducible	
--	---	--

7.2 Reactivos

- Medio de cultivo MS
- Medio de cultivo LB
- Medio de cultivo R2YE
- Caldo de cultivo YT2x
- Caldo de cultivo YEME
- Caldo de cultivo LB + 25% sacarosa
- Buffer P
- Apramicina 50 mg/mL
- Kanamicina 100 mg/mL
- Cloranfenicol 50 mg/mL
- Ácido Nalidíxico 25 mg/mL
- Glicerol 20%
- NaCl 1N
- EDTA 0.5 M pH 8.27
- Sacarosa 10.3%
- TE 25mM
- TE 10mM



- $C_2H_3NaO_2$ 4M
- $C_2H_3NaO_2$ 3M
- CH_3CO_2K 3M pH5.0
- SDS 10%
- Isopropanol
- Etanol absoluto
- Fenol/cloroformo pH 8
- Lisozima 2mg/mL
- Polietilenglicol p.m. 1,450 (PEG)
- Triton X-100
- TES 100mM pH 7.2
- Paranitrofenil laurato (pNPL)

7.3 Materiales

- Cajas Petri estériles desechables
- Tubos de vidrio 13X100
- Tubos de vidrio 16X150
- Tubos de vidrio con tapa de rosca 13X100
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Matraces Erlenmeyer 250 mL
- Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Puntas para micropipeta marca Axygen de 1-200 μ L y 100-1000 μ L estériles

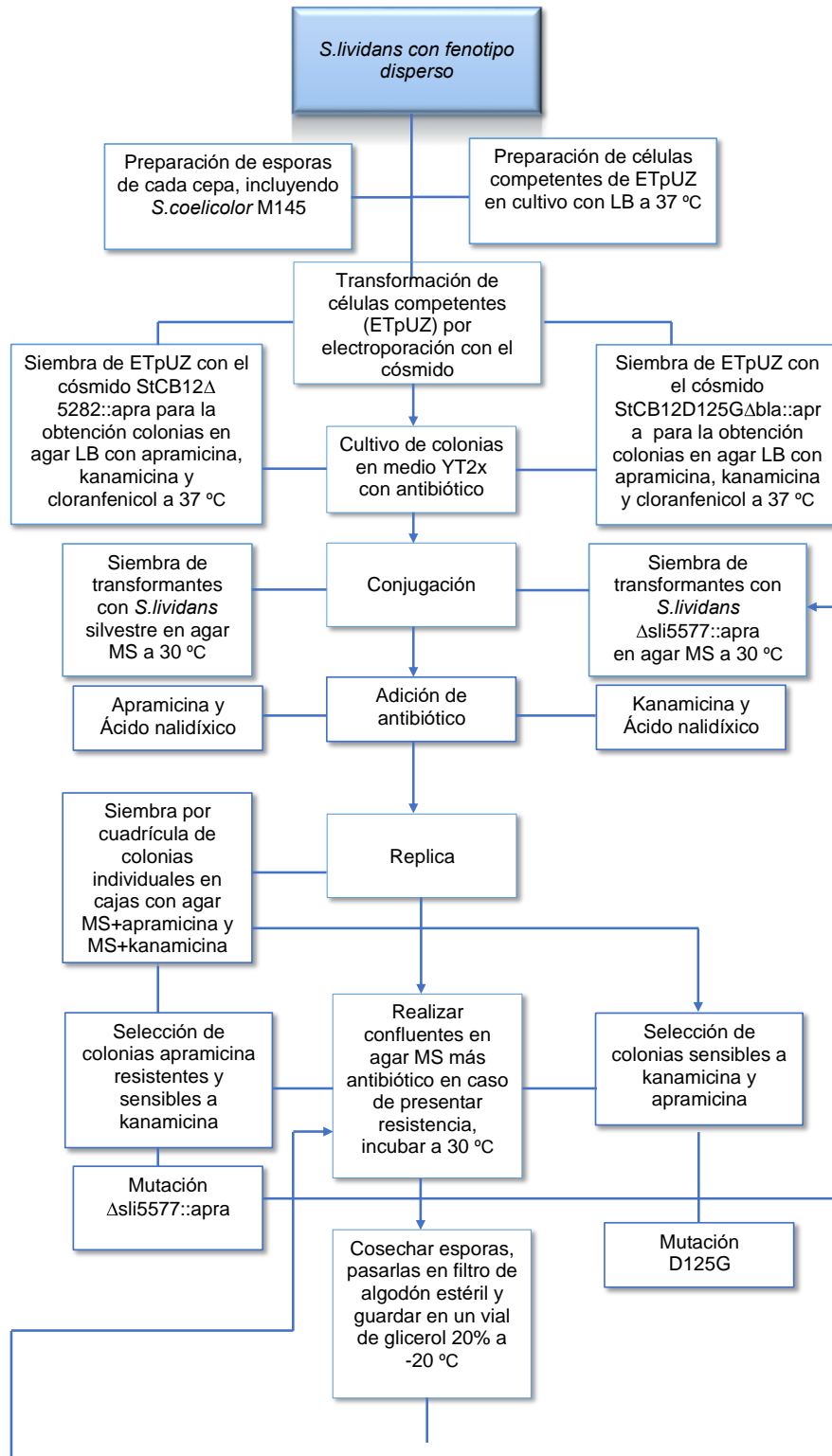


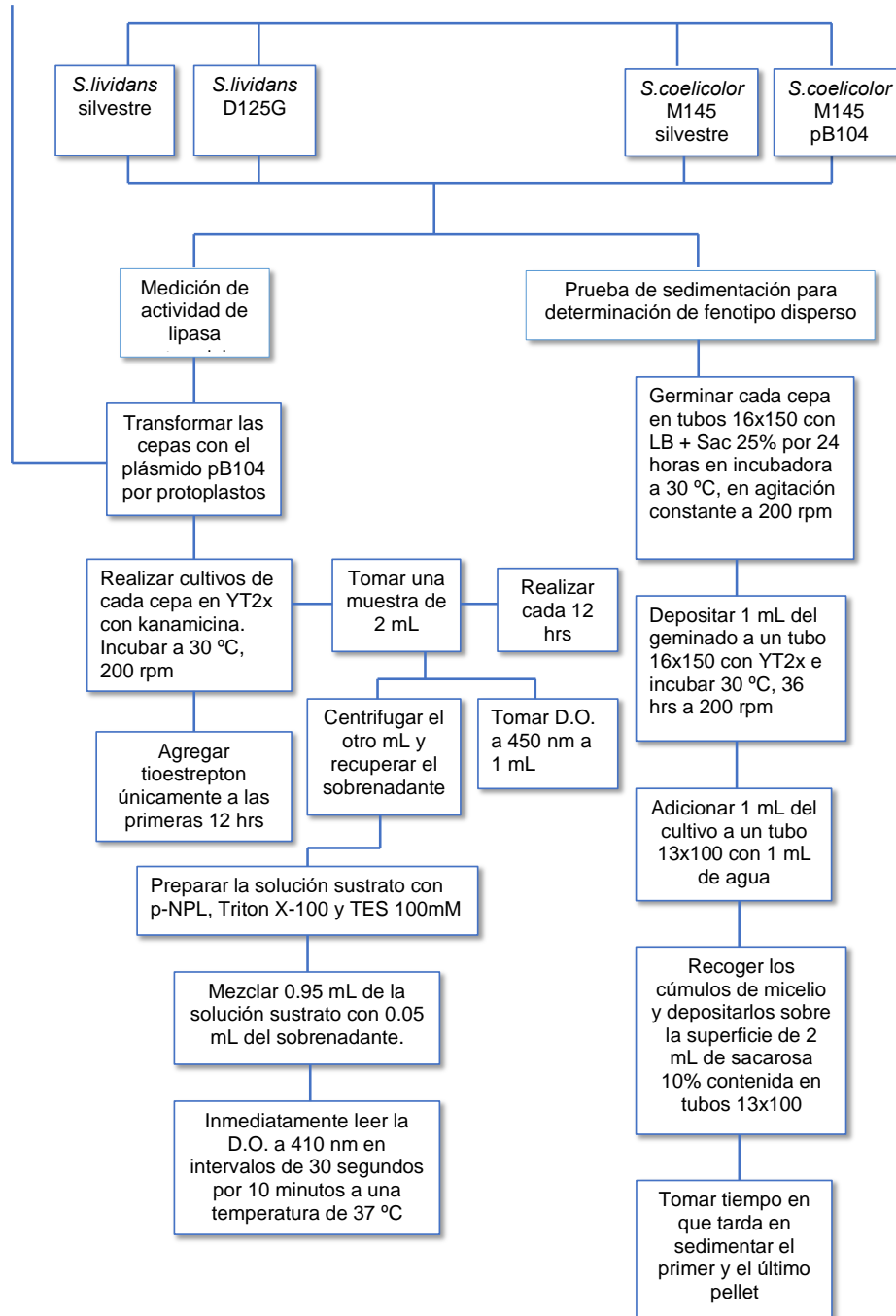
7.4 Equipos.

