



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y  
MATERIALES

INGENIERÍA METABÓLICA DE *STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII* C34<sup>T</sup>, PARA  
AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,  
MENCION INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ANETT RUBIO TORRES

PROFESOR GUÍA:  
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

PROFESORA CO-GUÍA:  
BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
IRENE MARTINEZ BASTERRECHEA  
BERNARDO GONZÁLEZ OJEDA  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE  
2023

**RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**POR:** ANETT RUBIO TORRES

**FECHA:** 2023

**PROF. GUÍA:** JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

**INGENIERÍA METABÓLICA DE *STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII* C34<sup>T</sup>, PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINAS**

La resistencia antimicrobiana (ARM) de los microorganismos patógenos se incrementa año a año, generando problemas de salud en la población a nivel mundial. Para combatir la ARM se necesita de manera urgente encontrar nuevos metabolitos especializados. La cepa *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, aislada desde el desierto de Atacama, produce los compuestos chaxamicinas A–D los cuales han mostrado tener actividad antibiótica y antitumoral. Para estudiar la producción de los metabolitos especializados se ha generado un modelo metabólico a escala genómica (GSM), *VR1007*.

Por otra parte, la producción de metabolitos especializados por las cepas *wild-type* suele ser ineficiente para obtener la cantidad requerida para producir los compuestos de manera comercial. Es por esto que distintas técnicas de ingeniería metabólica se han usado para aumentar la producción de dichos compuestos, como lo es la sobreexpresión de genes clave. En el caso de las chaxamicinas, estas son producidas en baja cantidad por la cepa *wild-type*. Por estos motivos, en este trabajo, se evaluó el efecto de sobreexpresiones predichas por el GSM sobre la producción de chaxamicinas por la cepa *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. Los mutantes derivados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, que sobreexpresan los distintos genes seleccionados fueron obtenidos utilizando técnicas de clonamiento tradicionales. La cuantificación por HPLC de la producción de chaxamicinas se llevó a cabo usando un estándar interno de rifampicina y determinando las condiciones cromatográficas para obtener la separación de los picos de los compuestos de interés.

En las muestras de sobrenadante se obtuvo un incremento en la producción de chaxamicinas en ocho de los nueve mutantes generados. El mutante que sobreexpresa el gen *sle11600* fue el más efectivo en aumentar la producción, cuantificándose un aumento de 13.2 veces la producción de chaxamicina A, mientras que la producción total se incrementó 6.6 veces. El gen *sle11600* codifica para una transcetolasa asociada a reacciones del ciclo de las pentosas fosfato y además a la producción del precursor de chaxamicinas, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (AHBA). Es así como la sobreexpresión de este gen podría estar asociada a un aumento del poder reductor y a la producción de AHBA. Las muestras de extractos micelares presentaron bajas concentraciones de chaxamicinas en todas las muestras, incluido el *wild-type*. Finalmente, los incrementos en la producción detectados en los sobrenadantes se vieron reflejados en aumentos en la actividad antibiótica contra *Micrococcus luteus*. Este trabajo demuestra la efectividad de las sobreexpresiones predichas por el modelo metabólico, *VR1007*, sobre el aumento en la producción de chaxamicinas.

**SUMMARY OF THE THESIS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR IN ENGINEERING SCIENCES MENTION  
CHEMICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY**

**BY: ANETT RUBIO TORRES**

**DATE: 2023**

**SUPERVISOR: JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE**

**METABOLIC ENGINEERING OF STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII C34<sup>T</sup>, TO  
INCREASE CHAXAMYCIN PRODUCTION**

Antimicrobial resistance (ARM) against pathogenic microorganisms increases every year, leading to health issues in the world-wide population. There is an urgent need to find new specialized metabolites to fight antimicrobial resistance. *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> strain, isolated from the Atacama Desert, produces chaxamycins A-D which have shown antibiotic and antitumoral activities. A genome scale model (GSM), *NR1007*, has been created to study the production of specialized metabolites by this strain.

On the other hand, the production of specialized metabolites by wild-type strains usually does not fit commercial requirements. For this reason, different metabolic engineering techniques had been employed to increase the production of those compounds, such as overexpression of key genes. In the case of chaxamycins, they are produced in low amounts by the wild-type strain. For these motives, the effect of overexpression predicted by a GSM to increase chaxamycins production by *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, was evaluated in this work. The mutants that overexpress different selected genes were obtained using traditional cloning techniques. The quantification of chaxamycins was done by HPLC, using a rifamycin internal standard and through determination of the chromatographic conditions to obtain the separated peaks. mutants

Increased production of chaxamycins was obtained in eight out of nine of the generated mutants. The mutant overexpressing the gene *sle11600* was the most effective augmenting the production, getting a 13.2 fold increment of chaxamycin A production, while total chaxamycin production was of 6.6 fold than the wild-type. The gene *sle11600* encodes for a transketolase associated to reactions of the pentose pathway and production of the chaxamycin precursor 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA). Therefore, the overexpression of this gene could be related to an increase of reducing power and AHBA production. The mycelial extract samples showed low chaxamycin concentration, including the wild-type. Finally, the increased production detected in the supernatant was related with higher antibiotic activity against *Micrococcus luteus*. This work demonstrates the effectiveness of the overexpression predicted by the metabolic model, *NR1007*, in increasing chaxamycin production.

*A mis maravillosos padres*

*“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la investigación desinteresada e incesante de la verdad”*

*Karl Popper*

# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
Productos naturales: definición y clasificación.....	1
Policétidos y enzimas policétido sintasas .....	1
Productos naturales y su relación con el metabolismo microbiano .....	2
Importancia y aplicaciones de los productos naturales: antibióticos .....	3
¿Por qué es necesaria la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de productos naturales? .....	5
<i>Streptomyces</i> como productor de productos naturales .....	6
Ambientes extremos como estrategia para la búsqueda de nuevos productos naturales: desierto de Atacama y <i>Streptomyces</i> .....	8
<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	9
Chaxamicinas y chaxalactinas.....	9
Modelos a escala genómica de <i>Streptomyces</i> spp.....	10
Modelo a escala genómica de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	14
Descripción de la tesis .....	15
 <b>Hipótesis</b>	 <b>16</b>
 <b>Objetivos</b>	 <b>16</b>
 <b>2. Metodología</b>	 <b>17</b>
2.1 Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y procedimientos generales .....	17
2.2 Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	18
2.2.1 Estrategia general .....	18
2.2.2 Amplificación por PCR y secuenciación.....	19
2.2.3 Generación de vectores de sobreexpresión en <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.2.4 Obtención de las cepas modificadas de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	22
2.2.5 <i>Softwares</i> de análisis de resultados y generación de ilustraciones .....	23

2.3	Selección de las condiciones de cultivo para la producción y cuantificación de chaxamicinas.....	23
2.4	Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS.....	24
2.4.1	Condiciones cromatográficas e implementación.....	24
2.4.2	Preparación de muestras y <i>softwares</i> usados .....	25
2.5	Análisis y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC .....	25
2.5.1	Instrumentación.....	25
2.5.2	Soluciones de referencia y preparación de muestras.....	25
2.5.3	Desarrollo del método de cuantificación .....	26
2.5.4	Condiciones cromatográficas.....	26
2.5.5	Determinación del límite de detección y cuantificación.....	26
2.6	Análisis estadísticos .....	27
2.7	Ensayos de bioactividad contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Micrococcus luteus</i> .....	27
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>29</b>
3.1	Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	29
3.1.1	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O41020 (M1).....	31
3.1.2	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O11600 (M2).....	32
3.1.3	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O11610 (M3).....	33
3.1.4	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> OACC (M4) .....	33
3.1.5	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O16220 (M5).....	35
3.1.6	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O22940 (M6).....	35
3.1.7	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O22570 (M7).....	36
3.1.8	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> O2222 (M8).....	36
3.1.9	Obtención de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> OP1P2 (M9).....	36
3.2	Modificaciones en el crecimiento de las cepas recombinantes derivadas de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	37
3.3	Selección de las condiciones de cultivo para la producción y cuantificación de chaxamicinas.....	38
3.4	Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS.....	40
3.5	Detección y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC.....	41
3.5.1	Desarrollo de un método cromatográfico para la cuantificación relativa de chaxamicinas mediante HPLC .....	41
3.5.2	Determinación del límite de detección y límite de cuantificación .....	47
3.5.3	Cuantificación de chaxamicinas provenientes de sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes generados .....	49
3.5.4	Cuantificación de chaxamicinas provenientes de extractos micelares de cultivos de producción de los mutantes generados .....	58
3.6	Ensayos de bioactividad contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Micrococcus luteus</i> .....	62

<b>4. Discusión</b>	<b>66</b>
4.1 Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	66
4.1.1 Empleo de los promotores <i>ermE</i> * y <i>kasO</i> * como estrategia de sobreexpresión.....	67
4.2 Detección y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC.....	70
4.2.1 Rifampicina como estándar interno y desarrollo de un método de cuantificación de chaxamicinas.....	70
4.3 Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS.....	74
4.4 Evaluación y análisis de la producción de chaxamicinas en sobrenadantes de cultivo celular de los mutantes generados .....	75
4.4.1 Influencia de la sobreexpresión de los genes <i>sle11600</i> , <i>sle11610</i> y <i>sle41020</i> en el incremento del <i>pool</i> de AHBA.....	75
4.4.2 Influencia de la sobreexpresión del complejo acetil-CoA carboxilasa y el gen <i>sle16220</i> en el incremento del <i>pool</i> de malonil-CoA.....	81
4.4.3 Influencia de la sobreexpresión de los genes <i>sle22570</i> , <i>sle22940</i> y una combinación de ambos en el incremento del <i>pool</i> de (S)-metilmalonil-CoA.....	83
4.4.4 Influencia de la sobreexpresión del complejo propionil-CoA carboxilasa en el incremento del <i>pool</i> de (S)-metilmalonil-CoA.....	87
4.4.5 Otros compuestos producidos por <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y su posible relación con los mutantes generados .....	88
4.5 Posible efecto de la regulación génica en <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> sobre la producción de chaxamicinas .....	89
4.6 Ensayos de bioactividad contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Micrococcus luteus</i> .....	91
<b>5. Conclusiones</b>	<b>93</b>
<b>Bibliografía</b>	
<b>Anexo Mapa de vectores y construcciones</b>	<b>132</b>
<b>Abreviaturas y símbolos</b>	<b>154</b>

# Lista de Tablas

1	Lista de genes seleccionados para sobreexpresión, a partir de las predicciones del modelo a escala genómica de <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	18
2	Lista de cebadores utilizados para los clonamientos de los genes a sobreexpresar en sus respectivos plásmidos de expresión. ....	20
3	Lista de cebadores utilizados para los chequeos de inserción de los genes a sobreexpresar en sus respectivos plásmidos de expresión. ....	21
4	Lista de genes seleccionados para evaluar el efecto de su sobreexpresión en la producción de chaxamicinas.....	29
5	Lista de mutantes de sobreexpresión generados en este trabajo. ....	31
6	Condiciones cromatográficas seleccionadas para la separación de los picos correspondientes a chaxamicinas A-C y el estándar interno rifampicina. ....	47
7	Parámetros analíticos de la regresión lineal de las curvas de calibración de rifampicina para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación de chaxamicinas A-C .....	49
8	Parámetros analíticos de la regresión lineal de las curvas de calibración de rifampicina para la determinación de las concentraciones de chaxamicinas A-C ....	53
9	Producción de chaxamicina A (µg/ml) en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo .....	54
10	Producción de chaxamicina B (µg/ml) en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo .....	55
11	Producción de chaxamicina C (µg/ml) en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo .....	57
12	Producción total de chaxamicinas A-C (µg/ml) en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo .....	57
13	Producción total de chaxamicinas A y C (µg/ml) en extractos micelares de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo .....	62



14 Evaluación de la actividad antibacteriana de las muestras de sobrenadantes de los cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión, contra <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698.....	64
--	----

# Lista de Figuras

1	Cronología del descubrimiento de antibióticos.....	4
2	Análisis del resultado de secuenciación de Sanger del gen <i>sle22570</i> .....	30
3	Representación de las vías metabólicas que tributan a la formación de UDP-glucosa, AHBA e intermediarios de la ruta de las pentosa fosfato y glicólisis. ....	32
4	Representación de las vías metabólicas que tributan a la formación de los precursores de chaxamicinas (S)-metilmalonil-CoA y malonil-CoA .....	34
5	Modificaciones en el crecimiento de las cepas recombinantes derivadas de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	37
6	Influencia del medio de cultivo de producción de chaxamicinas empleado sobre la calidad final de las muestras luego de ser concentradas por liofilización o rotaevaporación.....	39
7	Patrones de fragmentación de las diferentes especies de chaxamicinas detectadas en la cepa recombinante <i>S. leeuwenhoekii</i> O11600, derivada de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> .....	40
8	Estructura química de chaxamicinas A-D y rifampicina. ....	41
9	Evaluación de las condiciones cromatográficas reportadas para la identificación de chaxamicinas en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> mediante HPLC-MS/MS usando el medio de cultivo ISP2m.....	42
10	Condiciones cromatográficas evaluadas para la separación de chaxamicinas A, B, C y el estándar interno rifampicina.....	43
11	Modificaciones de la fase móvil acuosa reportada para la identificación de chaxamicinas en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> mediante HPLC-MS/MS usando el medio de cultivo ISP2m (ácido fórmico 28 mM), manteniendo como fase móvil orgánica metanol-acetonitrilo (2:8).....	44
12	Espectros de absorción UV de los estándares de chaxamicinas A, B y C.....	45
13	Perfil cromatográfico de los estándares de chaxamicinas A-C y del estándar interno rifampicina .....	46
14	Gradiente de elución cóncavo seleccionado para la separación cromatográfica de chaxamicinas A-C y el estándar interno rifampicina.....	47
15	Curvas de calibración dentro del rango de detección del estándar interno rifampicina para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación.....	48

