



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica

Montevideo, Uruguay

Marzo 2025

Producción de quimosina bovina recombinante en *Aspergillus nidulans*

Bach. Antonella Benítez Rey

Tutor: Manuel Sanguinetti

Co-tutor: Juan José Marizcurrena

Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular,
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
1. Introducción	3
1.1. Proteasas	3
1.2. Aspartil proteasas	3
1.3. Quimosina	4
1.4. Sistemas de expresión	6
1.5. <i>Aspergillus nidulans</i> como sistema de expresión	7
1.5.1. Presentación del organismo	7
1.5.2. <i>A. nidulans</i> como sistema de expresión de enzimas de interés comercial	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Resultados y discusión.....	12
3.1. Generación de construcciones génicas de interés por Fusion-PCR	12
3.1.1. Fusion-PCR.....	14
3.2. Clonado de las construcciones en vector comercial para su secuenciación	17
3.3. Generación de plásmido que porte el marcador <i>argB</i> y sub-clonado de las construcciones en el mismo.	20
3.4. Transformación en <i>A. nidulans</i>	27
3.5. Análisis de expresión de la quimosina	30
4. Conclusiones y perspectivas	36
5. Materiales y métodos	37
5.1. Genotipo y fenotipo de cepas utilizadas	37
5.2. Condiciones de cultivo	37
5.3. Medios de cultivo y Soluciones	37
5.4. <i>Primers</i>	40
5.5. ADNg y plásmidos utilizados	41
5.6. Generación de construcciones	41
5.6.1. Fusion-PCR.....	41
5.6.2. Clonado de las construcciones en vector comercial para secuenciación.....	44
5.6.3. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción	48

5.6.4.	Clonado de <i>argB</i> en plásmido zero blunt	48
5.6.4.5.	Subclonado de las construcciones en plásmido portador del marcador <i>argB</i> ...	51
5.7.	Cuantificación de ADN	52
5.8.	Análisis electroforético de ácidos nucleicos.....	52
5.9.	Purificación por gel	53
5.10.	Técnicas empleadas en <i>A. nidulans</i>	53
5.10.1.	Protoplastización y transformación en <i>Aspergillus nidulans</i>	53
5.10.1.1.	Purificación de transformantes	55
5.10.2.	Extracción de ADN genómico.....	55
5.11.	Western blot	56
5.11.1.	Extracción de proteínas	56
5.11.2.	Dosificación de proteínas mediante método BCA	57
5.11.3.	SDS-PAGE.....	57
5.11.4.	Transferencia	58
5.12.	Ensayos de actividad proteolítica.....	59
6.	<i>Bibliografía</i>	60
7.	<i>Anexo</i>	64

Agradecimientos

A la Sección Bioquímica, por brindarme el espacio y los recursos para desarrollar este trabajo.

Al gran equipo del laboratorio 313, por su constante apoyo, compañerismo y las inolvidables experiencias compartidas.

A Manuel, por transmitirme sus conocimientos con paciencia y dedicación, guiándome en cada etapa del aprendizaje.

A Juan, por su buena energía y disposición.

A mi familia, por su apoyo incondicional en cada etapa.

A Martín, por su apoyo, por compartir este camino conmigo y celebrar cada logro a mi lado.

Resumen

La industria láctea, un sector valorado en miles de millones a nivel global, enfrenta constantes desafíos en su búsqueda por optimizar procesos y mejorar la calidad de sus productos. Dentro de este contexto, las proteasas juegan un papel crucial, especialmente la quimosina, una aspartil proteasa esencial en la producción de quesos mediante el cuajado de la leche. Esta se produce como zimógeno (proquimosina), y su activación autocatalítica se da en el pH ácido del cuarto estómago de los rumiantes. La alta demanda de quimosina por parte de la industria quesera ha impulsado el desarrollo de su producción recombinante, asegurando un suministro sostenible y escalable que optimiza el proceso de coagulación de la leche.

Este trabajo busca optimizar la expresión recombinante de la quimosina bovina en *Aspergillus nidulans*. Éste es un hongo filamentoso multicelular que posee un ciclo de vida corto y de rápido crecimiento, lo que permite obtener grandes cantidades de biomasa con mínimos requerimientos nutricionales.

Se realizó un diseño para expresar la proquimosina en *A. nidulans*, para lo cual se generaron dos construcciones, una que permite la expresión constitutiva, y otra que permite una expresión inducible de la misma. Para favorecer la secreción al medio extracelular, la proquimosina se fusionó a una versión truncada de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, una enzima altamente secretada por este organismo. A diferencia de intentos anteriores de expresión en *A. nidulans*, la secuencia que codifica para la proquimosina fue optimizada para su expresión en este organismo junto con una etiqueta de polihistidinas.

Las construcciones se generaron mediante fusion-PCR, y se clonaron en un plásmido que porta el marcador auxotrófico *argB*. Posteriormente se transformaron en una cepa de *A. nidulans* portadora de la mutación *argB2*. Logramos detectar la expresión de la quimosina en los sobrenadantes del medio de cultivo de los transformantes obtenidos, mediante Western blot con anticuerpo α -His tag y, además, detectamos actividad proteolítica de la quimosina expresada mediante ensayos con leche como sustrato. Nuestros resultados demuestran que *A. nidulans* es un sistema viable para la expresión recombinante de quimosina bovina, abriendo nuevas posibilidades para su producción a escala.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	2-Desoxinucleótidos 5-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
Kb	Kilobases
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
MMS	Medio mínimo sacarosa
MPM	Marcador de peso molecular
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
PEG	Polietilenglicol
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TAE	Tris Acetato EDTA
UV	Ultravioleta

1. Introducción

1.1. Proteasas

Las proteasas, también conocidas como enzimas proteolíticas, catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas, facilitando su degradación. Estas enzimas desempeñan un papel crucial en diversas industrias y representan aproximadamente el 60% del mercado global de enzimas (Gimenes et al., 2021).

Se trata de un grupo heterogéneo de biocatalizadores que incluyen proteinasas, peptidasas y amidasas, cada una con funciones específicas en la degradación de proteínas y péptidos. Su versatilidad las hace indispensables en múltiples aplicaciones industriales, especialmente en los sectores alimentario, de detergentes y farmacéutico, donde optimizan procesos, mejoran la calidad de los productos y contribuyen a la sostenibilidad de las tecnologías productivas (Li et al., 2013).

Según la Clasificación de Enzimas (EC, *Enzyme Commission*), las proteasas pertenecen a la categoría de hidrolasas (EC 3), específicamente al subgrupo EC 3.4, que incluye peptidasas y proteinasas encargadas de la ruptura de enlaces peptídicos. Dentro de este subgrupo, se pueden clasificar aún más según su mecanismo catalítico en serín-proteasas, cisteín-proteasas, aspartil-proteasas y metaloproteasas.

1.2. Aspartil proteasas

Las aspartil proteasas o proteasas ácidas, son endopeptidasas que requieren dos residuos de ácido aspártico en su sitio activo para ejercer su función catalítica. Estos residuos se localizan en segmentos cortos de la cadena polipeptídica, los cuales muestran una alta homología de secuencia y una notable similitud en su estructura tridimensional. Estas enzimas actúan en condiciones de pH bajo, prefiriendo escindir enlaces peptídicos entre aminoácidos hidrófobos, y son fuertemente inhibidas por la pepstatina. Además, sus puntos isoeléctricos se sitúan en el rango de pH 3 a 4.5 y presentan masas moleculares entre 30 y 50 kDa (Fitzgeraldsj et al., 1990).

La estructura de las aspartil proteasas es bilobulada, donde cada lóbulo aporta un residuo de ácido aspártico que, al aproximarse, forma el sitio activo. Su mecanismo catalítico se basa en una catálisis ácido-base: uno de los residuos de aspartato actúa como donador de protones mientras que el otro funciona como aceptor, permitiendo la

activación de una molécula de agua. Este proceso se inicia con la extracción de un protón de la molécula de agua, generando un ion hidroxilo nucleofílico que ataca el carbono del grupo carbonilo del enlace peptídico y forma un intermediario tetraédrico. Posteriormente, el segundo aspartato dona un protón al nitrógeno del enlace a romper, facilitando su escisión y regenerando el estado de protonación inicial. (Polgár, 1987).

1.3. Quimosina

La quimosina (EC 3.4.23.4) es una aspartil proteasa compuesta por 323 aminoácidos y presenta una masa molecular de 35.6 kDa. Su principal aplicación se encuentra en la industria láctea, donde se utiliza para la producción de quesos, específicamente actúa en el cuajado de la leche mediante la hidrólisis de la k-caseína. El corte específico entre los residuos de fenilalanina (Phe105) y metionina (Met106) de esta proteína confiere a la quimosina su característica única, resultando en la textura y el sabor distintivo del queso (Langholm Jensen et al., 2013).

Naturalmente es secretada en el cuarto estómago de rumiantes recién nacidos. La proquimosina (365 aa), precursor inactivo de la quimosina, es sintetizada por las células de la mucosa como pre-proquimosina (381 aa) con un péptido señal hidrofobo de 16 aa (Figura 1). La quimosina se forma por activación autocatalítica en medio ácido, lo que resulta en la escisión de un fragmento de 42 aa en el extremo N-terminal de la proquimosina (Zinovieva et al., 2002).

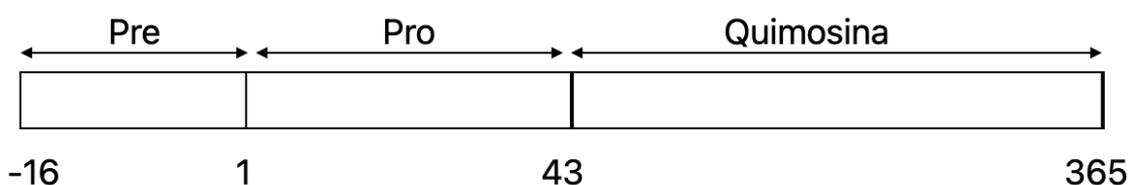


Figura 1. Esquema de la estructura de la quimosina tomada y modificada Mohanty et al., 1999.

Los 16 residuos de aminoácidos hidrofóbicos iniciales constituyen el péptido señal o pre-péptido, esencial para que se dé la secreción de la quimosina a través de la membrana celular. Este péptido es eliminado durante el proceso de secreción, y en el estómago, la enzima se presenta como proquimosina, con una masa molecular de 40 kDa. A pH menor de 5, la proquimosina se activa y se convierte en quimosina, perdiendo 42 residuos de aminoácidos N-terminales. La activación depende del pH, ya que las interacciones electrostáticas entre residuos básicos en el segmento pro y residuos ácidos en la porción activa son cruciales. A pH neutro, estas interacciones mantienen el zimógeno inactivo, mientras que a pH < 5, los residuos ácidos se protonan, rompiendo

las interacciones y promoviendo cambios conformacionales en la enzima (Mohanty et al., 1999).

Existen dos variantes genéticas de quimosina bovina: quimosina A y B, que difieren en un solo residuo en la posición 244. Este cambio otorga a la quimosina A una mayor afinidad por la caseína K, mientras que la quimosina B muestra mayor estabilidad a pH bajos. (Gilliland et al., 1990).

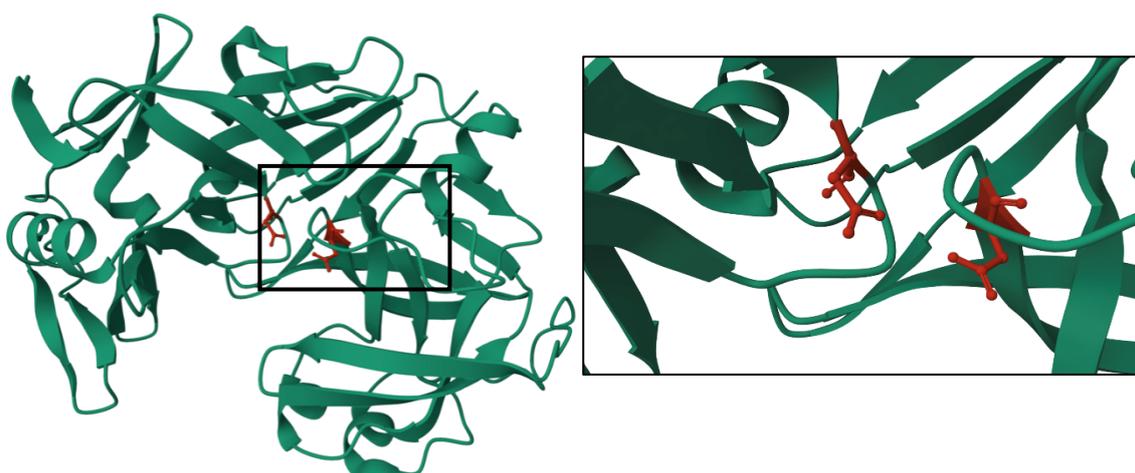


Figura 2. Estructura de la quimosina bovina extraída de Protein Data Bank, código PDB: 1CMS (<https://www.rcsb.org/structure/1CMS>). Modelada por Gilliland et al., 1990. En el sitio activo se representan los residuos de aspartato necesarios para el mecanismo catalítico.

La quimosina presenta una estructura secundaria compuesta principalmente por láminas β y algunos pocos segmentos cortos de hélices α (Gilliland et al., 1990). Su estructura terciaria se caracteriza por una forma bilobular, que consiste en dominios N-terminal y C-terminal separados por un surco profundo que alberga el sitio activo, donde se encuentran los residuos catalíticos Asp32 y Asp215 (Figura 2). Presenta dos sitios teóricos para N-glicosilación (252 y 291). La glicosilación desempeña un papel significativo en la estabilidad y actividad de la enzima, influyendo en su interacción con los sustratos (Langholm Jensen et al., 2013).

La proquimosina contiene tres enlaces disulfuro esenciales para su estructura y función, Cys45-Cys50, Cys206-Cys210 y Cys250-Cys283. Se ha demostrado que el enlace Cys250-Cys283 es indispensable para el correcto plegamiento de la proquimosina, ya que su ausencia impide la adquisición de una conformación funcional. En contraste, el enlace Cys45-Cys50 es prescindible, aunque su presencia contribuye a la estabilidad estructural de la enzima y afecta su especificidad de sustrato. Estos hallazgos destacan la importancia diferencial de los enlaces disulfuro en la maduración

y funcionalidad de la quimosina, proporcionando información clave para su producción y optimización en sistemas recombinantes (Chen et al., 2000).

1.4. Sistemas de expresión

La incapacidad de las quimosinas animales para cubrir las demandas actuales de cuajo en la industria quesera, ha conducido a un aumento del interés por las quimosinas recombinantes, lo que ha llevado al desarrollo de quimosina recombinante en distintos organismos. La producción de proteínas recombinantes a nivel industrial ha permitido optimizar la obtención de enzimas con alta eficiencia y pureza, reduciendo la dependencia de fuentes animales y promoviendo procesos más sostenibles.

En particular, la expresión de quimosina en microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos ha mejorado considerablemente la disponibilidad de esta enzima para la industria láctea, garantizando un suministro constante y estandarizado. Se han utilizado diferentes sistemas para la expresión recombinante de quimosina bovina, entre los cuales se encuentran las bacterias *Escherichia coli* (Nishimori et al., 1982), *Proteus mirabilis* (Klessen et al., 1989) y *Bacillus subtilis* (Parente et al., 1991); la levadura *Pichia pastoris* (Zhang et al., 2009;) y los hongos filamentosos *Aspergillus awamori* (Cardoza et al., 2003) y, *A. nidulans* (Cullen et al., 1987). Además, se han expresado de forma recombinante quimosinas de otros mamíferos, como la quimosina proveniente de camello, la cual se expresó con éxito en *Aspergillus niger* (Kappeler et al., 2006).

La producción de quimosina bovina recombinante en procariotas y eucariotas difiere significativamente en términos de modificaciones postraduccionales y actividad enzimática. La glicosilación es una modificación postraduccional que puede influir significativamente en la actividad y estabilidad de las enzimas. En el caso de la quimosina, se ha reportado que esta modificación afecta su eficiencia catalítica, su capacidad hidrolítica y sus niveles de producción en sistemas heterólogos. Estudios previos han demostrado que la quimosina de camello con doble glicosilación presenta una eficiencia catalítica ligeramente mayor en comparación con su forma no glicosilada, aunque sin cambios en la afinidad por el sustrato (Jensen et al., 2015) .

Además, se ha observado que estrategias de glicosilación mejorada pueden incrementar los niveles de producción de quimosina en hongos filamentosos, lo que resulta de gran importancia para su aplicación en la industria alimentaria (Kappeler et al., 2006).

Los sistemas procariotas a menudo producen proteínas que están menos glicosiladas, lo que puede afectar su funcionalidad y estabilidad, además en ciertas ocasiones

presenta problemas de solubilidad y correcto plegamiento. Por el contrario, los sistemas eucariotas pueden realizar modificaciones postraduccionales complejas. Además, la glicosilación puede mejorar la solubilidad y la resistencia a condiciones adversas, lo que es esencial para aplicaciones industriales (Bozkurt et al., 2023).

La expresión de quimosina en procariotas, como *E. coli*, presenta desafíos significativos debido a la formación de enlaces disulfuro, los cuales son esenciales para el correcto plegamiento y actividad enzimática. En *E. coli*, el citoplasma es un ambiente altamente reductor, lo que impide la formación adecuada de estos enlaces y puede provocar plegamiento incorrecto alterando la función de la proteína (Baneyx & Mujacic, 2004). Como consecuencia, la quimosina mal plegada tiende a agregarse en cuerpos de inclusión, estructuras insolubles que requieren estrategias adicionales de solubilización y replegado, lo que disminuye la eficiencia del proceso (Singh et al., 2015). Además, a diferencia de los eucariotas, *E. coli* carece de una maquinaria eficiente para la formación de enlaces disulfuro, como la que se encuentra en el retículo endoplasmático de células fúngicas o de mamíferos (Berkmen, 2012).

Por estas razones, la expresión de quimosina en *E. coli* no solo es ineficiente, sino que también requiere estrategias adicionales para recuperar la actividad enzimática, lo que limita su aplicabilidad a escalas industriales. Esto resalta la necesidad de explorar sistemas eucariotas que permitan un plegamiento y procesamiento más eficiente de la quimosina.

1.5. *Aspergillus nidulans* como sistema de expresión

1.5.1. Presentación del organismo

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso multicelular del filo Ascomycota, clasificado como aerobio obligado. Su ciclo de vida corto y su rápida tasa de crecimiento permiten la producción de grandes cantidades de biomasa, lo que lo convierte en un organismo modelo valioso para diversas aplicaciones biotecnológicas. Además, sus requerimientos nutricionales son mínimos y simples, lo que facilita su cultivo.

El genoma de *A. nidulans* ha sido secuenciado (Galagan et al., 2005) y es relativamente fácil de manipular, lo que permite la introducción de modificaciones genéticas (Todd et al., 2007). Este organismo presenta un genoma haploide compuesto por 8 cromosomas, con un tamaño aproximado de 30 Mb, lo que facilita estudios de genética clásica,

recombinación y regulación de la expresión génica. Su alta eficiencia en recombinación homóloga lo convierte en un modelo ideal para experimentos de ingeniería genética.

Presenta un desarrollo tanto asexual como sexual, a través de un crecimiento vegetativo. Su capacidad para producir conidias uninucleadas permite la propagación clonal, así como la rápida purificación de mutantes, transformantes y descendencia de cruas. La reproducción sexual facilita la generación de cruas, simplificando la obtención de cepas para diversos análisis genéticos. Además, al ser un organismo haploide, se favorece la selección de mutantes en una sola generación (Todd et al., 2007).

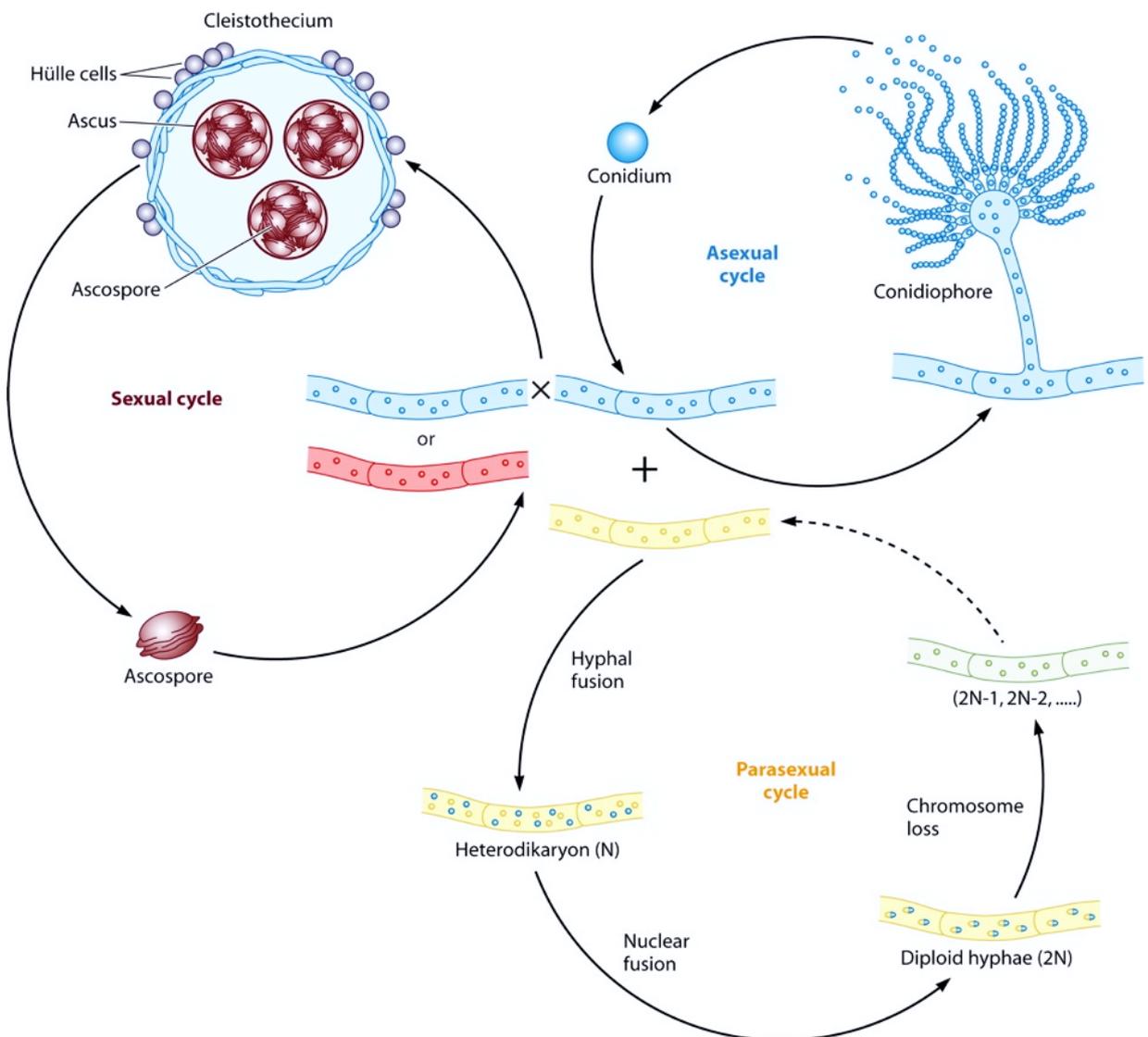


Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Tomada de (Lee et al., 2010).