- Micropipetas 1-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL
- Incubadora con agitación orbital New Brunswick Innova 4330
- Incubadora con agitación New Brunswick
- Incubadora a 30 °C
- Incubadora a 37 °C
- Centrífuga Beckman Coulter modelo J2-21
- Microcentrífuga Eppendorf 5418
- Espectrofotómetro Ultrospec 3000
- Espectrofotómetro Ultrospec 7000
- Equipo de electroporación MicroPulser (BioRad)
- Cámara de electroforesis



7. Métodos





8.1 Obtención de esporas de *S. lividans*

En cajas Petri estériles con agar MS (manitol 2%, harina de soya 2%, agar 2%) se inocularon esporas de *S. lividans* con la finalidad de obtener crecimiento confluyente. Se incubaron de 4 a 5 días a 30 °C o hasta lograr esporulación visible. Las esporas obtenidas se recolectaron raspando la superficie del micelio esporulado con agua estéril y con un asa bacteriológica. Las esporas fueron filtradas a través de algodón estéril, se lavaron con agua y se centrifugaron, se suspendieron en glicerol 20% y se guardaron a -20 °C.

8.2 Transformación de células competentes por electroporación

- Introducción de los cósmidos utilizados (StCB12Δ5282::apra y StCB12D125GΔbla::apra) a ET12567/pUZ8002 (ETpUZ)

En 3 mL de caldo de cultivo YT2x (Bacto-Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%) con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 25 µg/mL se inocularon 6 µL de células de *E. coli* ETpUZ mantenidas en glicerol 20% a -20C, y el cultivo se dejó incubando a 37°C toda la noche con agitación constante de 200 rpm. Se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz con 20 mL de medio YT2x con los mismos antibióticos, dejándolo incubar a 37 °C con la misma agitación por 4 horas. Después del tiempo de incubación se centrifugó el cultivo, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en agua destilada estéril; esto se repitió tres veces con la finalidad de eliminar el medio con antibióticos y sensibilizar a las células para volverlas electrocompetentes. Después del último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en un pequeño volumen



de agua. Se tomaron 80 μL y se transfirieron a un tubo Eppendorf, se añadió 1 μL de DNA del cósmido, la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación estéril previamente enfriada. La electroporación se realizó en el equipo MicroPulser (BioRad) utilizando el programa Eco1 (pulso de 1.8 kV) con la finalidad de hacer poros en la membrana permitiendo la entrada del cósmido. Inmediatamente se agregó 1 mL de medio de cultivo YT2x sin antibióticos y se transfirió a un tubo de vidrio estéril con tapa. Esta mezcla se incubó 1 hora a 37°C con una agitación de 200 rpm.

Se hicieron cajas con medio LB (Bacto-Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, agar 1.5%) con apramicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cloranfenicol 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde se sembraron de manera uniforme con varilla de vidrio estéril 100 μL del concentrado y 100 μL de una dilución 10^{-1} de la misma. Las cajas se incubaron a 37°C con la finalidad de seleccionar las colonias transformadas con el cósmido.

8.3 Conjugación

Se llevaron a cabo dos conjugaciones, una con la cepa ETpUZ/StCB12 Δ 5282::apra para *S. lividans* silvestre y otra con la cepa ETpUZ/StCB12D125G Δ bla::apra para *S. lividans*-sli5577::apra.

De las cajas de LB con antibióticos crecieron colonias específicas con el cósmido, de las cuales se tomó una colonia para realizar un precultivo en 3 mL de YT2x con los mismos antibióticos utilizados para las cajas, el cual se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Del precultivo se tomó un 1 mL y se depositó en 20 mL de YT2x fresco con los mismos



antibióticos, se incubó durante 4 horas a 37 °C y 200 rpm. Una vez pasado el tiempo se centrifugó, se hicieron 3 lavados con YT2x, en el último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en un pequeño volumen de YT2x. Se tomaron 100 µL para adicionarlos en un tubo Eppendorf que contenía esporas de *S. lividans* correspondientes. La activación de esporas se llevó a cabo previamente adicionando en un Eppendorf 500 µL de YT2x y 50 µL de esporas, se dejó en baño de agua a 50°C por 10 minutos para inducir la germinación mediante choque térmico, y posteriormente se pasaron a hielo. Se colocó en placa 100 µL del concentrado y 100 µL de diluciones 10⁻¹ y 10⁻² en cajas con agar MS sin antibiótico, dejándolas en incubación a 30°C durante la noche. La mañana siguiente se adicionó a cada caja de las conjugaciones con el cósmido StCB12Δ5282::apra 1 mL de una solución que contenía apramicina 50 µg/mL y ácido nalidíxico 50 µg/mL (el primero se utiliza con el fin de seleccionar las cepas que contienen el cósmido y el segundo antibiótico se emplea con la finalidad de eliminar *E.coli*). A las cajas de conjugación con el cósmido StCB12D125GΔbla::apra se adicionó 1 mL de una solución que contenía kanamicina 50 µg/mL y ácido nalidíxico 50 µg/mL que realizan el mismo principio antes mencionado. Se siguió incubando hasta la esporulación de colonias de *S. lividans* resistentes a apramicina para el cósmido StCB12Δ5282::apra y resistentes a kanamicina para el cósmido StCB12D125GΔbla::apra.

8.4 Réplica

Para la conjugación con el cósmido StCB12Δ5282::apra, se hicieron cajas con agar MS, ácido nalidíxico y apramicina, así como cajas con agar MS, ácido nalidíxico y kanamicina



donde se sembraron, empleando cuadrículas de 20 posiciones, colonias individuales de la conjugación en ambas cajas. Se dejaron incubando a 30°C hasta su esporulación. Se seleccionaron las que fueron resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina, y se purificaron por estría cruzada. Se dejó incubando a 30°C hasta su esporulación para la obtención de cepas de *S. lividans* Δ sli5577::apra.

Para la obtención de cepas de *S. lividans* D125G se realizó un doble sembrado de colonias individuales de la conjugación en agar MS con ácido nalidíxico y MS con ácido nalidixico y kanamicina a 30 °C. Este paso se realizó para recombinación de los cromosomas y confirmación de la presencia del cósmido. Después de su esporulación se estrió a partir de las esporas obtenidas en la caja sin kanamicina y se incubó a 30 °C en MS sin antibióticos.. Al esporular se tomaron colonias aisladas para llevar a cabo un triple sembrado en cuadrículas de 20 posiciones, en cajas de MS sin antibiótico, MS con apramicina y MS con kanamicina, para identificar colonias con sensibilidad a estos dos últimos antibióticos. Se seleccionaron colonias sensibles a apramicina y kanamicina por estría cruzada en MS sin antibióticos, dejandolas en incubación a 30 °C hasta su esporulación. De esta forma se obtuvo el remplazo del cassette de apramicina introducido en el gen sli5577 (Δ sli5577::apra) por el gen con la mutación puntual D125G.

8.5 Confluentes y cultivo de esporas

- Recolección de esporas *S. lividans* Δ sli5577:apra y *S.lividans* D125G



Se seleccionó una colonia sensible a kanamicina y resistente a apramicina de la conjugación para la obtención de *S.lividans* Δ sli577::apra, así como una colonia sensible tanto a kanamicina como apramicina de la segunda conjugación para obtener *S.lividans* D125G. Se tomaron esporas con un asa bacteriológica estéril de cada conjugación y se agitaron en un tubo de vidrio con 500 μ L de agua estéril, se depositó en cada caja de MS con apramicina 100 μ L de esporas *S.lividans* Δ sli577::apra y en cajas MS sin antibióticos 100 μ L de esporas *S.lividans* D125G, con la finalidad de tener crecimiento confluyente de ambas cepas. Se dejó incubando alrededor de 7 días a 30°C para su esporulación. Pasado el tiempo a cada caja se le colocaron 10 mL de agua estéril y se rasparon las esporas con un asa bacteriológica. Las esporas se filtraron a través de algodón estéril con la finalidad de separar los restos del micelio. Las esporas obtenidas en el filtrado se lavaron dos veces con agua estéril por centrifugación, se eliminó todo el sobrenadante, se le adicionó un volumen pequeño de glicerol al 20% (entre 1 y 3 mL según el número de esporas obtenidas) y se guardaron en un vial a -20 °C.