16	Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y sus derivados.....	50
17	Curvas de calibración del estándar interno rifampicina para la determinación de las concentraciones de chaxamicinas A, B y C.....	52
18	Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina A en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.....	54
19	Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina B en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.....	55
20	Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina C en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.....	56
21	Comparación de la producción total de chaxamicinas A-C en sobrenadantes de cultivos de producción de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.....	58
22	Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en extractos micelares de cultivos de producción concentrados de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> y sus derivados, usando medio R3 .....	59
23	Ensayos de bioactividad contra <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 de los sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión generados, mediante el método de difusión en agar con discos de sensibilidad antibiótica .....	63
24	Ensayos de bioactividad contra <i>Bacillus subtilis</i> EC1524 de los sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión generados, mediante el método de difusión en agar con discos de sensibilidad antibiótica .....	65
25	Rutas involucradas en la biosíntesis de chaxamicinas A-D .....	79
1A	Mapa del plásmido integrativo pIJ12551 .....	133
2A	Mapa del constructo p41020, derivado de pIJ12551 .....	134
3A	Mapa del constructo p16220, derivado de pIJ12551 .....	135
4A	Mapa del constructo pACC derivado de pIJ12551 .....	136
5A	Mapa del constructo p27500 derivado de pIJ12551 .....	137
6A	Mapa del plásmido integrativo pIJ10257 .....	138
7A	Mapa del constructo p11610, derivado de pIJ10257 .....	139
8A	Mapa del constructo p39830 derivado de pIJ10257 .....	140
9A	Mapa del plásmido integrativo pKAS1 .....	141
10A	Mapa del constructo p11600, derivado de pKAS1 .....	142
11A	Mapa del constructo p22570 derivado de pKAS1 .....	143
12A	Mapa del plásmido integrativo pKAS2 .....	144
13A	Mapa del constructo p22940 derivado de pKAS2 .....	145
14A	Secuencia de construcción del plásmido p41020 .....	146

15A	Secuencia de construcción del plásmido p16220 .....	147
16A	Secuencia de construcción del plásmido pACC.....	148
17A	Secuencia de construcción del plásmido p11610 .....	149
18A	Secuencia de construcción del plásmido p39830 .....	150
19A	Secuencia de construcción del plásmido p11600 .....	151
20A	Secuencia de construcción del plásmido p22570 .....	152
21A	Secuencia de construcción del plásmido p22940 .....	153

# 1. Introducción

## Productos naturales: definición y clasificación

Los productos naturales (NP, por sus siglas en inglés), también denominados metabolitos secundarios o especializados, ejercen funciones fisiológicas específicas y son producidos o secretados por animales, plantas y microorganismos (Bérdy, 2005; Patridge *et al.*, 2016); existen definiciones más precisas de NP, pero no siempre alcanzan un consenso. La estructura molecular de los NP varía sustancialmente, lo que se refleja en el alto porcentaje de estos metabolitos y sus derivados (30–66 %) (Pye *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2018; Thomford *et al.*, 2018).

Generalmente, se pueden clasificar atendiendo al modo en el que son sintetizados. En muchos casos, estas moléculas se sintetizan utilizando compuestos que provienen del metabolismo primario, por lo tanto, algunas de las categorías son definidas por el metabolito primario utilizado (Adamek *et al.*, 2018). De este modo, entre los metabolitos secundarios podemos encontrar: moléculas de bajo peso molecular (<500 Da), como los alcaloides, terpenos, glicósidos, compuestos aromáticos, etc.; moléculas de peso molecular algo mayor, producidas por grandes estructuras moleculares a modo de fábrica celular, donde se ubican los policétidos, productos de sintasas de ácidos grasos, péptidos no ribosomales y los híbridos de estos tres tipos de moléculas; y por último se encuentran las moléculas mucho más grandes de tipo polimérico (por ejemplo: péptidos ribosomales, polisacáridos, etc.) (Chan *et al.*, 2009; Du & Lou, 2010).

## Policétidos y enzimas policétido sintasas

Dentro de la clasificación de NP, los policétidos son uno de los más valiosos, ya que constituyen una de las familias más extensas y variadas de metabolitos secundarios y son producidos por bacterias, plantas, hongos, protistas e incluso por animales, pero no por arqueas (Cane *et al.*, 1998; Hertweck, 2009; Mahajan & Balachandran, 2012). A pesar de la gran diversidad en la estructura química de esta familia, presentan un patrón común

de biosíntesis, mediante la condensación sucesiva de unidades de acil-CoA de cadena corta, realizada por parte de las enzimas policétido sintasa (PKS, por sus siglas en inglés).

Principalmente existen tres tipos de PKS, en función de su organización y del mecanismo mediante el que se van añadiendo las unidades acil-CoA (Shen, 2003). Las PKS-I son enzimas multifuncionales que se organizan en módulos, cada uno de los cuales incluye un conjunto de dominios de acción no iterativa, responsables de un ciclo de elongación de la cadena de policétidos. Las PKS-II son complejos multienzimáticos que llevan un único conjunto de dominios iterativos. Por su parte, las PKS-III son enzimas homodiméricas que contienen dominios cetosintasa de acción iterativa (Pfeiffer and Khosla, 2001; Risdian *et al.*, 2019).

## **Productos naturales y su relación con el metabolismo microbiano**

La biosíntesis de NP ocurre como parte del metabolismo microbiano, el cual se puede dividir en dos tipos, primario y secundario. El metabolismo primario, esencialmente idéntico en todos los seres vivos, engloba todo el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas involucradas en el crecimiento, desarrollo y reproducción del microorganismo (Turner, 1973).

Por otro lado, el metabolismo secundario da lugar a los metabolitos que originalmente se definieron como compuestos no esenciales para las actividades fisiológicas normales del organismo productor, y sin una función aparente identificada. No obstante, estos metabolitos confieren ventajas adaptativas que desempeñan un papel importante en la determinación de la aptitud física de un individuo (Stone & Williams, 1992; Hodgson, 2000; Bérdy, 2005). Este metabolismo coincide con la etapa de producción de NP, aunque la biosíntesis de algunos de ellos ocurre en etapas muy tempranas de desarrollo, coincidiendo con el metabolismo primario (Hiltner *et al.*, 2015).

El metabolismo secundario se caracteriza por la presencia de vías biosintéticas divergentes y generalmente específicas de cada especie o cepa (Doroghazi & Metcalf, 2013). Los genes implicados en estas vías, suelen agruparse en grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) en el genoma (Ochi & Hosaka, 2013; Belknap *et al.*, 2020). La mayoría de los BGCs no se han detectado experimentalmente y se los denomina crípticos o silenciosos, ya que no se expresan en condiciones normales de laboratorio (Scherlach & Hertweck, 2009; Lee *et al.*, 2020).

Los BGC incluyen genes estructurales que codifican para enzimas biosintéticas, así como genes reguladores, de resistencia/transporte y de modificación post-síntesis. La

extensión de estos puede ser de unas pocas kilobases (kb), hasta más de 100 kb (Fisch, 2013; Zarins-Tutt *et al.*, 2016; Martín & Liras, 2021).

La regulación del metabolismo secundario se ha considerado tradicionalmente jerárquica. En este sentido, los niveles más altos (mediados por reguladores globales o pleiotrópicos) controlan el desarrollo y el metabolismo secundario, y los niveles más bajos regulan la producción de un metabolito secundario específico. Estos mecanismos interactúan entre sí a diferentes niveles, siendo una regulación bastante flexible y a veces difusa. Así, más que una jerarquía, deberíamos hablar de una red regulatoria muy compleja (Huang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013).

La regulación se ejerce a nivel traduccional y postraduccional, también puede estar mediada por ARNs pequeños no codificantes (Hoe *et al.*, 2013), degradación de proteínas y epigenética (Salerno *et al.*, 2009). En muchos casos existe regulación cruzada, lo que hace más complejo este fenómeno (Iqbal *et al.*, 2012).

## **Importancia y aplicaciones de los productos naturales: antibióticos**

Cerca de la mitad de todos los metabolitos microbianos conocidos exhiben algún tipo de actividad biológica, siendo esta de amplio espectro, si se considera la diversidad de sus estructuras químicas (Bérdy, 2012; Patridge *et al.*, 2016; Matsumura *et al.*, 2018).

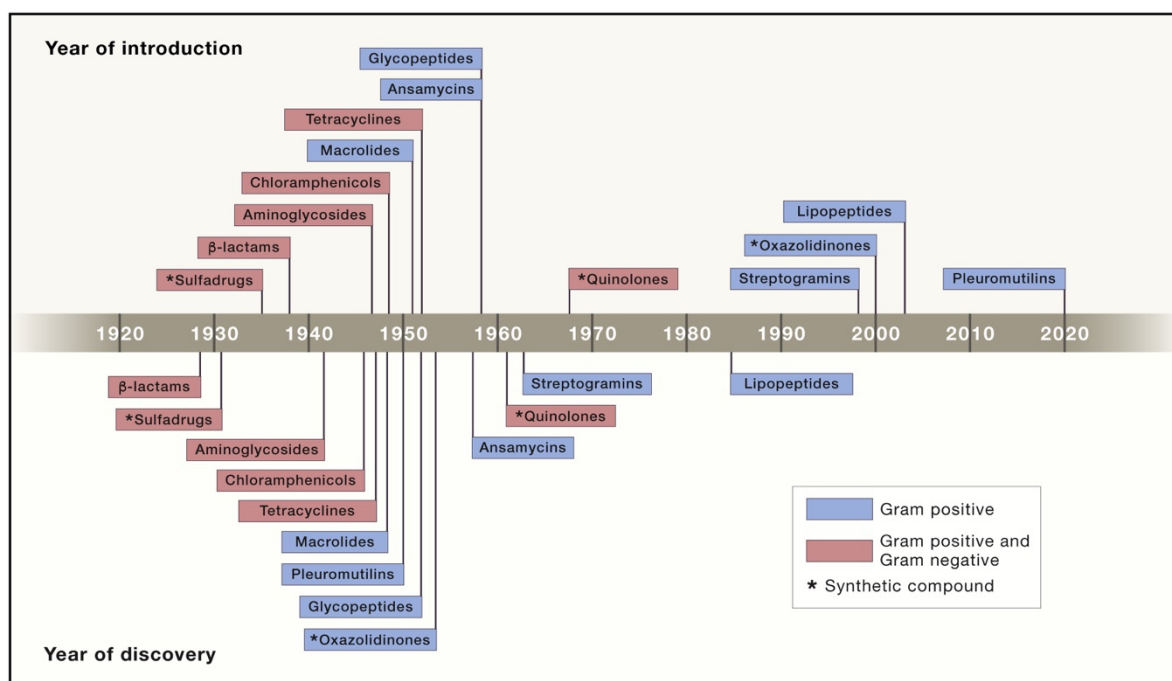
Las aplicaciones de los NP han contribuido sustancialmente al tratamiento y cura de muchas enfermedades, por ejemplo, enfermedades infecciosas, metabólicas, inmunológicas, neoplásicas, cognitivas y psiquiátricas (Gomez-Pinilla & Nguyen, 2012; Hwang *et al.*, 2014; Chang & Kim, 2019). Los NP son los recursos más importantes para desarrollar nuevos compuestos en la farmacología moderna (Mirza *et al.*, 2015; Newman & Cragg, 2016; Khalifa *et al.*, 2019); de hecho, en el período de enero de 2020 a febrero de 2022 se han reportado 18 programas clínicos derivados o relacionados con los NP (Pye *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2018; Thomford *et al.*, 2018).

Desde el año 1928, cuando Alexander Fleming descubrió la existencia de la penicilina, producida por el hongo *Penicillium notatum* (Fleming, 1945), el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias, se ha considerado uno de los mayores logros de la humanidad.

Históricamente, los NP microbianos han sido la fuente más importante de compuestos antibióticos. En los últimos 40 años, alrededor del 60 % de todas las nuevas entidades químicas en el campo de los antibacterianos se basaron o derivaron de NP (Patridge *et al.*, 2016; Newman & Cragg, 2020); sin embargo, entre los años 2000 y 2020, solo se han

introducido la daptomicina y la lefamulina como clases novedosas, como se evidencia en la Figura 1 (Rossiter *et al.*, 2017; Durand *et al.*, 2019; Hutchings *et al.*, 2019; Atanasov *et al.*, 2021).

La lefamulina, comercializada como Xenleta<sup>®</sup>, es el primer diterpenoide de la familia de las pleuromutilinas que se usa en humanos (World Health Organization, 2021). La lefamulina es eficaz contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, denominada NAC (Paukner & Riedl, 2017; Paukner *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Cronología del descubrimiento de antibióticos. Se muestra: en la parte superior, año del descubrimiento y en la parte inferior: año en que el primer miembro de la clase se introdujo en la clínica. Los antibióticos de amplio espectro se muestran en rojo. \*Indica un compuesto sintético. Ilustración tomada de (Lewis, 2020).