A. nidulans presenta un ciclo de vida compuesto por tres fases de desarrollo: asexual, sexual y parasexual (Figura 3). Crece como hifas filamentosas vegetativas haploides, que pueden originarse a partir de la germinación de conidias uninucleadas en el ciclo asexual o de ascosporas binucleadas en el ciclo sexual. El ciclo asexual se caracteriza por el crecimiento vegetativo de las hifas, formando colonias filamentosas. Este proceso inicia con la germinación de una conidia (espora asexual), que origina hifas tubulares que se extienden de manera hiperpolarizada mediante la elongación apical y la ramificación lateral, creando una red interconectada conocida como micelio. Posteriormente, estas hifas desarrollan estructuras especializadas llamadas conidióforos, de los cuales se generan conidias uninucleadas, capaces de germinar y formar nuevas hifas. En el ciclo sexual, se forma un cuerpo de fructificación esférico, denominado cleistotecio, que contiene numerosos sacos llamados ascos, donde se producen las ascosporas (esporas sexuales). Por otro lado, el ciclo parasexual ocurre cuando los núcleos heterocariontes se fusionan, dando lugar a hifas diploides que, tras un proceso de haploidización, restauran la condición haploide del organismo (Todd et al., 2007).

1.5.2. *A. nidulans* como sistema de expresión de enzimas de interés comercial

A. nidulans ha sido ampliamente estudiado y se ha consolidado como un modelo fúngico eficaz para la producción de enzimas con aplicaciones industriales debido a su alta capacidad de secreción de proteínas y su facilidad de manipulación genética (Osmani et al., 2008). Se destaca su capacidad como fábrica celular para sintetizar una amplia variedad de enzimas, incluyendo celulasas, β -glucosidasas, hemicelulasas, lacasas, lipasas, proteasas, β -galactosidasas, tanasas, queratinasas, cutinasas y aril alcohol oxidasa (Kumar, 2020). Además, puede utilizar sustratos de bajo costo, como residuos agrícolas (salvado de trigo, bagazo de caña, paja de arroz, entre otros), lo que permite reducir los costos de producción en procesos industriales (Jabasingh & Nachiyar, 2011; Kumar et al., 2016).

También se ha investigado su uso como plataforma para la expresión de enzimas heterólogas, permitiendo la producción de proteínas recombinantes de alto valor comercial. Se han desarrollado cepas modificadas genéticamente para mejorar la expresión y secreción de diversas enzimas. Se logró la sobreexpresión de xilanasas, arabinofuranosidasas y aril alcohol oxidasa, alcanzando altos niveles de producción en

medios fermentativos optimizados (Segato et al., 2012; Liu et al., 2020). En otro estudio, se modificó *A. nidulans* para la producción sinérgica de xilooligosacáridos a partir de bagazo de caña, demostrando su potencial en la valorización de biomasa lignocelulósica (da Silva Menezes et al., 2018). Además, se ha desarrollado un mutante de *A. nidulans* incapaz de sintetizar piridoxina, lo que permitió redirigir la energía metabólica hacia la producción de aril alcohol oxidasa en condiciones de fermentación limitada, incrementando significativamente la productividad enzimática (Pardo-Planas et al., 2017). Otras modificaciones han permitido la producción de lipasas recombinantes utilizando residuos agroindustriales como fuentes de carbono, mejorando la eficiencia del proceso y reduciendo costos (Cerioni et al., 2020).

Diversos factores pueden influir en la producción enzimática de *A. nidulans*. Entre los parámetros más relevantes se encuentran la temperatura de incubación, el pH inicial y el tiempo de fermentación. Se ha observado que la producción enzimática óptima ocurre en un rango de temperatura entre 30 y 45°C, dependiendo del tipo de enzima (Kumar et al., 2016). El pH inicial es otro factor clave, ya que esta especie puede producir enzimas en un amplio rango de pH (3 - 10), aunque los valores óptimos dependen del tipo de enzima y del proceso de fermentación empleado (Liu et al., 2020). El tiempo de incubación varía según la cepa y el tipo de enzima, y puede oscilar entre 1 y 11 días, aunque tiempos de fermentación más cortos suelen ser elegidos para minimizar costos y evitar contaminaciones (Jabasingh & Nachiyar, 2011). Estos factores, en conjunto con el tipo de sustrato utilizado y la disponibilidad de fuentes de nitrógeno, determinan la eficiencia de producción de enzimas en este sistema biotecnológico (Kumar, 2020).

Las enzimas producidas por *A. nidulans* presentan aplicaciones en diversas industrias (revisado en Kumar, 2020):

Biorrefinería	Degradación de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles.
Industria alimentaria	Producción de prebióticos como xilooligosacáridos y uso de β -galactosidasa en productos lácteos.
Industria papelera	Aplicación de xilanasas y celulasas para el blanqueo de pulpa y el biodeinking (eliminación de tinta impresa) de papel reciclado.
Tratamiento de efluentes	Uso de lacasas para la degradación de colorantes industriales y la biorremediación de aguas residuales.

1.5.2.1. Expresión de quimosina en *A. nidulans*

El trabajo de Cullen et al. (1987) es considerado uno de los antecedentes clave en la expresión de quimosina en *A. nidulans*. Se utilizó el promotor de la glucoamilasa de *A. niger* para dirigir la expresión del gen de la proquimosina. Este promotor es fuerte y está bien caracterizado. En este estudio, la estrategia para lograr la expresión y secreción de proquimosina en *A. nidulans* se basó en la construcción de plásmidos que incluían un marcador seleccionable (*pyr4*, el cuál complementa la auxotrofia por la uridina y el uracilo) y unidades de expresión que contenían el ADNc de proquimosina o preproquimosina, flanqueadas por las regiones de control transcripcional, translacional y secretora del gen de glucoamilasa de *Aspergillus niger*. La quimosina fue secretada al medio de cultivo y mostró actividad proteolítica funcional, confirmando que la proteína era biológicamente activa y capaz de hidrolizar la caseína.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Contribuir a la mejora de la expresión de quimosina bovina recombinante a través de la optimización de su expresión, como proquimosina, en *Aspergillus nidulans*, estableciendo este microorganismo como plataforma de expresión para la producción de proteínas recombinantes.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Generar construcciones génicas para la expresión constitutiva (y alta) o inducible de la proquimosina, asegurando su secreción al medio de cultivo.
- 2.2.2. Clonar las construcciones génicas generadas en vector comercial para su secuenciación.
- 2.2.3. Generar un plásmido con el marcador auxotrófico *argB* y sub-clonar en el las construcciones génicas verificadas por secuenciación.
- 2.2.4. Transformar una cepa de *A. nidulans* portadora de la mutación *argB2*, y verificar de la integración de las construcciones de interés.
- 2.2.5. Analizar la expresión de la quimosina mediante Western Blot y evaluar su actividad proteolítica.

3. Resultados y discusión

3.1. Generación de construcciones génicas de interés por Fusion-PCR

Para expresar la proquimosina en *A. nidulans* se diseñaron dos construcciones génicas, una que permite la expresión constitutiva (y alta), y otra que permite una expresión inducible de la misma (Figura 4). La expresión constitutiva, se realiza mediante el uso del promotor del gen *gpdA* (el cual codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa en *A. nidulans*) (Pantazopoulou et al., 2009). Para la expresión inducible se utiliza el promotor del gen *alcA* (el cual codifica para la alcohol deshidrogenasa en *A. nidulans*). La expresión a través de este promotor es inducible mediante la adición de etanol/metiletilcetona al medio de cultivo (Waring et al., 1989).



Figura 4. Representación esquemática de las construcciones génicas generadas.

Para lograr que la proteína se secrete al medio extracelular, ésta se fusionó a una versión trunca de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (ANGlaA₁₋₅₁₄; la cual posee 514 aminoácidos, mientras que la versión completa comprende 616 aminoácidos). ANGlaA (EC 3.2.1.3) es una enzima secretada en grandes cantidades por *A. niger* para producir azúcar a partir de almidón. Dado su nivel de secreción, es utilizada como proteína *carrier* para la expresión y secreción de proteínas heterólogas al medio de cultivo. La versión trunca utilizada carece del dominio de unión a almidón, por lo que además de eliminar la actividad catalítica de esta enzima (innecesaria para su rol como *carrier*), reduce el peso molecular de la fusión de interés (*i.e.*, ANGlaA-proteína a secretar). Asimismo, ayuda a estabilizar y facilitar el correcto plegamiento de proteínas heterólogas (Svensson et al., 1986. Broekhuijsen et al., 1993).

La secuencia que codifica para la proquimosina se optimizó, tomando en cuenta el uso de codones de *A. nidulans* (se sintetizó dicha secuencia en la empresa Genscript quien ofrece este servicio de optimización y síntesis). También se le adicionó la secuencia que codifica para un *tag* de 6 histidinas en su extremo C-terminal para su eventual purificación y también para su detección por Western blot. Como terminador de la transcripción se utilizó el terminador del gen *cgrA* de *Aspergillus fumigatus*.

En los extremos de cada construcción génica se añaden los sitios de corte NotI y XbaI para su posterior clonado en el plásmido de interés (ver más adelante).

Las construcciones se generaron mediante la técnica de *fusion-PCR* (Szewczyk et al., 2006), la cual mediante la amplificación de fragmentos utilizando *primers* híbridos, permite fusionarlos. En una primera instancia (1^{era} ronda de la PCR) se amplifican los fragmentos a fusionar mediante PCR convencional, con la variante del uso de *primers* híbridos. Esto es importante, dado que estos contienen una región que hibrida en el gen que se quiere amplificar y una región que solapará con el fragmento contiguo. Luego, se realiza una 2^{da} ronda de PCR en donde ocurrirá la fusión propiamente dicha de los fragmentos que compondrán la construcción génica y la amplificación del mismo a través del uso de *primers* anidados (*primers* “internos” a los extremos de los fragmentos que flanquean el *cassette* génico; esto permite una mejor eficiencia de amplificación) (Figura 5).

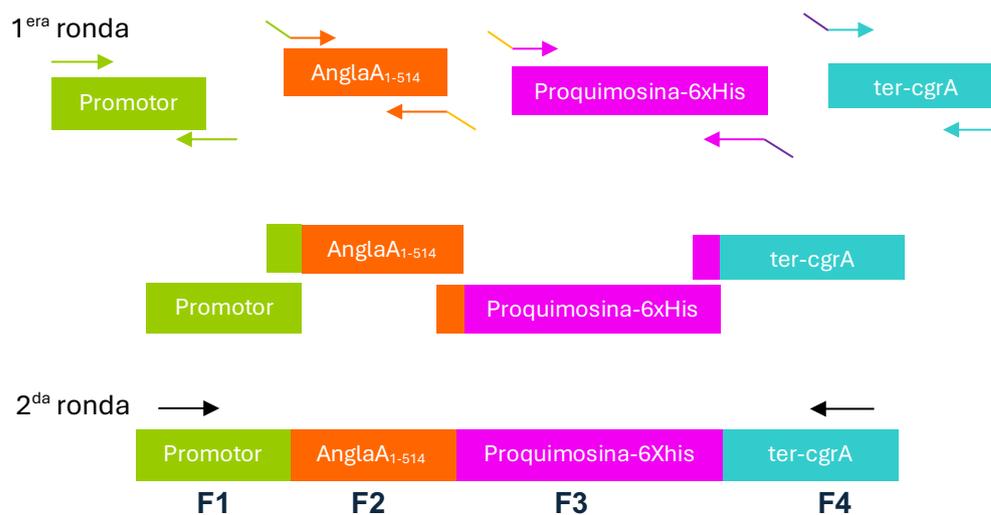


Figura 5. Ilustración de la técnica *fusion-PCR*. En la parte superior, se representa la primera ronda de *Fusion-PCR*, en la cual se amplifican los distintos fragmentos a fusionar. Los *primers* están ilustrados como flechas, cuyo color indica su complementariedad con respecto al molde. Los *primers* híbridos se representan con una flecha que incluye una extensión en diagonal. En la región central de la figura, se muestran las regiones solapantes complementarias de cada fragmento. Finalmente, en la región inferior de la figura, se representa la segunda ronda de *Fusion-PCR* con los primers anidados (flechas negras), en la que se generan y se amplifican las construcciones deseadas. Para facilitar la nomenclatura se le va a denominar a los distintos fragmentos F1, F2, F3 y F4.

3.1.1. Fusion-PCR

A continuación, se describe en detalle el proceso experimental empleado para generar las construcciones génicas, comenzando con la amplificación individual de los fragmentos mediante una primera ronda de PCR.

Primera ronda

Para generar las construcciones génicas de interés, se realizó la amplificación de cada uno de los fragmentos a fusionar (ver Tabla 1 y Figura 6).

Tabla 1. Nomenclatura de los fragmentos y tamaños esperados

Fragmento	Nomenclatura (ver Figura 5)	Tamaño esperado
Promotor	F1 P _{gpdA}	1124 pb
	F1 PalcA	490 pb
ANGlaA ₁₋₅₁₄	F2 P _{gpdA} -ANGlaA	1713 pb
	F2 PalcA-ANGlaA	1713 pb
Proquimosina	F3	1255 pb
Terminador (ter_cgrA_AF)	F4	307 pb

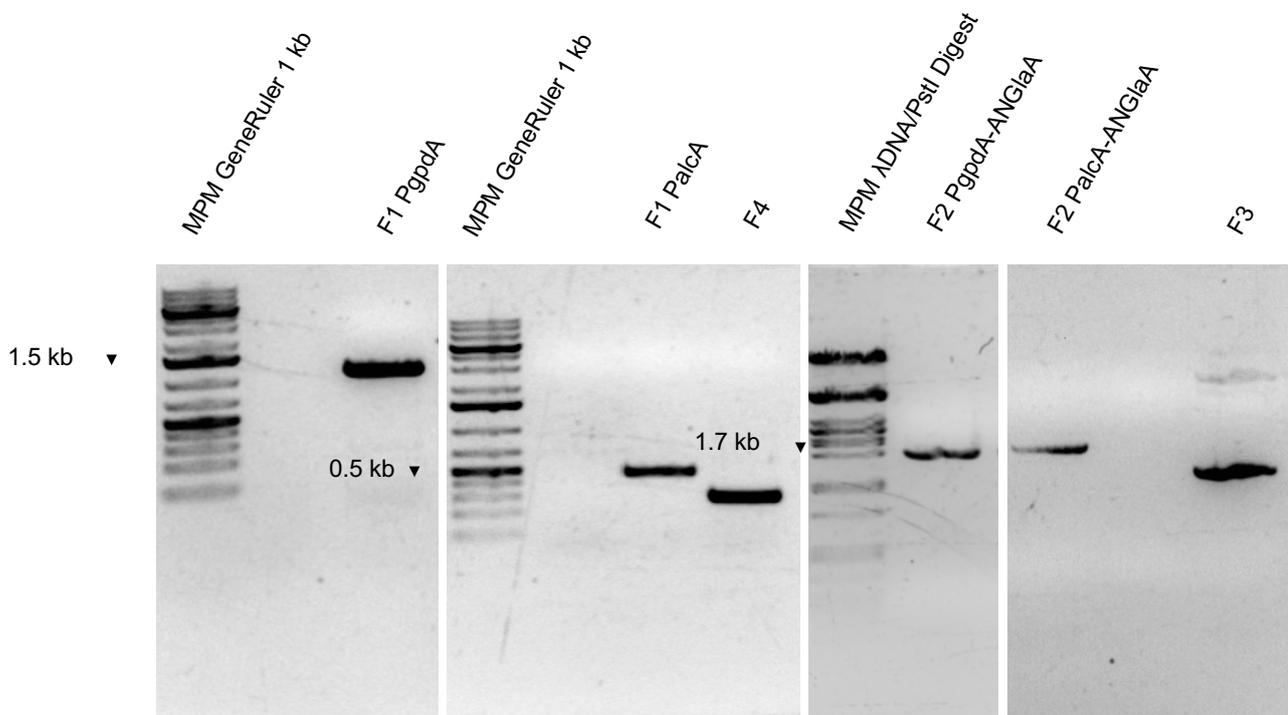


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de los productos de PCR de la primera ronda de Fusion-PCR. Se sembraron 3 μ L de muestra y 4 μ L del marcador de peso molecular indicado.

Se logró amplificar con éxito cada uno de los fragmentos de interés de la primera ronda de PCR (Tabla 1). Una vez optimizadas las condiciones, se repitieron las PCRs para obtener una mayor cantidad de cada fragmento, lo cual facilita su posterior purificación. Los productos fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa. La purificación es un paso fundamental antes de la fusión, ya que la presencia de *primers* libres de la primera amplificación podría comprometer su eficiencia. Los productos purificados se cuantificaron en el Nanodrop (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de productos purificados de la primera ronda

Fragmento	Concentración (ng/μL)
F1 PgpdA	70.8
F1 PalcA	28.8
F2 PgpdA-ANGlaA	58.1
F2 PalcA-ANGlaA	50.7
F3	55,9
F4	112,9

Segunda ronda

Una vez obtenidos los fragmentos deseados se realizó la fusión de estos, para la obtención de las construcciones de interés (Figura 4):

PgpdA: NotI-PgpdA::ANGlaA₁₋₅₁₄::proquimosina::ter_cgrA_AF-XbaI (4234 pb)

PalcA: NotI-PalcA::ANGlaA₁₋₅₁₄::proquimosina::ter_cgrA_AF-XbaI (3665 pb)

Se obtuvieron las fusiones con los tamaños esperados. Estas fueron purificadas por gel (Figura 7) y se cuantificaron en el nanodrop para determinar la concentración (Tabla 3).

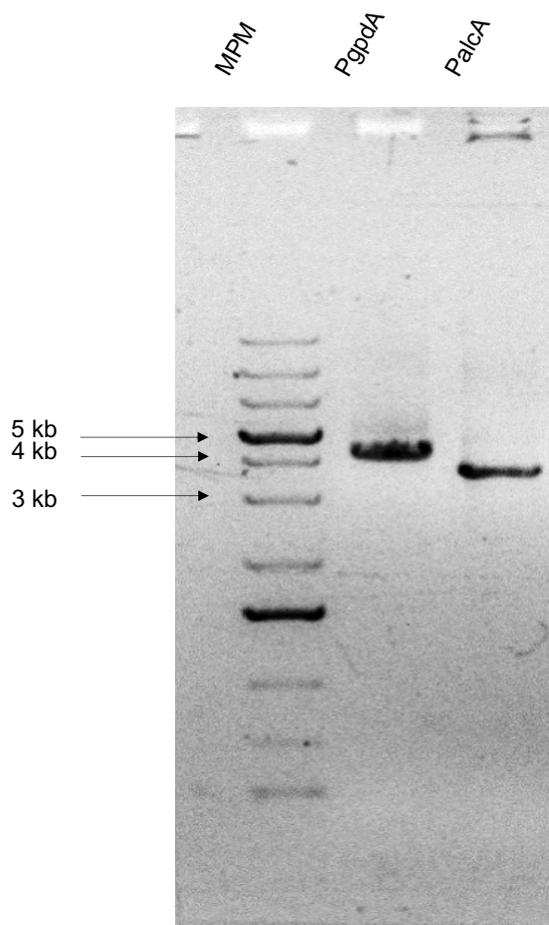


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de las fusiones purificadas obtenidas en la segunda ronda. Se sembraron 3 μL de muestra y 4 μL del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb.

Tabla 3. Concentración de las fusiones purificadas generadas en la segunda ronda

Fusión	Concentración
PgpdA	55 ng/ μL
PalcA	40 ng/ μL

3.2. Clonado de las construcciones en vector comercial para su secuenciación

Una vez obtenidas las construcciones, se clonaron en el plásmido pJET con el objetivo de secuenciar las fusiones generadas y verificar la ausencia de mutaciones (producto de las sucesivas rondas de PCR) (Figura 8).

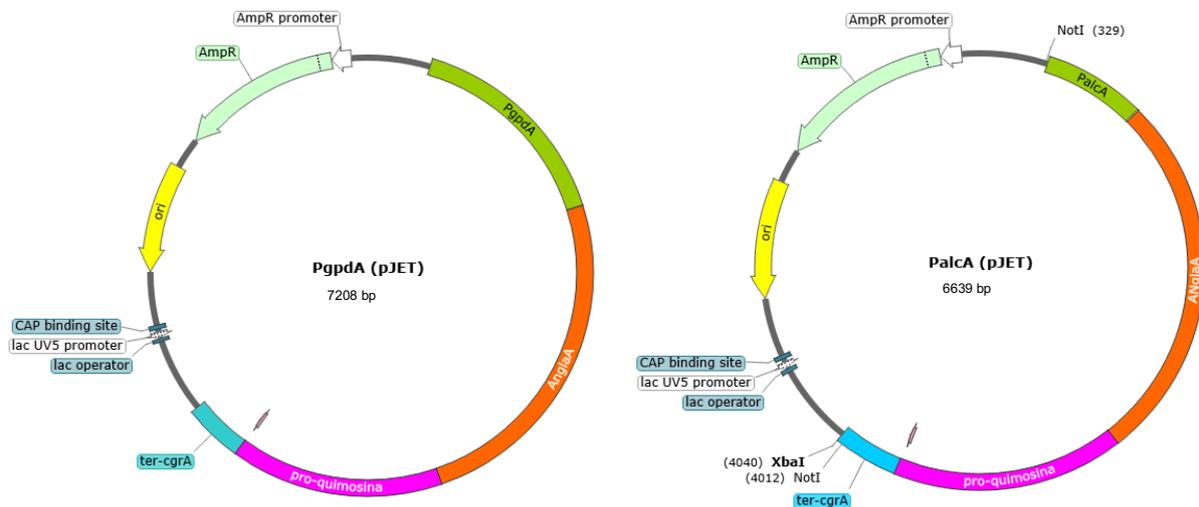


Figura 8. Mapa de los plásmidos esperados al clonar las construcciones PgpdA y PalcA en vector comercial pJET.

Para ello, se empleó el kit CloneJET y se llevó a cabo la ligación de los fragmentos (ver Materiales y Métodos). Tras la ligación, el producto fue transformado en células de *E. coli* DH5 α y plaqueado en medio LB con ampicilina. A partir de la transformación, se seleccionaron tres colonias resistentes a ampicilina para evaluar la presencia del plásmido deseado. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico, y se confirmó el tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa. Como control negativo se utilizó el plásmido pBluescript KS, que tiene un peso molecular de 2958 pb (similar al peso molecular del plásmido pJET utilizado para el clonado).