8.6 Minipreparaciones de DNA

- Miniprep de plásmido de *E.coli* de acuerdo al protocolo del laboratorio del Doctor Luis Servín

Al tener en agar LB colonias de *E.coli* con los cósmidos utilizados en este trabajo, se tomó una muestra y se dejó incubando en YT2x con apramicina, cloranfenicol y kanamicina a 37°C 200 rpm durante la noche. Al día siguiente en 20 mL de YT2x con los



mismos antibióticos se incubó 1 mL del precultivo por 1 hora en las mismas condiciones. Se centrifugó a 6500 rpm 10 minutos, al decantar el medio se lavó 3 veces con YT2x.

1. Centrifugar 1.5 mL de cultivo en un tubo Eppendorf. Eliminar el sobrenadante y dispersar bien el pellet de células en el vórtex. Resuspender en 100 μ L de Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH=8
2. Añadir 200 μ L de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta conseguir una mezcla transparente, homogénea y viscosa. dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 150 μ L de acetato de potasio 3M pH=5, mezclar bien por inversión hasta perder viscosidad y que se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir al tubo 400 μ L de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos.
5. Pasar la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y añadir 1 mL de etanol absoluto frío. Mezclar bien invirtiendo los tubos varias veces. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad. Retirar y eliminar todo el sobrenadante. Dar un pulso en la microcentrífuga para bajar todo el líquido remanente y eliminarlo con una micropipeta. Cuidado de no tocar del pellet.
7. Disolver el pellet en 50 μ L de TE 10mM. Cerciorarse que el pellet esté perfectamente disuelto y entonces añadir 150 μ L de acetato de sodio 4M pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C



8. Centrifugar 5 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ L de isopropanol. Precipitar 10 minutos.
9. Centrifugar 10 minutos. Eliminar el sobrenadante. Disolver en 45 μ L de TE 10 mM, calentando en baño María. Añadir 5 μ L de acetato de sodio 3M pH=6 y 125 μ L de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
10. Centrifugar 10 minutos, eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet y disolverlo en 25 μ L de TE 10mM.

Para confirmar la estructura del plásmido pB104, el cual contiene el gen de lipasa extracelular bajo el control del promotor tipA inducibles por tioestreptón, se siguió el siguiente protocolo para realizar las minipreparaciones de plásmido.

- *Miniprep rápido de DNA de Streptomyces*
 1. Cultivo de micelio: colocar en un tubo 3 mL de LB con azúcar al 25%, 150 μ L de glicina 10%, 20 μ L de esporas de *Streptomyces*, se deja incubando a 30°C a 200 rpm por 2 días.
 2. Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm y lavar con sacarosa 10.3%, pasar a un Eppendorf.
 3. Resuspender micelio en 500 μ L de una solución de lisozima (2 mg/mL lisozima, 50 μ g por mL de RNasa en 0.3 M sacarosa, 25 mM TE 25mM) por 30 minutos o hasta que las células se vean traslucidas.
 4. Agregar 250 μ L de SDS 2% y vortexear 1 minuto hasta que la viscosidad decrezca notablemente.



5. Agregar 250 μ L de una solución neutra de fenol-cloroformo, vortexear la mezcla por 30 segundos, centrifugar y remover el sobrenadante.
6. Agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y mezclar, agregar 1 volumen de isopropanol y mezclar de nuevo, incubar 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugar 2 minutos y remover todo el líquido.
7. Redisolver el pellet en TE 10 mM hasta que se disuelva completamente, si es necesario se pone en baño de agua y se repite desde el paso 6.
8. Adicionar 50 μ L de TE 10 mM y guardar a -20°C .

8.7 Digestión

La finalidad de las digestiones es determinar la estructura correcta de los diferentes plásmidos utilizados (presencia o ausencia, orientación o tamaño de un inserto). El ADN plasmídico purificado se digiere con una o más enzimas de restricción (RE) seleccionadas para proporcionar un patrón de bandas de ADN específico que se observará mediante electroforesis. Con la secuencia del cósmido y el programa DNAMAN se puede obtener un patrón de digestión para las RE utilizadas en este trabajo.



Tabla 3. Adición de reactivos para digestión.

	StCB12 Δ 5282::apra y StCB12 D125G Δ bla::apra.		pB104
Orden de adición	Enzima BamHI	Enzima SacI	Enzima KpnI
1	6 μ L de agua estéril	6 μ L de agua estéril	6 μ L de agua estéril
2	1 μ L de NEBuffer 3.1 (Biolabs)	1 μ L NEBuffer 1.1 (Biolabs)	1 μ L NEBuffer 1.1 (Biolabs)
3	2 μ L de DNA plasmídico	2 μ L de DNA plasmídico	2 μ L de DNA plasmídico
4	1 μ L de la enzima	1 μ L de la enzima	1 μ L de la enzima

Los Eppendorf con las mezclas se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente las muestras con el ADN digerido se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio, se fotografiaron bajo luz ultravioleta y se prosiguió a realizar la comparación experimental e informática de la presencia o ausencia de sitios de restricción (Figuras 1,2 y 4).

8.8 PCR punto final

Se realizó en el equipo TECHNE TC-312 Thermal cycler. Los reactivos para las reacciones de PCR se adicionaron en el siguiente orden, en un tubo Eppendorf en baño de hielo: se añadieron 32 μ L de agua esteril, 10 μ L de amortiguador 5X Phusion HF, 1



μL de dNTPs 10 mM c/u, 1 μL de mezcla de oligonucleótidos 10 mM c/u (sco 5282 forward y reverse), 1.5 μL DMSO, y 0.5 μL de Phusion DNA polymerase (New England Biolabs), de esta mezcla se tomaron 23 μL para juntarlo con 2 μL (20 ng) de DNA de la cepa silvestre de *S.lividans* añadiendo también 15 μL de aceite mineral sobre la mezcla; a los otros 23 μL se les añadió el DNA de *S.lividans* Δsli5577::apra y la misma cantidad de aceite mineral. Este método se repitió para el DNA de *S. lividans* D125G.

Se programó el termociclador con un programa que consistió en una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98°C, seguida de 30 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 98°C, 20 segundos de alineamiento a 57°C y 40 segundos de extensión a 72°C, finalizando con una extensión a 72°C por 5 min. Al finalizar se confirmó el tamaño del producto amplificado mediante una electroforesis. El tamaño de las bandas se verificó comparando con el marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con PstI, que da un patrón de fragmentos que van de 210 a 14,167 pb).

8.9 Comparación del fenotipo entre la cepa de *S.lividans* silvestre y la cepa mutante *S. lividans* D125G.

Este método consistió en realizar cultivos de las cepas en medio LB con sacarosa (Bacto-Tripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, sacarosa 25%, pH 7) durante 24 horas, se tomaron 0.5 mL de estas esporas germinadas para dejarlas incubando 36 horas más en medio YT2x sin sacarosa. Del último cultivo se tomó 1 mL y se dejó reposando en una parte igual de agua, se tomaron los cúmulos de micelio y se depositaron sobre la superficie de 2 mL de sacarosa al 10 % contenida en un tubo con



la finalidad de tomar el tiempo que tardan en sedimentarse a través del colchón de sacarosa y llegar al fondo del tubo.

8.9.1 Transformación por protoplastos

Un matraz con 25 mL de YEME suplementado con $MgCl_2$ 1M y glicina 10% se inoculó con 100 μ L de esporas de *S.lividans*, y el cultivo se incubó a 29 °C con agitación constante durante 36 horas.

El micelio se lavó tres veces con sacarosa al 10.3% utilizando un rotor de centrifuga JA20 por 10 minutos a 7000 rpm. Terminado el último lavado, el pellet se resuspendió en 20 mL de sacarosa 10.3%, se distribuyó en 4 tubos de vidrios con tapa de rosca, estos tubos se centrifugaron 10 minutos a 3500 rpm para finalmente tirar el sobrenadante y congelar los pellets a -20 °C.

Se suplementó el buffer P y se dejó reposar por 30 minutos. En 5 mL de éste se dejó disolver 2.5 mg de lisozima, por otro lado en 1.5 mL de buffer P se disolvieron 0.5 g de PEG, se prosiguió a filtrarlos por separado a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m de poro, depositando cada uno en un tubo de vidrio, de igual forma el resto de buffer P se filtró y se almacenó en otro recipiente.