Hoy en día, más de la mitad de todos los antibióticos conocidos (51 %) exhiben otras bioactividades, en medicina, como citostáticos para el tratamiento del cáncer (Newman & Cragg, 2016), en la agricultura, como potentes herbicidas, insecticidas (Sparks *et al.*, 2019), promotores del crecimiento animal y en la acuicultura como compuestos anti-incrustantes (Ahmed *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014; Naveja *et al.*, 2018; Dagan-Wiener *et al.*, 2019). De igual manera, se han utilizado significativamente en otras funciones, como en la cosmética (Dunkel *et al.*, 2008; Mahesh *et al.*, 2019), y en el reciclaje de compuestos orgánicos, la biorremediación de agentes tóxicos y metales pesados (Wink *et al.*, 2017; Joginder Singh & Ajar Nath Yadav, 2020).



La demanda de NP ha ido aumentando rápidamente debido a la reciente concienciación sobre las preocupaciones ambientales y de salud, con respecto al consumo de productos sintetizados químicamente. El descubrimiento de NP con nuevas propiedades químicas abre una gama de soluciones a diversos problemas médicos, así como a la creciente necesidad de un suministro seguro de alimentos a medida que la población mundial, en constante aumento, exige una productividad agrícola eficiente y sostenible (Miethke *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022). Estos descubrimientos contribuirán a nuevos tratamientos para enfermedades conocidas y nuevas, así como al desarrollo de la biotecnología y otras ramas como la bioinformática.

## **¿Por qué es necesaria la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de productos naturales?**

Tras la era dorada de los antibióticos, los programas de *screening* para la búsqueda de compuestos antibacterianos naturales, con propiedades novedosas, decayeron. Como resultado, en la actualidad tenemos una carencia en el *pipeline* de antibióticos, lo que ha dejado indefensa a la humanidad ante el inminente desarrollo de resistencias antimicrobianas; donde los patógenos conocidos ya no responden a un fármaco al que originalmente eran sensibles (Singer *et al.*, 2020; Thakare *et al.*, 2020; Bernal *et al.*, 2022).

Dentro las últimas décadas, el uso excesivo de antibióticos a nivel global, ha impulsado la selección de bacterias patógenas causantes de graves complicaciones en los pacientes; la mayoría de estas infecciones no son tratables hoy en día. Se estima que al menos 700 000 personas en todo el mundo mueren cada año como resultado de infecciones resistentes a los medicamentos conocidos. Solo en el 2019, 1.27 millones de muertes en todo el mundo se han asociado con la resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) (Murray *et al.*, 2022), cifra que podría aumentar hasta 10 millones para el año 2050 si no se aborda este problema (O'Neill, 2016; Wellcome Trust, 2019; AMR Industry Alliance, 2020).

El número anticipado de muertes causadas por infecciones resistentes a los medicamentos en los próximos años y décadas puede compararse con la tasa de mortalidad global de la actual pandemia de SARS-CoV-2 (COVID-19) (<https://coronavirus.jhu.edu/>) que ya ha dado lugar a inversiones multimillonarias en el desarrollo de vacunas, la reutilización de fármacos existentes y el descubrimiento de antivirales (Chen *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Varios son los factores que han llevado al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, entre ellos, la prescripción frecuente de antibióticos contra infecciones de carácter no

bacteriano, como las infecciones virales; su uso no regulado; el incumplimiento por parte de los pacientes; así como al poco interés de las farmacéuticas en el descubrimiento y desarrollo de nuevas terapias en los últimos 30 años, a medida que la cadena de valor de nuevos productos antibacterianos se rompe en gran medida (Centers for Disease Control U.S, 2019; Pacios *et al.*, 2020; World Health Organization, 2021).

Otro aspecto de preocupación, quizás pasado por alto en la pandemia de COVID-19 es la gran cantidad de infecciones secundarias, a menudo asociadas con bacterias multirresistentes, que se han observado especialmente en pacientes hospitalizados y en aquellos con sistemas inmunológicos ya comprometidos (Chen *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Asociado a este problema, se encuentra el uso masivo de antibióticos como (co)tratamiento de COVID-19 en todo el mundo (Baron *et al.*, 2020; Rawson *et al.*, 2020; Sodhi & Etminan, 2020; Yates *et al.*, 2020), lo que se prevé que tribute al incremento de la AMR (Bengoechea & Bamford, 2020; Buehrle *et al.*, 2020; Huttner *et al.*, 2020).

Dado lo anterior, la AMR fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) como un problema crítico de salud pública a nivel mundial, si queremos preservar la salud humana y animal (World Health Organization, 2020). La lista de patógenos prioritarios para el desarrollo de antimicrobianos propuesta por la WHO incluye 12 bacterias, algunas de las cuales han llegado al borde de no disponer de antimicrobianos adecuados para su control (Tacconelli *et al.*, 2018). A pesar de los argumentos expuestos, si bien el problema de la AMR ya alcanzó dimensiones globales, la inevitable propagación y aparición de resistencia se encuentra solo en sus primeras fases (O'Neill, 2016; Boston Consulting Group, 2022).

## ***Streptomyces* como productor de productos naturales**

Actinobacteria es uno de los filos más grandes y diversos en su dominio (Bergey, 2012), en el que se ubica el género *Streptomyces*, formado por bacterias Gram-positivas, con un alto contenido de G+C en su ADN (Hopwood, 2006). Además, se caracterizan por un ciclo de vida complejo, durante el cual forman micelios filamentosos, hifas aéreas y esporas conidiales (Goodfellow & Williams, 1983; Chater, 1993).

Los estreptomicetos tienen capacidades metabólicas únicas, lo que les permite sobrevivir en ambientes con nutrientes limitados y también juegan un papel importante en el intercambio de carbono y nitrógeno, descomponiendo la materia orgánica. También tienen la capacidad de hidrolizar una amplia gama de polisacáridos y polímeros orgánicos que forman complejos insolubles. A la ventaja ecológica que poseen al producir una amplia batería de enzimas, se suma la capacidad de sintetizar una importante gama de metabolitos secundarios con diversas bioactividades (Chater *et al.*, 2010; Bérdy, 2012).

Entre los 23 000 metabolitos bioactivos provenientes de microorganismos, se reportan alrededor de 10 000 sintetizados por actinobacterias. Entre las actinobacterias, solamente el género *Streptomyces* aporta aproximadamente 7 600 compuestos con la capacidad de suprimir patógenos multirresistentes y con otras propiedades farmacéuticas, incluyendo a varios productos clínicos de gran relevancia, como antibióticos, medicamentos contra el cáncer y la obesidad (Balachandran *et al.*, 2016; Newman & Cragg, 2016; Girão *et al.*, 2019). Adicionalmente, el uso de cepas de *Streptomyces* para la producción de compuestos valiosos a escala industrial se ha establecido durante décadas (Chater, 2006), comenzando con el uso de *Streptomyces griseus* para producir el antibiótico estreptomina en entornos industriales (Quinn *et al.*, 2020).

Pese a lo mencionado, sigue sin estar clara la regulación de las redes metabólicas de producción de antibióticos en este género, lo que dificulta la generación de drogas finales, a partir de los metabolitos aislados (McCormick & Flärdh, 2012). En *Streptomyces*, la biosíntesis de la mayoría de estos compuestos está mediada por BGCs, incluyendo las PKSs de tipo modular y las sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPSs, por sus siglas en inglés) (Salwan & Sharma, 2020).

En contraste a lo anterior, avances en los enfoques basados en minería de genomas han demostrado que, el 90 % de los BGCs en *Streptomyces* son silenciosos o crípticos en condiciones de crecimiento de laboratorio estándar, lo que inhibe la producción de antibióticos y sugiere que se ha subestimado la capacidad de los estreptomicetos de producir metabolitos secundarios (Rebets *et al.*, 2014; Ziemert *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2018).

En cada especie de *Streptomyces*, existe un potencial genético para producir, en promedio, más de 30 metabolitos secundarios, que varían entre especies (Ōmura *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002). Cabe destacar que este género es uno de los más grandes, contando con más de 1100 especies, según la base de datos de taxonomía del LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>). Por lo tanto, decenas de miles de BGCs permanecen sin descubrir y el género *Streptomyces* aún tiene gran importancia como reservorio dominante para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios (Bentley *et al.*, 2002).

## **Ambientes extremos como estrategia para la búsqueda de nuevos productos naturales: desierto de Atacama y *Streptomyces***

A pesar del elevado número de NP encontrados hasta la fecha y utilizados clínicamente, el aumento de microorganismos multirresistentes ha provocado la disminución e incluso la ineficacia de los medicamentos derivados de los NP. Debido a esto, en el mundo científico existe una urgente necesidad de diseñar estrategias rápidas y efectivas para el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial terapéutico (Liu *et al.*, 2018).

En este sentido, una de las principales estrategias para descubrir nuevas estructuras químicas ha sido la detección de nuevos microorganismos en hábitats descuidados e inexplorados, en particular la extremobiosfera. Esta idea se basó en una hipótesis que sugería que aquellos microorganismos que viven de forma óptima en condiciones extremas (extremófilos) deberían poseer nuevas propiedades químicas y metabólicas, lo que impulsaría la biotecnología innovadora en la búsqueda de soluciones a los problemas actuales (Pidot *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015; Rateb *et al.*, 2018).

Dentro de los biomas extremos, los más investigados han sido los hipertérmicos, los de aguas profundas y los criambientes. Entre los años 2010-2018, microorganismos taxonómicamente diversos, extremofílicos y extremotolerantes, han sido la fuente de cerca de 200 nuevos metabolitos especializados (Sayed *et al.*, 2020). Desde hace algunos años los desiertos no polares, que representan alrededor del 20 % de la masa terrestre del planeta, han despertado el interés de los microbiólogos (Laity, 2009; Sivalingam *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2020), ya que una amplia variedad de estudios de bioprospección ha demostrado una importante diversidad microbiana en ellos (Kurapova *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2015; Bull *et al.*, 2018; Ouchari *et al.*, 2019).

El desierto de Atacama en el norte de Chile, designado como 'el límite seco de la vida microbiana', se ha convertido en el representante más atractivo y estudiado de los biomas extremos (Bull & Asenjo, 2013; Bull *et al.*, 2016; Bull & Goodfellow, 2019). Dentro de la vida microbiana encontrada, el *phylum* Actinobacteria ha sido el más estudiado (Okoro *et al.*, 2009, 2010; Crits-Christoph *et al.*, 2013; Busarakam *et al.*, 2016), incluyendo miembros de los géneros conocidos, así como representantes de los taxones "raros" *Amycolatopsis* (Tang *et al.*, 2016; Adamek *et al.*, 2018), *Lentzea* (Nouioui *et al.*, 2018), *Micromonospora* (Carro *et al.*, 2018, 2019), *Nonomuraea* (Nouioui *et al.*, 2018) y *Salinispora* (Jensen, 2016). Este bioma en particular ha sido fuente de nuevas especies de *Streptomyces* (Santhanam *et al.*, 2012, 2013; Busarakam *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019).

*Streptomyces* ha sido la principal fuente de compuestos microbianos bioactivos aislados de muestras de los diferentes sitios del desierto de Atacama (Rateb *et al.*, 2011a; Schulz *et al.*, 2011; Bull & Goodfellow, 2019). Hasta el 2018 se han reportado 46 NP de nuevas

especies aisladas de actinobacterias filamentosas extremofílicas y extremotolerantes provenientes de diferentes sitios del desierto de Atacama, para lo cual se han utilizado diferentes enfoques de bioprospección. Estos metabolitos secundarios abarcan diferentes clases químicas (alcaloides, péptidos, policétidos, macrólidos y terpenos) con actividades antibacterianas, antivirales y citotóxicas (Idris *et al.*, 2017; Goodfellow *et al.*, 2018; Rateb *et al.*, 2018).

### ***Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>**

*S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> fue aislado de la Laguna Chaxa, Salar de Atacama en el desierto de Atacama (Okoro *et al.*, 2009). La primera secuenciación parcial del genoma de esta cepa se llevó a cabo en 2014 (Busarakam *et al.*, 2014). Un año después, se reportó un genoma de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> de alta calidad y no fragmentado, obtenido mediante tecnologías de secuenciación masiva (Gomez-Escribano *et al.*, 2015). El análisis *in silico* posterior predijo la presencia de 35 BGCs (34 en el cromosoma lineal y uno en el plásmido extracromosómico pSLE2). Casi la mitad de estos BGCs codifican para PKS, NRPS o híbridos PKS/NRPS.

*S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> tiene un alto potencial biotecnológico, ya que se ha demostrado que 27 de los 35 BGCs predichos para esta cepa, están involucrados en la síntesis de metabolitos especializados desconocidos, por lo tanto, posibles nuevos compuestos (Gomez-Escribano *et al.*, 2015; Razmilic *et al.*, 2018). La producción de varios de estos metabolitos se confirmó a partir de análisis de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masa (HPLC-MS/MS, por sus siglas en inglés), combinada con espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), destacándose por su novedad, las chaxamicinas y chaxalactinas (Rateb *et al.*, 2011b, 2011a).