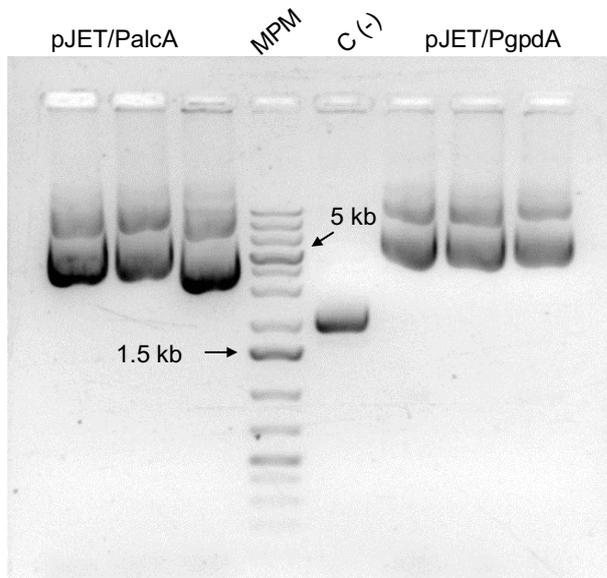


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% de las minipreparaciones de ADN plasmídico realizadas a partir de colonias candidatas a poseer el plásmido de interés. Se sembraron 3 μ L de muestra y 4 μ L del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb. Control negativo: plásmido pBluescript KS. pJET/Palca: plásmidos pJeT con la construcción Palca. pJET/PgpdA: plásmidos pJeT con la construcción PgpdA.

Al comparar la migración de los distintos ADN plasmídicos extraídos de las colonias seleccionadas con el control negativo, se observa que presentan un mayor peso molecular. Esto sugiere que son candidatos a contener las construcciones deseadas. El tamaño esperado para el plásmido pJET/PgpdA es de 7208 pb, mientras que para el vector pJET/Palca es de 6639 pb (Figura 9).

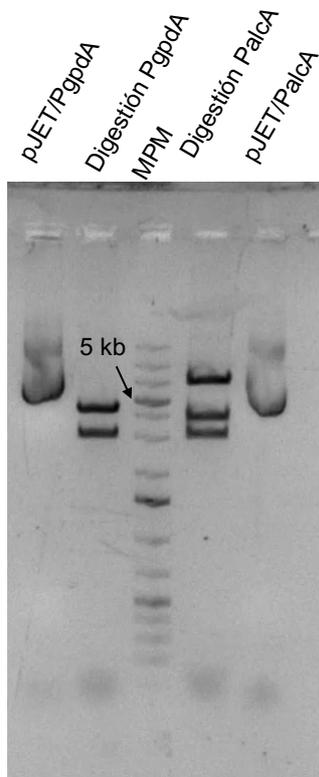


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de la digestión de los plásmidos candidatos a tener el inserto con las enzimas NotI y XbaI. Se sembraron 3 μ L de los plásmidos, 40 μ L producto de digestión y 4 μ L del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb.

Para verificar que los plásmidos contenían la construcción deseada se realizó una digestión para la liberación del inserto con las enzimas de restricción NotI y XbaI.

Como se muestra en la Figura 10 la digestión del plásmido pJET con la construcción bajo PgpdA fue exitosa, obteniéndose las dos bandas esperadas: una correspondiente al vector pJET de 2974 pb y otra de 4234 pb, correspondiente a la construcción PgpdA. En el caso del vector pJET/PalcA, también se observaron las dos bandas esperadas (pJET de 2974 pb y PalcA de 3665 pb). Sin embargo, se detectó una banda adicional de aproximadamente 7 kb, esto podría ser resultado de una digestión parcial, lo que habría dejado una fracción del plásmido sin digerir.

Una vez confirmada la presencia del inserto, se enviaron los plásmidos a secuenciar a la empresa Macrogen (ver Materiales y Métodos). Se analizaron las secuencias y se corroboró la ausencia de mutaciones.

3.3. Generación de plásmido que porte el marcador *argB* y sub-clonado de las construcciones en el mismo.

3.3.1. Generación de plásmido Zeroblunt/*argB*

El primer paso en la generación del plásmido fue la amplificación del gen *argB* (2168 pb) para ser utilizado como marcador auxotrófico, seguida de su purificación por gel para su posterior clonado en el plásmido ZeroBlunt (ver Materiales y Métodos).

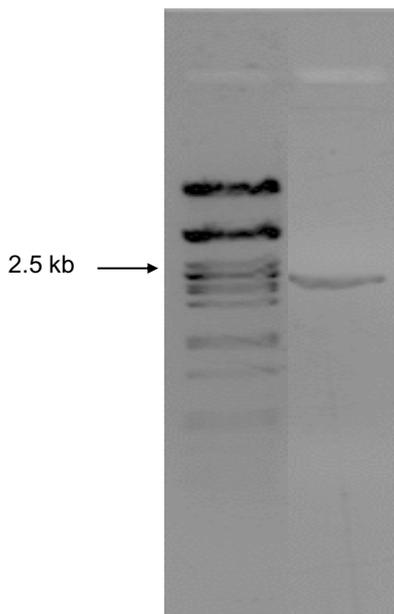


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el producto de *argB* purificado. Se sembraron 2 μ L del producto de PCR y 4 μ L del marcador de peso molecular λ DNA/ PstI Digest.

Una vez obtenido el producto purificado, se clonó en el plásmido Zeroblunt (Figura 12).

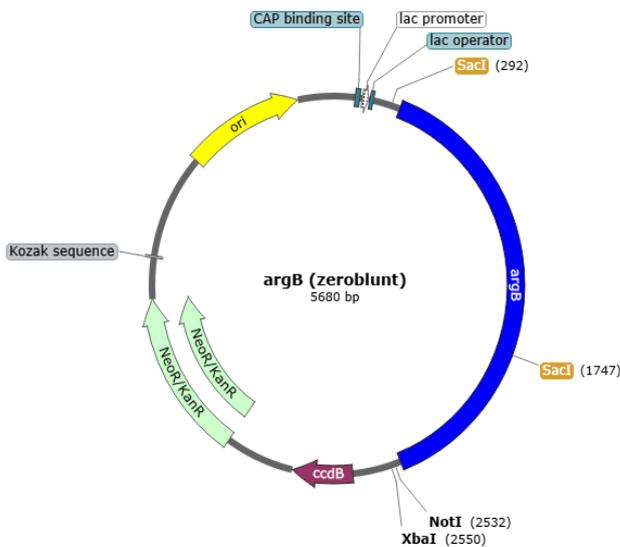


Figura 12. Mapa del plásmido esperado al clonar *argB* en vector zeroblunt.

Para ello, se utilizó el kit Zero Blunt® PCR Cloning y se realizó la ligación correspondiente. Posteriormente, el producto fue transformado en células de *E. coli* DH5α y plaqueado en medio LB suplementado con kanamicina.

A partir de la transformación, se seleccionaron cuatro colonias resistentes a kanamicina, para evaluar la presencia del plásmido deseado se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico, y se confirmó el tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa. Como control negativo se utilizó el vector pCRII (~4 kb) que tiene un peso molecular de similar al peso molecular del plásmido Zeroblunt.

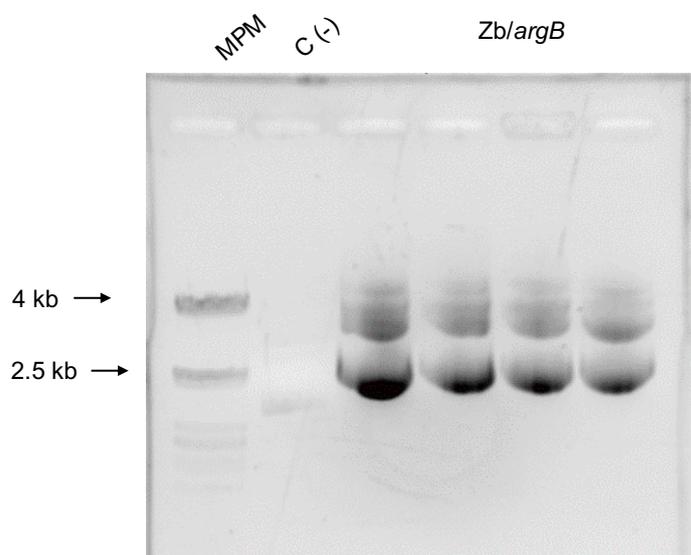


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de las minipreparaciones realizadas a partir de colonias candidatas a tener el plásmido de interés. Se sembraron 4 μ L de los ADN plasmídicos, 4 μ L del control negativo y 4 μ L del marcador de peso molecular molecular λ DNA/ PstI Digest. C (-): control negativo, vector pCRII. Zb/argB: plásmido Zeroblunt con marcador *argB*.

En la Figura 13 se observan de manera exitosa las minipreparaciones de plásmidos, los cuales se presentan mayoritariamente en su conformación superenrollada. Sin embargo, el control negativo no se logra resolver de manera adecuada en el gel.

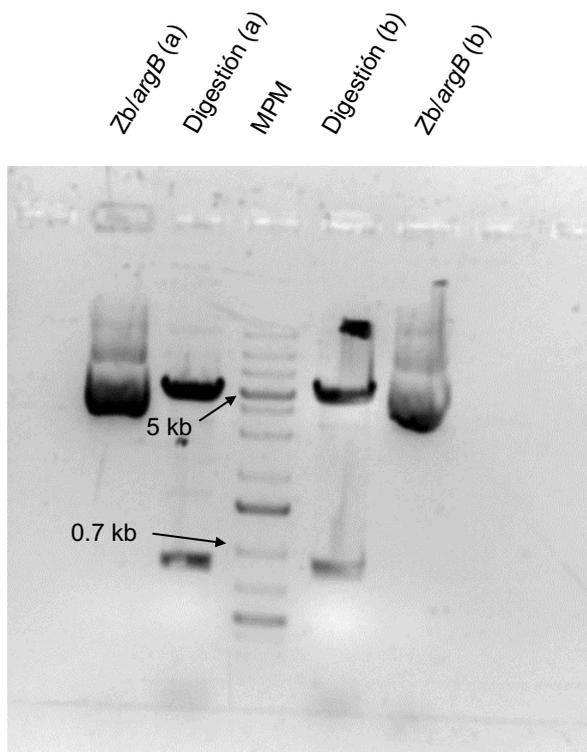


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de la digestión de los plásmidos *Zb/argB*. Se sembraron 3 μ L de los plásmidos, 30 μ L producto de digestión y 4 μ L del marcador de peso molecular molecular GeneRuler 1 kb. Se sembro el plásmido sin digerir de cada minipreparación (a) y (b) y la digestión de cada uno con la enzima *SacI*.

Para confirmar la presencia del inserto, se seleccionaron dos minipreparaciones y se realizó una digestión con la enzima de restricción *SacI* (ver Figura 12). De contener el inserto se esperaban contener los siguientes fragmentos, según la orientación de inserción:

<i>Tamaños esperados según la orientación de inserción</i>	
Inserción A	Inserción B
3937 pb	4593 pb
1455 pb	799 pb
288 pb	288 pb

En la Figura 14, se muestra la digestión con *SacI*, donde los tamaños esperados coinciden con una inserción en orientación B. No obstante, las bandas correspondientes a 288 pb aparecen difusas. Aunque se intentó mejorar su visualización mediante tinción con bromuro de etidio (realizando un post-teñido del gel), no se observó un incremento significativo en la intensidad de estas bandas. De todas maneras se envió a secuenciar

a la empresa Macrogen (ver Materiales y Métodos). Se analizaron las secuencias y se corroboró la ausencia de mutaciones.

3.3.2. Subclonado de las construcciones en plásmido Zeroblunt/*argB*

Tras confirmar que las secuencias de las construcciones y la de *argB* en el plásmido *Zb/argB* generado no presentaban mutaciones, se procedió con el subclonado de las construcciones en el mismo (Figura 15).

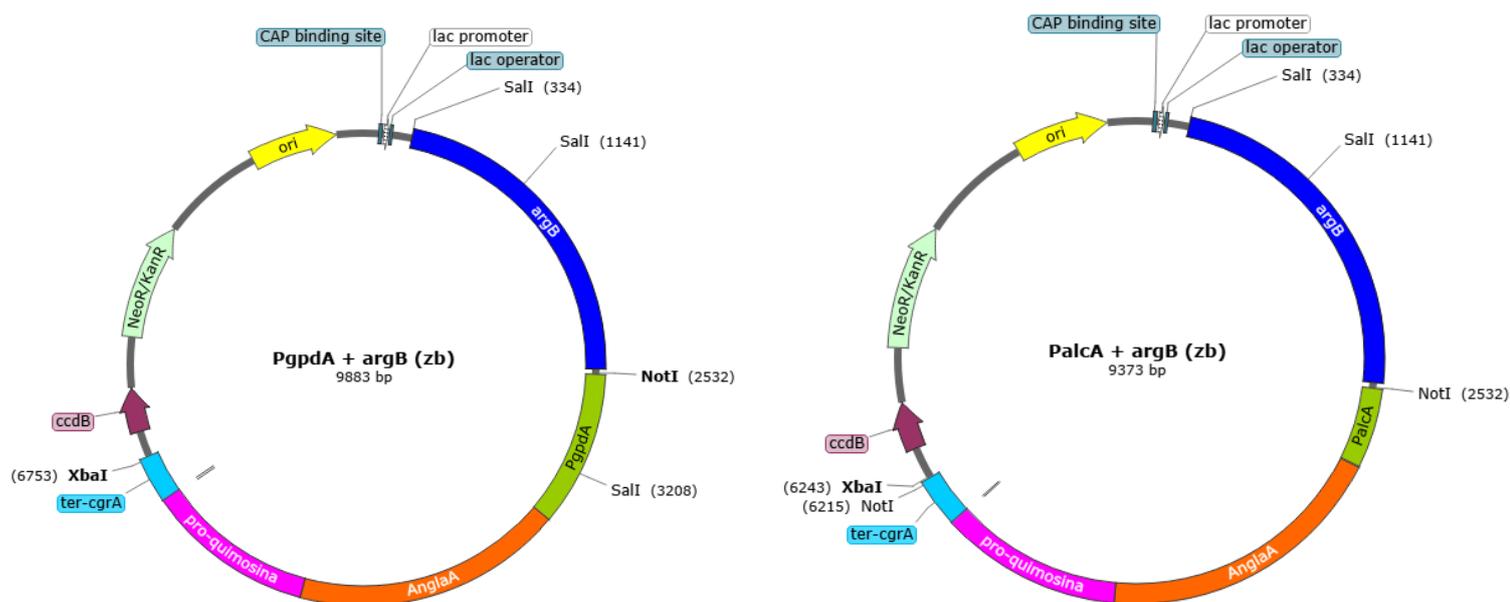


Figura 15. Mapa de los plásmidos esperados al subclonar las construcciones de interés en plásmido Zeroblunt/*argB*.

Tabla 4. Concentración de los plásmidos a utilizar para el subclonado

Plásmidos	Concentración (ng/μL)
pJET/PgpdA	1839
pJET/PalcA	2042
<i>Zb/argB</i>	2057

Primero, se realizó la digestión de los plásmidos pJET/PgpdA, pJET/PalcA y *Zb/argB* (Tabla 4) con las enzimas de restricción NotI y XbaI.

Los productos de la digestión se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa, confirmando los tamaños esperados: 4234 pb para la construcción PgpdA, 3665 pb para la construcción PalcA y 5668 pb para el plásmido *Zb/argB* digerido.

Posteriormente, se purificaron y cuantificaron (Tabla 5) para determinar la proporción óptima de inserto:vector en la ligación.

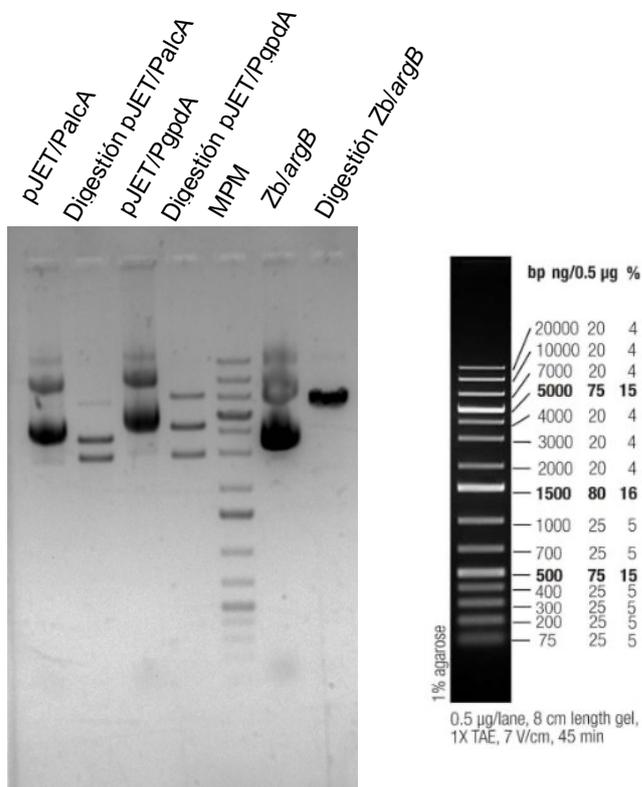


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de la digestión de los plásmidos con NotI y XbaI. Se sembraron 2 µL de los plásmidos sin digerir (pJET/Palca, pJET/PgpdA y Zb/argB), 9 µL de cada digestión y 4 µL del marcador de peso molecular molecular GeneRuler 1 kb.

Tabla 5. Concentración de insertos y vector purificados

Inserto	Concentración (ng/µL)
PgpdA	31
Palca	30
Vector	
Zb/argB	90

Una vez purificadas las construcciones y el plásmido Zb/argB, se llevó a cabo la ligación (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, el producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5α y se seleccionaron cuatro colonias resistentes a kanamicina por cada ligación para la extracción de ADN plasmídico.

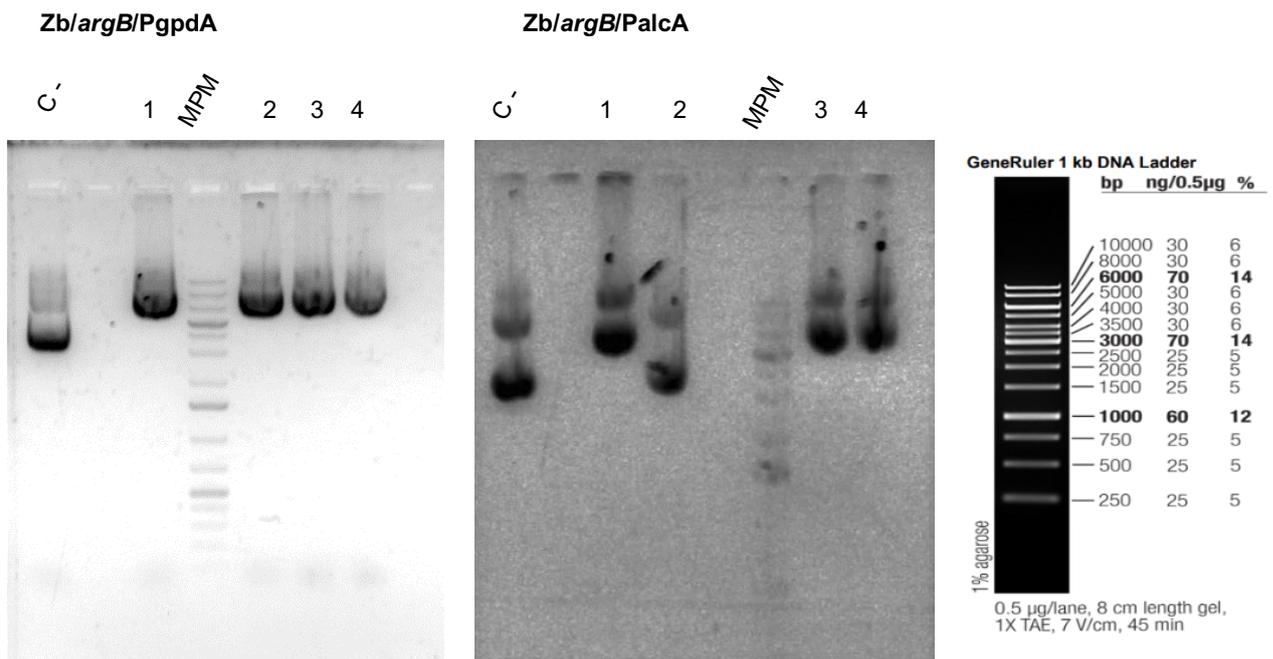


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de los plásmidos extraídos de colonias candidatas a poseer el plásmido de interés. Se sembraron 3 µL de las muestras y 4 µL del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb. Control negativo (C-): plásmido *Zb/argB*. Las muestras 1, 2, 3 y 4 corresponden a el ADN plásmidico extraído de las cuatro colonias seleccionadas.

Los plásmidos candidatos a tener las construcciones de interés se identifican por su mayor tamaño, lo que provoca una menor migración en gel en comparación con el control negativo. Como control negativo, se utilizó el plásmido *Zb/argB* sin inserto. En la Figura 17, se observan cuatro plásmidos candidatos a contener la construcción *PgpdA* y y tres candidatos a contener la construcción *PalcA*.

Tabla 6. Peso Molecular de los distintos vectores

Plásmido	Tamaño
<i>Zb/argB</i>	5668 pb
<i>Zb/argB/PgpdA</i>	9883 pb
<i>Zb/argB/PalcA</i>	9373 pb

Finalmente, para confirmar el subclonado de las construcciones en el plásmido *Zb/argB*, se seleccionaron dos plásmidos de cada construcción y se llevó a cabo una digestión con la enzima *Sall* (Tabla 7 y Figura 18).