Se dejó incubando a 30 °C un tubo con micelio descongelado al que se le agregó el filtrado de lisozima y se prosiguió a mezclar suavemente cada 15 minutos durante 1 hora. Se observó una muestra al microscopio para verificar la formación de protoplastos, y una vez comprobado ésto se depositó el contenido del tubo en un filtro de algodón estéril, se



adicionaron 5 mL de buffer P para lavar. El filtrado se pasó a un tubo con rosca y se llevó a centrifugar 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se eliminó y en el pellet resuspendido se adicionaron 2 μ L de plásmido pB104 purificado, inmediatamente se agregó 0.6 mL de PEG y se mezcló todo suavemente subiendo y bajando con una pipeta Pasteur estéril. Posteriormente se añadieron 5 mL de buffer P, se llevó a centrifugar 10 minutos a 3500 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 0.3 mL de buffer P, se realizaron diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . En cajas de medio R2YE suplementado se adicionaron 100 μ L de cada dilución, posteriormente se agregó a cada caja 2.5 mL de agar suave, con el cual se cubrió completamente la superficie, se dejó gelificar y se llevó a incubar a 30 °C entre 18 y 20 horas. A las cajas se le agregaron 200 μ L de kanamicina y se llevaron a incubar nuevamente a la misma temperatura durante 1 semana o hasta su esporulación.

8.9.2 Medición de actividad de lipasa extracelular

En un matraz se colocaron 25 mL de YT2x con 12.5 μ L de kanamicina, se agregó cantidad suficiente de esporas para tener una D.O₄₅₀ de cultivo a 0.1; se llevó a incubar a 30 °C con agitación constante de 200 rpm. A las 12 horas se tomó una muestra de 2 mL, el primero se utilizó para medir su D.O₄₅₀ y el otro para realizar peso húmedo. El peso húmedo se realizó anotando previamente el peso del eppendorf, al depositar 1 mL se llevó a centrifugar, se eliminó todo el sobrenadante para poder pesarlo de nuevo y realizar la diferencia de pesos. El sobrenadante se guardó en otro eppendorf esteril rotulándolo con día y hora de la toma.



Se añadió 10 μL de tioestrepton para activar la expresión del gen de lipasa y se dejó incubando 72 horas de las cuales se tomó muestra cada 12 horas como anteriormente se describió.

En un recipiente con 0.42 mL de Triton X-100 se disolvieron 16.1mg de pNPL (paranitrofenil laurato) y con agitación suave se agregó 10 mL de una solución de TES 100 mM pH 7.2, se agregaron 8.6 mL de agua.

En celdas de plástico se agregaron 950 μmL de la mezcla seguido de 50 μL de sobrenadante, se utilizó un blanco conformado con la misma cantidad de mezcla y 50 μL de medio YT2x, inmediatamente se colocaron en el espectrofotómetro mantenido a 37 $^{\circ}\text{C}$ para tomar lecturas de absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 410 nm. Se tomaron lecturas cada 30 segundos durante 10 minutos, para después determinar el incremento de Abs/min en la parte lineal de la reacción y transformarlo a unidades, empleando el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol ($14,775 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad corresponde a 1 μmol de *p*-nitrofenol producida por min. La actividad producida por mL de sobrenadante se dividió entre la lectura de D.O.₄₅₀ correspondiente al crecimiento del micelio en ese punto de la curva, con la finalidad de tener una actividad específica respecto al crecimiento.



9. Resultados

9.1 Construcción de una cepa de *S. lividans* con la mutación D125G.

Con el fin de construir una cepa de *S. lividans* con la mutación D125G en el gen *sli5577*, que es homólogo al *sco5282*, y cuyo efecto en la morfología fue descrito por Arroyo et al., (2019)⁹, se comenzó por verificar la estructura de los cósmidos empleados para introducir las mutaciones. El análisis de restricción a través de los cortes para la misma enzima permite observar las diferencias en las mutaciones presentadas en la figura 1, y confirmar que la estructura de los cósmidos es correcta. Es importante mencionar que estos cósmidos no se construyeron en este trabajo, sino que ya se contaba con ellos en el laboratorio, por lo que estas digestiones simplemente tenían la finalidad de confirmar su estructura antes de utilizarlos.



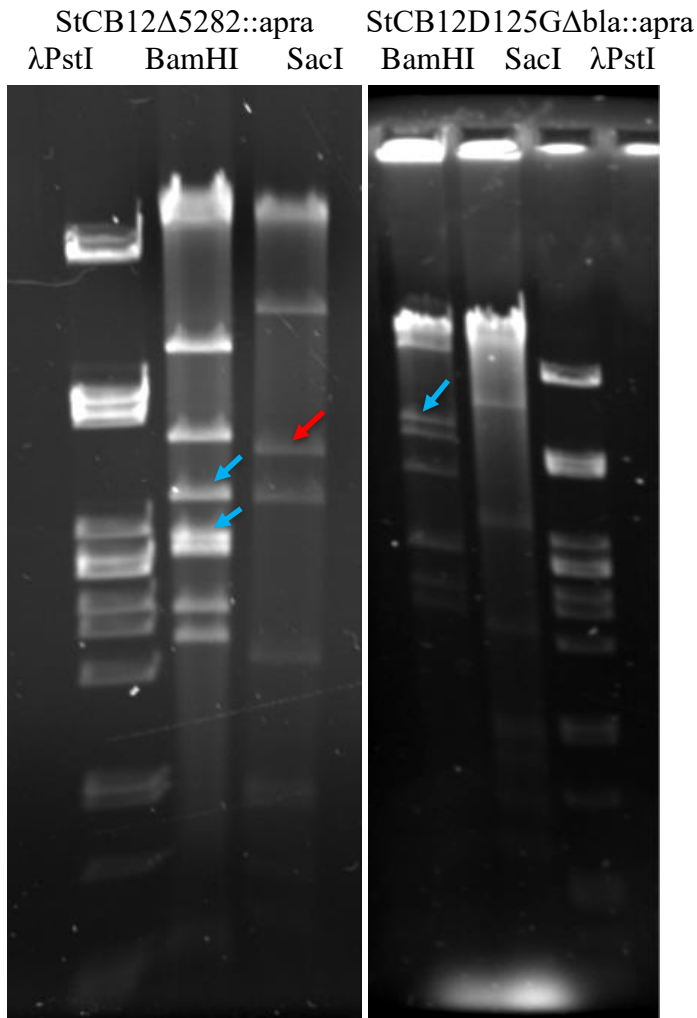


Figura 1. Análisis de restricción de los cósmidos StCB12Δ5282::apra y StCB12D125GΔbla::apra con las enzimas BamHI y SacI, indicando con flechas azules las bandas que presentaron los cambios esperados (3195 pb, 2623 pb y 6388 pb respectivamente) para la enzima BamHI y con roja para la enzima SacI (3919 pb).

Con los cósmidos ya verificados se llevó a cabo la construcción y purificación de la cepa *S. lividans* D125G como se describe detalladamente en Material y Métodos (secciones 6.8.2 a 6.8.4)³⁹.

Mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos que amplifican al gen sco5282 se amplificó dicha región del cromosoma de las diferentes cepas; lo anterior demostró que



efectivamente el cromosoma de *S. lividans* silvestre pasó por una inserción del casete de resistencia a apramicina (1661 pb) y posteriormente a la mutación puntual, por lo que la banda de la cepa mutante D125G se observa del mismo tamaño a la banda de la cepa silvestre (1414pb), ya que la mutación se genera por la sustitución de un solo nucleótido dentro del gen, que ocasiona la sustitución del ácido aspártico en la posición 125 por una glicina en la cinasa sco5282 y la inserción del casete permite primeramente la eliminación del gen para después insertarse en ese espacio (figura 2).

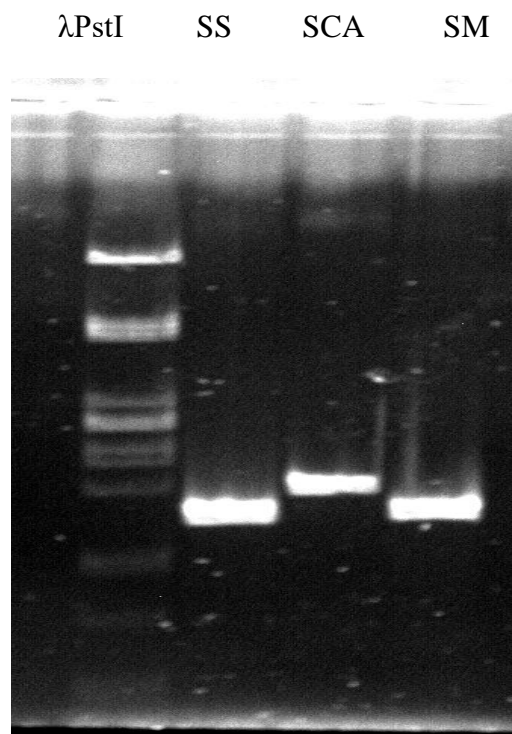


Figura 2. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los oligos sco5282 up y sco5282 down de SS: *S.lividans* silvestre (1414pb), SCA: *S.lividans*Δsli5577::apra y SM: *S.lividans* sco5282-D125G (1661 pb), λPstI: marcador de peso molecular.