### **Chaxamicinas y chaxalactinas**

Las chaxamicinas son cuatro policétidos macrocíclicos de tipo ansamicina, identificados mediante el uso de minería genómica y el uso del gen que codifica el ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (AHBA) como objetivo de los análisis. La evidencia experimental mostró que las chaxamicinas exhibieron una potente actividad antibacteriana, incluso contra un panel de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Además, tienen un efecto antitumoral prometedor, al inhibir la actividad ATPasa intrínseca de la proteína humana de choque térmico Hsp90 (Rateb *et al.*, 2011a).

Los genes del BGC de biosíntesis de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> se estudiaron utilizando enfoques computacionales basados en el genoma y en la expresión heteróloga en *Streptomyces coelicolor* (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015). Por otro lado, la aplicación del enfoque una cepa-muchos compuestos (OSMAC, por sus siglas en inglés) a esta cepa, dio como resultado la producción de tres compuestos, las chaxalactinas, pertenecientes al grupo de policétidos de tipo macrolactonas de 22 miembros. Este tipo de estructura es bastante rara en la naturaleza, representada por muy pocos compuestos. Las chaxalactinas muestran una fuerte actividad contra cepas Gram-positivas y débil contra las Gram-negativas (Rateb *et al.*, 2011b). La ruta biosintética de las chaxalactinas se propuso bioinformáticamente en un estudio anterior (Castro, 2015).

Además de las chaxalactinas, bajo el enfoque OSMAC, *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> fue capaz de producir el sideróforo microbiano conocido, desferrioxamina E, el antibiótico aminoglucósido higromicina A (o totomicina) y su congénero 5"-dihidrohigromicina A (Rateb *et al.*, 2011b, 2011a) .

## **Modelos a escala genómica de *Streptomyces* spp.**

El modelado metabólico a escala del genoma es un enfoque matemático que permite estudiar los flujos metabólicos y los fenotipos de una célula, bajo una plétora de perturbaciones nutricionales/genéticas/regulatorias (López-Agudelo *et al.*, 2017; Tiukova *et al.*, 2019; Gutierrez *et al.*, 2020). Esta plataforma matemática, junto con la integración de datos ómicos (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.) ha demostrado ser útil para guiar los esfuerzos experimentales y dilucidar los mecanismos que afectan los fenotipos en diferentes tipos de células (Kleessen *et al.*, 2015; Greenhalgh *et al.*, 2019; Hastings *et al.*, 2019; Baloni *et al.*, 2020).

Los GSMs contienen el conocimiento bioquímico de una célula a través de la formulación de balances de masa por metabolitos y la asociación existente entre genes, proteínas/enzimas y reacciones (Bordbar *et al.*, 2014). El balance de masa en estado estacionario es la formulación matemática que permite calcular los flujos de las reacciones en distintas condiciones nutricionales. Los balances de masa se representan en una matriz estequiométrica multiplicada por un vector desconocido de velocidades de reacción (flujos de reacción), configurando un problema de programación lineal con una función objetivo basada en algunos criterios de evolución como la maximización del crecimiento o el rendimiento de producción de energía (Feist & Palsson, 2010).

Bajo esta consideración, las células *in silico* utilizan la mayoría de los nutrientes disponibles para crecer como se espera que ocurra bajo las condiciones biológicas apropiadas (Thiele & Palsson, 2010). Este enfoque es ampliamente conocido como

análisis de balance de flujos y se usa ampliamente para estudiar el metabolismo celular en muchas áreas de investigación (Gianchandani *et al.*, 2010; Orth *et al.*, 2010).

El estudio de los flujos metabólicos ha permitido determinar la comunicación existente entre el metabolismo primario y secundario a nivel de sistemas, lo que ha permitido la predicción de objetivos de ingeniería metabólica para redirigir los flujos metabólicos primarios hacia la producción de los compuestos de interés, específicamente NP, como los antibióticos (Mohite *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha expandido sustancialmente el uso de GSMs para estudiar la comunicación existente entre el metabolismo primario y secundario a nivel de sistemas, lo que ha permitido la predicción de objetivos de ingeniería metabólica para redirigir los flujos metabólicos primarios hacia la producción de los compuestos de interés, específicamente productos naturales, como los antibióticos (Mohite *et al.*, 2019). (Palazzotto *et al.*, 2019)

Los GSM son reconstruidos iterativamente, donde los modelos iniciales deben ser refinados/curados por usuarios expertos. Este proceso implica la extracción de estequiometrías de reacción y la reversibilidad de las bases de datos bioquímicas específicas del organismo, como BioCyc (Caspi *et al.*, 2016; Karp *et al.*, 2019), KEGG (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2017), BIGG (Schellenberger *et al.*, 2010; Norsigian *et al.*, 2020), y BRENDA (Barthelmes *et al.*, 2007) o el uso de herramientas, como Pathway Tools (Karp *et al.*, 2002, 2016), ModelSEED (DeJongh *et al.*, 2007), KBase (Arkin *et al.*, 2018) and Car-veMe (Machado *et al.*, 2018), que toman una secuencia o un genoma anotado para reconstruir automáticamente el modelo inicial.

Desde la creación de la primera reconstrucción metabólica a escala genómica en 1999 (Edwards & Palsson, 1999), el desarrollo y reconstrucción de GSMs se ha establecido como uno de los principales enfoques *in silico* para simular el comportamiento de un sistema biológico a nivel metabólico y así comprenderlo mejor (Mohite *et al.*, 2019; Frioux *et al.*, 2020). Se han desarrollado reconstrucciones GSM para 6239 organismos (5897 para bacterias) (Gu *et al.*, 2019), que han sido posible gracias a una mayor secuenciación de genomas completos de alta calidad y avances en las tecnologías ómicas (Wook lee *et al.*, 2012; McCloskey *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2019; Peñalver Bernabé *et al.*, 2019), redes de anotación genómica y herramientas computacionales dedicadas a estudiar las reacciones que gobiernan el metabolismo de un organismo, como *matching learning* (Kavvas *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021).

Considerando que *Streptomyces* continúa siendo una de las principales fuentes para la obtención de NP, con una amplia gama de aplicaciones, se han desarrollado varios GSM para miembros de este importante género. A partir de 2018, los GSM estaban disponibles

para ocho especies de *Streptomyces*. Algunos de estos modelos se han reconstruido repetidamente, como los de *S. coelicolor* (Borodina *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014; Amara *et al.*, 2018), *Streptomyces clavuligerus* (Medema *et al.*, 2010; Toro *et al.*, 2018; Zorro-Aranda *et al.*, 2022), *Streptomyces lividans* (D'huys *et al.*, 2012; Valverde *et al.*, 2018) y *Streptomyces tsukubaensis* (Huang *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2017b). A continuación, se comentan brevemente algunos ejemplos del uso de GSM para obtener NPs.

Además de los mencionados anteriormente, para el principal organismo modelo del género, *S. coelicolor*, se han reportado otras reconstrucciones de GSMs (Wang *et al.*, 2018; Kumelj *et al.*, 2019; Sulheim *et al.*, 2020). Estos modelos se han utilizado para identificar genes blancos de sobreexpresión y delección, que han resultado en una mayor producción de los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina (Borodina *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014). En esta especie, los GSMs han permitido la descripción de rutas biosintéticas de más de 17 metabolitos secundarios (Mohite *et al.*, 2019) y se han utilizado con frecuencia para el desarrollo de GSMs de cepas estrechamente relacionadas, como *Streptomyces roseosporus* (Huang *et al.*, 2012) y *S. clavuligerus* (Toro *et al.*, 2018).

Para *Streptomyces albus* J1074 también se desarrolló un GSM, lo que permitió la identificación de varias dianas de sobreexpresión, con el objetivo de incrementar la producción de los metabolitos especializados aulomicina, antimicina y candicidina. De las dianas predichas, tres se asociaron con la ruta de las PP, responsables de la disponibilidad del intermediario eritrosa 4-fosfato, que junto con el fosfoenolpiruvato de la ruta glucolítica es el precursor directo del primer paso de la ruta del shikimato, a través de la 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa. La mayor actividad de la ruta del shikimato beneficia la producción de los metabolitos de interés, ya que cada uno de los objetivos cuenta con corismato entre sus precursores (Kittikunapong *et al.*, 2021).

Una alternativa para la mejora de las cepas microbianas productoras de metabolitos secundarios mediante la identificación de objetivos de ingeniería metabólica, ha sido la incorporación de una herramienta de optimización de cepas basada en transcriptómica en los GSM (Bordbar *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016). En *Streptomyces ambofaciens*, tSOT se ha aplicado como un enfoque para caracterizar el panorama metabólico de esta cepa, permitiendo la identificación de posibles objetivos de ingeniería metabólica para la sobreproducción de espiramicina. La evaluación experimental de uno de estos objetivos mostró que la productividad de la espiramicina puede aumentar considerablemente al mejorar el flujo de carbono a través de la ruta metabólica de etilmalonil-CoA (Fondi *et al.*, 2017). En *S. coelicolor*, los mutantes que sobreexpresan genes blancos, identificados mediante tSOT, como la ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa y la



enzima málica dependiente de NADP mostraron aumentos de 2 y 1.8 veces en la producción de actinorrodina, respectivamente (Kim *et al.*, 2016).

Otro ejemplo de streptomycetes para el que se ha construido un GSM es *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, con el fin de mejorar la producción de rapamicina, ya que la cepa *wild-type* produce este compuesto con muy bajo rendimiento. La rapamicina es un metabolito importante, ya que tiene actividad inmunosupresora, antifúngica y antitumoral. El estudio permitió la identificación de cuatro genes blancos de delección y 13 de sobreexpresión. Debido a la inactivación y la co-expresión de dos de estos genes, el título de rapamicina aumentó un 142.3 %, en comparación con la cepa original (Dang *et al.*, 2017).

Por otro lado, el importante inmunosupresor KF506 (tacrolimus) ha sido objeto de considerables esfuerzos, destinados a optimizar la producción industrial del mismo en diferentes microorganismos (Jiang & Kobayashi, 1999; Husain & Singh, 2002; Webster *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012). El desarrollo de un GSM, simulado con un conjunto de restricciones dinámicas para la generación de biomasa, la captación de glucosa y la secreción de iones de amonio y la producción de tacrolimus, permitió la manipulación simultánea de varios objetivos de inactivación y sobreexpresión de genes. La cepa mejor diseñada produjo un 129.8 % más que la cepa de tipo salvaje (Wang *et al.*, 2017b). Otros tres estudios reportan diferentes versiones de GSM para esta cepa (Huang *et al.*, 2013a, 2013b; Wang *et al.*, 2017a).

Del mismo modo, una reconstrucción de la red metabólica, utilizando análisis de flujo metabólico *in silico* en *S. roseosporus* predijo tres objetivos potenciales de ingeniería genética para aumentar la producción de daptomicina, un antibiótico lipopeptídico cíclico ácido, con amplia aplicación en terapia clínica. El rendimiento de daptomicina aumentó un 43.2 % en la cepa modificada con respecto a la cepa parental (Huang *et al.*, 2012).

Varios GSM de especies con gran potencial productivo están pendientes de validación experimental. En *S. clavuligerus*, guiado por GSM, se llevó a cabo un diseño de cepas para identificar dianas de sobreexpresión o delección con el fin de maximizar la producción de ácido clavulánico (Toro *et al.*, 2018), que es un inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa utilizado clínicamente en combinación con antibióticos  $\beta$ -lactámicos para tratar infecciones causadas por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa (Paradkar, 2013).

Teniendo en cuenta el continuo interés en los metabolitos secundarios, así como los avances en el desarrollo de algoritmos computacionales, se espera que el uso de GSM siga aumentando en los próximos años. Este hecho podría contribuir a una situación de producción competitiva de antibióticos y otros metabolitos bioactivos.

## Modelo a escala genómica de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

Se desarrolló y validó un GSM para *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, denominado NR1007, utilizando información experimental sobre el crecimiento en diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo; mostrando una precisión del 83.7 %. El modelo se utilizó para encontrar objetivos de ingeniería metabólica no intuitivos que predijeran un aumento en la producción de precursores de metabolitos especializados.

De acuerdo con las predicciones del modelo, hay un número significativo de genes diana asociados con la producción de varios metabolitos especializados de interés. Algunos blancos muestran una relación directa con respecto a la producción de cada uno de los precursores, mientras que en otros esta relación es indirecta (Razmilic *et al.*, 2018).

A partir del GSM NR1007, se identificaron objetivos de sobreexpresión para aumentar la producción de chaxamicinas, chaxalactinas o híbridos PKS/NRPS, principalmente asociados con la biosíntesis de precursores de malonil-CoA o con la vía de las PP. Algunos de estos objetivos se centran en la sobreexpresión del complejo acetilcarboxilasa (*acc*), cuya sobreexpresión ha demostrado ser muy útil para lograr la sobreproducción de varios metabolitos especializados (Ryu *et al.*, 2006; Maharjan *et al.*, 2010, 2012).

Dentro de la batería de reacciones no directamente relacionadas con la producción de los precursores de interés, se encuentra por ejemplo, la sobreexpresión de los genes *sle41020* y *sle16220*. El gen *sle41020* aumenta la producción de uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) que puede convertirse en uno de los precursores de las chaxamicinas. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *sle16220* (que codifica para una anhidrasa carbónica), produce un alto flujo de malonil-CoA, lo que genera una mayor producción de chaxamicinas y chaxalactinas (Razmilic, 2017; Razmilic *et al.*, 2018).