Tabla 7. Tamaños esperados para la digestión con Sall

Zb/argB/PgpdA	Zb/argB/PalcA
7009 pb	8566 pb
2067 pb	807 pb
807 pb	

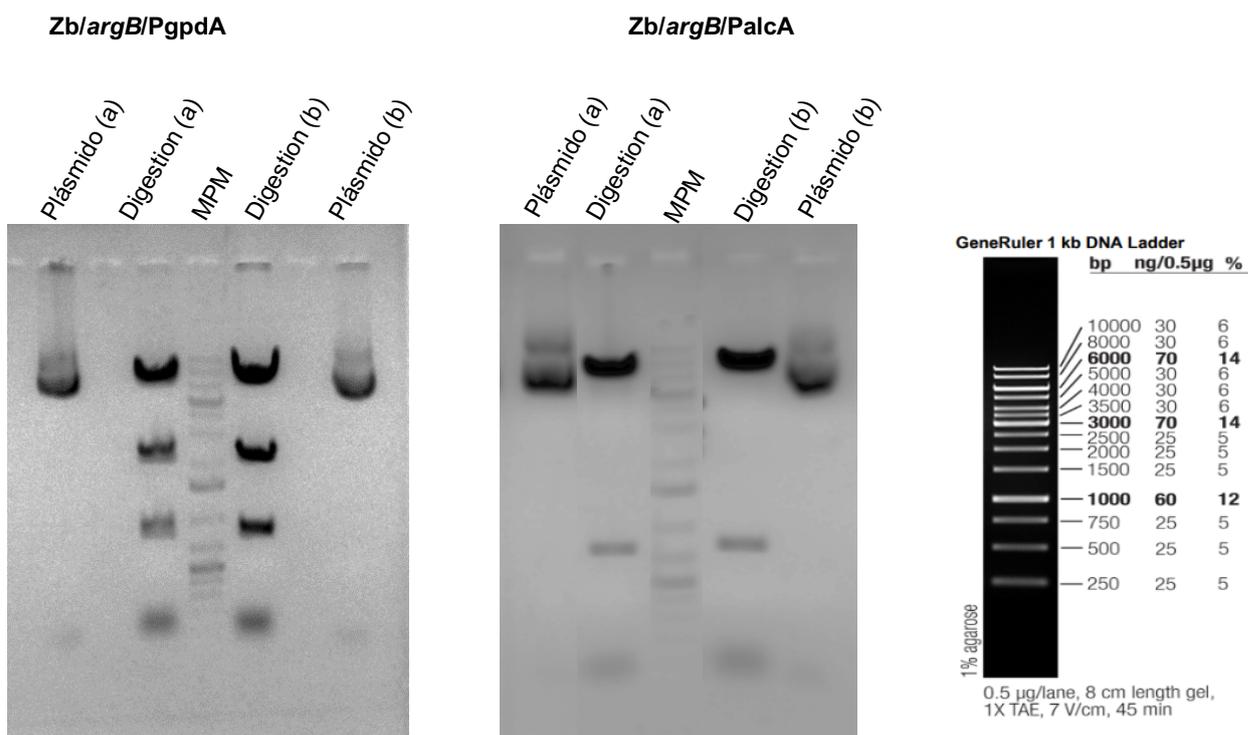


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para el análisis de la digestión con Sall. Se sembraron 3 µL del plásmido sin digerir, 20 µL del producto de digestión y 4 µL del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb.

El patrón de bandas observado tras la digestión con la enzima Sall permitió confirmar la presencia del inserto en los distintos plásmidos (Figura 18). Una vez verificada la correcta inserción, los plásmidos fueron cuantificados para su posterior transformación en *A. nidulans*.

Tabla 8. Concentración de plásmidos a transformar

Plásmidos		Cuantificación
Zb/argB/PgpdA	(a)	2271 ng/µL
	(b)	2587 ng/µL
Zb/argB/PalcA	(a)	1587 ng/µL
	(b)	1869 ng/µL

3.4. Transformación en *A. nidulans*

Una vez obtenidos los plásmidos con las construcciones de interés, se llevó a cabo la transformación en *A. nidulans* utilizando la cepa MV059, la cual posee auxotrofia para arginina, producto de la mutación *argB2*. En esta transformación se espera que el plásmido recombine, por recombinación homologa en el locus *argB2*, integrando el marcador *argB* y por tanto complementado la mutación, restaurando la capacidad de síntesis de arginina. No se puede descartar que también se integre por recombinación no homologa en otras partes del genoma.

De este modo, los transformantes fueron seleccionados en un medio mínimo sin arginina, donde solo las cepas que integraron el plásmido de manera estable pueden proliferar (Figura 19).

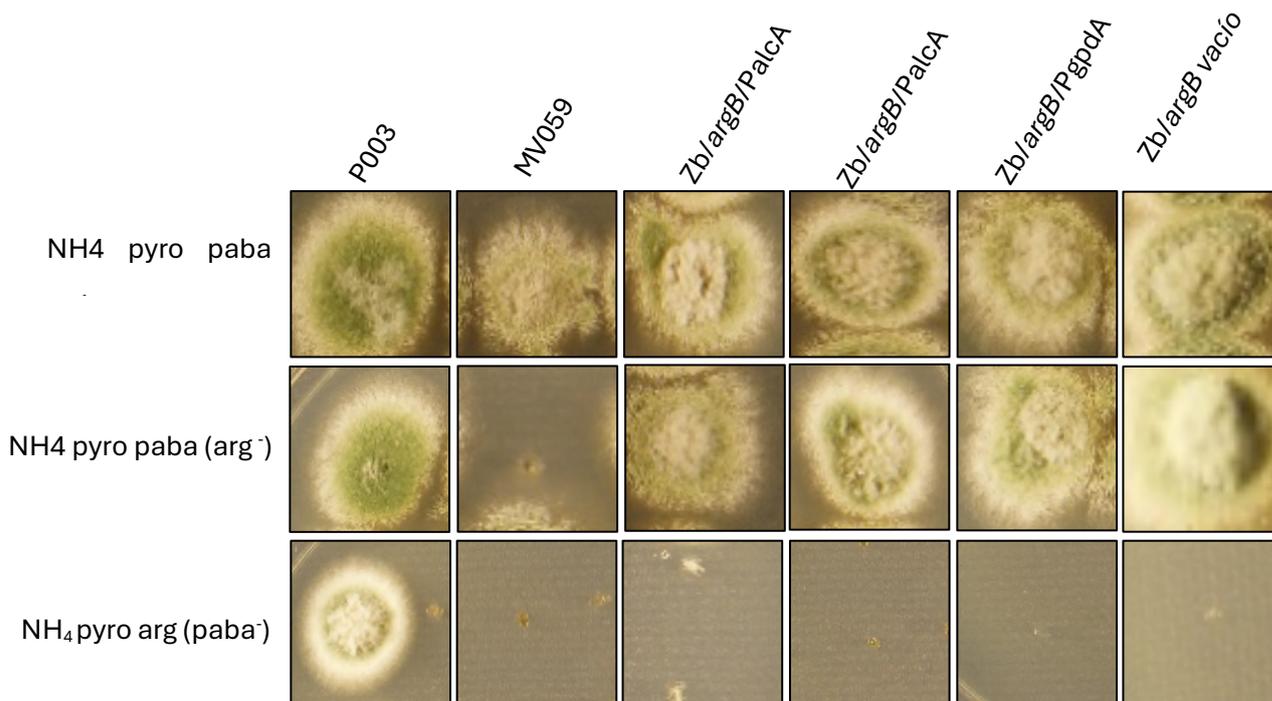


Figura 19. Ensayos de crecimiento en placa para el análisis de las cepas transformadas a 37°C por 48 hs. NH₄ (amonio), pyro (piridoxina), arg (arginina) y paba (ácido p-aminobenzoico) se refieren a suplementos específicos añadidos en el medio de cultivo. El símbolo (-) indica la ausencia del suplemento correspondiente.

Como control de los ensayos en placa se cultivaron distintas cepas, para el control de los transformantes se cultivó la cepa receptora MV059 (*argB2 pabaA1*). Para verificar las auxotrofías utilizadas, se empleó la cepa P003 (*pyroA4*). Además de transformar con los plásmidos que contenían las construcciones de interés, se llevó a cabo la transformación con el plásmido vacío ZeroBlunt/*argB*, utilizado como control negativo en la verificación de los transformantes. El ensayo en placa permitió identificar un posible transformante con la construcción bajo el control del promotor P*gpdA* y dos con la construcción regulada por el promotor inducible (Figura 19).

Para confirmar la integración de las construcciones de interés, se realizó la extracción de ADN genómico de los transformantes obtenidos. Posteriormente, se amplificaron las construcciones completas mediante PCR utilizando los mismos *primers* empleados en la generación de las fusiones.

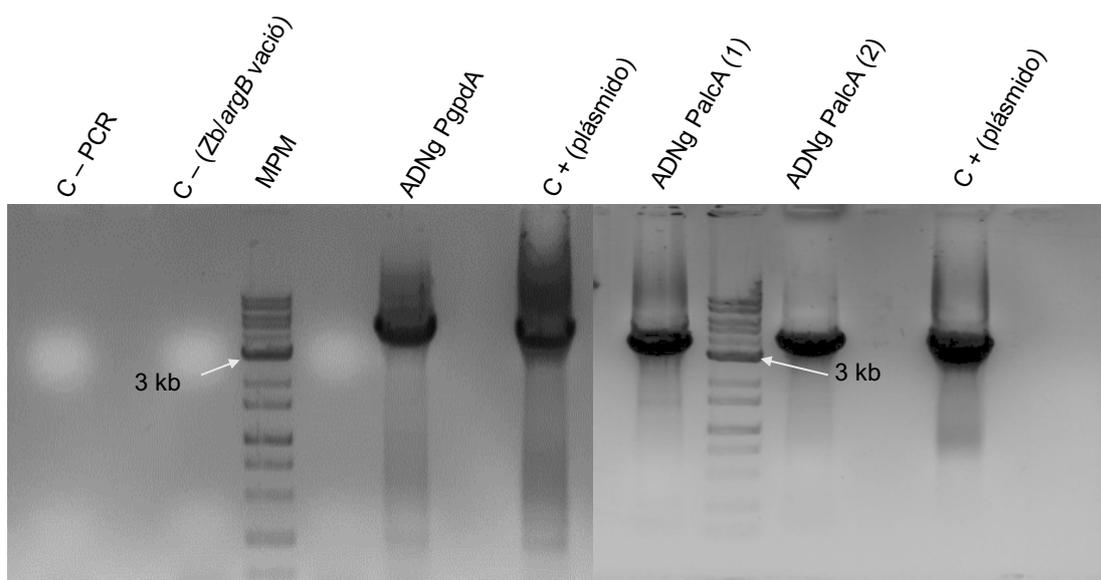


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de la integración de las construcciones en el genoma. Se sembró 30 μ L del producto de PCR y 4 μ L del marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder RTU (Bio-Helix). C- PCR: control negativo de la reacción de PCR (se utilizó H₂O mQ como molde), C -: plásmido *Zb/argB*. Controles positivos (C+): plásmidos utilizados para transformar (*Zb/argB/Pgpda* y *Zb/argB/Palca*). ADNg: ADN genómicos obtenidos de los transformantes.

Como se observa en la Figura 20, los transformantes obtenidos contienen las construcciones de interés, con los tamaños esperados, 3645 pb para *PalcA* y 4234 pb para *PgpdA*. El agua se utilizó como control negativo de la PCR, mientras que el ADN genómico del transformante obtenido con el plásmido vacío sirvió como control negativo de las construcciones. Los plásmidos utilizados para la transformación fueron empleados como controles positivos.

Una vez obtenidas y confirmadas las cepas modificadas genéticamente con las construcciones de interés, se procedió a analizar la expresión de la quimosina. Estas cepas fueron denominadas MVD 133 (cepa de expresión constitutiva) y MVD 134 (cepa con plásmido *Zb/argB*).

3.5. Análisis de expresión de la quimosina

Los ensayos de expresión y actividad de la quimosina se realizaron exclusivamente con MVD 133, utilizando como control negativo la cepa MVD 134. El análisis de las cepas con la construcción bajo el promotor inducible se llevará a cabo en el futuro para continuar con el desarrollo de este proyecto.

3.5.1. Western blot

Se realizó un Western blot para detectar la proquimosina utilizando el sobrenadante de cultivos de las cepas MVD 133 y MVD 134, cultivadas en medio completo (MC) y medio mínimo (MM) por 16 hs. La detección se llevó a cabo empleando un anticuerpo α -His tag.

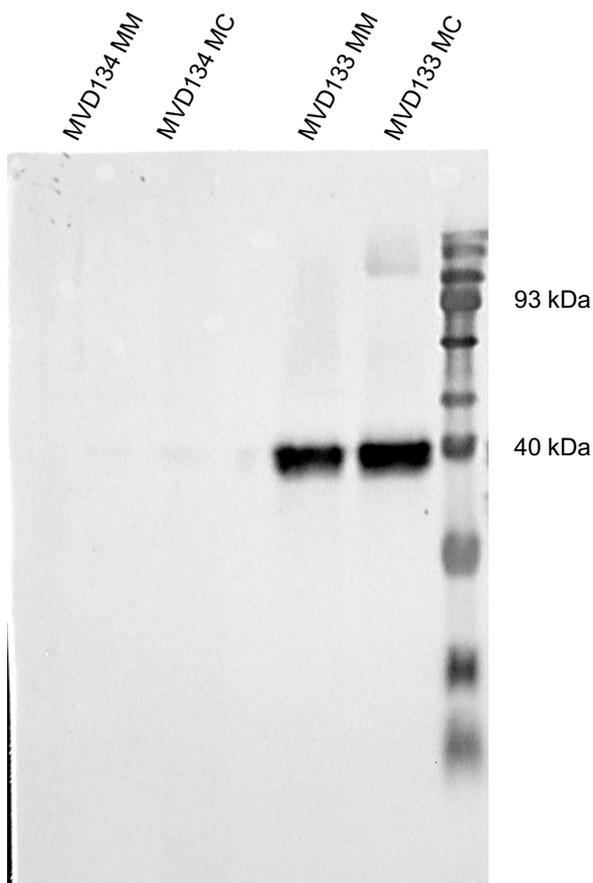


Figura 21. Western blot con anticuerpo α -His tag para la detección de proquimosina en los sobrenadantes de la cepa MVD 133 en medio mínimo (MM) y completo (MC). Como control se utilizó la cepa MVD 134. Marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus.

En el Western blot (Figura 21), se observó la presencia de una banda con un peso molecular de menos de 40 kDa, la cual parece corresponderse con el peso molecular de la quimosina (~36,5 kDa), lo que indica que, al ser secretada al medio extracelular, se encuentra en su forma activa. Esto sugiere que el propéptido ha sido clivado, liberándose de la proteína *carrier* utilizada. No obstante, en el carril en donde se sembró el sobrenadante de la cepa MVD 133 en MC se puede observar una banda tenue de alta peso molecular que podría corresponderse a la fusión ANGlaA₁₋₅₁₄-proquimosina-6xHis (~96 kDa).

La estrategia experimental planteada inicialmente era obtener la fusión ANglaA-proquimosina en el sobrenadante del medio de cultivo, y luego inducir el autoclivaje de la proquimosina a pH ácido para obtener la quimosina activa. La presencia de quimosina en su forma activa implica que el proceso de maduración proteolítica, en el cual se cliva el propéptido de la proquimosina, ha ocurrido correctamente. En términos biotecnológicos, esta activación en el medio extracelular sugiere que el sistema de expresión y secreción utilizado es eficiente, eliminando la necesidad de pasos adicionales para la activación enzimática.

Con el objetivo de determinar si el autoclivaje del propéptido ocurre a nivel intracelular o extracelular, se llevaron a cabo cultivos en medio completo. A partir de estos cultivos, se prepararon extractos proteicos totales a partir del micelio obtenido y se cosechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó un Western blot utilizando tanto los extractos proteicos totales (proteínas intracelulares) como el sobrenadante (Figura 22).

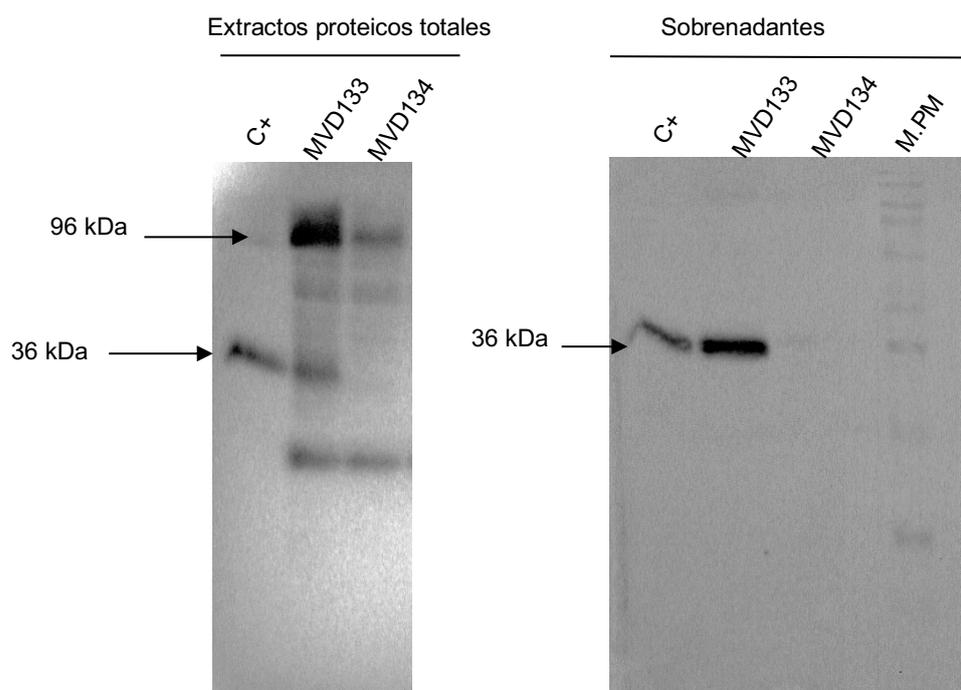


Figura 22. Western blot con anticuerpo α -His tag para la detección de quimosina en los extractos proteicos totales y sobrenadantes. Como control positivo se utilizó el sobrenadante de la cepa MVD 133 en medio completo. MVD 133: cepa de expresión constitutiva. MVD 134: cepa control negativo (plásmido Zb/argB vacío).

En el Western blot (Figura 22), se observó que en los extractos proteicos totales (proteínas intracelulares) la quimosina se encuentra mayoritariamente unida a la proteína carrier en su forma de proquimosina, aunque también se detecta una fracción ya clivada. Por otro lado, en el sobrenadante, la quimosina aparece completamente en su forma activa, lo que indica que el clivaje del propéptido ocurre antes o durante su secreción al medio extracelular. Para verificar que se sembró la misma cantidad de proteínas, se realizó una detección de α -tubulina como control de carga, las imágenes obtenidas no quedaron con una buena resolución. De todas formas, estos resultados permiten confirmar la presencia de quimosina activa a nivel intracelular.

Con respecto al clivaje, es posible que este proceso ocurra durante el transporte a través de la vía secretora, probablemente en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, donde cambios en el pH o en el entorno químico podrían inducir la activación y el clivaje. La posibilidad de que el clivaje se produzca en el medio extracelular no se ve apoyada tomando en cuenta que el pH del medio post-cultivo de la cepa en cuestión es de $\sim 6,8$. Dado que en el sobrenadante la quimosina aparece completamente activa, es probable que el autoclivaje ocurra principalmente en una etapa tardía del proceso de secreción.

3.5.2. Ensayos de actividad proteolítica

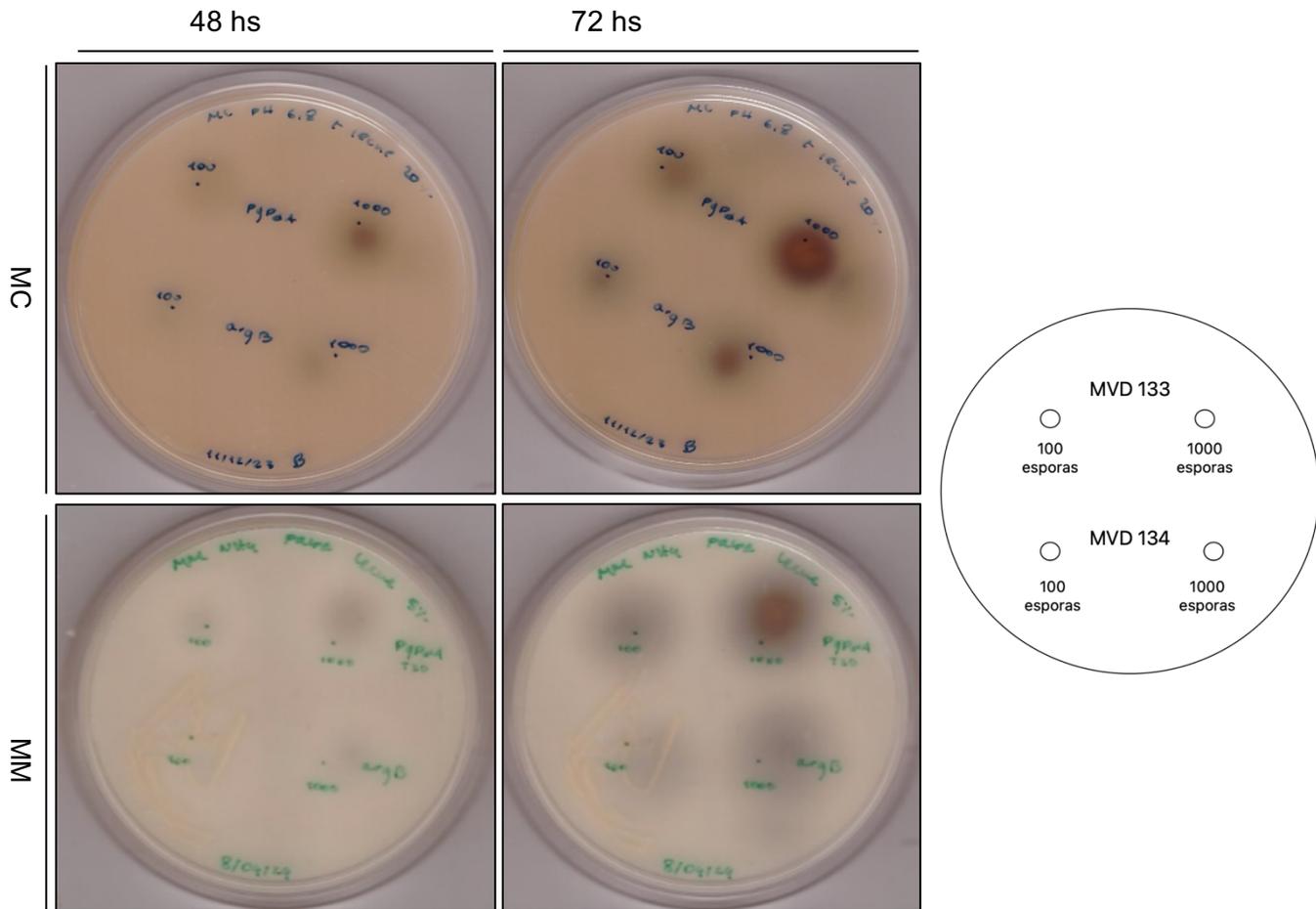


Figura 23. Ensayos en placa para el análisis de la actividad proteolítica de la quimosina. Se sembraron 100 y 1000 esporas de la cepa MVD 133 (Pgpda), y se utilizó como control la cepa MVD 134 (*argB*). MC: medio completo. MM: medio mínimo. MVD 133: cepa de expresión constitutiva. MVD 134: cepa control negativo (plásmido *Zb/argB* vacío). Este experimento se realizó por triplicado, obteniendo el mismo resultado en todas las ocasiones. Se muestra uno de los triplicados de forma representativa.

Para evaluar la actividad proteolítica de la quimosina, se realizaron ensayos en dos formatos, en placas sólidas y en medio líquido, empleando leche como sustrato. En las placas sólidas, la actividad se mide observando zonas de aclaramiento, halo característico que indica hidrólisis de la κ -caseína. En medio líquido, se evaluó la coagulación de la leche monitoreando la formación de coágulos en el tiempo.