9.2 Fenotipo de sedimentación de *S. lividans* silvestre y *S. lividans* D125G.

Con el fin de analizar si la mutación D125G ocasiona el mismo fenotipo de sedimentación lenta con respecto a la silvestre, tal y como se describió en *S. coelicolor*, se llevó a cabo



una comparación del fenotipo de la cepa *S.lividans* silvestre y *S.lividans* D125G en crecimiento líquido y con prueba de sedimentación. Como resultado de la mutación D125G se obtuvo una cepa mutante con micelio disperso, que demoraba mucho más tiempo en sedimentar que la cepa silvestre con micelio compacto (rápida sedimentación) (figura 3).

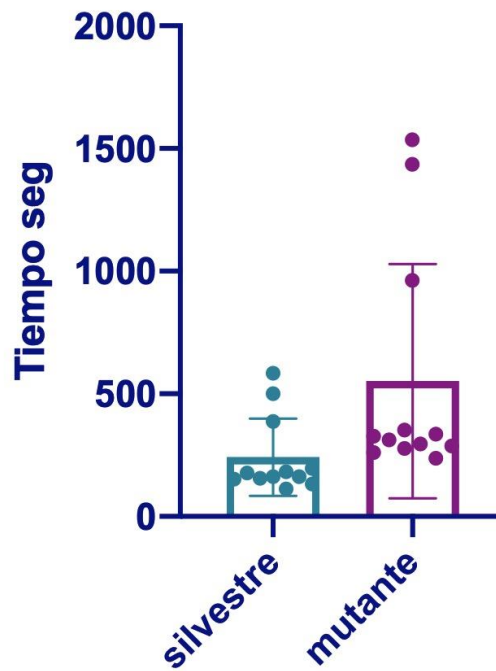


Figura 3. Tiempo de sedimentación de las cepas *S. lividans* (silvestre) y *S. lividans* D125G(mutante). Diferencia de medias y SD entre los tiempos de sedimentación de los cúmulos de la cepa silvestre y la mutante.

9.3 Actividad de lipasa extracelular en *S. lividans* TK24 silvestre y *S. lividans* TK24D125G

Con el propósito de observar si el cambio en la morfología ocasionado por la mutación D125G repercute en la cantidad de enzimas extracelulares secretadas, se decidió tomar como parámetro la actividad de lipasa extracelular de *S. exfoliatus* debido a que es una



enzima muy estable, lo que facilita su medición^{4,40,41}. El micelio en crecimiento es capaz de sintetizar y secretar altos niveles de lipasa al medio cuando *lipA* se transcribe bajo el control de un promotor fuerte, como es el promotor *tipA*. Se escogió al plásmido pB104, el cual es derivado del vector de alto número de copias pIJ6021³⁸ (Tabla 2), que da resistencia a kanamicina, y contiene al gen de lipasa (*lipA*) clonado bajo el control del promotor *tipA*⁴. Fue necesario corroborar la estructura del plásmido mediante un análisis de restricción (figura 4) con la finalidad de obtener resultados confiables en el ensayo de actividad de lipasa.

P SS SM
λPstI pB104 pB104 pB104

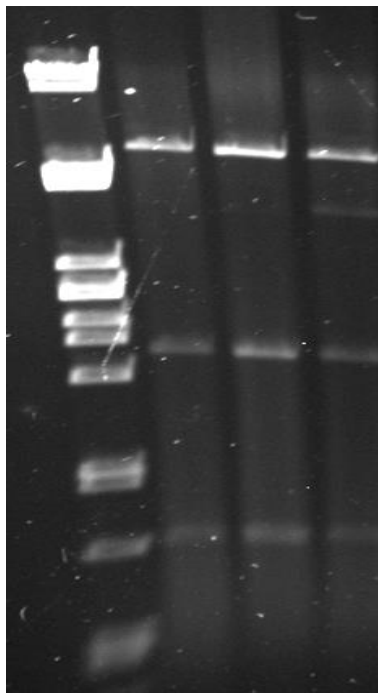


Figura 4. Comprobación de la integridad del inserto pB104.. El plásmido fue aislado de las diferentes cepas y digerido con la enzima KpnI, dando fragmentos de restricción de 6391 pb, 1890 pb y 816 pb respectivamente. P: plásmido pB104 original, SS: *S. lividans* TK24 silvestre y SM: *S. lividans* TK24-D125G, donde λPstI: marcador de peso molecular.



Para este ensayo se inocularon esporas a una D.O.₄₅₀ de 0.1 en 25 mL de medio líquido YT2X con kanamicina 50 µg/mL, se indujeron con tioestrepton 10 µg/mL a las 12 horas. Posteriormente se determinó cada 12 horas la D.O.₄₅₀ de cada cultivo, y además se recolectaron muestras del sobrenadante por centrifugación. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la actividad de lipasa mediante un ensayo colorimétrico, donde el incremento de la coloración amarilla es directamente proporcional a la cantidad de enzima producida por las cepas, debido a la capacidad de la lipasa para catalizar la hidrólisis del pNPL, obteniendo un producto cromogénico (*p*-nitrofenol) que absorbe a 410 nm. Las curvas de crecimiento y de actividad de lipasa extracelular específica se muestran en la Fig. 5. En dicha figura es posible observar que la mayor producción, tanto en la cepa TK24 como en la mutante TK24-D125G, se obtuvo durante la fase exponencial del crecimiento. Además, también es posible observar que la mutación D125G favoreció el crecimiento, adelantándose al de la cepa silvestre. A pesar de esto, fue la cepa silvestre la que mostró una mayor producción específica de lipasa.



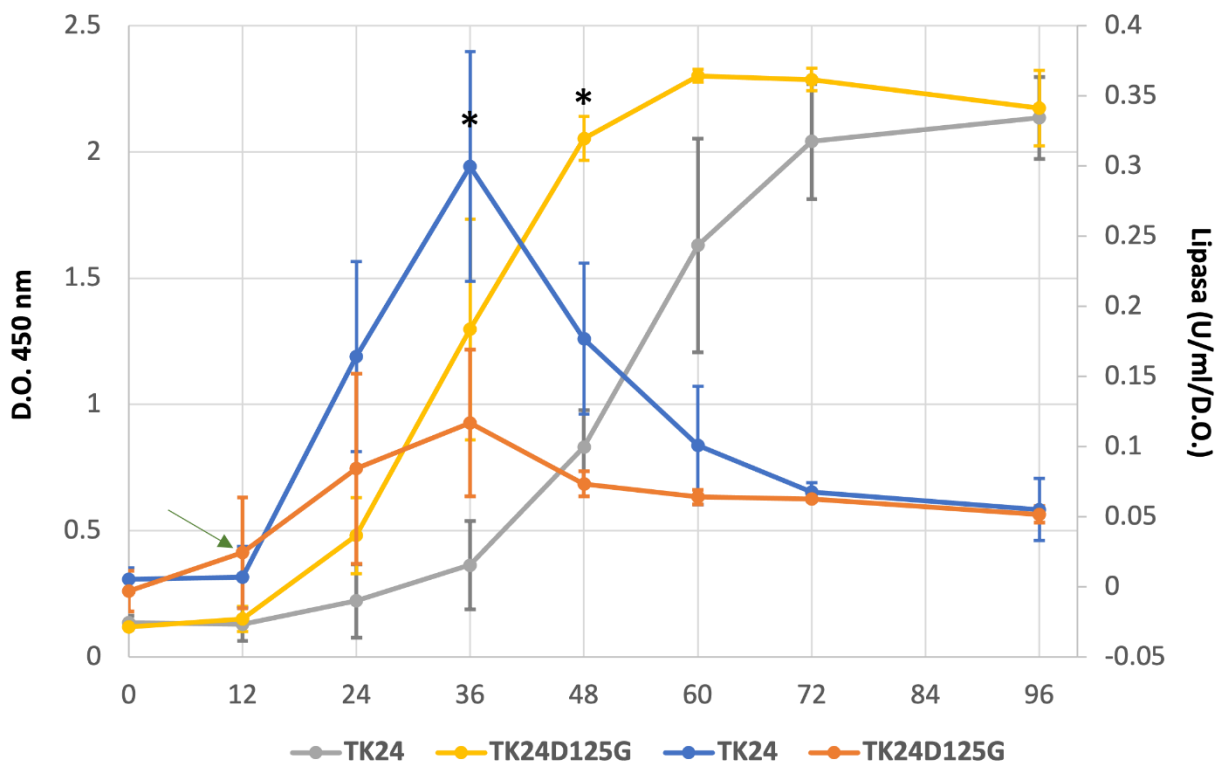


Figura 5. Crecimiento y actividad de lipasa extracelular por *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24-D125G. Curvas de crecimiento indicadas de color amarillo para la cepa mutante (TK24-D125G) y de color gris para la cepa silvestre (TK24). La actividad específica (Unidades/mL/D.O.) indicadas de color naranja para la cepa mutante y de color azul para la cepa silvestre. Los valores corresponden a las medias de tres ensayos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar y los asteriscos los tiempos donde hay diferencia estadísticamente significativa entre ambas cepas.