Otra diana de interés es el gen *sle22940*, cuya sobreexpresión predice un aumento en los niveles de (R)-metilmalonil-CoA, un intermediario que es utilizado por el gen *sle22570* para convertirse en (S)-metilmalonil-CoA. (S)-metilmalonil-CoA es un precursor importante en la biosíntesis de chaxamicinas y chaxalactinas, por lo que ambos genes son objetivos previstos para la sobreexpresión. Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *sle11600*, *sle56380* y *sle66460* se asoció con un aumento de los intermedios de la ruta de las PP. Esto contribuye a un aumento en la producción de los metabolitos chaxamicinas e híbridos PKS/NRPS en el caso de los genes *sle11600*, *sle56380* y solo chaxalactinas en el caso de *sle66460* (Razmilic, 2017).

Además, el GSM NR1007 permitió obtener nuevos objetivos genéticos para *knockouts*, que podrían utilizarse para mejorar la biosíntesis de metabolitos especializados. Se

detectaron genes *knockouts* que predecían una mayor producción de chaxamicina A, chaxalactina A e híbridos PKS/NRPS. Se observó que la delección del gen *sle03600* produce un aumento en la disponibilidad de acetil-CoA, y en consecuencia, un flujo mejorado hacia la producción de chaxalactina A. Asimismo, el diseño de un doble mutante, *knockout* de *sle39090* y *sle03600* predice un aumento de los flujos hacia la producción de AHBA, precursor clave para la biosíntesis de la chaxamicina A (Razmilic, 2017).

## **Descripción de la tesis**

Basado en los antecedentes antes mencionados, este trabajo consistió en realizar ingeniería genética de la cepa productora de metabolitos especializados *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, aislada del desierto de Atacama, para aumentar la producción de chaxamicinas. Esto se llevó a cabo utilizando técnicas tradicionales de biología molecular, para sobreexpresar genes claves de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, predichos por un modelo metabólico. La producción de chaxamicinas fue cuantificada mediante HPLC, usando un estándar de referencia interno. Para finalizar con la evaluación de bioactividad de las cepas recombinantes generadas frente a microorganismos indicadores.

# Hipótesis

El uso de herramientas de ingeniería genética en la cepa *wild-type Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, basadas en las predicciones del modelo metabólico a escala del genoma *NR1007*, aumentará la producción de los metabolitos especializados chaxamicinas.

## Objetivos

### Objetivo general:

Realizar ingeniería metabólica en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> para aumentar la producción de chaxamicinas.

### Objetivos específicos:

1. Generar cepas recombinantes de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> que sobreexpresen genes de interés, predichos por el modelo a escala genómica *NR1007* mediante ingeniería genética.
2. Seleccionar las mejores condiciones de cultivo para la producción de chaxamicinas por los mutantes generados.
3. Desarrollar un método cromatográfico para la cuantificación relativa de chaxamicinas mediante HPLC.
4. Cuantificar la producción de chaxamicinas mediante HPLC a partir del empleo de un estándar interno.
5. Evaluar la bioactividad de los mutantes generados *versus* la cepa de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> *wild-type*.

## 2. Metodología

### 2.1 Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y procedimientos generales

El cultivo de las cepas de *Streptomyces* y *Escherichia coli* se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos estándares descritos (Kieser *et al.*, 2000) y (Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; Maniatis, 1989), respectivamente.

La cepa parental C34<sup>T</sup> de *S. leeuwenhoekii* (cepa C34<sup>T</sup> = DSM 42122<sup>T</sup> = NRRL B-24963<sup>T</sup>) fue aislada de la laguna de Chaxa en el desierto de Atacama y obtenida de una colección de cultivo del Prof. Michael Goodfellow (Universidad de Newcastle, Reino Unido) (Busarakam, 2014) a partir de una colaboración existente.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  fue usada como cepa receptora en los experimentos de sub-clonamientos (Grant *et al.*, 1990). La cepa deficiente de metilación, *E. coli* ET12567/pUZ8002 (MacNeil *et al.*, 1992) fue usada como donadora en la transferencia de los constructos generados a la cepa receptora *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, mediante conjugación intergénica. *E. coli* ET12567/pUZ8002 permite propagar ADN sin metilar y posee el plásmido pUZ8002 (Wilson, J. & Figurski, D, no publicado), el cual proporciona la maquinaria requerida para la conjugación (Kieser *et al.*, 2000).

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; Maniatis, 1989) a 200 rpm o en placas a 37 °C. Los medios se suplementaron con los antibióticos apropiados para la selección, ya fuese apramicina (50  $\mu$ g/ml) y/o higromicina (80  $\mu$ g/ml).

Las cepas de *Streptomyces* fueron cultivadas y mantenidas en medio harina de soja-manitol (SFM, por sus siglas en inglés), conteniendo 2 % agar, 2 % manitol, 2 % polvo de soja y ajustado a pH 7.2. Para generación de esporas se siguió el protocolo descrito en (Kieser *et al.*, 2000), para lo cual la cepa *wild-type* y sus derivados fueron esparcidos en placas con medio SFM, incubadas durante 4-5 días a 30 °C, recolectadas y filtradas

con Miracloth (No. US1475855, Merck, Alemania). Los *stocks* de esporas fueron preservados en glicerol 20 % a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El medio de cultivo R3 (Shima *et al.*, 1996) fue usado como caldo de producción para las cepas de *Streptomyces*. La composición del medio por litro de agua destilada es: 10 g de glucosa, 5 g de extracto de levadura, 100 mg de ácidos-casamino, 3 g de prolina, 10 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 50 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.6 g de ácido N-tris (hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES) y 1 ml de solución de elementos trazas (Kieser *et al.*, 2000) ajustado a pH 7.2 con NaOH. Todos los cultivos se realizaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a 200 rpm.

El medio de cultivo ISP2 modificado (ISP2m) también fue usado como caldo de producción para las cepas de *Streptomyces*. La composición del medio por litro de agua destilada es: 5 g de extracto de levadura, 4g de extracto de malta y 10 g de glicerol, ajustado a pH 7.2 con NaOH (Shirling & Gottlieb, 1966). Todos los cultivos se realizaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a 200 rpm.

## 2.2 Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

### 2.2.1 Estrategia general

Los objetivos genéticos para la generación de mutantes que potenciaran la producción de chaxamicinas se seleccionaron a partir de simulaciones computacionales, en base al GSM NR1007 de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> (Razmilic *et al.*, 2018). Los genes elegidos para sobreexpresión (Tabla 1) fueron amplificados y clonados corriente abajo de un promotor constitutivo fuerte, en plásmidos integrativos.

**Tabla 1:** Lista de genes seleccionados para sobreexpresión, a partir de las predicciones del modelo a escala genómica de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> (Razmilic *et al.*, 2018)

Gene(s)	Función propuesta	Reacción
<i>sle41020</i>	UTP: $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	$\text{UTP} + \text{D-Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{Difosfato} + \text{UDP-glucosa}$
<i>sle16220</i>	Carbonato hidro-liasa (formadora de dióxido de carbono)	$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

**Continuación Tabla 1:** Lista de genes seleccionados para sobreexpresión, a partir de las predicciones del modelo a escala genómica *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> (Razmilic et al., 2018)

Gene(s)	Función propuesta	Reacción
<i>sle39830</i> o <i>sle27560</i>	Proteína transportadora de carboxil-biotina: carbón-dióxido ligasa (formadora de ADP)	ATP + Holo-[carboxilasa] + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <=> ADP + ortofosfato + Proteína transportadora de carboxil-biotina
<i>sle47660</i>	Proteína transportadora de carboxil-carboxibiotina: acetil-CoA carboxitransferasa	Acetil-CoA + Proteína transportadora de carboxil-carboxibiotina <=> malonil-CoA + Holo-[carboxilasa]
<i>sle27500</i> y <i>Sle39830</i>	Propanoil-CoA: carbón-dióxido ligasa (formadora de ADP)	ATP + Propanoil-CoA + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <=> ADP + ortofosfato + (S)-metilmalonil-CoA
<i>sle11610</i>	Sedoheptulose-7-fosfato: D-gliceraldehído 3-fosfato gliceronatransferasa	Sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato <=> D-eritrosa 4-fosfato + β-D-fructosa 6-fosfato
<i>sle22570</i>	Metilmalonil-CoA epimerasa (2S)-etilmalonil-CoA epimerasa	(R)-metilmalonil-CoA <=> (S)-metilmalonil-CoA (2S)-etilmalonil-CoA <=> (2R)-etilmalonil-CoA
<i>sle22940</i>	(R)-metilmalonil-CoA CoA-carbonilmutasa	(R)-metilmalonil-CoA <=> succinil-CoA
<i>sle11600</i>	D-fructosa 6-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato glicolaldehído transferasa	D-fructosa 6-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato <=> D-eritrosa 4-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato
	β-D-fructosa 6-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato glicolaldehído transferasa	β-D-fructosa 6-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato <=> D-eritrosa 4-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato
	Sedoheptulose-7-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato glicolaldehído transferasa	Sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato <=> D-ribosa 5-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato
	Transcetolasa	Aminofructosa 6-fosfato + D-ribosa 5-fosfato <=> iminoeritrosa 4-fosfato + sedoheptulosa 7-fosfato

## 2.2.2 Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación de los genes a sobreexpresar fue realizada a partir del ADN genómico de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> mediante PCR, usando Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, EE. UU.); los dNTPs se utilizaron a una proporción de 30:70 (AT:GC). Para la purificación de los fragmentos de ADN a partir de PCR o de gel de agarosa fue empleado el GeneJET Gel Extraction *kit* (No. K0691, Thermo Scientific<sup>™</sup>, EE. UU.). Los cebadores (Tabla 2 y 3) y constructos se diseñaron con el *software* SnapGene v.4.3. La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por

IDT (Integrated DNA Technologies) y las secuenciaciones de Sanger de rutina fueron realizadas por MacroGen, Inc. (Corea del sur). El *kit* GeneJET Plasmid Miniprep (No. K0502, Thermo Fisher Scientific™, EE. UU.) fue empleado como sistema de purificación del DNA plasmidial.

**Tabla 2:** Lista de cebadores utilizados para los clonamientos de los genes a sobreexpresar en sus respectivos plásmidos de expresión.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
OV1	gaaagcatatgatcactttgtcc	Clonamiento de <i>sle11610</i> en pIJ10257 (digerido con <i>HindIII</i> y <i>NdeI</i> ) mediante T4 ligasa
OV2	tttaagcttcttcgccttctcgt	
OV3	aggcatatgatcaccagcctgctc	Clonamiento de <i>sle39830</i> en pIJ10257 (digerido con <i>HindIII</i> y <i>NdeI</i> ) mediante T4 ligasa
OV4	gggaagcttctttgtgttcctcggattcg	
OV5	tttcatatgactgattccatgctgacg	Clonamiento de <i>sle22570</i> en pKAS1 (digerido con <i>EcoRV</i> y <i>NdeI</i> )
OV6	aataagatatcaacctaccggccccttt	
OV7	gtctagaacaggaggccccaatgtccgagccggaagaact	Clonamiento de <i>sle27500</i> en pIJ12551 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV8	taatcactcgagatctcactacaggggatgttgccgt	
OV9	tagaacaggaggccccaatgcagcccctcatcgacaac	Clonamiento de <i>sle16220</i> en pIJ12551 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV10	gttaattaatcactcgagatctcatcacagagcctcgaacgcg	
OV11	tagaacaggaggccccaatgactcagtcacccccag	Clonamiento de <i>sle41020</i> en pIJ12551 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV12	gttaattaatcactcgagatctcatcaacgttcgtccatctcctcg	
OV13	gtctagaacaggaggcccagtcgcaagggtgctcat	Clonamiento de <i>sle27560</i> en pIJ12551 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV14	gctcagccactcagtccttgatctcgagat	
OV15	caaggactgagtggctgagcggctct	Clonamiento de <i>sle47660</i> en pIJ12551 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV16	attaatcactcgagatctcatcacagcgcagatcacc	
OV17	gaacaggaggccccaatgagcacgcagaccgc	Clonamiento de <i>sle11600</i> en pRA0012 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV18	taatcactcgagatctcactggcgatcggatcagcc	
OV19	gaacaggaggccccaatgaccgggtgcgacac	Clonamiento de <i>sle22940</i> en pKAS2 (digerido con <i>NdeI</i> ) mediante Gibson Assembly
OV20	taatcactcgagatctcacatcagccggtccacgct	