Como se observa en la Figura 23 a las 48 horas se observó la formación de un halo, el cual se intensificó significativamente a las 72 horas, indicando una mayor actividad proteolítica con el tiempo. En el control, se detectó un halo tenue, que podría atribuirse a la actividad de proteasas extracelulares intrínsecas de *A. nidulans*. Sin embargo, la diferencia en la intensidad y el tamaño del halo entre las muestras sugiere que la quimosina es la principal responsable de la actividad observada en las placas experimentales.

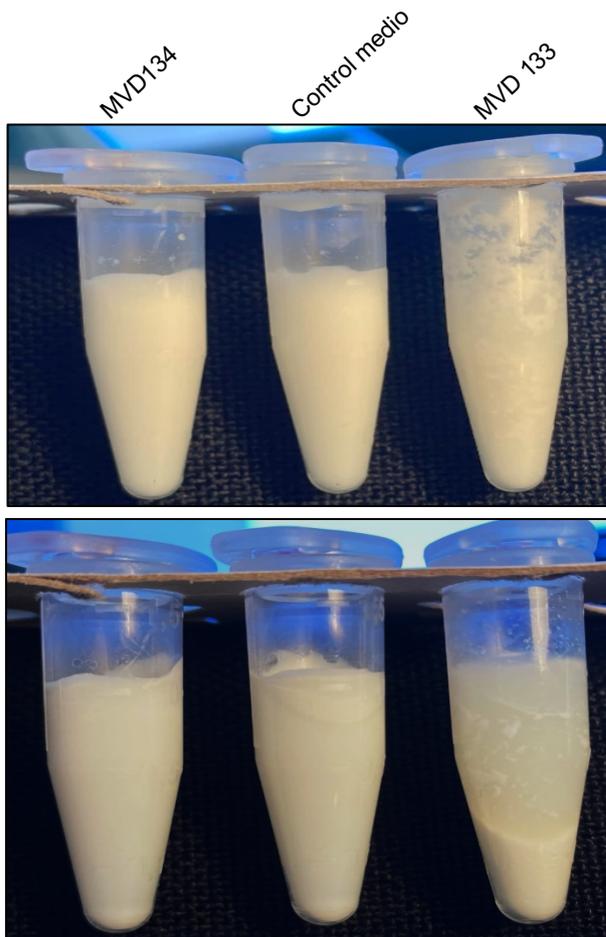


Figura 24. Ensayo en medio líquido para la visualización de la coagulación de la leche. Se utilizó 45 μ L de sobrenadante obtenido a partir de un cultivo en medio completo. En la imagen inferior se observa, post centrifugación, el cuajo formando una masa más densa, mientras que el suero aparece como la fase líquida que contiene lactosa, proteínas solubles, minerales y agua. La centrifugación facilita la separación de estas fases al acelerar la sedimentación del cuajo y la clarificación del suero.

En el ensayo en medio líquido (Figura 24), se mezcló sobrenadante del cultivo de la cepa MVD 133 en medio completo con leche entera al 5 %. Como control se utilizó la cepa MVD 134, y el medio, se observó la coagulación de la leche a los 50 minutos, mientras que al aumentar el volumen de muestra a 750 μ L, el tiempo de coagulación se redujo significativamente (10 minutos). Este resultado sugiere que la concentración de quimosina en la muestra tiene un impacto directo en la velocidad de coagulación, lo que es consistente con la cinética enzimática, donde una mayor cantidad de enzima acelera la reacción al aumentar la tasa de hidrólisis de la κ -caseína.

4. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

En el presente trabajo se logró la generación exitosa de plásmidos con las construcciones génicas diseñadas para la expresión recombinante de quimosina bovina en *Aspergillus nidulans*, utilizando tanto promotores constitutivos como inducibles. La transformación estable de estos plásmidos valida la plataforma de expresión como una estrategia efectiva para la producción de proteínas recombinantes.

Mediante Western blot se detectó la quimosina en su forma activa en el sobrenadante de la cepa MVD133, acompañada de una destacada actividad proteolítica. La obtención de la quimosina en su forma activa resulta esencial, ya que elimina la necesidad de pasos adicionales de activación, simplificando el proceso y reduciendo la optimización requerida.

Los resultados de la presente tesis posicionan a *Aspergillus nidulans* como una plataforma biotecnológica prometedora para la producción recombinante de quimosina y potencialmente de otras proteínas de interés industrial. Su capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales, junto con su eficiencia en la secreción de proteínas, lo convierten en una alternativa competitiva frente a otros sistemas de expresión. En este sentido, la optimización de esta estrategia podría contribuir al desarrollo de procesos más sostenibles y escalables en la industria biotecnológica, facilitando la producción de enzimas con aplicaciones en sectores como el alimentario y el farmacéutico.

Perspectivas

- Evaluar la expresión y actividad de la quimosina en las cepas de expresión inducible.
- Purificar la quimosina mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y evaluar el rendimiento de su producción.
- Optimizar la producción, ajustando condiciones de cultivo y expresión para maximizar la eficiencia del proceso.

A futuro, se explorará la expresión de quimosina en un organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe* por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos), como *Aspergillus niger*, con el fin de potenciar su aplicación a nivel industrial.

5. Materiales y métodos

5.1. Genotipo y fenotipo de cepas utilizadas

Tabla 9. Genotipos cepas utilizadas

MV059	<i>argB2 pabaA1</i>
P003	<i>pyroA4</i>
MVD 901 (Schalén et al. Fungal Biol Biotechnol (2016) 3:3)	<i>argB2 pyrG89 nkuAΔ, Pgpda-ASNglaA-mRFP-TtrpC::AFpyrG</i>

Tabla 10. Genotipos y fenotipos

<i>argB2</i>	alelo responsable de la auxotrofia para arginina
<i>pabaA1</i>	alelo responsable de la auxotrofia para ácido p-aminobenzoico
<i>pyroA4</i>	alelo responsable de la auxotrofia para piridoxina
<i>ASNglaA</i>	ANglaA ₁₋₅₁₄
<i>mRFP</i>	gen que codifica para la proteína roja fluorescente
<i>TtrpC</i>	terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i>
<i>AFpyrG</i>	gen <i>pyrG</i> de <i>Aspergillus fumigatis</i>

5.2. Condiciones de cultivo

Para obtener una colonia compacta que permita observar las características fenotípicas, se debe inocular esporas en un medio sólido y dejarlas crecer a 37 °C, su temperatura óptima de crecimiento, durante 48 - 72 horas. Para lograr un crecimiento completo en la placa, se realiza un estriado de esporas y se incuba a las mismas condiciones.

5.3. Medios de cultivo y Soluciones

Los medios de cultivo pueden prepararse en forma líquida o sólida, añadiendo agar en concentraciones del 1.3% o 3%.

5.3.1. Medio mínimo

- 20 mL de solución de sales
- 10 g de glucosa

Se lleva a un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

Este medio no posee fuentes de nitrógeno, por lo que deben ser agregadas al igual que los suplementos nutricionales necesarios.

5.3.2. Medio completo

- 20 mL de solución de sales
- 10 mL de solución de vitaminas
- 10 mL de solución de casaminoácidos
- 10 g de glucosa
- 2 g de peptona
- 1 g de extracto de levadura

Se lleva a un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

5.3.3. Medio para la regeneración de protoplastos

- 20 mL de solución de sales
- 10 g de glucosa
- 342.3 g de sacarosa

Se lleva a un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos. Este medio no posee fuentes de nitrógeno, por lo que deben ser agregadas al igual que los suplementos necesarios.

5.3.4. Medio Luria-Bertani (LB)

- 5 g extracto de levadura
- 10 g triptona
- 10 g NaCl

Se lleva a un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos. Cuando se utiliza kanamicina se le agrega una concentración de 30 ug/mL, y cuando se requiere ampicilina se le agrega 50 ug/mL.

5.3.5. Solución de Sales

- 26 g de cloruro de potasio
- 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado
- 76 g fosfato de potasio monobásico
- 50 mL de solución de elementos traza

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

5.3.6. Solución de Casaminoácidos

- 150 g de caseína hidrolizada

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

5.3.7. Solución de Elementos Traza

- 40 mg de borato de sodio decahidratado
- 400 mg de sulfato de cobre pentahidratado
- 800 mg fosfato férrico dihidratado
- 800 mg molibdato de sodio dihidratado
- 800 mg sulfato de manganeso dihidratado
- 8 g de sulfato de zinc heptahidratado

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

5.3.8. Solución de Vitaminas

- 50 mg de tiamina-HCl
- 10 mg de biotina
- 100 mg de ácido nicotínico
- 200 mg de pantotenato de calcio
- 50 mg de piridoxina-HCl
- 100 mg de riboflavina
- 500 mg de ácido p-aminobenzóico

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

5.3.9. Suplementos nutricionales

- Ácido p-aminobenzoico: 20 mg / 100 mL
- Amonio: 9.2 g / 100 mL

- Arginina: 5.26 g / 100 mL
- Piridoxina-HCl: 500 mg / 100 mL

Son preparados a una concentración 100x. Se esterilizan mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos, y se conservan a 4°C.

5.4. Primers

Tabla 11. Primers utilizados. Los primers fueron sintetizados por Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
PgpdA1000-Fw	GACTTCAGCAACATCTCCTG	Fusion-PCR 1era ronda
PgpdAmini-1000-Rv	TGTGATGTCTGCTCAAGCGGGGTAG	
PgpdA-ANglaA-Fw	CCGCTTGAGCAGACATCACAATGTCGTTCCGATCTC TACTCG	Fusion-PCR 1era ronda
ANglaA514-Rv	AGGTACCAATGGCAGATGTG	
ANglaA514-Fw	CACATCTGCCATTGGTACCT	Fusion-PCR 1era ronda
ter-cgrA-Rv	GGAGAGAGATTCTTCTGCTGT	
ter-cgrA-Fw	ACAGCAGAAGAATCTCTCTCC	Fusion-PCR 1era ronda
pFW9.3-Rv	CGAAAGGGCCTCGTGATACG	
PalcA-Fw	ACCTAAGACACTTTGACACG	Fusion-PCR 1era ronda
PalcA-Rv	TTTGAGGCGAGGTGATAGGA	
PalcA-ANglaA-Fw	TCCTATCACCTCGCCTCAAATGTCGTTCCGATCTC TACTCG	Fusion-PCR 1era ronda
ANglaA514-Rv	AGGTACCAATGGCAGATGTG	
Not I – PgpdA-1000-Fw	AATGCGGCCGCGGTTGACCGGTGCCTGGATC	Fusion-PCR 2da ronda
XbaI – cgrA – ter – Rv	CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC	
Not I – PalcA- Fw	AATGCGGCCGCTAAGTCCCTTCGTATTTCTC	Fusion-PCR 2da ronda
XbaI – cgrA – ter – Rv	CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC	
ArgB-pl-Fw	AAGCTTTATTTGCGGTTTTTTGG	Generación y Secuenciación de <i>argB</i>
ArgB-pl-Rv	GTCGACCTACAGCCATTGC	
PalcA-seq	AGGTTCTCAGTCTCACCAAC	Secuenciación
PgpdA-seq	ACATCCATACTCCATCCTTC	
ANglaA-seq1	CAACTGCTATGATCGGCTTC	
ANglaA-seq2	ATGTGTCGCTGGACTTCTTC	
quimo-seq	GCTTCGATCCCAGAAAGAGC	

5.5. ADNg y plásmidos utilizados

ADNg	Regiones a amplificar	Plasmidos	Uso
MVD P003	PgpdA; PalcA, <i>argB</i>	pUC57-quimo (Genscript)	Amplificación de proquimosina
MVD 901	ANglaA1-514	pFW 9.3 (Wanka et al, 2016)	Amplificación del terminador <i>cgrA_AF</i>
		pJET	Clonado de las construcciones
		Zeroblunt	Clonado de <i>argB</i>

5.6. Generación de construcciones

5.6.1. Fusion-PCR

Las construcciones de interés se generan mediante la técnica de fusion-PCR, utilizando en todos los casos la ADN polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi (Roche).

Primera ronda de PCR

En la primera ronda se generan todos los fragmentos a fusionar. Se utilizan 10 ng de ADN plasmídico o 500 ng de ADN genómico como molde, según corresponda.

Construcción génica para la expresión constitutiva de la proquimosina

Fragmento	Molde	Cebador fw	Cebador RV	Tamaños esperados
<i>PgpdA</i>	ADNg MVD P003	PgpdA1000-Fw	PgpdAmini-1000-Rv	1124 pb
<i>ANglaA1-514</i>	ADNg MVD 901	PgpdA-ANglaA-Fw	ANglaA514-Rv	1713 pb
<i>proquimosina</i>	Plásmido pUC57-quimo	ANglaA514-Fw	ter-cgrA-Rv	1255 pb
<i>ter_cgrA_AF</i>	plásmido pFW 9.3	ter-cgrA-Fw	pFW9.3-Rv	307 pb

Mix PCR	<i>PgpdA</i>	<i>ANglaA</i>	<i>proquimosina</i>	<i>ter_cgrA_AF</i>
5x KAPA HiFi buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
ADN polimerasa KAPA	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dNTPs	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Cebador Fw	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Cebador Rv	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Molde	2 µL	2 µL	2 µL	1 µL
H ₂ O mQ	15,25 µL	15,25 µL	15,25 µL	16,25 µL

Construcción génica para la expresión inducible de la proquimosina

Fragmento	Molde	Cebador fw	Cebador RV	Tamaños esperados
PalcA	ADNg MVD P003	PalcA-Fw	PalcA-Rv	490 pb
ANglaA1-514	ADNg MVD 901	PalcA-ANglaA-Fw	ANglaA514-Rv	1713 pb
proquimosina	Plásmido pUC57-quimo	ANglaA514-Fw	ter-cgrA-Rv	1255 pb
ter_cgrA_AF	Plásmido p.fw 9.3	ter-cgrA-Fw	pFW9.3-Rv	307 pb

Mix PCR	<i>PalcA</i>	<i>ANglaA</i>	<i>proquimosina</i>	<i>ter_cgrA_AF</i>
5x KAPA HiFi buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
ADN polimerasa KAPA	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dNTPs	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Cebador Fw	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Cebador Rv	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Molde	2 µL	2 µL	2 µL	1 µL
H ₂ O mQ	15,25 µL	15,25 µL	15,25 µL	16,25 µL

Programa PCR- Fragmentos: <i>PgpdA</i> ; <i>PalcA</i>		
Temperatura	Duración	Ciclos
95°C	3 minutos	1
98°C	20 segundos	25
59 °C	15 segundos	
72°C	(1 minuto/kb)	
72°C	5 minutos	1
Programa PCR - Fragmentos: <i>AnglaA1-514</i> ; <i>proquimosina</i> ; <i>ter_cgrA_AF</i>		
Temperatura	Duración	Ciclos
95°C	3 minutos	1
98°C	20 segundos	25
61 °C	15 segundos	
72°C	(1 minuto/kb)	
72°C	5 minutos	1

Segunda ronda de PCR. Fusion-PCR

Los fragmentos obtenidos en la primera ronda se purifican por gel, y se lleva a cabo una segunda ronda de PCR con los fragmentos purificados. En esta PCR, las secuencias solapantes actúan como *primers*, facilitando la unión de los fragmentos. Además, se emplean cebadores anidados que hibridan más allá de los cebadores usados en la primera ronda de PCR, permitiendo así una mayor eficiencia en la amplificación de la fusión completa. Se utilizan 25 ng de cada fragmento a fusionar.

Construcción génica para la expresión constitutiva de la proquimosina

Mix PCR	
5x KAPA HiFi buffer	5 µL
ADN polimerasa KAPA	0,5 µL
dNTPs	0,75 µL
Nested Fw (Not I – PgpdA-1000- Fw)	1 µL
Nested Rv (<i>XbaI</i> – Cgra – ter – Rv)	1 µL
PgpdA	0,35 µL
ANglaA	0,4 µL
proquimosina	0,5 µL
ter_cgrA_AF	0,25 µL
H ₂ O mQ	15,25 µL

Construcción génica para la expresión inducible de la proquimosina

Mix PCR	
5x KAPA HiFi buffer	5 µL
ADN polimerasa KAPA	0,5 µL
dNTPs	0,75 µL
Nested Fw (Not I – PalcA- Fw)	1 µL
Nested Rv (<i>XbaI</i> – cgra – ter – Rv)	1 µL
PalcA	0,9 µL
ANglaA	0,5 µL
proquimosina	0,5 µL
ter_cgrA_AF	0,25 µL
H ₂ O mQ	15,25 µL

Programa fusion-PCR		
Temperatura	Duración	Ciclos
95°C	2 minutos	1
98°C	20 segundos	10
65°C	15 segundos	
72°C	4 minutos	
98°C	20 segundos	15
65°C	15 segundos	
72°C	4 minutos (+20 segundos/ciclo)	
72°C	5 minutos	1

5.6.2. Clonado de las construcciones en vector comercial para secuenciación

5.6.2.1. Vector de clonado pJET 1.2/blunt

El vector de clonación pJET 1.2/blunt es un plásmido lineal de 2974 pb diseñado para la clonación eficiente de fragmentos de ADN con extremos romos. Para la selección de colonias recombinantes, el plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina y un gen letal de una enzima de restricción (Eco47IR), el cual se interrumpe cuando un inserto de ADN se liga al sitio de clonación. Como resultado, solo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Si el vector se recirculariza sin un inserto, se expresa la enzima de restricción letal, lo que provoca la muerte de la célula huésped de *E. coli* tras la transformación.

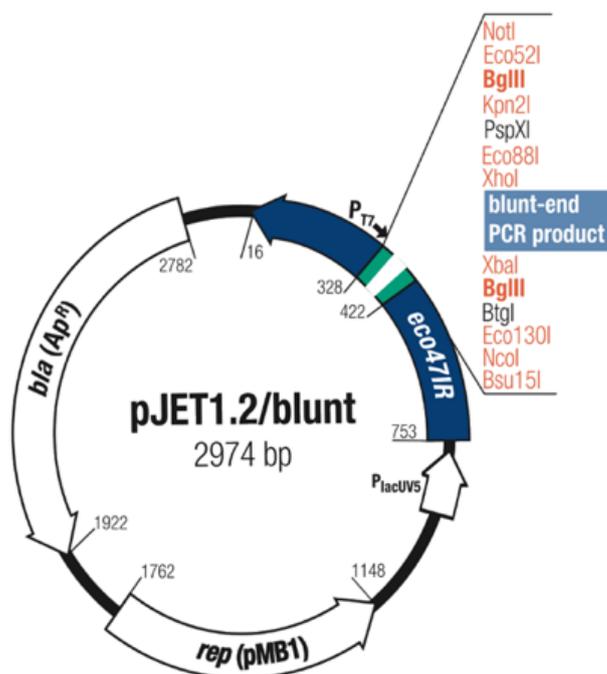


Figura 25. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt.

5.6.2.2. Ligación

Para la ligación se utiliza el kit *CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific)*, siguiendo las instrucciones del fabricante, con la modificación de ajustar el volumen de reacción a la mitad. Los productos de PCR obtenidos de la fusión-PCR se purifican por gel utilizando el kit *Neb Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit*. Para la ligación se utilizan 100 ng del producto PCR purificado de la fusión bajo control *PgpdA*, y 75 ng del producto de PCR purificado de la fusión bajo control *PalcA* (relación inserto:vector 3:1).

Mix ligación	<i>PgpdA</i>	<i>PalcA</i>
2X Buffer	5 µL	5 µL
Producto PCR purificado	1,8 µL	1,9 µL
pJET (25 ng/µL)	0,5 µL	0,5 µL
T4 ADN ligasa	0,5 µL	0,5 µL
H ₂ O	2,2 µL	2,1 µL

5.6.2.3. Transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* con la mezcla de ligación

Para llevar a cabo la transformación en *E.coli* por shock térmico, se añadieron los 10 µL del producto de ligación en 100 µL células quimiocompetentes de la cepa *E.coli DH5α*.

Se deja en hielo durante 20 a 30 minutos para favorecer la interacción del ADN con la membrana celular. Luego, se realiza el shock térmico transfiriendo a un baño a 42°C durante 90 segundos o alternativamente a 37°C durante 120 segundos. Inmediatamente después, se colocan nuevamente en hielo y se incuban durante 1 a 2 minutos para estabilizar las células. Este paso es crucial y debe realizarse con rapidez para maximizar la eficiencia de transformación.

Para permitir la recuperación de las bacterias, se añade un volumen de medio LB equivalente a cuatro veces el volumen inicial de células y se incuban a 37°C durante una hora con agitación a 200 r.p.m.

Tras el período de recuperación, se procede al plaqueo de 100 µL de la suspensión celular en placas de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, en este caso ampicilina. Con el volumen restante, se realiza una centrifugación a 2000 g durante un minuto y se descarta parte del sobrenadante, dejando un volumen suficiente para resuspender las células y así plaquearlas completamente en otra placa con el mismo medio selectivo.

Finalmente, las placas se incuban a 37°C durante 16 a 24 horas, permitiendo el crecimiento de las colonias transformadas.

5.6.2.4. Minipreparación de ADN plasmídico

Para realizar la extracción de ADN plasmídico se realizan minipreparaciones, se comienza seleccionando una colonia aislada e incubándola 16 a 24 horas en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente. Es importante recordar repicar la misma colonia o una gota de un tubo crecido en una placa de LB con antibiótico para conservar el clon. Luego, se transfiere el cultivo a un tubo Eppendorf, se centrifuga por 30 segundos y se descarta el sobrenadante, repitiendo este proceso hasta finalizar con los 3 mL.

A continuación, se resuspende el pellet con 200 μ L de Solución I. De manera opcional, se puede agregar 5 μ L de ARNasa a una concentración de 10 mg/mL e incubar a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añade 200 μ L de Solución II recién preparada y se mezcla bien por inversión, evitando dejar mucho tiempo en la Solución II.

Luego, se agrega 200 μ L de Solución III fría, que debe haber sido retirada de la heladera y mantenida en hielo. La mezcla se agita por inversión lentamente y se deja en hielo durante 5 minutos. Opcionalmente, se puede agregar 200 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclando bien y vortexando. Este paso ayuda a purificar el plásmido y separar la fase acuosa, donde se encuentra el ADN plasmídico, de los otros componentes celulares.

Se procede a centrifugar a más de 12000 g durante 15 minutos y se toma el sobrenadante (~400-500 μ L). En caso de no haber agregado ARNasa en el paso anterior, se puede añadir 1 μ L de ARNasa a 10 mg/mL y dejar incubar 15 minutos a 37°C. Si no se utilizó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), también se puede agregar 1 volumen de esta mezcla, vortexear, centrifugar por 5 minutos a más de 12000 g y tomar la fase superior.

Para la precipitación del ADN, se añade 1 volumen de isopropanol, se mezcla por inversión y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga durante 15 minutos a más de 12000 g, descartando el sobrenadante. El siguiente paso es lavar el pellet con 500 μ L de etanol al 70%, invirtiendo varias veces. Después, se centrifuga durante 5 minutos a más de 12000 g, se descarta el sobrenadante y se deja secar al aire, pudiendo acelerarse el proceso dejando secar bajo una lámpara durante unos 10 minutos. Finalmente, se resuspende el ADN en 50 μ L de solución TE 10-1 pH 8 y se almacena a -20°C.