Con el fin de determinar si las diferencias observadas en producción específica de lipasa entre la cepa TK24 y la mutante TK24-D125G eran estadísticamente significativas, se compararon estos valores de producción para cada punto de la curva, mediante la prueba de *t* de Student, observándose que solamente a las 36 y 48 horas las diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La observación de que la mutación D125G ocasionaba un crecimiento más rápido y adelantado de la cepa TK24-D125G con respecto al de la cepa silvestre TK24 fue inesperada, pues se había descrito previamente que la cepa silvestre M145 de *S.*



coelicolor presentaba un crecimiento similar al de la mutante M145-D125G⁹. Por lo tanto decidimos investigar la producción de lipasa en *S. coelicolor* silvestre M145 y su mutante M145-D125G, para lo cual se introdujo el plásmido pB104 en ambas cepas y se realizaron cultivos en las mismas condiciones que los de *S. lividans*, con el fin de determinar el crecimiento y la actividad específica de lipasa extracelular. Dichos resultados se muestran en la Figura 6. Es posible observar que, contrario a *S. lividans*, no hay diferencia entre el crecimiento de la cepa de *S. coelicolor* M145 y su mutante M145-D125G, lo cual concuerda con lo descrito previamente⁹.

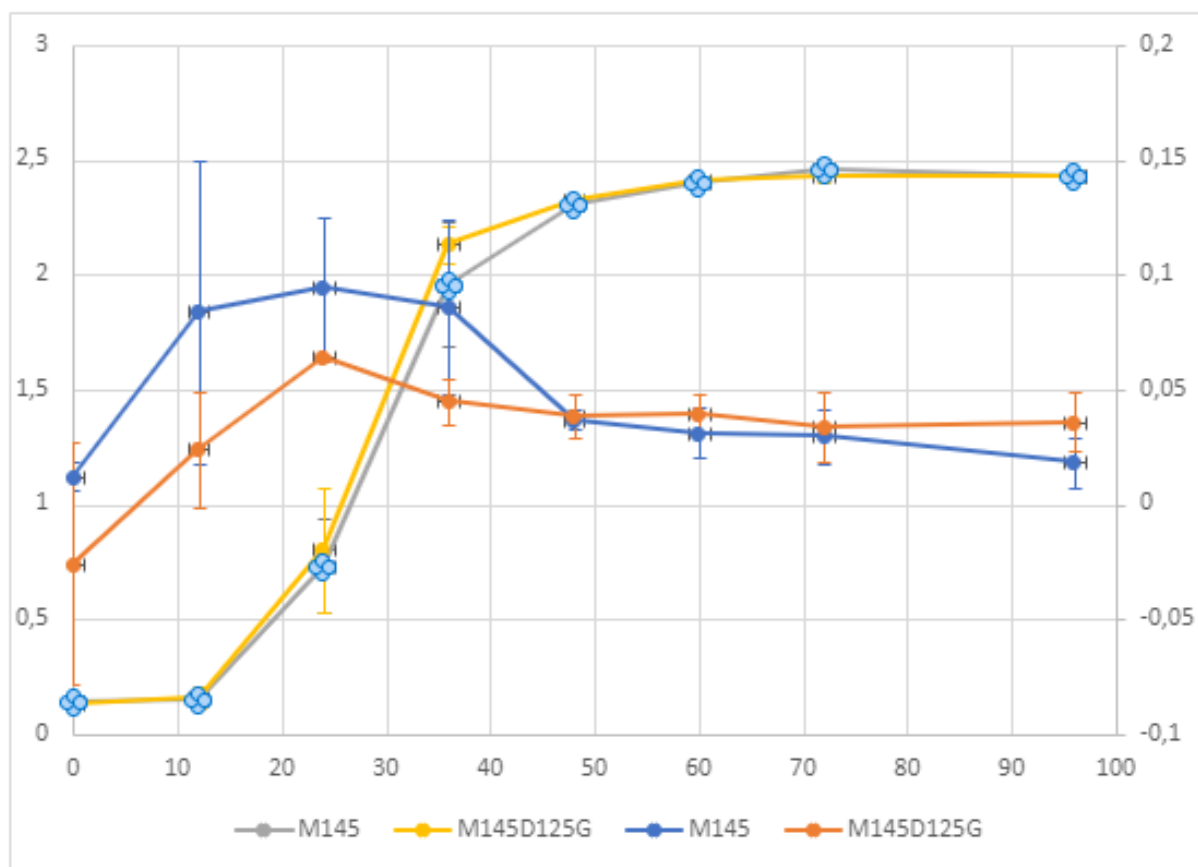


Figura 6. **Crecimiento y actividad de lipasa extracelular por *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145-D125G.** Curvas de crecimiento indicadas de color amarillo para la cepa mutante (M145D125G) y de color gris para la cepa silvestre (M145). La actividad específica (Unidades/ml/D.O.) indicada de color naranja para la cepa mutante y de color azul para la cepa silvestre. Las barras de error indican la desviación estándar.



En este caso es posible observar que la mayor producción específica se presentó también durante la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió en *S. lividans*, no hubo diferencia estadísticamente significativa en la producción específica de lipasa entre la cepa silvestre y la mutante en ningún punto de la curva, ya que todos los valores de p resultaron mayores a 0.05 al aplicar la prueba t de Student.

10. Discusión de Resultados

Streptomyces es un género bacteriano de gran importancia por ser un eficiente productor de enzimas industriales y antibióticos, así como diferentes agentes importantes a nivel farmacéutico². Con el paso del tiempo diversos estudios han demostrado que su crecimiento miceliar en forma de pellets representa un obstáculo para su cultivo en medio líquido, por lo que el implemento de nuevas estrategias para mejorar su productividad ha ido evolucionando. Como resultado de esto, se ha demostrado que un crecimiento disperso y fragmentado intensifica la producción de enzimas extracelulares, en donde se ven involucrados genes como *ssgA*, *matAB*, *csIA*, entre otros ^{24, 27, 33}.

En un estudio previo de *S. coelicolor*, se observó que la mutación en el gen *sco5282*, la cual ocasionaba la sustitución de un ácido aspártico por una glicina (D125G) en el dominio HAMP de una cinasa perteneciente a un sistema de dos componentes, afectaba la morfología en medio líquido ocasionando un crecimiento disperso, consistente en



cúmulos o pellets miceliares más pequeños y que se fragmentaban más frecuentemente⁹. Además, al hacer un estudio transcriptómico mediante RNAseq, se encontraron genes con expresión incrementada relacionados con la secreción de proteínas como *secDF*, cuya delección da como resultado una reducción de la eficiencia de secreción de xilanas A y amilasa C, secretadas mediante la ruta Sec, la cual transporta proteínas no plegadas ⁴², lo que indica que su presencia ocasiona el efecto contrario. También se encontraron genes reprimidos, involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, como *matB*; es importante mencionar que la delección de los genes *matA*, *matB* o *matAB* en *S. coelicolor* genera un fenotipo disperso con aumento en su tasa de productividad enzimática ²⁴.

Para evaluar el efecto de la producción de enzimas extracelulares con respecto a la mutación D125G, se realizó una sustitución del gen *sli5577*, de *S. lividans* (cepa TK24), por el gen mutante *sco5282-D125G* de *S. coelicolor*. Dado que *sli5577* codifica la cinasa ortóloga a *sco5282* y que su secuencia es idéntica, esta sustitución ocasiona la misma mutación de un aspartato por una glicina en la posición 125 en el dominio HAMP, solo que ahora en *S. lividans*. Se evaluó la producción de proteínas extracelulares por la cepa mutante de *S. lividans*, una especie que tiene con *S. coelicolor* una relación filogenética muy estrecha, y que es considerada importante a nivel industrial por su habilidad de secretar altos niveles de proteínas activas directamente al caldo de cultivo, ya que es menos proteolítica que *S. coelicolor* ^{19,20}.



Una vez introducida la mutación y verificada mediante la técnica de PCR (figura 2) fue evaluado su fenotipo de sedimentación, con el método descrito en el apartado 8.9 ⁹. La morfología de la cepa mutante se observó más dispersa y fragmentada en comparación con la cepa silvestre, la cual al generar cúmulos densos y apretados, se sedimentaron mucho más rápido que la cepa mutante dispersa (Figura 3), obteniendo resultados similares a los reportados en la bibliografía para *S. coelicolor* ⁹. Esto significa que el efecto fenotípico de la mutación D125G es el mismo, a pesar de ser especies diferentes.