**Tabla 3:** Lista de cebadores utilizados para los chequeos de inserción de los genes a sobreexpresar en sus respectivos plásmidos de expresión.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
OVI1	ctgggcatcgctctccg	Confirmación de inserción de <i>sle11600</i> en pKAS1 (amplifica dentro del gen)
OVI2	atggcggctctcgttggc	
OVI3	ggtgtgaaataccgcacaga	Confirmación de inserción de <i>sle11600</i> en pKAS1 (amplifica desde el plásmido)
OVI4	caccccaggctttacacttt	
OVI5	tgcgcggtcccctgct	Confirmación de inserción de <i>sle22940</i> en pKAS2 (amplifica dentro del gen)
OVI6	gcgccgcggtgcccgaag	
GBA002	tcactctggttctccgctcat	Confirmación de inserción de los genes en los plásmidos pIJ10257 y pKAS2
GBA005	ctgaggttgaaaaacgctcact	
GBA003	cacacaggaaacagctatgaca	Confirmación de inserción de los genes en los plásmidos pIJ12551 y pKAS1
GBA004	gttttcccagtcacgacgtt	
GBA001	ccggttgtaggatcgtcta	<i>Foward</i> combinable con GBA002 y GBA003 para la confirmación de inserción de los genes en los plásmidos pIJ12551, pKAS1, pIJ10257 y pKAS2
OVI7	gagaggtgcggggaggatct	Chequeo de integración de pIJ12551, conteniendo el gen <i>sle41020</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI8	tcactcgagatctcatcaacgt	
OVI9	gactctagaggatccagcccga	Chequeo de integración de pIJ12551, conteniendo el gen <i>sle16220</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI10	ttacgaattcgatatcgcgcg	
OVI11	gatgctagtcgcggttgatcg	Chequeo de integración de pIJ12551, conteniendo el gen <i>sle27560</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI12	gttgatgcggaactcgaaggag	
OVI13	ctggtccgagatgttcc	Chequeo de integración de pIJ12551 conteniendo los genes <i>sle27560</i> y <i>sle47560</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI14	aactcgaacgccatcagca	
OVI15	gccatctgcgagatcaaggact	Chequeo de integración de pIJ12551, conteniendo el gen <i>sle47560</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI16	ttacgaattcgatatcgcgcg	
OVI17	gatgctagtcgcggttgatcg	Chequeo de integración de pIJ10257, conteniendo el gen <i>sle11610</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI18	ccaagcttcttcgcttcttcg	
OVI19	tgctgcaaggcgattaagttgg	Chequeo de integración de pIJ10257, conteniendo el gen <i>sle22570</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI20	ttcgatatcaaccctaccggcc	
OVI21	gatgctagtcgcggttgatcg	Chequeo de integración de pKAS2, conteniendo el gen <i>sle22940</i> en el genoma de <i>Streptomyces</i>
OVI22	ctccgctcatgagaaccctagg	

### 2.2.3 Generación de vectores de sobreexpresión en *Escherichia coli*

La manipulación genética de las cepas de *E. coli* empleadas se llevó a cabo siguiendo los procedimientos estándares ya descritos (Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, 1989). Los vectores de expresión pIJ10257 y pIJ12551 se usaron en este trabajo para los subclonamientos en *E. coli*, conteniendo el promotor fuerte constitutivo *ermE\** (*ermE\**<sub>p</sub>).

Los vectores pIJ10257 y pIJ12551 son de integración sitio-específica en el genoma de *Streptomyces*, en diferentes sitios *attB* con el sistema integrasa de los bacteriófagos φC31 (Rausch & Lehmann, 1991) y φBT1 (Gregory *et al.*, 2003), respectivamente. En este trabajo también se usaron para las sobreexpresiones los vectores pKAS1 y pKAS2, los cuales son derivados de los plásmidos pIJ12551 y pIJ10257, respectivamente, pero con sustitución del *ermEp\** por el promotor fuerte constitutivo *kasO\**.

La ligación de los productos purificados de PCR al plásmido de expresión correspondiente, fue realizada mediante las técnicas de Gibson Assembly o enzimas de restricción T4 DNA ligasa (No. 15224-017, Thermo Fisher Scientific™, EE. UU). Los clonamientos mediante Gibson Assembly se realizaron entre los fragmentos amplificados por PCR y el plásmido receptor linealizado con la enzima *NdeI*. Por otro lado, en los clonamientos mediante T4 ligasa se ligaron los fragmentos de PCR y el plásmido de expresión, ambos previamente digeridos con dos enzimas de restricción. Se utilizaron como templados los ADN genómicos de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados, los que fueron obtenidos usando el DNeasy® UltraClean® Microbial kit (No. 12224-50, QIAGEN, Países Bajos).

Los plásmidos con el respectivo gen de interés fueron incorporados en la cepa *E. coli* DH5α mediante transformación química. Los plásmidos fueron aislados, purificados y secuenciados para confirmar las clonaciones. Los constructos confirmados fueron traspasados a la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación química.

### 2.2.4 Obtención de las cepas modificadas de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

Los plásmidos pIJ10257, pIJ12551, pKAS1 y pKAS2, conteniendo los genes de interés, fueron movilizados desde *E. coli* ET12567/pUZ8002 a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> siguiendo el protocolo descrito por (Kieser *et al.*, 2000). Brevemente, se utilizaron 10<sup>8</sup> esporas resuspendidas en 500 μl de medio de cultivo: dos veces extracto de levadura-triptona (2x YT, por sus siglas en inglés) (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 L de agua destilada) y fueron sometidas posteriormente a un choque térmico a 50 °C durante 10 min.

Las esporas tratadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Por otra parte, *E. coli* fue cultivada en medio LB más los antibióticos de selección, a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 600nm (OD<sub>600</sub>) de 0.4. Las células de *E. coli* fueron lavadas en una serie de centrifugaciones, posterior a lo cual se mezclaron con las esporas tratadas de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. El resultado de la mezcla fue sembrado en placas de SFM suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM en el caso de los exconjugantes con selección por higromicina y MgCl<sub>2</sub> 60 mM y CaCl<sub>2</sub> 60 mM para apramicina. Una cobertera de ácido nalidíxico, más los antibióticos relevantes fue usada para eliminar las colonias de *E. coli* y seleccionar los exconjugantes transformados. Estos exconjugantes fueron plaqueados en medio sólido SFM, suplementado con ácido nalidíxico y el antibiótico de selección correspondiente en cada caso, posterior a lo cual se plaquearon nuevamente, pero sin añadir antibióticos para eliminar la presión selectiva. Los exconjugantes seleccionados fueron confirmados mediante PCR y secuenciación, a partir del DNA genómico de cada mutante generado.

### **2.2.5 Softwares de análisis de resultados y generación de ilustraciones**

El diseño de los cebadores (Tablas 2 y 3) y constructos, la anotación manual y la visualización de los plásmidos se realizaron en el *software* SnapGene v.7.0. (<https://www.snapgene.com>). Para el análisis de todos los resultados de secuenciación obtenidos en este trabajo se emplearon los *softwares* pregap4 y gap4 incluidos en el Staden package v2.0 (<https://staden.sourceforge.net>). Las figuras generadas fueron editadas con el *software* Inkscape v1.2.2 (<https://inkscape.org>).

## **2.3 Selección de las condiciones de cultivo para la producción y cuantificación de chaxamicinas**

La cepa *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados se cultivaron en caldo de cultivo R3 e ISP2m, usando matraces Erlenmeyer de 250 ml y 50 ml como volumen de trabajo. Se añadieron perlas de vidrio de 3 mm (No. 104015, Merck, Alemania) a los matraces, para mejorar la dispersión del cultivo. Los cultivos semilla se inocularon con 10<sup>8</sup> esporas e incubaron con agitación durante 48 h a 200 rpm, 30 °C. De una alícuota de 20 ml del cultivo semilla se colectó el micelio mediante centrifugación, a 13 000 × *g* durante 10 min. El micelio fue lavado 3 veces a 10 000 rpm durante 10 min, con medio de cultivo R3 fresco; a partir del cual se inocularon 500 ml de cultivo de producción a una OD<sub>600</sub> inicial de 0.2.

El paso a cultivos de producción se realizó en matraces de 2 L, se incubaron a 30 °C y se agitaron a 200 rpm durante 5 días, después de lo cual los cultivos se colectaron y centrifugaron a 13 000 × *g*, a 4 °C durante 30 min. De la centrifugación, el sobrenadante

se colectó y filtró con papel de filtro cualitativo Whatman™ grado 2 (No. 1002-125, GE Healthcare, EE. UU), seguido de un filtro de membrana de 0.22 µm como tamaño de poro (MF-Millipore®, Merck, EE. UU.); finalmente fue congelado a - 80 °C. Por otro lado, el sedimento micelar del cultivo fue extraído con metanol 100 %, en volúmenes proporcionales al peso húmedo del sedimento celular. Posteriormente fue sonificado durante 30 min y centrifugado a 13 000 × g (4 °C por 30 min). La fase líquida del producto de la centrifugación fue colectada, filtrada nuevamente con papel filtro y congelada a - 40°C.

Los sobrenadantes se liofilizaron empleando el equipo Alpha 1-2 LDPlus (Christ GmbH, Alemania). Los extractos micelares se concentraron en un rotaevaporador RE100-PRO (No. PRO1004001, DLAB Scientific, China) a un rango de temperatura de calentamiento de 40-45 °C y 90 rpm como velocidad de rotación. El concentrado por rotaevaporación fue resuspendido en 10 ml de metanol 100 %. Las muestras provenientes de ambos concentrados se utilizaron para realizar análisis HPLC.

## **2.4 Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS**

### **2.4.1 Condiciones cromatográficas e implementación**

La comparación del perfil metabólico de los diferentes mutantes generados en este trabajo se realizó mediante análisis HPLC-MS/MS. Las muestras se analizaron en un sistema con una columna Kinetex® C18 de 2.1 mm x 100 mm, con un tamaño de partícula de 1.7 µ. La separación se realizó tanto en las fracciones liofilizadas como en los extractos de micelio. Las muestras fueron analizadas en un Elute UHPLC, un cromatógrafo consistente de una bomba binaria, autosampler y horno de columna, y un compact QTOF, espectrómetro de masa (Bruker, Alemania).

Se eluyó a un flujo de 0.350 ml/min por minuto, empleando ácido fórmico 28 mM en agua como fase móvil A y ácido fórmico 28 mM en acetonitrilo como fase móvil B. El gradiente empleado se describe como los minutos de cada tramo, seguido del porcentaje de la fase móvil B alcanzado en ese tiempo: 0 min, 10 % B; 1 min, 10 % B; 15 min, 90 % B; 18 min, 90 % B; 18.2 min, 10 % B; y 21 min, B al 10 % para el equilibrio. La columna se mantuvo a una temperatura de 40 °C y se inyectaron 2 µl de muestra. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C. La detección por HPLC-MS/MS se realizó en modo de iones positivos y negativos.

## 2.4.2 Preparación de muestras y *softwares* usados

En el caso de las muestras sólidas, se agregó 1 mL de metanol 100 % frío a cada tubo con 150 mg cada uno. Las muestras fueron resuspendidas usando vortex por 10 s y 10 inversiones por muestra. Luego, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a  $12\ 000 \times g$  por 10 min. El sobrenadante fue transferido a un vial HPLC. Las muestras líquidas fueron transferidas directamente a viales HPLC.

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el *software* Metaboscape® v4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Se realizó la identificación de metabolitos con las librerías espectrales del MoNA (MassBank of North America) (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu>) y la librería interna de chaxamicinas confeccionada. La visualización de los espectros también se realizó en el *software* Bruker CompSalias DataAnalysis v4.4 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) instalado en una computadora con sistema Windows 10 de 64 bits, CPU 11th Gen Intel® Core™ i7-1164G7 a 2,80 GHz con 16 GB de RAM. Las figuras generadas fueron editadas con el *software* Inkscape v1.2.2 (<https://inkscape.org>).

## 2.5 Análisis y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC

### 2.5.1 Instrumentación

El análisis de HPLC se realizó en un sistema LC-20 A prominence, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (SPD-M20A) (Shimadzu, Japón) y una columna Onyx™ Monolithic C18, 130 Å, 100 x 4.6 mm (No. de parte CH0-7643; Phenomenex, EE. UU.).

### 2.5.2 Soluciones de referencia y preparación de muestras.

Los estándares de chaxamicina A, B y C fueron proporcionados amablemente por el Dr. Mostafa Rateb y el Prof. Marcel Jaspars (Universidad de Aberdeen, Escocia). La rifampicina fue obtenida de Sigma-Aldrich (No. 3501-1G, Merck, Alemania).

Las muestras se prepararon a partir de los sobrenadantes y extractos micelares procesados como se explica en la sección 2.3. Las muestras de sobrenadantes provenientes de los liofilizados de cultivo celular fueron preparadas en metanol 100 % a una concentración de 150 mg/ml, sonicadas, centrifugadas durante 10 min a  $11\ 000 \times g$  e inyectadas al sistema cromatográfico. Por su parte, una alícuota de la fase micelar concentrada por rotaevaporación fue cuidadosamente colectada hacia un vial de HPLC, de la cual fue inyectada directamente una muestra de 10 µl en el cromatógrafo.

Para la cuantificación de las chaxamicinas A, B y C se preparó un *stock* del estándar interno rifampicina a  $2.0E-03$  mol/L, a partir del cual se realizaron diluciones para la construcción de tres curvas de calibración, en el rango de concentraciones de trabajo empleadas,  $4.88E-07$  a  $2.50E-04$  mol/L. Previo a la inyección en el HPLC, a las muestras a analizar se les añadió individualmente una concentración conocida y fija de rifampicina,  $2.0E-05$  mol/L, a partir de lo cual se ajustaron las concentraciones reales finales de cada pico de chaxamicina detectado en las distintas muestras inyectadas.

### **2.5.3 Desarrollo del método de cuantificación**

Todos los químicos y solventes orgánicos de grado HPLC se obtuvieron de Merck (Alemania). Para obtener una buena separación de los picos de chaxamicinas y rifampicina, se evaluaron varias condiciones cromatográficas, incluyendo: gradientes, temperatura, pH, longitud de onda ( $\lambda$ ) de detección, flujos de elución y fases móviles. Se emplearon dos fases móviles, la primera acuosa y la segunda conformada por solventes orgánicos. En primer lugar, se determinó la fase orgánica a partir de variaciones en las proporciones de los solventes a usar, modificando la polaridad de los mismos. Posteriormente se seleccionó la fase acuosa, incrementando la concentración de ácido fórmico y evaluando el empleo de sales de fosfato y amonio.