Soluciones minipreparación ADN plasmídico

Solución I: 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM EDTA pH 8.

Solución II: 0,2 N NaOH; 1% SDS.

Solución III: 3 M AcK; 11,5% ácido acético glacial.

5.6.3. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción

Para verificar la presencia de inserto, se realizan digestiones con las enzimas de restricción con NotI y XbaI (*FastDigest*, *Thermo*). Se sigue el protocolo del fabricante, incubando 1 hora a 37°C.

Mix digestión	<i>PgpdA</i>	<i>PalcA</i>
NotI	2 µL	2 µL
XbaI	2 µL	2 µL
ADN plasmídico	2 µL	2 µL
Buffer 10X	4 µL	4 µL
H ₂ O	29 µL	29 µL

5.6.3.1. Secuenciación

El secuenciado es realizado por la empresa MacroGen con los primers descritos para ese uso en la Tabla 11. Primers utilizados

5.6.4. Clonado de *argB* en plásmido zero blunt

5.6.4.1. Zero blunt

El vector zero blunt contiene el gen letal *ccdB* de *E. coli* fusionado al extremo C-terminal de LacZ α . La ligación de un fragmento de PCR de extremo romo interrumpe la expresión de la fusión génica lacZ α -*ccdB*, lo que permite el crecimiento de únicamente los recombinantes positivos tras la transformación. Además, el plásmido posee resistencia a kanamicina. El plásmido zero blunt se utilizó para clonar el gen *argB* de *A. nidulans* (el cual complementa la mutación *argB2*).

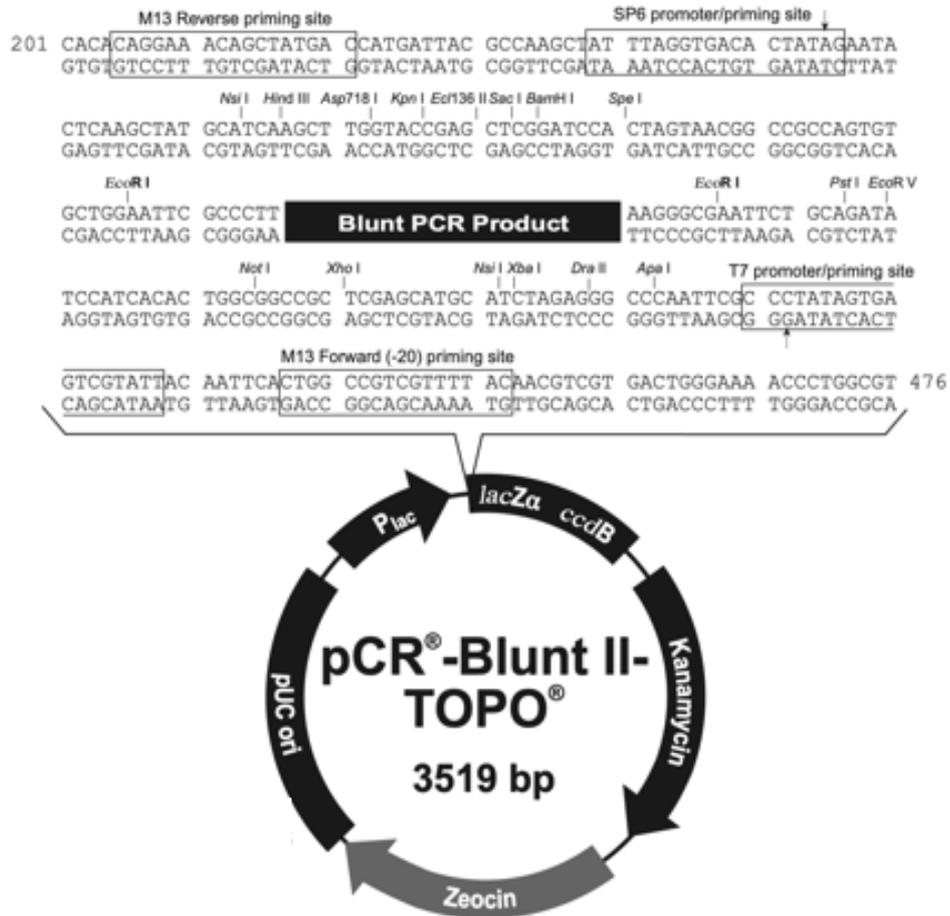


Figura 26. Mapa del plásmido Zeroblunt.

5.6.4.2. Generación de fragmento *argB*

Para generar el fragmento *argB* se amplificó la secuencia utilizando como molde ADN_g de *A. nidulans*. El tamaño del amplicón es de 2168 pb.

Mix PCR	
5x KAPA HiFi buffer	5 μ L
ADN polimerasa KAPA	0,5 μ L
dNTPs	0,75 μ L
ArgB-pl-Fw	0,75 μ L
ArgB-pL-Fw	0,75 μ L
ADN _g (MVD P003)	2 μ L
H ₂ O mQ	15, 25 μ L

Programa		
Temperatura	Duración	Ciclos
95°C	3 minutos	1
98°C	20 segundos	25
61°C	15 segundos	
72°C	2 minutos	
72°C	5 minutos	1

5.6.4.3. Clonado *argB* en plasmido Zeroblunt

El producto de PCR *argB* purificado es clonado en el plásmido Zero blunt siguiendo las especificaciones del kit Zero Blunt® PCR Cloning.

Mix ligación	
Vector	1 µL
Producto PCR	2,5 µL
Buffer 5x	2 µL
T4 ADN ligasa	1 µL
H ₂ O	3,5 µL

El producto de ligación se transforma en *E.coli*, y se extrae el ADN plasmídico, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 5.6.2.3. y 5.6.2.4, respectivamente.

5.6.4.4. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción y secuenciación

La elección de enzimas de restricción se realiza analizando la secuencia con el software Nebcutter (poner link). La digestión se realiza con la enzima SmaI (RO156S), para verificar la presencia del inserto y la orientación. Se sigue el protocolo del fabricante, incubando durante toda la noche a 33°C.

Mix digestion	
Vector	2 µL
Buffer	2 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL
Enzima	2 µL
H ₂ O	23,7 µL

Finalmente, el gen *argB* clonado en el plásmido Zeroblunt fue secuenciado por la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

5.6.4.5. Subclonado de las construcciones en plásmido portador del marcador *argB*

Para la liberación del inserto (construcciones clonadas en pJET), se realizaron digestiones con las enzimas de restricción NotI y XbaI (FastDigest Thermo), siguiendo el protocolo del fabricante e incubando durante 2 horas a 37 °C. El mismo procedimiento se aplicó al plásmido ZeroBlunt/*argB*, asegurando la generación de extremos cohesivos compatibles para su posterior clonación.

Mix digestión	pJET/PgpdA	pJET/Palca	Zb/ <i>argB</i>
NotI	4 µL	4 µL	4 µL
XbaI	4 µL	4 µL	4 µL
ADN plasmídico	4 µL	4 µL	4 µL
Buffer 10X	10 µL	10 µL	10 µL
H ₂ O mQ	68 µL	68 µL	68 µL

5.6.4.6. Ligación

La ligación se lleva a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa (NEB M0202S), con una proporción inserto:vector de 5:1, incubando la reacción durante toda la noche a 17 °C. Tras la incubación, la enzima se inactiva a 65 °C durante 10 minutos. Luego de la ligación, el producto resultante se transforma en *E. coli*, utilizando kanamicina como antibiótico de selección. La recuperación se realiza en presencia de kanamicina durante 2 horas y media, tras lo cual se procede a la extracción de ADN plasmídico, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 5.6.2.3. y 5.6.2.4, respectivamente.

Mix ligación	PgpdA	Palca
Buffer	2 µL	2 µL
Vector Zb/ <i>argB</i>	0,55 µL	0,55 µL
Fusiones	6 µL	5 µL
T4 ADN ligasa	1 µL	1 µL
H ₂ O mQ	10,45	11,45 µL

5.6.4.7. Digestión de plásmido candidatos a portar las construcciones en plásmido Zb/argB

Finalmente, para confirmar el subclonado de las fusiones en el plásmido Zb/argB, se realizó una búsqueda de enzimas de restricción. Posteriormente, se llevó a cabo una digestión con la enzima Sall (incubación *overnight* a 37 °C).

Mix digestión	PgpdA	PalcA
ADN plasmídico	3 µL	4 µL
Sall	1 µL	1 µL
Buffer O 10X	2 µL	2 µL
H ₂ O mQ	14 µL	14 µL

5.7. Cuantificación de ADN

Las cuantificaciones de los fragmentos de ADN se realizaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™), evaluando tanto la concentración como la pureza del ADN mediante las relaciones de absorción $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$.

5.8. Análisis electroforético de ácidos nucleicos

Para la visualización del ADN, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las muestras se cargan en el gel utilizando un buffer de carga 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylencianol).

La electroforesis se realiza aplicando un voltaje de 9 V/cm, y el ADN se visualiza mediante exposición a luz UV de 302 nm. Se utilizan como referencia los marcadores de peso moleculares presentados en la Figura 27.

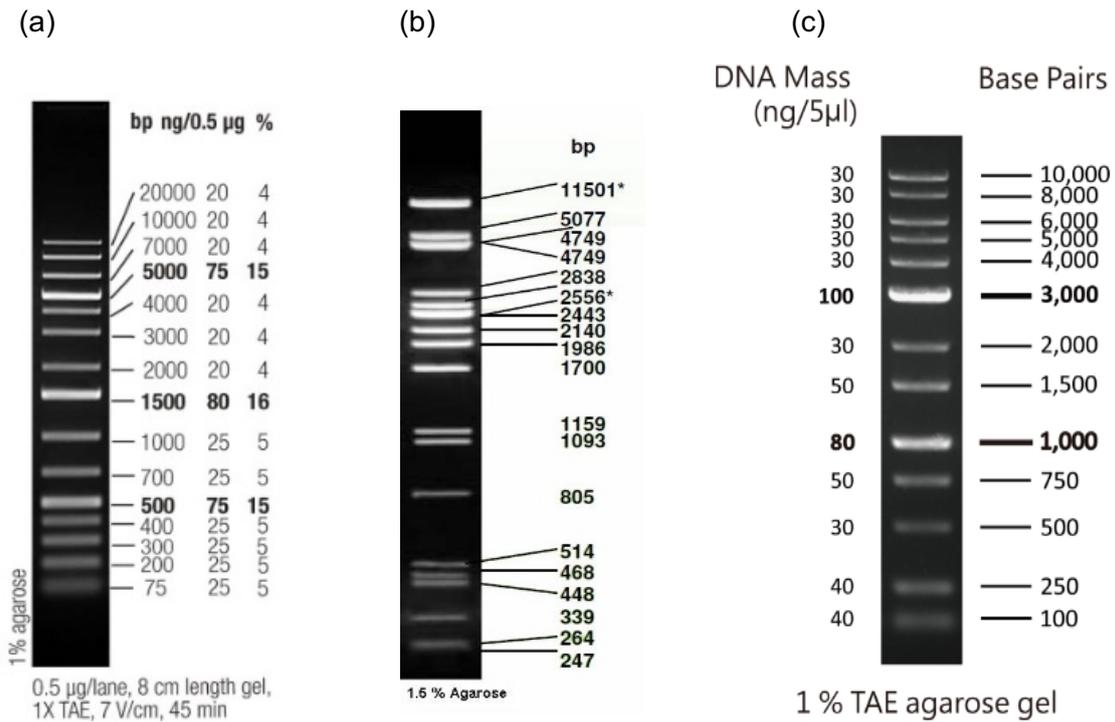


Figura 27. (a) GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). (b) λDNA/ PstI Digest. (c) 1Kb plus DNA Ladder RTU (Bio-Helix).

5.9. Purificación por gel

Las purificaciones por gel de agarosa se realizan mediante el uso del kit comercial Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.10. Técnicas empleadas en *A. nidulans*

5.10.1. Protoplastización y transformación en *Aspergillus nidulans*

La cepa a transformar se cultiva en medio completo al 3% durante 72 horas. Se realiza una suspensión de esporas en 10 mL de Tween 80 al 0,01% y se filtran a través de blutex. Esta suspensión se realiza el día previo a la transformación y se conserva a 4°C. Antes de iniciar, se observa al microscopio el tamaño inicial de las esporas como referencia.

Las esporas se inoculan en 100 mL de medio mínimo con los suplementos requeridos y la fuente de nitrógeno en un matraz de 250 mL. El cultivo se incuba a 37°C, 130 rpm durante un período de 3 a 5 horas. Después de 3,5 horas de incubación, se observa al microscopio la aparición de tubos germinativos y, cuando entre el 5 y el 10% de las esporas presentan un pequeño tubo germinativo, se detiene la incubación.

El cultivo se transfiere a tres tubos Falcon estériles y se centrifuga a 3000 g durante 10 minutos a 10 °C. El sobrenadante se descarta utilizando una pipeta p5000, y los pellets se resuspenden en un volumen único de 20 mL de solución I, transfiriéndolos a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL. Se añade 1 g de la enzima lítica Vinotaste Pro (Novozymes®) para la degradación de la pared celular y la liberación de los protoplastos. La solución se deja en hielo durante 5 minutos y luego se incuba a 30 °C con agitación a 60 rpm durante 1 hora y 45 minutos.

Los protoplastos obtenidos se concentran por centrifugación en tubos Falcon estériles a 3000 g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y los pellets se lavan con 10 mL de solución II, repitiendo la centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente, los pellets se resuspenden en 4 mL de solución II y, una vez homogéneos, se agrega 1 mL de solución III.

Los protoplastos se distribuyen en tubos de Eppendorf en alícuotas de 300 µL y se añade el ADN de interés a una concentración final de 1-2 µg. Para los controles negativo y de viabilidad, se añade H₂O mQ estéril en lugar de ADN. Las alícuotas de protoplastos no utilizadas se almacenan a -80°C.

El mix de transformación se incuba en hielo durante 15 minutos, tras lo cual se añade 1 mL de solución III. Luego de homogenizar, se incuban otros 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugan a 3000 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se lavan los pellets con 1 mL de solución II sin resuspender. Se centrifugan nuevamente a 3000 g durante 2 minutos y finalmente los pellets se resuspenden cuidadosamente en 200 µL de solución II.

En tubos Falcon estériles de 15 mL, se añaden 5 mL de MMS top agar, se mantiene a 45-55°C antes de su uso, y se mezclan con los protoplastos transformados cuidadosamente. Se distribuyen sobre placas selectivas para la transformación y el control negativo, así como en placas no selectivas para el control de viabilidad. Se deja

polimerizar y posteriormente las placas se incuban a 37 °C durante 4-5 días hasta la aparición de transformantes.

Soluciones de transformación

Solución I: 1,2 M MgSO₄, 10 mM ortofosfato pH 5,8.

Solución II: 1 M de sorbitol, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de CaCl₂.

Solución III: 60% p/v PEG 6000, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂.

MMS top agar:

- 20 mL de solución de sales
- 10 g de glucosa
- 342.3 g de sacarosa

Se lleva a un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos, conservar a 65°C. Este medio no posee fuentes de nitrógeno, por lo que deben ser agregadas al igual que los suplementos necesarios.

5.10.1.1. Purificación de transformantes

Una vez obtenidos los transformantes, estos deben seleccionarse y purificarse. Con este propósito, se preparan suspensiones de esporas a partir de los transformantes primarios y se plaquean en medios selectivos. Estos se incuban a 37 °C por 48-72 horas hasta observar un crecimiento de colonias aisladas, a partir de las cuales se genera una “placa madre”. A partir de esta, se realizan réplicas para analizar las auxotrofías mediante ensayos de crecimiento en placa.

5.10.2. Extracción de ADN genómico

Se inocula una suspensión de esporas, obtenida a partir de una placa de conidias de la cepa correspondiente en 7.5 mL de Tween 80 al 0.01%, en 100 mL de medio mínimo líquido (MM) suplementado con los nutrientes necesarios. El cultivo se incuba a 37 °C y 140 r.p.m. durante 16-18 horas.

El cultivo se filtra utilizando blutex, lavando el micelio con agua estéril y asegurando su secado entre hojas de papel estériles. El micelio obtenido se congela en presencia de nitrógeno líquido y se pulveriza con mortero hasta obtener un polvo blanco homogéneo.

Para la extracción de ADN, se añade 800 μ L de solución de extracción por cada 200 mg de micelio molido, y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, el ADN se purifica mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguida de una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente, se centrifuga a 11.600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La fase acuosa resultante se recoge y se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto en presencia de 0.3 M de acetato de sodio (AcNa), centrifugando nuevamente a 11.600 g por 10 minutos. El precipitado se lava con etanol al 70%, se seca a temperatura ambiente y se resuspende en 50 μ L de buffer Tris-EDTA 10:1. Finalmente, la solución se incuba a 37 °C en baño de agua durante 30 minutos con RNAsa a una concentración final de 10 μ g/mL.

Solución de extracción: 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 1 % SDS, 1 mM EDTA.

Buffer Tris-EDTA (TE) 10:1: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.

5.11. Western blot

5.11.1. Extracción de proteínas

Se inoculan 100 mL de medio completo con una suspensión de esporas de una placa de la cepa en cuestión en 7.5 mL de 0,01% Tween 80. Se incuba durante 16 horas a 37°C y 140 r.p.m. Se filtra el cultivo y el micelio es molido en presencia de nitrógeno líquido. Se toman 200 mg de micelio molido y se resuspenden en 1 mL de Buffer de Precipitación. Se vortexea por 10-20 segundos y luego se incuba durante 10 minutos en hielo. Se centrifuga por 10 minutos a 4°C a 13 000 r.p.m. El sobrenadante se remueve y el pellet se resuspende en 1 mL de EtOH 100% helado. Se centrifuga por 5 minutos a 4°C a 13 000 r.p.m. y se remueve el sobrenadante. Se lava el pellet 2 veces con 1 mL de acetona helada. Posterior a los lavados, el pellet se deja secar a 60°C por 30 minutos para luego resuspenderlo en 400 μ L de buffer de extracción. Se centrifuga por 15 minutos a 4°C a 13 000 r.p.m. y se toma el sobrenadante.

Buffer de Precipitación: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 12.5 % TCA

Buffer de Extracción: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl ,1% SDS, 1 mM EDTA, inhibidores de proteasas para hongos (Sigma-Aldrich P8215, dilución 1:500).

5.11.2. Dosificación de proteínas mediante método BCA

Para la cuantificación de proteínas, se utiliza el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los extractos proteicos y el Buffer de Extracción (utilizado como control blanco) se diluyen 1:10 en agua destilada antes de las mediciones. La curva de calibración se construye con albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones finales de 0, 0.025, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5 y 2 mg/mL. La absorbancia se mide a 562 nm mediante un lector de placas.

5.11.3. SDS-PAGE

Para el análisis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realiza un gel SDS-PAGE al 10%. Previo a sembrar las muestras, se agrega buffer de carga a una concentración final 1X y se calientan a 100°C durante 5 minutos. Se siembra 25 µg de cada extracto proteico, y 4 µL del marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus (Figura 28). La visualización de proteínas se realiza mediante la tinción con Commasie Blue R-250 (Sigma-Aldrich) incubando el gel en la solución durante toda la noche. Luego se decolora con solución decolorante hasta la visualización de las bandas.

SDS Loading Buffer (4X): 250 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 12% de SDS, 40% de glicerol y 0.02% de Azul de Bromofenol. Antes de su uso, se le añade β-mercaptoetanol hasta alcanzar una concentración final del 20% en la alícuota correspondiente.

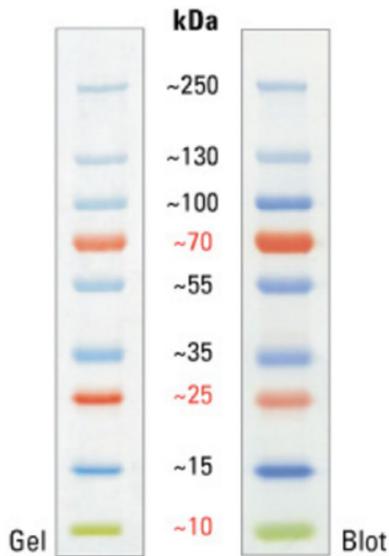


Figura 28. Marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus.

5.11.4. Transferencia

50 µg de proteínas se separan por un gel SDS-PAGE (10%), el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific). Antes del ensamblaje del dispositivo de transferencia, tanto el gel como los materiales de transferencia se sumergen en Buffer de Transferencia frío. La transferencia se lleva a cabo a 120 V durante 1 hora.

Buffer de Transferencia: Disolver 3.02 g de Tris Base y 14.42 g de Glicina en 200 mL de H₂O mRo. Agregar 200 mL de Etanol y completar el volumen con H₂O mRo hasta alcanzar 996.3 mL. Antes de usar, añadir 3.7 mL de SDS al 10%.

5.11.5. Bloqueo

El bloqueo se realiza con leche descremada en polvo al 5% en TBST, incubando la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente.

TBST (Buffer de Lavado) para 1 litro: 20 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5 , 30 mL NaCl 5 M y 0.1% Tween 20 – 1 mL Tween 20.

5.11.6. Revelado

La membrana se incuba con una dilución 1:1000 del anticuerpo α -His *tag* en solución de bloqueo durante 2 horas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizan 6 lavados de 5 minutos con TBST. A continuación, la membrana se incuba por 1 hora con una dilución 1:1000 en solución de bloqueo del anticuerpo secundario α -ratón acoplado a la enzima Horseradish Peroxidase (HRP). Luego, se realizan otros 6 lavados de 5 minutos con TBST.

El revelado se lleva a cabo utilizando el kit HRP Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen), y las imágenes se adquieren en el sistema G-BOX registrándose la señal con seis series de 10 segundos.

Solución de bloqueo: 5% leche descremada en polvo disuelta en TBST.

5.12. Ensayos de actividad proteolítica

Para evaluar la actividad proteolítica de la quimosina, se llevan a cabo ensayos tanto en placas sólidas como en medio líquido, utilizando leche como sustrato.

Solución de Leche 20%: Se disuelve 20 g de leche en polvo en 100 mL de agua destilada y se esteriliza mediante calor húmedo a 116°C x 10 minutos.

5.12.1. Ensayos en medio sólido

Se preparan placas con medio completo y con medio mínimo, incorporando leche al 5% como sustrato a cada medio. Se siembran 100 y 1000 esporas por cada cepa en evaluación, incluyendo la cepa control, con el objetivo de analizar la actividad proteolítica. La determinación de la concentración de esporas se determina mediante un recuento en cámara de Neubauer. El ensayo se realiza por triplicado.

5.12.2. Ensayos en medio líquido

En este ensayo, se mezclan 45 μ L de sobrenadante obtenido de un cultivo de la cepa en evaluación con 1 mL de leche entera y 2 μ L de CaCl_2 1 M. La mezcla se incuba a 42°C, y la actividad enzimática se evalúa cualitativamente cada 5 minutos hasta observar la coagulación de la leche.