A las cepas con la mutación puntual D125G se le introdujo el plásmido pB104, el cual contiene al gen *lipA*, que codifica una lipasa extracelular, clonado bajo el control del promotor inducible *tipA* ⁴⁸. Este plásmido es un derivado del vector pIJ6021, el cual tiene alto número de copias. En la literatura se ha reportado que *S. lividans*, al llevar el plásmido pB104, secreta altos niveles de lipasa al medio cuando la transcripción del promotor *tipA* es inducida con tioestrepton al comenzar la fase de crecimiento exponencial ⁴. Es por esa razón que este plásmido fue introducido en *S.coelicolor* y *S. lividans*, tanto en las cepas silvestres como en las mutantes, para determinar si había una mayor producción de lipasa en estas últimas, debido al crecimiento disperso.

Los resultados de crecimiento, muestran que para *S. coelicolor* silvestre (M145) y mutante (M145-D125G) no hay diferencias significativas a lo largo del tiempo de cultivo, lo cual concuerda con lo ya reportado. Así mismo, la actividad específica de lipasa extracelular no presenta diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que en el gráfico (Fig. 6) la actividad del cultivo de la mutante se observa por debajo de la actividad de la silvestre entre las 0 y 36 horas.



En el caso de *S. lividans* es posible observar (Fig. 6) que el crecimiento de la cepa mutante de *S. lividans* es más rápido y anticipado en comparación con la cepa silvestre, debido a que la mutante tiene el micelio más disperso. Además, sí existe una diferencia estadísticamente significativa en la producción específica de lipasa entre los cultivos de la mutante y la silvestre a las 36 y 48 horas. Curiosamente, son los cultivos de la cepa silvestre los que muestran una mayor actividad específica, lo cual va en el sentido contrario a lo planteado en la hipótesis, en donde se pensaba que al tener la morfología más dispersa secretaría más enzima.

Debido a los estudios previos sobre mutaciones que provocan un fenotipo de mayor dispersión en el micelio, como son las mutaciones en los genes *matAB*, así como el crecimiento disperso provocado por la sobreexpresión de *ssgA*, esperábamos que las cepas con crecimiento disperso provocado por la mutación D125G presentaran características similares, y por eso se planteó una hipótesis que predecía una mayor producción de enzima. Sin embargo, encontramos que, en el caso de *S. lividans*, la cepa mutante produce una menor cantidad específica de enzima que la cepa silvestre, y solamente durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que en *S. coelicolor* no hubo diferencia significativa en la producción. Es decir, las diferencias en producción entre las cepas silvestre y mutantes son mínimas o inexistentes. Una posibilidad para explicar la falta de diferencia significativa es el uso de un sistema inducible para la expresión de la lipasa extracelular. Los estudios en las cepas mutantes en *matAB* y sobreproductoras de *ssgA* se realizaron midiendo la producción total de la enzima tirosinasa, codificada en el gen *melC2*, el cual se expresa a partir de su propio promotor. Por otro lado, en nuestro estudio se empleó una construcción en donde el gen *lipA* se



encuentra bajo el control de un promotor inducible, que ha sido descrito como un promotor muy fuerte en presencia de su inductor, el tiostreptón. Esto ocasiona que la expresión de la lipasa ocurra desde el momento de la inducción, independientemente del estado fisiológico o morfológico del micelio. De esta manera la cepa silvestre de *S. lividans*, a pesar de crecer más lentamente que la cepa dispersa, es forzada a dedicar recursos celulares a la producción de la enzima, lo que repercute en una mayor producción específica, mientras que la cepa mutante, al crecer más rápidamente, da como resultado una menor producción específica, pero solo durante la etapa exponencial de mayor crecimiento. Adicionalmente, la dispersión del micelio ocasionada por la mutación D125G consiste en cúmulos o “pellets” miceliares de menor tamaño, pero que todavía están presentes, mientras que la sobreexpresión de *ssgA* o la eliminación de los genes *matAB* provocan la pérdida de los cúmulos miceliares y la dispersión total en forma de hifas aisladas y fragmentadas. Es decir, el efecto de la mutación D125G es menor en comparación a dichos estudios. Adicionalmente, otro hecho que vale la pena mencionar es que en los estudios que muestran mayor producción de tirosinasa en cepas dispersas por mutación de *matAB* o por sobreproducción de *ssgA* no se midió la producción específica de tirosinasa (respecto al crecimiento), sino solamente la cantidad total de enzima secretada al medio, por lo que es muy probable que si la actividad se midiera en forma específica, como hacemos nosotros, la diferencia entre los dos fenotipos fuera menor o inexistente.



11. Conclusión

El efecto de la mutación D125G en *S. lividans* es igual al de *S. coelicolor* en cuanto a la dispersión del micelio, pues produce cúmulos o “pellets” miceliares que sedimentan más lentamente.

El efecto de la mutación D125G es diferente a *S. coelicolor* en cuanto al crecimiento, ya que en *S. coelicolor* esta mutación no afecta la velocidad de crecimiento, mientras que en *S. lividans* la mutante crece más rápido.

No hay diferencia significativa en la producción específica de lipasa extracelular entre cepa la silvestre y mutante de *S. coelicolor*, mientras que en el caso de *S. lividans* la cepa silvestre muestra una mayor producción específica, pero solamente durante la fase exponencial.

12. Perspectivas

Continuar con el estudio de la productividad de cepas con la mutación D125G, utilizando otros sistemas de expresión que no dependan del uso de un promotor fuerte e inducible, ya que esto podría estar influyendo en opacar el efecto de la morfología.

Extender los estudios de productividad entre cepas silvestres y cepas con crecimiento disperso provocado por la mutación D125G, pero empleando otras enzimas, y mediante el uso de condiciones controladas, por ejemplo en biorreactores.



13. Referencias

1. Leblond P, Redenbach M, Cullum J. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 1993; 175 (11): 3422-3429. doi: 10.1128/jb.175.11.3422-3429.1993.
2. Hobbs G, Frazer C, Gardner D, et al. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989; 31(3):272-277. DOI: 10.1007/bf00258408
3. Pimienta E. Evaluación de *Streptomyces lividans* como hospedero para la expresión de interferón alfa 2b y estreptoquinasa. [tesis doctoral]. Cuba: Universidad de la habana; 2009
4. Servín L, Castro C, Pérez C, et al. *bldA*-Dependent expression of the *Streptomyces exfoliates* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *American Society for Microbiology*. 1997; 179 (24):7816-7826. doi: [10.1128/jb.179.24.7816-7826.1997](https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7816-7826.1997)
5. Sikyta B, Slezak J, Herold M. Growth of *Streptomyces aureofaciens* in continuous culture. *Antibiotics Research Institute* [Internet]. 1960 [Consultado 3 de Marzo 2019]; 9:233-238. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/9/3/233.full.pdf>.
6. Wheelis M, Wells B. Uniform growth of *Streptomyces coelicolor* in liquid medium. *John Innes Annual Report* [Internet]. 1974 [Consultado 3 de Marzo 2019]; 77-78. Disponible en: <http://shakingtechnology.org/publication-database/uniform-growth-of-streptomyces-coelicolor-in-liquid-medium>
7. Hodgson D. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J Gen Microbiol*. 1982; 128:2417-2430. DOI: [10.1099/00221287-128-10-2417](https://doi.org/10.1099/00221287-128-10-2417)
8. Palacín A, de la Fuente R, Valle I, et al. *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. *Microbiology*. 2003; 149(9) 2435-2442. doi:10.1099/mic.0.26313-0
9. Arroyo E, González G, Soberón G, et al. A Novel Two-Component System, Encoded by the *sco5282/sco5283* Genes, Affects *Streptomyces coelicolor* Morphology in Liquid Culture. *Front. Microbiol*. 2019; 10:1568. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01568>
10. Redenbach, M, Kieser H, Denapaite D, et al. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol*. 1996; 21 (1):77-96. DOI: [10.1046/j.1365-2958.1996.6191336.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6191336.x)
11. Hopwood D. Therapeutic treasures from the deep. *Nat Chem Biol*. 2007; 3(8):457-458. DOI: [10.1038/nchembio0807-457](https://doi.org/10.1038/nchembio0807-457)
12. Mori H & Ito K. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol*. 2001; 9(10):494-500. DOI: [10.1016/s0966-842x\(01\)02174-6](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02174-6)