### **2.5.4 Condiciones cromatográficas**

Para la cuantificación final de chaxamicinas se emplearon las fases móviles seleccionadas: ácido fórmico 28 mM (fase A) y metanol-acetonitrilo 2:8 (fase B). El flujo de las fases móviles fue fijado en 0.6 ml/min y la temperatura de la columna, sostenida a 40 °C. La detección de los compuestos de interés fue monitoreada a una  $\lambda$  de 270 nm y la identificación fue realizada por comparaciones con los tiempos de retención y el espectro UV de los estándares externos conocidos. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ l. La solución de fase A utilizada se filtró a través de un filtro de membrana de 0.22  $\mu$ m (Millipore Corporation, EE. UU.) antes del análisis por HPLC. El procesamiento de datos posterior a la ejecución se realizó en el *software* LC solución (Shimadzu, Japón). La cuantificación de la producción de chaxamicinas informada es el promedio de tres series de cultivos. Los resultados fueron expresados en  $\mu$ g/ml.

### **2.5.5 Determinación del límite de detección y cuantificación**

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon de acuerdo con las regulaciones de la ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). La ICH refiere el LOD de un procedimiento analítico individual, como la concentración más baja de un analito

en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Por otra parte, el LOQ es definido como la concentración más baja del analito en una muestra, que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas (ICH, 2005).

Soluciones del estándar interno rifampicina fueron preparadas a bajas concentraciones, para la construcción de tres curvas de calibración. Cada concentración fue inyectada una vez en el HPLC. Las curvas de calibración se graficaron a partir del ploteo de las áreas bajo la curva de la respuesta *versus* la concentración de cada solución del estándar de referencia. Finalmente, los parámetros LOD y LOQ fueron calculados mediante la desviación estándar del intercepto de las curvas de calibración:

$$\text{LOD} = 3.3 \cdot \sigma / S,$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \sigma / S,$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar de los interceptos y S es la pendiente de la curva de calibración, a baja concentración. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2.6 Análisis estadísticos

Los experimentos fueron realizados con triplicados biológicos y con tres réplicas técnicas de cada una y los resultados analizados con el *software* GraphPad Prism v9.5. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante *test* de *Student* no pareado con corrección de Welch, al no asumir varianzas iguales. El nivel de significancia estadística se estableció en un  $p < 0.05$ ; \* indicando 0.0332 (\*), 0.0021 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). Los datos se reportaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

## 2.7 Ensayos de bioactividad contra *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*

La actividad antibacteriana de los mutantes derivados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> se evaluó frente a las cepas Gram-positivas *Micrococcus luteus* ATCC 4698 y *Bacillus subtilis* EC1524, utilizando el método de difusión en agar Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). En este trabajo se modificó el medio de cultivo empleado en el método original, Mueller Hinton por el medio triptona-extracto de levadura-glucosa agar (TYG, por sus siglas en inglés) (NRRL Medium No. 1: [https://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/medium/1/nrrl\\_medium\\_1.pdf](https://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/medium/1/nrrl_medium_1.pdf)). La composición del medio TYG por litro de agua destilada es: 5 g de

triptona, 5 g de extracto de levadura, 1 g de  $K_2HPO_4$ , 1 g de glucosa, y 15 g de agar ajustado a pH 7.0 con ácido fosfórico. Todos los cultivos se realizaron a 30 °C y a 200 rpm.

Las muestras evaluadas provenían del concentrado de los sobrenadantes de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y de cada una de las cepas derivadas de esta, y fueron preparadas a una concentración final de 150 mg/ml, empleando metanol 100 %. Suspensiones de cultivos líquidos de los microorganismos indicadores se sembraron en placas de Petri, con medio de cultivo LB-Agar, a una  $OD_{625nm}$  en el rango de 0.08-0.13, equivalente al estándar de turbidez de 0.5 McFarland. El inóculo fue distribuido uniformemente sobre toda la superficie de la placa de Petri, frotando en tres direcciones. Posteriormente, se colocaron discos de susceptibilidad antibiótica OXOID (No. 3315595, Thermo Fisher<sup>TM</sup>, Países Bajos), previamente temperados a temperatura ambiente y conteniendo 10ul de cada una de las muestras a evaluar, rifampicina a una concentración de 5.0E-5 mol/L como control positivo y metanol 100 % como control negativo. Las placas de Petri se invirtieron e incubaron durante 18 h. Finalmente, los diámetros de las zonas de inhibición se midieron al milímetro más cercano con pie de metro.



## 3. Resultados

### 3.1 Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

En este trabajo se seleccionaron para sobreexpresión diez genes endógenos de la cepa *wild-type* de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. A partir del GMS *NR007*, ocho de estos genes fueron predichos *in silico* como dianas de interés para el incremento de la producción de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>.

El clonamiento de los genes se llevó a cabo mediante las técnicas de Gibson Assembly y enzimas de restricción-T4 ligasa. Los constructos obtenidos fueron movilizados a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, resultando en la integración de estos en los sitios cromosómicos  $\phi$ BT1 *attB* para el plásmido pIJ12551 y  $\phi$ C31 *attB*, para pIJ10257. La Tabla 4 resume el promotor fuerte constitutivo, el respectivo plásmido integrativo y la técnica de clonamiento empleada para la inserción de cada uno de los genes seleccionados.

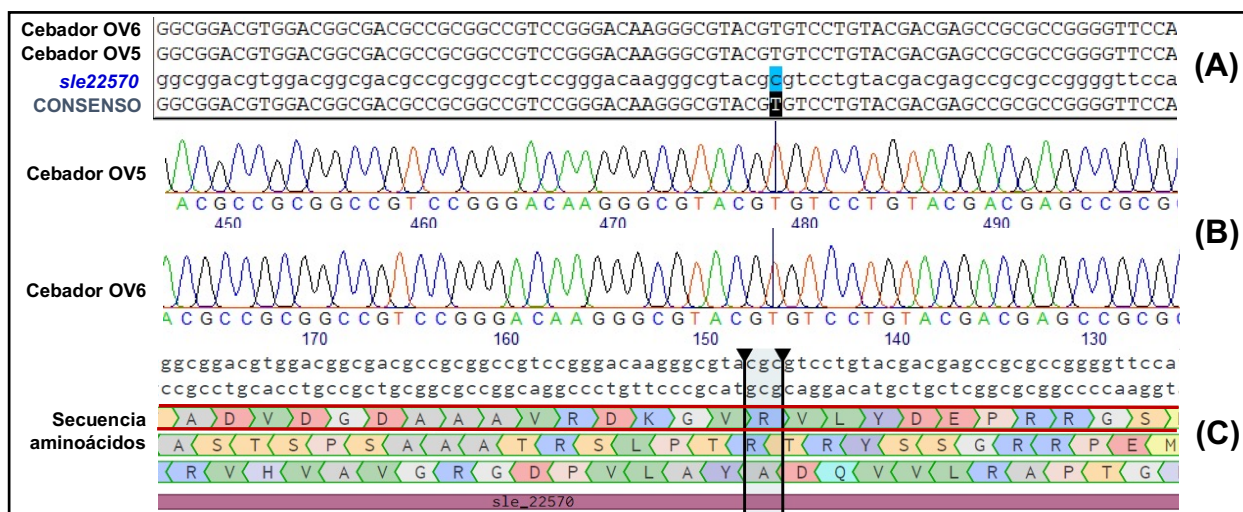
**Tabla 4:** Lista de genes seleccionados para evaluar el efecto de su sobreexpresión en la producción de chaxamicinas.

<b>Gen</b>	<b>Plásmido</b>	<b>Promotor</b>	<b>Técnica usada</b>	<b>Vector generado</b>
<i>sle41020</i>	pIJ12551	<i>ermE</i> *	Gibson Assembly	p41020
<i>sle16220</i>	pIJ12551	<i>ermE</i> *	Gibson Assembly	p16220
<i>sle47660</i> <i>sle27560</i>	pIJ12551	<i>ermE</i> *	Gibson Assembly	pACC
<i>sle39830</i> <i>sle27500</i>	pIJ10257 pIJ12551	<i>ermE</i> *	Gibson Assembly Enzimas de restricción	pP1P2
<i>sle11610</i>	pIJ10257	<i>ermE</i> *	Enzimas de restricción	p11610
<i>sle22570</i>	pKAS1	<i>kasO</i> *	Enzimas de restricción	p22570
<i>sle11600</i>	pKAS1	<i>kasO</i> *	Gibson Assembly	p11600

**Continuación Tabla 4:** Lista de genes seleccionados para evaluar el efecto de su sobreexpresión en la producción de chaxamicinas.

Gen	Plásmido	Promotor	Técnica usada	Vector generado
<i>sle22940</i>	<i>pKAS2</i>	<i>kasO*</i>	Gibson Assembly	p22940
<i>sle22570</i>	<i>pKAS1</i>		Enzimas de restricción	p2222
<i>sle22940</i>	<i>pKAS2</i>	<i>ermE*</i>	Gibson Assembly	p2222

Cada uno de los mutantes de sobreexpresión, resultantes de estos clonamientos, fueron confirmados por secuenciación, usando el DNA genómico de los mismos. Para dicha confirmación se emplearon diferentes pares de cebadores, indicados en la sección 2.2.2 de materiales y métodos. La figura 2 muestra el resultado del análisis de secuenciación del DNA genómico del mutante *Streptomyces leeuwenhoekii* O22570.



**Figura 2:** Análisis del resultado de secuenciación de Sanger del gen *sle22570*. La muestra proviene del DNA genómico extraído del mutante *S. leeuwenhoekii* O22570 y se analizó con los softwares pregap y gap4. Se visualiza: A, secuencia nucleotídica obtenida para el cebador *forward* OV5 y el *reverse* OV6, secuencia nucleotídica del gen *sle22570* y secuencia consenso de las anteriores; B, calidad de la secuenciación reportada para el gen *sle22570* para ambos cebadores y C, secuencia de aminoácidos del gen *sle22570*, señalando el marco abierto de lectura.

En la secuencia del gen *sle22570*, clonado en este mutante, se observó un cambio en una de las bases nitrogenadas del DNA, específicamente de cisteína a timina, lo cual modificó el triplete de nucleótidos CGC que codifica para el aminoácido arginina (R). El cambio de base mencionado resultó ser una mutación silente al no generar un cambio de aminoácido. Al realizar el mismo análisis para el resto de los mutantes generados en este trabajo se obtuvo que todos los genes se encontraban íntegramente clonados en el vector de expresión correspondiente e insertos en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. La

Tabla 5 describe cada uno de los mutantes obtenidos en el presente estudio, seguido de lo cual se detalla el proceso de obtención de cada una de ellas.

**Tabla 5:** Lista de mutantes de sobreexpresión generados en este trabajo.

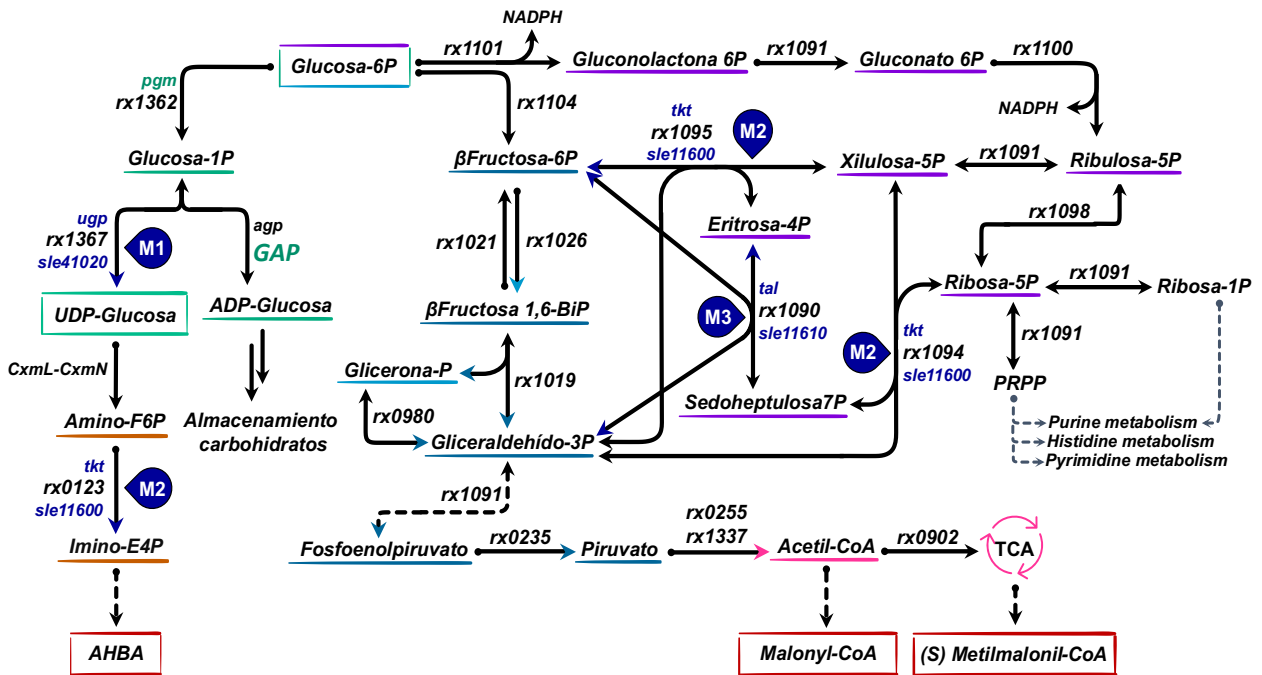
<b>Mutantes</b>	<b>Descripción</b>
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p22570 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle22570</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p22940 en $\phi$ C31 <i>attB</i> ( <i>sle22940</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p22570 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle22570</i> ) y p22940 en $\phi$ C31 <i>attB</i> ( <i>sle22940</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p41020 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle41020</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p11600 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle11600</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p11610 en $\phi$ C31 <i>attB</i> ( <i>sle11610</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p16220 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle16220</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2*	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando p27500 en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle27500</i> ) y p39830 in $\phi$ C31 <i>attB</i> ( <i>sle39830</i> )
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup> portando pACC en $\phi$ BT1 <i>attB</i> ( <i>sle27560</i> y <i>sle47660</i> )

\*Mutante facilitado por Martín Bonilla para ser incluida en el presente estudio.