6. Bibliografía

A. Kumar, D. Dutt, and A. Gautam, Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 107–118, 2016.

Anuradha Jabasingh, S., & ValliNachiyar, C. (2011). Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 85–97.

Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399-1408.

B. da Silva Menezes, D. M. Rossi, F. Squina, and M. A. Z. Ayub, "Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic bio-mass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillusnidulans*XynC A773," *InternationalJournalofFoodScience&Technology*, vol. 53, no. 9, pp. 2110–2118, 2018.

Berkman, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 240-251.

Bozkurt, E. U., Çağıl, İ. N., Şahin Kehribar, E., Işılak, M. E., & Şeker, U. Ö. Ş. (2023). Glycosylation Circuit Enables Improved Catalytic Properties for Recombinant Alkaline Phosphatase. *ACS Omega*, 8(39), 36218–36227. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04669>

Broekhuijsen, M. P., Mattern, I. E., Contreras, R., Kinghorn, J. R., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993). Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J. Biotechnol.*, 31, 135–145.

Cardoza RE, Gutiérrez S, Ortega N, Colina A, Casqueiro J, Martín JF. (2003). Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnol Bioeng*, 83, 249–259.

Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, Hayenga KJ, Lamsa MH, Rey MW, Norton S, Berka RM. (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology*, 5, 369–376.

Chen H, Zhang G, Zhang Y, Dong Y, Yang K. Functional implications of disulfide bond, Cys206-Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry*. (2000) 10;39(40):12140-8. doi: 10.1021/bi000976o. PMID: 11015192.

E. Cerioni Spiropoulos Gonçalves, M. Martiinez Perez, A. C. Vici et al., "Potential biodiesel production from Brazilian plant oils and spent coffee grounds by *Beauveria bassiana* lipase 1 expressed in *Aspergillus nidulans* A773 using different agroindustry inputs," *Journal of Cleaner Production*, vol. 256, Article ID 120513, 2020.

E. Liu, M. Li, A. Abdella, and M. R. Wilkins, "Development of a cost-effective medium for submerged production of fungal aryl alcohol oxidase using a genetically modified *Aspergillus nidulans* strain," *Bioresource Technology*, vol. 305, Article ID 123038, 2020

Fitzgeralds, P. M. D., Mckeever, B. M., Vanmiddlesworths, J. F., Springer, J. P., Heimbach, J. C., Leull, C.-T., Herbern, W. K., Dixon, R. A. F., & Darkeli, P. L. (n.d.). Crystallographic Analysis of a Complex between Human Immune Deficiency Virus Type 1 Protease and Acetyl-Pepstatin at 2.0-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(24).

F. Segato, A. R. L. Damasio, T. A. Gonçalves et al., "High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 51, no. 2, pp. 100–106, 2012.

Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Sczozocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105–1115. <https://doi.org/10.1038/nature04341>

Gilliland, G. L., Winborne, E. L., Nachman, J., & Wlodawel, A. (1990). The Three-Dimensional Structure of Recombinant Bovine Chymosin at 2.3 Å Resolution. *Proteins Structure, Function, and Genetics*, 8.

Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications. *Separation and Purification Reviews*, 50(3), 223–243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>

Jensen, J. L., Jacobsen, J., Moss, M. L., Rasmussen, F., Qvist, K. B., Larsen, S., & van den Brink, J. M. (2015). The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2853–2860. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8672>

Kappeler, S. R., Van Den Brink, H. M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhon, Z., Hansen, E. B., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>

Klessen C, Schmidt KH, Gumpert J, Grosse HH, Malke H. (1989). Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1009–1015.

Kumar, A. (2020). *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. *Int J Microbiol*, 2020:8894215. <https://doi.org/10.1155/2020/8894215>

Langholm Jensen, J., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., Lorentzen, A. M., Hjernø, K., Van Den Brink, J. M., Qvist, K. B., & Larsen, S. (2013). Camel and bovine chymosin: The relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(5), 901–913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>

Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., & Heitman, J. (2010). The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 298–340. <https://doi.org/10.1128/membr.00005-10>

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>

Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Grover, S., & Batish, V. K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17.

Nishimori, K., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., & Beppu, T. (1982). Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *Escherichia coli* (Recombinant DNA; lac control; radioimmuno-detection by western blotting). *Gene*, 19.

O. Pardo-Planas, R. A. Prade, M. Müller, H. K. Atiyeh, and M. R. Wilkins, "Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an *Aspergillus nidulans* cell factory," *Bioresource Technology*, vol. 243, pp. 874–882, 2017.

Parente D, de Ferra F, Galli G, Grandi G. (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 61, 243–249.

Polgár, L. (1987). The mechanism of action of aspartic proteases involves "push-pull" catalysis. *FEBS Letters*, 219(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81179-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81179-1)

S. A. Osmani, H. Liu, M. J. Hynes, and B. R. Oakley, "Advances in gene manipulations using *Aspergillus nidulans*," in *Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, G. Goldman and S. Osmani, Eds., pp. 93–512, Taylor & Francis, New York, NY, USA, 2008.

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-8.

Svensson, B., Larsen, K., & Gunnarsson, A. (1986). Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 154, 497–502.

Todd, R. B., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature Protocols*, 2(4), 811–821. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>

Wanka, F., et al. (2016). Tet-on, or Tet-off, that is the question: Advanced conditional gene expression in *Aspergillus*. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 72–83.

Zhang L, Jiang Y, Zhang J, Yang Z. (2009). Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 25, 1160–1165.

Zinovieva, N., Müller, M., & Brem, G. (2002). Short Communication: Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3476–3479. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)7443](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)7443)

7. Anexo

Secuencias para la expresión de proquimosina en *Aspergillus nidulans*

Proquimosina

Propéptido

>proquimosina (optimizada para expresión en *A. niger* - mismo uso de codones que *A. nidulans*).

**GCAGAAATCACCCGCATCCCCCTCTACAAGGGCAAATCCTTAAGGAAAGCTCTCAAGGAGCACGGCTTGC
TTGAGGATTTTTTGCAAAGCAGCAGTACGGGATCTCTTCCAAATATTCGGGCTTC**GGAGAAGTCGCATC
CGTACCACTGACCAACTACCTCGATAGTCAATACTTCGGCAAGATCTATCTCGGTACTCCACCACAAGAG
TTCCTGTACTGTTTGATACCGGCAGCAGCGACTTCTGGGTGCCGAGCATTTACTGCAAATCTAATGCCT
GCAAGAACCATCAGCGCTTCGATCCCAGAAAGAGCTCTACTTTCAGAACCTTGGAAGCCGCTATCTAT
CCACTATGGTACGGGCAGTATGCAGGGTATCCTTGGTTATGACACCGTGACGGTCTCAAATATTGTTGAT
ATTAGCAAACAGTTGGACTTTCGACCCAAGAGCCTGGTGATGTTTTCACCTACGCTGAATTCGACGGGA
TTCTCGGCATGGCCTATCCTTCCTTAGCTTCAGAATATCTATTCCTGTGTTTGACAACATGATGAACCG
GCATCTAGTCGCCCAAGATCTCTTTTCGGTGTATATGGACCGGAATGGCCAGGAATCCATGCTAACCTTG
GGAGCCATCGACCCGTCGTACTACACAGGTTCTCTCCATTGGGTACCGGTCACTGTGCAACAGTACTGGC
AGTTCACAGTGGATAGTGTACCATCTCGGGAGTCGTTGTTGCTTGTGAGGGCGGATGCCAGGCGATACT
GGATACGGGGACTTCGAAGCTGGTGGGTCCCAGCAGTGACATCCTCAACATCCAACAAGCTATTGGCGCG
ACACAGAATCAGTATGGAGAGTTTGACATAGACTGCGACAATTTGTCTTACATGCCACGGTGGTATTTG
AGATCAATGGGAAGATGTACCCTTTGACGCCCTCCGCGTACACCTCCCAGGACCAGGGGTCTGTACATC
TGGATTCCAATCAGAGAACCACTCACAGAAGTGGATTCTGGGCGATGTCTTCATCCGTGAATACTATAGC
GTCTTTGATCGAGCCAACAACCTGGTTGGTCTGGCCAAAGCAATA**CATCACCATCATCACCAC**

>Secuencia proteica proquimosina (optimizada para expresión en *A. niger* - mismo uso de codones que *A. nidulans*) con propéptido

AEITRIPLYK GKSLRKALKEHGLEDFLQKQYGISSKYSGFGEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQE
FTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQILGYDVTVSNIVD
IQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTL
GAIDPSYYTGSLHWVPVTVQYQWQFTVDSVTISGVVACEGGCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQQAIGA
TQNQYGEFDIDCDNLSYMPVTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVFIREYYS
VFDRANNLVGLAKAI**HHHHHH**

GlaA₁₋₅₁₄ *A. niger*

>Secuencia genómica *glaA* *A. niger* - codifica para los primeros 514 AA

Intrones

ATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCCTCGTCTGCACAGGGTTGGCAAATGTGATTTCCAAGC
GCGCGACCTTGGATTCATGGTTGAGCAACGAAGCGACCGTGGCTCGTACTGCCATCCTGAATAACATCGG
GGCGGACGGTGCTTGGGTGTCGGGCGCGGACTCTGGCATTGTCGTTGCTAGTCCCAGCACGGATAACCCG
GACTgtatgtttcgagctcagatttagtatgagtgtgtcattgattgattgatgctgactggcgtgtcgt
ttgttttagACTTCTACACCTGGACTCGGACTCTGGTCTCGTCCTCAAGACCCCTCGTCGATCTCTTCCG
AAATGGAGATAACCAGTCTCCTCTCCACCATTGAGAACTACATCTCCGCCCAGGCAATTGTCCAGGGTATC
AGTAACCCCTCTGGTGATCTGTCCAGCGGCGCTGGTCTCGGTGAACCCAAGTTCAATGTCGATGAGACTG
CCTACACTGGTTCTTGGGGACGGCCGCAGCGAGATGGTCCGGCTCTGAGAGCAACTGCTATGATCGGCTT
CGGGCAGTGGCTGCTTgtatgtttccacccccttgctctgatctgtgacatatgtagctgactggtca
gGACAATGGCTACACCAGCACCGCAACGGACATTGTTTGGCCCCCTCGTTAGGAACGACCTGTCGTATGTG
GCTCAATACTGGAACCAGACAGGATATGgtgtgtttgttttattttaaatttcaaagatgcgccagcag
agctaaccgcgatcgcagATCTCTGGGAAGAAGTCAATGGCTCGTCTTTCTTTACGATTGCTGTGCAAC
ACCGCGCCCTTGTGCAAGGTAGTGCCCTTCGCGACGGCCGTGGCTCGTCTGCTCCTGGTGTGATTCTCA
GGCACCCGAAATTTCTGCTACCTGCAGTCTTCTGGACCGGCAGCTTCATTCTGGCCAACCTTCGATAGC
AGCCGTTCCGGCAAGGACGCAAACACCCCTCCTGGGAAGCATCCACACCTTTGATCCTGAGGCCGCATGCG
ACGACTCCACCTTCCAGCCCTGCTCCCCGCGCGCTCGCAACCACAAGGAGGTGTAGACTCTTTCCG
CTCAATCTATAACCCCAACGATGGTCTCAGTGACAGCGAGGCTGTTGCGGTGGGTCGGTACCCTGAGGAC
ACGTACTACAACGGCAACCCGTGGTTCCTGTGCACCTTGGCTGCCGCAGAGCAGTTGTACGATGCTCTAT
ACCAGTGGGACAAGCAGGGGTCGTTGGAGGTCACAGATGTGTGCTGGACTTCTTCAAGGCACTGTACAG
CGATGCTGCTACTGGCACCTACTCTTCGTCCAGTTCGACTTATAGTAGCATTGTAGATGCCGTGAAGACT
TTCGCCGATGGCTTCGTCTCTATTGTGgtaagtctacgctagacaagcgtcatgttgacagaggggtgcg
tactaacagaagtagGAAACTCACGCCGCAAGCAACGGCTCCATGTCCGAGCAATACGACAAGTCTGATG
GCGAGCAGCTTTCGCTCGCGACCTGACCTGGTCTTATGCTGCTCTGCTGACCGCCAACAACCGTCGTAA
CTCCGTCGTGCTGCTTCTTGGGGCGAGACCTCTGCCAGCAGCGTGCCCGGCACCTGTGCGGCCACATCT
GCCATTGGTACCTACAGCAGTGTGACTGTCACCTCGTGGCCGAGTATCGTGGCTACTGGCGGCACCACTA
CGACGGCTACCCCACTGGATCCGGCAGCGTGACCTCGACC

Promotores

PalcA: inducible por etanol/metiletilcetona

>PalcA + 2000 pb upstream (fondo amarillo: PalcA, con letra azul: 1 kb upstream codón de inicio gen alcA)

GGTAATGACAAAAGCCCCCTAGTGCCCTGAAGAATGGAAACTCGTGCGTTAGTTCACCGAGTGAGTGTCTG
GGGACATGCAGAATGCTCACAATGGAGTTGGATTGCCGACTTTCCTAGCCAGGCTGGGCTGCTGGCGCAT
CATTGGGGACAGATACAGCTTTTCGAATTGCTCCGCAGAGAGGGTGATAGAGGACGGTATCGTGGAGAGA
TGATGGCCCTTGGCCTCACCGTTACTGATCTCGGTAGTCATTTCTGCTGTTTCTGGGCTCAATGCTTTGG
TATCTCAAAGGAGAGGAGAAGCGTCCGTGGAAGGCAGGAAGACCTACAAGACCTGGCACTCAGAAAAGAGG
GCGGTTGCTCTTAAGTGTAGGGCTGCGCAGGGGAGGAACTCTGGGGTTGTCAAATGCGGCAGACGGAAAT
CTACATTAGCAGCGTCAATCCACCCCTTTTGGTGAACCATAAAGGGGCTAGTCTACCCAGCTTCGAAT
CAGAATAATATAAAATGCGGGGAAAGCTTTAGGTATGCGGACAGATCCATACTGGGTCTCCAAGAGATCG
GCCCCACATCTGACGTGGTTTCAAGGTTGACCCATGCGGAGCCGCATTGGAGGATCTATCCCTGTAGG
TACCTTAGCTAAAGATCTACGCCGTATGGCCAAGCGGAAGATATAGGAACGATCGGCCATGAAGTCGTGT
CTTCTACAAACTCTCGTATATTTACTAGGTTTCGACGTCTGCTAAACTAACCTGACCTAACCTAACCTAA
CTCCCTGCCAGTTCAGCCATGCGGACCCGGCAGTCATGTCTTTTCGCTTCAGATTGAACGCGGCTGCCTC
GTCTCGATCAGGATTTAGCAGAAAGACAGTACACACTGAAAAAGTACCACAATAAAGAAGCTATATTGCAG
GCCAAATAGCCGTCTGCTCGGTCTGTTTATTCAACCTGGCCTCTTTCATCGTTTTTCCCTTTTCTTATT
AAACCATATATCTCCAGCAGAGATGGACGACCCTTTACTCCGCGCTGGACGACGCAATATACAACTCA
CCAATCACAAACACCACGGTCTGCTACACCTGGAGAGTGCCGCTACGCCACCGCGCGACGAACGCGTGG
AGAAGCCTCGACACCCCAAGAATCCTCCAACCCCGCCTTCCATGTCCATGCCCTATGCTGTCAGCTCTGT
GCCCCAAGGAAAACATGTGCAATGTGGACCGGGGCAACGGCGCACTTGAGTATATCAACCCGAGCCTGCTG
CTATTTCCACAAGACTATGCAAGCCAAGAGTCCAACAATTATGCGAGCGCAAGACGGGTAGTGACCGAC
GGATTGGTCAGTCTCCCTATACGCGTCCCAATACACCGAACGTGGAAGGTGTCTCCAATGTGTCTTCGTC
GGATCAACGGTCCCTCGCTGTCCGGGCGCAACGGGCGAGAGGAGCAATCCAACCCGCCAGTAGATATTTTC
GAAGGGATTCTAGCAAAAATGCTGGCGTTTGATGTTGTGCGGCCCGCTCTACGAACGAATTAGGCAATG
ATGAGCCTCCGCGTGAGGTGGAGGCGAAACAACCGACTGTCCATCATGGATTTGCAATTAGTGTGGCTG
GTCCAGTACATTTCTCCCGATGACATACAGGAGGGGTCAGGGCATTCGAGAAATACCGTGGATACAGTT
GGCATTCTAGGGCTGAATGGGAAGGAGAGAGTTTTGAAATAGGCGTTCGGTTCGCTTAGGGTATTTG
GGAACAATCAATGTCAATGTACATTTAATCCACGATTTTATAAAACGTCATCCTTTGCCCTCCCTTCTT
ATTTGCCAATACCAAAAATCTTACTCCAGTGGTTCGGTAATCGCAGAGTTAAATCTGGGCTCGGTGGCAG
ATCTGCGATGCTCCATAACCGTTCAGATGTTGATTGGAACGGGTGGGTAGACAGCTCGAAGACCGAGT
GAACGTATACCTAAGACACTTTGACACGGCCGGAACACTGTAAGTCCCTTCGTATTTCTCCGCCTGTGTG
GAGCTACCATCCAATAACCCCGAGCTGAAAAGCTGATTGTGATAGTTCCCACTTGTCCTCGCATCGGC
ATCCGACGCTCGGGATAGTTCCGACCTAGGATTGGATGCATGCGGAACCGCACGAGGGCGGGGCGGAAAT
TGACACACCACTCCTCTCCACGCACCGTTCAAGAGGTACGCGTATAGAGCCGTATAGAGCAGAGACGGAG
CACTTTCTGGTACTGTCCGACGGGATGTCCGCACGGAGAGCCACAAACGAGCGGGGCCCCGTACGTGCT
CTCCTACCCAGGATCGCATCCCCGCATAGCTGAACATCTATATAAAGACCCCAAGGTTCTCAGTCTCA
CCAACATCATCAACCAACAATCAACAGTTCTCTACTCAGTTAATTAGAACTCTTCCAATCCTATCACCTC
GCCTCAAA

PgpdA: constitutivo

>PgpdA_1000(rojo), PgpdA_mini(azul)

GCTCCTTATTGAAGTCGGAGGACGGAGCGGTGTCAAGAGGATATTCTTCGCTCTGTATTATAGATAAGAT
GATGAGGAATTGGAGGTAGCATAGCTTCATTTGGATTTGCTTTCCAGGCTGAGACTCTAGCTTGGAGCAT
AGAGGGTCCCTTTGGCTTCAATATTCTCAAGTATCTCGAGTTTGAAC TTATTCCCGTGAACCTTTTATT
CACCAATGAGCATTGGAATGAACATGAATCTGAGGACTGCAATCGCCATGAGGTTTTCGAAATACATCCG
GATGTCTGAAGGCTTGGGGCACCTGCGTTGGTTGAATTTAGAACGTGGCACTATTGATCATCCGATAGCTC
TGCAAAGGGCGTTGCACAATGCAAGTCAAACGTTGCTAGCAGTTCCAGGTGGAATGTTATGATGAGCATT
GTATTAATCAGGAGATATAGCATGATCTCTAGTTAGCTCACCACAAAAGTCAGACGGCGTAACCAAAAG
TCACACAACACAAGCTGTAAGGATTTCCGGCACGGCTACGGAAGACGGAGAAGCCCACCTCAGTGGACTC
GAGTACCATTTAATTTCTATTTGTGTTTGATCGAGACCTAATACAGCCCCACACGACCATCAAAGTCGT
ATAGCTACCAGTGAGGAAGTGGACTCAAATCGACTTCAGCAACATCTCCTGGATAAACTTTAAGCCTAAA
CTATACAGAATAAGATGGTGGAGAGCTTATACCGAGCTCCCAAATCTGTCCAGATCAT **GGTTGACCGGTG**
CCTGGATCTTCCATAGAATCATCCTTATTCGTTGACCTAGCTGATTCGGAGTGACCCAGAGGGTCATG
ACTTGAGCCTAAAATCCGCCCTCCACCATTTGTAGAAAAATGTGACGAACTCGTGAGCTCTGTACAGT
GACCGGTGACTCTTTCTGGCATGCGGAGAGACGGACGGACGCAGAGAGAAGGGCTGAGTAATAAGCGCCA
CTGCGCCAGACAGCTCTGGCGGCTCTGAGGTGCAGTGGATGATTTAATCCGGGACCGGCCGCCCTCC
GCCCCGAAGTGAAAGGCTGGTGTGCCCTCGTTGACCAAGAATCTATTGCATCATCGGAGAATATGGAG
CTTCATCGAATCACCGGCAGTAAGCGAAGGAGAATGTGAAGCCAGGGGTGTATAGCCGTCGGCGAAATAG
CATGCCATTAACCTAGGTACAGAAGTCCAATTGCTTCCGATCTGGTAAAAGATTCACGAGATAGTACCTT
CTCCGAAGTAGGTAGAGCGAGTACCCGGCGGTAAGCTCCCTAATTGGCCCATCCGGCATCTGTAGGGCG
TCCAAATATCGTGCCTCTCCTGCTTTGCCCGGTGTATGAAACCGGAAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGC
GGCGCAGACCGGGAACACAAGCTGGCAGTCGACCATCCGGTGCCTGTCACTCGACCTGCTGAGGTCCCT
CAGTCCCTGGTAGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCGGTGTGTCGGCGGGTTGACAAGTCTGTTGCG
TCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
CCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAAGTAAGTACTTTGCTACATC
CATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTTCAGTTCGAGCTTTCCCACCTCATCGCAGCT
TGACTAACAGCTACCCGCTTGAGCAGACATCACAATC

Terminador

>Terminador *cgrA* *A.fumigatus* (con fondo amarillo oscuro: *cgrA_AF*, en negro: plásmido pFW9.3 y con fondo verde oscuro: operador Tet)

ACAGCAGAAGAATCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCTGCCATGCATTAACCTCATCCTACTGCTCTAC
CCGCAGTACCCATTCACATTTGCGGCAGATACCAGGTTGTTTTCTATTCCCTCGGTTCTTCAGTCTTCA
GATATTACATTACTCGAGAAATGGCGGCGATGCAGGAGTTTGGTTGGTTTTAATTGTTTCAGTCTCCTT
GACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTCGACGGAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCATGC
GGCCGCGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCTCAC

Expresión proquimosina

>ANglaA-**proquimosina-6xHis** (885 AA) 96013.45 Da

36475.76 Da (quimosina el corte se da en **FGE**)

MSFRSLLALSGLVCTGLANVISKRATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNP
DYFYTWTRDSGLVLKTLVDLFRNGDTSLLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDLSSGAGLGEPKFNVDETAY
TGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRNDLSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSF
FTIAVQHRALVEGSAFATAVGSSCSWCDSQAPEILCYLQSFWTGSFILANFDSSRSGKDANTLLGSIHTF
DPEAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPEDTYNGNPNWFLCTLAAAE
QLYDALYQWDKQGSLEVTDVSLDFFKALYSDAATGTYSSTYSSTYSSIVDAVKTFADGFVSIVETHAASNG
SMSEQYDKSDGEQLSARDLTWSYAALLTANNRRNSVVPASWGETSASSVPGTCAATS AIGTYSSVTVTSW
PSIVATGGTTTTATPTGSGSVTST**AEITRIPLYKGS LRKALKEHGLLEDFLQKQYGISSKYSGFGEVA**
SVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPKSSTFQNLGKPLS
IHYGTGSMQGI LGYDVTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMN
RHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGS LHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVACEGGCQAI
LDTGTSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNYGEFDIDCDNLSYMPVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCT
SGFQSENHSQKWILGDVFIREYYSVFD RANNLVGLAKAIHHHHHH