13. Vrancken K, De Keersmaeker S, Geukens N, et al. *pspA* overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 73(5):1150-7. DOI: [10.1007/s00253-006-0571-7](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0571-7)
14. Low K, Muhammad M, Md Illias R. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(9): 3811-3826. DOI: [10.1007/s00253-013-4831-z](https://doi.org/10.1007/s00253-013-4831-z)
15. Widdick D, Hicks M, Thompson B, et al. Dissecting the complete lipoprotein biogenesis pathway in *Streptomyces scabies*. *Mol Microbiol.* 2011; 80(5):1395-412. DOI: [10.1111/j.1365-2958.2011.07656.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07656.x)
16. Berks B, Palmer T, Sargent F. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8(2):174-181. DOI: [10.1016/j.mib.2005.02.010](https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.010)
17. Botas A. Regulación del metabolismo en *Streptomyces*: Control por ArgR. [tesis doctoral]. León (Esp): Universidad de León; 2013
18. Bentley S, Chater K, Cerdeño-Tárraga A, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 2002; 417(6885):141-147. DOI: [10.1038/417141a](https://doi.org/10.1038/417141a)
19. García E. Caracterización de los genes *lsp* y *tatC* implicados en la maduración y plegamiento de proteínas secretadas en *Streptomyces lividans*. [tesis doctoral]. Madrid (Esp): Universidad Autónoma de Madrid; 2011.
20. Schaerlaekens K, Lammertyn E, Geukens N, et al. Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol.* 2004; 112(3): 279-288. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2004.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.004)
21. Jayapal K, Lian W, Glod F, et al. Comparative genomic hybridization reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics.* 2007; 8:229. DOI: [10.1186/1471-2164-8-229](https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-229)
22. Millo R, Galpert D, Casa G. Agregación de medidas de similitud para la detección de ortólogos: validación con medidas basadas en la teoría de conjuntos aproximados. *Comp. y Sist.* [Internet]. 2014 [Consultado 3 Marzo 2019]; 18(1):19-35. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/cys/v18n1/v18n1a3.pdf>
23. Manteca A, Yagüe P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. *Antibiotics* (Basel). 2018; 7(2):41. DOI: [10.3390/antibiotics7020041](https://doi.org/10.3390/antibiotics7020041)
24. van Dissel D, Claessen D, van Wezel G. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv Appl Microbiol.* 2014; 89:1–45. DOI: [10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9)
25. van Dissel D, Claessen D, Roth M, et al. A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microb Cell Fact.* 2015; 14:44. DOI: [10.1186/s12934-015-0224-6](https://doi.org/10.1186/s12934-015-0224-6)
26. Wang H, Zhao G, Ding X. Morphology engineering of *Streptomyces coelicolor* M145 by sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *Sci Rep.* 2017; 7:13226. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13493-y>
27. van Wezel G, Krabben p, Traag B, et al. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *App Environ Microbiol.* 2006; 72(8): 5283-5288. DOI: [10.1128/AEM.00808-06](https://doi.org/10.1128/AEM.00808-06)



28. Corona L. Evaluación de la expresión de una glucosa cinasa polifosfato funcional en el metabolismo de *Streptomyces coelicolor*. [tesis licenciatura]. CDMX (México): Universidad Nacional Autónoma de México; 2018
29. Celler K, Picioreanu C, van Loosdrecht M, et al. Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012; 102(3): 409-423. DOI: [10.1007/s10482-012-9760-9](https://doi.org/10.1007/s10482-012-9760-9)
30. van Wezel G, van der Meulen J, Kawamoto S, et al. ssgA Is Essential for *Streptomyces coelicolor* A3(2) and Affects Hyphal Development by Stimulating Septum Formation. *J Bacteriol*. 2000; 182 (20): 5653-5662. doi: [10.1128/jb.182.20.5653-5662.2000](https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5653-5662.2000)
31. van Wezel G, McKenzie N, Nodwell J. Chapter 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model Actinomycetes to the discovery of new antibiotics. *Methods Enzymol*. 2009; 458:117-141. DOI: [10.1016/S0076-6879\(09\)04805-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04805-8)
32. Zacchetti B, Willemse J, Recter B, et al. Aggregation of germlings is a major contributing factor towards mycelial heterogeneity of *Streptomyces*. *Sci Rep*. 2016; 6:27045. DOI: [10.1038/srep27045](https://doi.org/10.1038/srep27045)
33. Xu H, Chater K, Deng Z, et al. A cellulose Synthase-Like Protein Involved in Hyphal Tip Growth and Morphological Differentiation in *Streptomyces*. *J Bacteriol*. 2008; 190(14): 4971-4978. DOI: [10.1128/JB.01849-07](https://doi.org/10.1128/JB.01849-07)
34. van Veluw G, Petrus M, Gubbens J, et al. Analysis of two distinct mycelial populations in liquid-grown *Streptomyces* cultures using a flow cytometry-based proteomics approach. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 96(5):1301-1312. DOI: [10.1007/s00253-012-4490-5](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4490-5)
35. Gullón S, Vicente R, Mellado R. A novel Two-Component System Involved in Secretion Stress Response in *Streptomyces lividans*. *PLoS One*. 2012; 7(11):36-49. DOI: [10.1371/journal.pone.0048987](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048987)
36. MacNeil D, Gewain K, Ruby C, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*. 1992; 111(1):61-68. DOI: [10.1016/0378-1119\(92\)90603-m](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90603-m)
37. Kieser T, Bibb M, Buttner M, et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich (Inglaterra): John Innes Foundation. 2000
38. Takano E, White J, Thompson J, et al. Construction of thiostrepton inducible, high copy number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene*. 1995; 166(1):133-137. DOI: [10.1016/0378-1119\(95\)00545-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00545-2)
39. Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, et al. λ Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol*. 2004; 54:107-128. DOI: [10.1016/S0065-2164\(04\)54004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54004-2)
40. Pérez C, Juárez K, García-Catekks, et al. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase encoding gene from *Streptomyces* sp M11. *Gene*. 1993; 123(1):109-14. DOI: [10.1016/0378-1119\(93\)90548-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90548-h)
41. Valdez F, González G, Kieser H, et al. The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology*. 1999; 145(9): 2365-2374. DOI: [10.1099/00221287-145-9-2365](https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2365)



42. Zhan Z, Yudong L, Ning S, et al. Function and evolution of two forms of SecDF homologs in *Streptomyces coelicolor*. PLOS ONE. 2014; 9(8): e105237. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105237>
43. Yagüe P, Manteca A, Simon A, et al. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(10): 2401-4. DOI: [10.1128/AEM.00120-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00120-10)

14. Anexos

Buffer P

- Sacarosa 5.15 g
- K₂SO₄ 0.0125 g
- MgCl₂·6H₂O 0.101 g
- Trazas R5* 0.1 mL
- Aforar con agua Milli-Q pH 7.0 40 mL

Esterilizar en autoclave

*Trazas R5 (por litro)

- ZnCl₂ 40 mg
- FeCl₃·6H₂O 200 mg
- CuCl₂·2H₂O 10 mg
- MnCl₂·4H₂O 10 mg
- Na₂B₄O₇·10H₂O 10 mg
- (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10 mg

Esterilizar en autoclave (1.0 psi/10 min)

Para suplementar el buffer P agregar las siguientes soluciones estériles

- Trazas R5* 0.1 mL
- KH₂PO₄ (0.5%) 0.5 mL



- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) 5.0 mL
- $\text{Tris} \cdot \text{Cl}$ (0.25M) pH 7.2 5.0 mL

Dejar reposar 30 minutos

Medios de cultivo

YEME

- Extracto de levadura 0.3 g
- Bacto-Peptona 0.5 g
- Extracto de malta 0.3 g
- Glucosa 1.0 g
- Sacarosa 34 g
- Aforar con agua Milli-Q pH 7.0 100 mL

Esterilizar en autoclave

Para suplementar el medio YEME agregar las siguientes soluciones estériles por cada 25 mL

- MgCl_2 (1M) 0.125 mL
- Glicina 10% 1.25 mL

R2YE

- Sacarosa 10.3 g
- K_2SO_4 0.025 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.012 g
- Glucosa 1.0 g
- Casaminoácidos 0.01 g
- Agar 0.22 g
- Aforar con agua Milli-Q pH 7.0 80 mL

Esterilizar en autoclave

Para suplementar el agar R2YE agregar las siguientes soluciones estériles



- KH_2PO_4 (0.5%) 1.0 mL
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) 8.0 mL
- L-Prolina 1.5 mL
- Tris·Cl (0.25M) pH 7.2 10 mL
- Trazas R5* 0.2 mL
- CuSO_4 0.2 mL
- NaOH (1N) 0.2 mL
- Extracto de levadura (10%) 5.0 mL

Agar suave para transformaciones

- Tris·Cl (0.25M) pH 7.2 10 mL
- MgCl_2 1.0 g
- CaCl_2 (5M) 0.4 mL
- Sacarosa 10.3 g
- Agar 0.65 g
- Aforar con agua Milli-Q pH 7.0 100 mL

Esterilizar en autoclave