Bajo control PalcA

Fusión *NotI-PalcA*::*ANglaA*₁₋₅₁₄::*proquimosina*::*ter_cgrA_AF-XbaI* - 3665 pb

Fragmento 1 (*PalcA*): *PalcA-Fw/PalcA-Rv* - 490 pb

Fragmento 2 (*ANglaA*): *PalcA-ANglaA-Fw/ANglaA514-Rv* - 1713 pb

Fragmento 3 (*pro-qui*): *ANglaA514-Fw/ter-cgrA-Rv* - 1255 pb

Fragmento 4 (*ter_cgrA_AF*): *ter-cgrA-Fw/pFW9.3-Rv* - 307 pb

ACCTAAGACACTTTGACACGGCCCGAACACTGTAAGTCCCTTCGTATTTCTCCGCCTGTGTGGAGCTACC
ATCCAATAACCCCGAGCTGAAAAGCTGATTGTGATAGTTCCCACTTGTCCTCCGCATCGGCATCCGCAG
CTCGGGATAGTTCCGACCTAGGATTGGATGCATGCGGAACCGCACGAGGGCGGGGCGAAATTGACACAC
CACTCCTCTCCACGCACCGTTCAAGAGGTACGCGTATAGAGCCGTATAGAGCAGAGACGGGACTTTCT
GGTACTGTCCGCACGGGATGTCCGCACGGAGAGCCACAAACGAGCGGGGCCCGTACGTGCTCTCCTACC
CCAGGATCGCATCCCCGCATAGCTGAACATCTATATAAAGACCCCCAAGTTCTCAGTCTCACCAACATC
ATCAACCAACAATCAACAGTTCTCTACTCAGTTAATTAGAACTCTTCCAATCCTATCACCTCGCCTCAA
ATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCCTCGTCTGCACAGGGTTGGCAAATGTGATTTCCAAGC
GCGGACCTTGGATTCATGGTTGAGCAACGAAGCGACCGTGGCTCGTACTGCCATCCTGAATAACATCGG
GGCGGACGGTGCTTGGGTGTCGGGCGCGGACTCTGGCATTGTCGTTGCTAGTCCCAGCACGGATAACCCG
GACTgtatgtttcgagctcagatttagtatgagtgtgtcattgattgattgatgctgactggcgtgtcgt
ttgtttagACTTCTACACCTGGACTCGCGACTCTGGTCTCGTCTCAAGACCCTCGTGCATCTCTCCG
AAATGGAGATAACAGTCTCCTCTCCACCATTGAGAACTACATCTCCGCCAGGCAATTGTCCAGGGTATC

AGTAACCCCTCTGGTGATCTGTCCAGCGGCGCTGGTCTCGGTGAACCCAAGTTCAATGTCGATGAGACTG
CCTACACTGGTTCTTTGGGGACGGCCGACGAGATGGTCCGGCTCTGAGAGCAACTGCTATGATCGGCTT
CGGGCAGTGGCTGCTTgtatgttctccacccttgctctgatctgtgacatatgtagctgactggtca
gGACAATGGCTACACCAGCACCGCAACGGACATTGTTTGGCCCCCTCGTTAGGAACGACCTGTCGTATGTG
GCTCAATACTGGAACCAGACAGGATATGgtgtgtttgttttaatttaaatccaaagatgcgccagcag
agctaaccgcatcgagATCTCTGGGAAGAAGTCAATGGCTCGTCTTTCTTTACGATTGCTGTGCAAC
ACCGCGCCCTTGTGCAAGGTAGTGCTTCGCGACGGCCGTCGGCTCGTCTGCTCCTGGTGTGATTCTCA
GGCACCCGAAATTCTCTGCTACCTGCAGTCTTCTGGACCGGCAGCTTCATTCTGGCCAACCTTCGATAGC
AGCCGTTCGGCAAGGACGCAAACACCTCCTGGGAAGCATCCACACCTTTGATCCTGAGGCCGCATGCG
ACGACTCCACCTTCCAGCCCTGCTCCCCGCGCGCTCGCCAACCACAAGGAGGTTGTAGACTCTTTCCG
CTCAATCTATAACCTCAACGATGGTCTCAGTGACAGCGAGGCTGTTGCGGTGGGTCGGTACCCTGAGGAC
ACGTACTACAACGGCAACCCGTGGTTCCTGTGCACCTTGGCTGCCGACAGCAGTGTGACGATGCTCTAT
ACCAGTGGGACAAGCAGGGGTCGTTGGAGTACAGATGTGTCGCTGGACTTCTTCAAGGCACTGTACAG
CGATGCTGCTACTGGCACCTACTCTTCGTCAGTTCGACTTATAGTAGCATTGTAGATGCCGTGAAGACT
TTCGCCGATGGCTTCGTCTCTATTGTGgtaagtctacgctagacaagcgctcatgttgacagagggtgcg
tactaacagaagtagGAAACTCACGCCGAAGCAACGGCTCCATGTCCGAGCAATACGACAAGTCTGATG
GCGAGCAGCTTCCGCTCGCGACCTGACCTGGTCTTATGCTGCTCTGCTGACCGCCAACAACCGTCGTAA
CTCCGTCGTGCTTCTTGGGGCGAGACCTCTGCCAGCAGCGTCCCGGCACCTGTGCGGCCACATCT
GCCATTGGTACCTACAGCAGTGTGACTGTCACCTCGTGGCCGAGTATCGTGGCTACTGGCGGCACCACTA
CGACGGCTACCCCACTGGATCCGGCAGCGTGACCTCGACC**GCAGAAATCACCCGCATCCCCCTCTACAA**
GGCAAATCCTTAAGGAAAGCTCTCAAGGAGCACGGCTTGCTTGAGGATTTTTTGCAAAAGCAGCAGTAC
GGGATCTCTTCAAATATTCGGGCTTCGGAGAAGTCGCATCCGTACCCTGACCAACTACCTCGATAGTC
AATACTTCGGCAAGATCTATCTCGGTACTCCACCACAAGAGTTCACCTGTACTGTTTGATACCGGCAGCAG
CGACTTCTGGGTGCCGAGCATTACTGCAAATCTAATGCCTGCAAGAACCATCAGCGCTTCGATCCCAGA
AAGAGCTCTACTTTCCAGAACCTTGGAAAGCCGCTATCTATCCACTATGGTACGGGCAGTATGCAGGGTA
TCCTTGGTTATGACACCGTGACGGTCTCAAATATTGTTGATATTCAGCAAACAGTTGGACTTTCGACCCA
AGAGCCTGGTGATGTTTTACCTACGCTGAATTCGACGGGATTCGCGCATGGCCTATCCTTCCTTAGCT
TCAGAAATTTCTATTCCTGTGTTTGACAACATGATGAACCGGCATCTAGTCGCCCAAGATCTCTTTTCGG
TGTATATGGACCGGAATGGCCAGGAATCCATGCTAACCTTGGGAGCCATCGACCCGTCGTAACACAGG
TTCTCTCCATTGGGTACCGTCACTGTGCAACAGTACTGGCAGTTCACAGTGGATAGTGTACCCATCTCG
GGAGTCGTTGTTGCTTGTGAGGGCGGATGCCAGGCGATACTGGATACGGGGACTTCGAAGCTGGTGGGTC
CCAGCAGTGACATCCTCAACATCCAACAAGCTATTGGCGCGACACAGAATCAGTATGGAGAGTTTGACAT
AGACTGCGACAATTTGTCTACATGCCACGGTGGTATTTGAGATCAATGGGAAGATGTACCCTTTGACG
CCCTCCGCTACACCTCCAGGACCAGGGGTTCTGTACATCTGGATTCCAATCAGAGAACCACTCACAGA
AGTGGATTCTGGCGATGTCTTCATCCGTGAATACTATAGCGTCTTTGATCGAGCCAACAACCTGGTTGG
TCTGGCCAAAGCAATACATCACCATCATCACC**TGAACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCA**
GTGTCTGCCATGCATTAACCTTCATCTACTGTCTACCCGCAGTACCCATTCACATTTGCGGCAGATACC
AGGTTGTTTTCTATTCCTCGGTTCTTCAGTTCTTCAGATATTACATTACTCGAGAAATTGGCGGCGATG

CAGGAGTTTGGTTGGTTTAAATTGTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTCGACG
GAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCATGGCGCCGCGCGTATCACGAGGCCCTTTCG

Bajo control Pgpda

Fusión *NotI-Pgpda::ANglaA₁₋₅₁₄::proquimosina::ter_cgrA_AF-XbaI* - 4234 pb

Fragmento 1 (*Pgpda*): Pgpda1000-Fw/PgpdaMini-1000-Rv - 1124 pb

Fragmento 2 (*ANglaA*): Pgpda-ANglaA-Fw/ANglaA514-Rv -1713 pb

Fragmento 3 (*pro-quim*): ANglaA514-Fw/ter-cgrA-Rv - 1255 pb

Fragmento 4 (*ter_cgrA_AF*): ter-cgrA-Fw/pFW9.3-Rv - 307 pb

GACTTCAGCAACATCTCCTGGATAAACTTTAAGCCTAAACTATACAGAATAAGATGGTGGAGAGCTTATA
CCGAGCTCCCAAATCTGTCCAGATCATGGTTGACCGGTGCCCTGGATCTTCCCTATAGAATCATCCTTATTC
GTTGACCTAGCTGATTTCTGGAGTGACCCAGAGGGTCATGACTTGAGCCTAAAATCCGCCGCCTCCACCAT
TTGTAGAAAAATGTGACGAACTCGTGAGCTCTGTACAGTGACCGGTGACTCTTCTGGCATGCGGAGAGA
CGGACGGACGCAGAGAGAAGGGCTGAGTAATAAGCGCCACTGCGCCAGACAGCTCTGGCGGCTCTGAGGT
GCAGTGATGATTATTAATCCGGGACCGGCCGCCCTCCGCCCGAAGTGGAAGGCTGGTGTGCCCTC
GTTGACCAAGAATCTATTGCATCATCGGAGAATATGGAGCTTCATCGAATCACCGGCAGTAAGCGAAGGA
GAATGTGAAGCCAGGGGTGTATAGCCGTCGGCGAAATAGCATGCCATTAACCTAGGTACAGAAGTCCAAT
TGCTTCCGATCTGGTAAAAGATTCACGAGATAGTACCTTCTCCGAAGTAGGTAGAGCGAGTACCCGGCGC
GTAAGCTCCCTAATTTGCCCATCCGGCATCTGTAGGGCTCCAAATATCGTGCCCTCTCTGCTTTGCCCG
GTGTATGAAAACCGAAAAGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTGGCAGTCG
ACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGGCAGCTTTGCCCGTCTG
TCCGCCCGGTGTGTCGGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTG
CTCTCCCACCAGCTGCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCA
AGAACCTTTATTTCCCCTAAGTAAGTACTTTGCTACATCCATATCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTT
TGAACCTTTCAGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACAATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCTCGTCTGCACAGGGTTGGCAAATGTGATTTCC
AAGCGCGACCTTGGATTCATGGTTGAGCAACGAAGCGACCGTGGCTCGTACTGCCATCCTGAATAACA
TCGGGGCGGACGGTGCTTGGGTGTCGGGCGGACTCTGGCATTGTCGTTGCTAGTCCCAGCACGGATAA
CCCGGACTgtatgtttcgagctcagatttagtatgagtgtgtcattgattgattgatgctgactggcgtg
tcgtttgtttagtACTTCTACACCTGGACTCGGACTCTGGTCTCGTCTCAAGACCCCTCGTCGATCTCT
TCCGAAATGGAGATAACCAGTCTCCTCTCCACCATTGAGAACTACATCTCCGCCAGGCAATTGTCCAGGG
TATCAGTAACCCCTCTGGTGATCTGTCCAGCGGCGTGGTCTCGGTGAACCCAAGTTCAATGTCGATGAG
ACTGCCTACACTGGTTCTTGGGGACGGCCGAGGAGATGGTCCGGCTCTGAGAGCAACTGCTATGATCG
GCTTCGGGCAGTGGCTGCTTgtatgtttccacccttgctgtctgatctgtgacatatgtagctgactg
gtcagGACAAATGGCTACACCAGCACCGCAACGGACATTGTTTGGCCCTCGTTAGGAACGACCTGTCGTA
TGTGGCTCAATACTGGAACCAGACAGGATATGgtgtgtttgttttattttaaatttcaaagatgcgcca

gcagagctaaccgcatcgagATCTCTGGGAAGAAGTCAATGGCTCGTCTTTCTTTACGATTGCTGTG
CAACACCGCGCCCTTGTGGAAGGTAGTGCCCTCGCGACGGCCGTGGCTCGTCCTGCTCCTGGTGTGATT
CTCAGGCACCCGAAATTTCTCTGCTACCTGCAGTCCTTCTGGACCGGCAGCTTCATTCTGGCCAACTTCGA
TAGCAGCCGTTCCGGCAAGGACGCAAACACCCCTCTGGGAAGCATCCACACCTTTGATCCTGAGGCCGCA
TGCGACGACTCCACCTTCCAGCCCTGCTCCCCGCGCGCTCGCCAACCACAAGGAGGTTGTAGACTCTT
TCCGCTCAATCTATAACCTCAACGATGGTCTCAGTGACAGCGAGGCTGTTGCGGTGGGTCGGTACCCTGA
GGACACGTACTACAACGGCAACCCGTGGTTCCCTGTGCACCTTGGCTGCCGCAGAGCAGTTGTACGATGCT
CTATAACAGTGGGACAAGCAGGGGTCGTTGGAGGTCACAGATGTGTGCTGGACTTCTTCAAGGCACTGT
ACAGCGATGCTGCTACTGGCACCTACTCTTCGTCCAGTTCGACTTATAGTAGCATTGTAGATGCCGTGAA
GACTTTCGCCGATGGCTTCGTCTCTATTGTG**gtaagtctacgctagacaagcgctcatgttgacagaggg**
tgcgtaactaacagaagtagGAAACTCACGCCGAAGCAACGGCTCCATGTCCGAGCAATACGACAAGTCT
GATGGCGAGCAGCTTCCGCTCGCGACCTGACCTGGTCTTATGCTGCTCTGCTGACCGCCAACAACCGTC
GTAACTCCGTCGTGCTTCTTGGGGCAGACCTCTGCCAGCAGCGTGCCCGGCACCTGTGCGGCCAC
ATCTGCCATTGGTACCTACAGCAGTGTGACTGTACCTCGTGGCCGAGTATCGTGGCTACTGGCGGCACC
ACTACGACGGCTACCCCCACTGGATCCGGCAGCGTGACCTCGACC**GCAGAAATCACCCGCATCCCCCTCT**
ACAAGGGCAAATCCTTAAGGAAAGCTCTCAAGGAGCACGGCTTGCCTTGAGGATTTTTTGCAAAAGCAGCA
GTACGGGATCTCTTCAAATATTCGGGCTTCGGAGAAGTCGCATCCGTACCCTGACCAACTACCTCGAT
AGTCAATACTTCGCAAGATCTATCTCGGTACTCCACCACAAGAGTTCACGTACTGTTTGATAACCGGCA
GCAGCGACTTCTGGGTGCCGAGCATTACTGCAAATCTAATGCCTGCAAGAACCATCAGCGCTTCGATCC
CAGAAAAGAGCTCTACTTTCCAGAACCTTGGAAGCCGCTATCTATCCACTATGGTACGGGCAGTATGCAG
GGTATCCTTGGTTATGACACCGTGACGGTCTCAAATATTGTTGATATTCAGCAAACAGTTGGACTTTCGA
CCCAAGAGCCTGGTGATGTTTTACCTACGCTGAATTCGACGGGATTCCTCGGCATGGCCTATCCTTCTT
AGCTTCAGAAATTTCTATTCCTGTGTTTGACAACATGATGAACCGGCATCTAGTCGCCCAAGATCTCTTT
TCGGTGTATATGGACCGAATGGCCAGGAATCCATGCTAACCTTGGGAGCCATCGACCCGTCGTACTACA
CAGGTTCTCTCCATTGGGTACCGGTCAGTGTGCAACAGTACTGGCAGTTCACAGTGGATAGTGTACCAT
CTCGGGAGTCGTTGTTGCTTGTGAGGGCGGATGCCAGGCATACTGGATACGGGGACTTCGAAGCTGGTG
GGTCCAGCAGTGACATCCTCAACATCCAACAAGCTATTGGCGCGACACAGAATCAGTATGGAGAGTTTG
ACATAGACTGCGACAATTTGTCTTACATGCCACGGTGGTATTTGAGATCAATGGGAAGATGTACCCTTT
GACGCCCTCCGCTACACCTCCAGGACCAGGGGTTCTGTACATCTGGATTCCAATCAGAGAACCACTCA
CAGAAGTGGAATCTGGGCGATGCTTTCATCCGTGAATACTATAGCGTCTTTGATCGAGCCAACAACCTGG
TTGGTCTGGCCAAAGCAATA**CATCACCATCATCACCAC**TGAACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGC
TTCAGTGTCTGCCATGCATTAACCTTCATCCTACTGTCCCTACCCGCAGTACCCATTCACATTTGCGGCAGA
TACCAGGTTGTTTTCTATTCCTCGGTTCTTCAGTTCTTCAGATATTACATTACTCGAGAAATGGCGGC
GATGCAGGAGTTGGTTGGTTTTAATTTGTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTC
GACGGAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCA**T**GCGGCCGCGGTATCACGAGGCCCTTTCG

>ArgB A. nidulans Aspergillus nidulans contig 1.76 [DNA] 108656-110823

Primers (*ArgB-pl-Fw*; *ArgB-pl-Rv*)

codón de inicio y **terminación**

intrones.

AAGCTTTATTTTCGCGTTTTTTGGGGTAGTCATCTAATGAAACAGACCCGGACGCAGCAGAGGAAGCCCG
CGATGACTCTATAACCACCGTACGCCGATATATCATCATCGCGGCGATGGAGAAGTGGGGTTGACTCCGAA
GACACTTCAAAGGAGCGACGCTGTTGATTTGTAGACGACGCTTGATAGGGAGAAGCATTATTGTCGTGAT
GCTCGCCCAACAGAGGCCGACTCGCCTCATCCGTCATAACGAACGCTGTGTAAAGCGGAGTGGGGGGAA
AGTGTGGATTGTGGAGAGTATGCGATAGTGTGAGGCTGATCAGACGGCGAATCGGGCCAGATATGACCA
GTTTAGAGGCCTCATTGACTATAATTTACATAAAATAGATAAAATAGAGATGAACGCATGCAATAATTGC
AGCAAATATTGATGAAGCGAGAGGTAGGACGATGAAGACTGTGAGCAGTTCAAGGTATCAGCAGAGTCA
AGGGCCTGATGCAATGGCGGTGATCCGTGATCAGCGAACGGAAGGGGCGCTAACTCTGTTTTCTTTACAA
TGATCGGAAGCTCCTGCTGGCGGACTT**ATG**AGTCATTCACGAATCATTCTCAGTTATTTGTGGATGCC
TCGTTCTGTCCACAATTTCTTTCCGCCCCAAGTCTTTTAAGTTCTTTAACATCTATATTCTTGCCTTCC
AATGGCATCCCTTCGCTCCGTACTCAAGAGCCAGAGCTTGGCAGACACCCGTGCGATCCTACTCCTCGAA
ACCATGCCTCCCGCCTCACCTTTGCTCCCCGCCACTTCTCTCCATTGCGGACCTCTCGCCCTCCGAGT
TCGCAACCCCTGTTCGCAATGCCTCCTCACACAAACGGGCTATCAAGTCGGGTCAATGCCCAAACCTT
GCAGGGATCACTCCTTGGGAAAACGTGTGGCCATGATCTTCAGCAAACGAAGCACGAGGACAAGGGTATCT
ACAGAAGGGGGCCGTTGTGCAGATGGGA**GGTCATCCGATGTTCTTGGGCAAGGATGATATCCAAC**TAGGTG
TCAACGAGTCCCTATACGACACCTCCGTTGTCAATTCGTCATGGTATCCTGCATTGTAGCCCGTGTCCG
TAAACATGCAGAGGTCGAGATCTGGCGAAGCACTC**TTCCGGTTCCAGTCATCAATGCCTTTGTGTGACTCT**
TTCCACCCCTCCAAGCCGTGGCCGATTTCCAGACCATCTATGAAGCATTACCCCCAAGGCGACCACC
TTTCAAGTCTAGGGTTGGAAGGATTGAAGATCGCTTGGGTGGGTGACGCCAACAACGTCTGTTTCGATAT
GGCCATTGCTGCTACAAAAATGGGTGTGCACATTGCTGTGCTACTCCCAAGGGGTACGAAATCCCTCCT
CACATGCTGGAGCTCATCAAGTCTGCTGGAGAGGGTGTCTCGAAACCAGGAAAGCTTCTGCAAACCAATA
TTCCGAAGAAGCGGTCAAGGACGCCGATATTTCTGGTCACAGACACCTGGGTCTCTATGGGCCAAGAGGA
AGAGAAGGCTCAGAGGCTGAAGGAGTTTGTATGGTTTCCAAATCACTGCTGAACTCGCCAAGCGAGGAGGA
GCTAAGGAGGGCTGGAAGTTCATGCACTGTCTCCCGCAGACCCCTGAGGAGGTCAGCGACGAGGTTTTCT
ACAGCAACCGGTCACTTGTCTTCCCTGAGGCTGAGAACCGGTTATGGGCTGCGATTTCCGCCCTGGAGGG
TTTCGTTGTCAATAAGGGAAAAATTGAA**TAA**ATATAACCAGGCTTCCATTTAAATATATAGAGGCTGGCG
TTATCAAACCTGATGAGTTGACGGGTATGAGATCATTCCGTCCCTAAATATATTTACTCCGATCACGTA
AGCCTGTTAGTAGAAGCATTTTCCCAATTATCCTGACCAATTTCTTTCTAGCATATATCAAATAACTAATT
GACATGTTCTCTCGCTTCTTATATTAATCAGAGTATTGGAAATGGGGCAAATCGCACCCGGTGACTTTC
ACATGTCACGAATGCGGAGTCGTCCTAGCCAAGGTAGATCCAGGCCTAACACACCCCAACCCCTCGACTCT
CCTCATTCCATACTCTTGACCTCTATCCAGCACATTCTTCTGAGGTTTC**GCAATGGCTGTAGGTCGAC**