### 3.1.1 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O41020 (M1)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O41020 contiene el gen *sle41020* clonado bajo el promotor *ermE*\* integrado en el sitio de inserción  $\phi$ BT1. El gen *sle41020* codifica para la enzima UTP:  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, asociada a la formación de difosfato y UDP-glucosa, a partir de UTP y D-glucosa 1-fosfato (rx1367; N° de reacción en KEGG: r00289). Esta reacción es parte del metabolismo de la galactosa, del metabolismo del almidón y la sacarosa, así como de la biosíntesis de metabolitos especializados. Específicamente, en la ruta de metabolitos especializados, el compuesto UDP-glucosa es utilizado para la producción de AHBA mediante una serie de reacciones secuenciales. El compuesto AHBA es uno de los precursores de la biosíntesis de chaxamicinas (Figura 3).

El mutante *S. leeuwenhoekii* O41020 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p41020. El plásmido p41020, fue generado por clonación mediante Gibson Assembly en el vector integrativo pIJ12551 bajo el promotor constitutivo fuerte *ermE*\*.



**Figura 3.** Representación de las vías metabólicas que tributan a la formación de UDP-glucosa, AHBA e intermediarios de la ruta de las pentosas fosfato y glicólisis. Los colores destacan las reacciones involucradas en cada ruta: celeste, glicólisis; rosa, ciclo del ácido tricarbóxico; verde, metabolismo de nucleótidos y naranja, ruta de biosíntesis de AHBA. En rojo se destacan los precursores de biosíntesis de chaxamicinas. Los genes destacados en azul indican los blancos de sobreexpresión involucrados en estas vías, los que corresponden a los mutantes: M1, *S. leeuwenhoekii* O41020; M2, *S. leeuwenhoekii* O11600 y M3, *S. leeuwenhoekii* O11610. Las flechas en color destacan las reacciones que muestran un flujo incrementado tras las simulaciones en el modelo a escala genómica de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *VR1007*. Abreviaturas: *tkt*, transcetolasa; *tal*, transaldolasa; *pgm*, fosfoglucomutasa y *agp*, ADP-glucosa pirofosforilasa.

### 3.1.2 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O11600 (M2)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O11600 contiene el gen *sle11600* clonado bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO\** integrado en su genoma. Este gen codifica para la enzima sedoheptulosa 7-fosfato: D-gliceraldehído 3-fosfato glicolaldehído transferasa, asociada a la biosíntesis del precursor AHBA, específicamente a la conversión de aminofructosa 6-fosfato (amino-F6P) y D-ribosa 5-fosfato a iminoeritrosa 4-fosfato (imino-E4P) y sedoheptulosa 7-fosfato (rx0123; N° de reacción en KEGG: r06590) (Fig. 3) y a varias reacciones pertenecientes a la ruta de las PP: conversión de D-fructosa 6-fosfato a D-gliceraldehído 3-fosfato y de D-eritrosa 4-fosfato a D-xilulosa 5-fosfato (rx1093; N° de reacción en KEGG: r01067); conversión de sedoheptulosa 7-fosfato y D-gliceraldehído 3-fosfato a D-ribosa5-fosfato y D-xilulosa 5-fosfato (rx1094; N° de reacción en KEGG: r01641); y la transformación de D-eritrosa 4-fosfato en D-xilulosa 5-fosfato y de

$\beta$ -D-fructosa 6-fosfato en D-gliceraldehído 3-fosfato (rx1095; N° de reacción en KEGG: r01830) (Figura 3).

De las mencionadas anteriormente, las reacciones rx0123 y rx1095 se encontraron como objetivos de interés para la sobreproducción de chaxamicinas (Razmilic *et al.*, 2018). Mientras que la reacción rx0123 está directamente relacionada a la biosíntesis de chaxamicinas al ser parte de la ruta de producción de AHBA, la reacción rx1095 está indirectamente relacionada.

El mutante *S. leeuwenhoekii* O11600 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p11600. El plásmido, p11600, fue generado por clonación mediante Gibson Assembly en el vector integrativo pKAS1 bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO*<sup>\*</sup>.

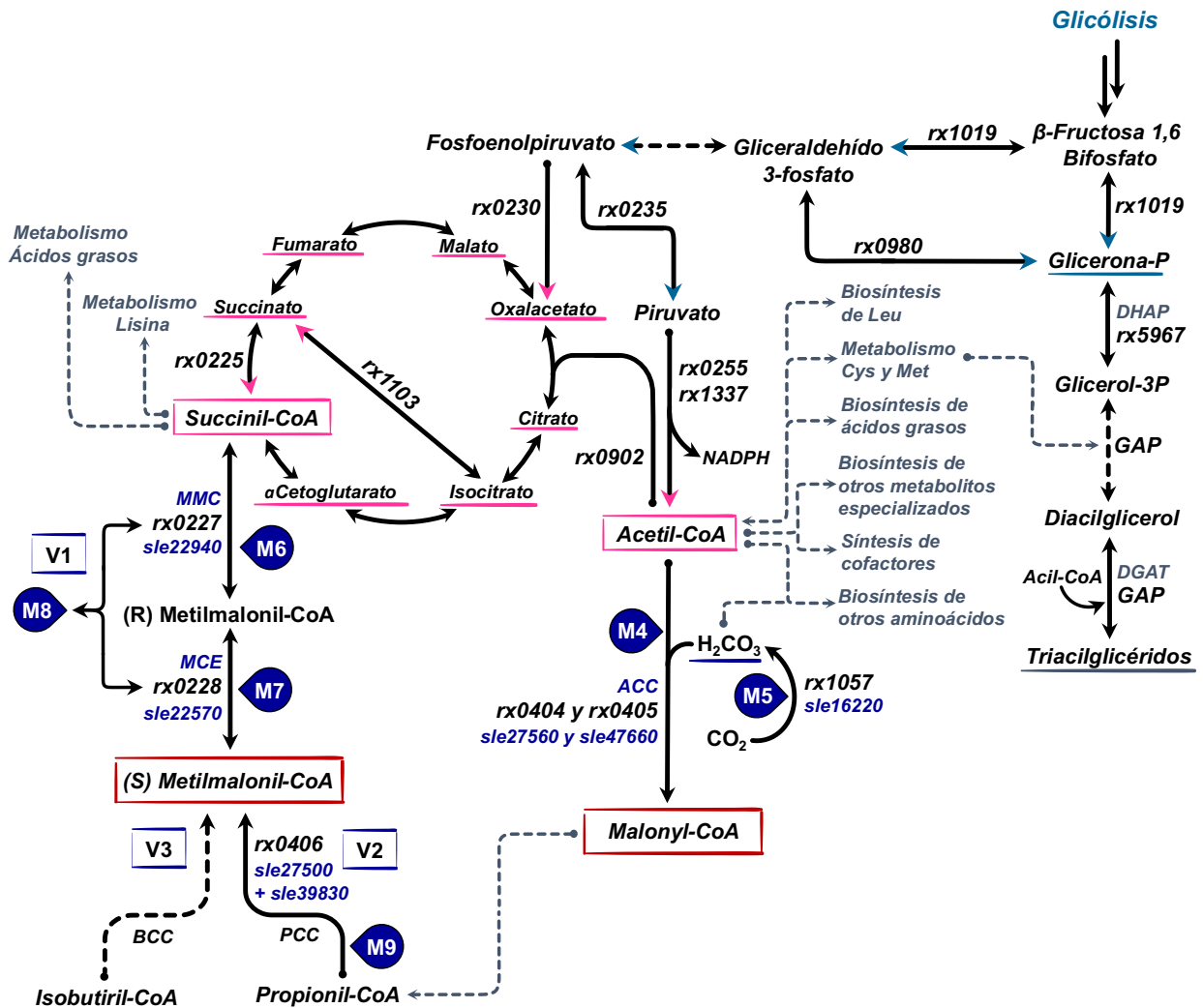
### 3.1.3 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O11610 (M3)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O11610 contiene el gen *sle11610* clonado bajo el promotor constitutivo fuerte *ermE*<sup>\*</sup> integrado en su genoma. Este gen codifica para la enzima sedoheptulose-7-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato glicerontransferasa y cataliza la conversión de sedoheptulosa 7-fosfato y D-gliceraldehído 3-fosfato a D-eritrosa 4-fosfato y  $\beta$ -D-fructosa 6-fosfato (rx1090; N° de reacción en KEGG: r01827) (Figura 3). Esta reacción es parte del ciclo de las PP, y al igual que los otros casos, fue predicho por el GSM *NR1007* como diana de sobreexpresión.

El mutante *S. leeuwenhoekii* O11610 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p11610. El plásmido p11610 fue generado por clonación con enzimas de restricción en el vector integrativo pIJ10257 bajo el promotor fuerte constitutivo *ermE*<sup>\*</sup>.

### 3.1.4 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* OACC (M4)

El mutante *S. leeuwenhoekii* OACC contiene los genes *sle27560* y *sle47660* clonados secuencialmente, bajo el promotor constitutivo fuerte *ermE*<sup>\*</sup>, integrado en el sitio de inserción  $\phi$ BT1 en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. El gen *sle27560* codifica para la proteína transportadora de carboxil-biotina: carbón-dióxido ligasa (formadora de ADP) (rx0404; N° de reacción en KEGG: r04385), mientras que el gen *sle47660* codifica para la proteína transportadora de carboxil-carboxibiotina: acetil-CoA carboxitransferasa (rx0405; N° de reacción en KEGG: r04386) (Figura 4).



**Figura 4:** Representación de las vías metabólicas que tributan a la formación de los precursores de chaxamicinas (S)-metilmalonil-CoA y malonil-CoA. Los colores destacan las reacciones involucradas en cada ruta: celeste, glicólisis y rosa, ciclo del ácido tricarboxílico. En rojo se destacan los precursores finales. Los genes destacados en azul indican los blancos de sobreexpresión involucrados en estas vías, los que corresponden a los mutantes: M4, *S. leeuwenhoekii* OACC; M5, *S. leeuwenhoekii* O16220; M6, *S. leeuwenhoekii* O22940; M7, *S. leeuwenhoekii* O22570; M8, *S. leeuwenhoekii* O2222 y M9, *S. leeuwenhoekii* OP1P1. V1, V2 y V3: Rutas de síntesis del precursor (S)-metilmalonil-CoA descritas en *Streptomyces*. Abreviaturas: ACC, acetil-CoA carboxilasa; PCC, propionil-CoA carboxilasa; BCC, buritil-CoA carboxilasa; MMC, metilmalonil-CoA mutasa; MCE, metilmalonil-CoA epimerasa; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; DHAP, dihidroxiacetona fosfato. GAP: reacciones incorporadas como GAP en el modelo a escala genómica *NR1007*.

Los genes clonados en este mutante conforman las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo enzimático de la ACC, la cual cataliza la transformación de acetil-CoA en malonil-CoA, uno de los precursores de la biosíntesis de chaxamicinas, por lo cual fueron predichos y seleccionados como blancos de sobreexpresión.

El mutante *S. leeuwenhoekii* OACC se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 pACC. El plásmido pACC, fue generado por la ligación secuencial con Gibson Assembly de ambos genes en el vector integrativo pIJ12551.

### 3.1.5 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O16220 (M5)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O16220 contiene el gen *sle16220* clonado bajo el promotor fuerte constitutivo *ermE*\* integrado en el sitio de inserción  $\phi$ BT1. El gen *sle16220* codifica para una carbonato hidrógeno-liasa asociada a la conversión de CO<sub>2</sub> a bicarbonato y agua (rx1057; N° de reacción en KEGG: r10092) (Figura 4). Esta reacción es parte del metabolismo del nitrógeno. El bicarbonato es necesario para la reacción de generación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. El malonil-CoA es un precursor de la biosíntesis de las chaxamicinas, es por este motivo que esta reacción es un objetivo de sobreproducción interesante.

El mutante *S. leeuwenhoekii* O16220 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p16220. El plásmido p16220 fue generado por clonación mediante Gibson Assembly en el vector integrativo pIJ12551 bajo el promotor constitutivo fuerte *ermE*\*.

### 3.1.6 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O22940 (M6)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O22940 contiene el gen *sle22940* clonado bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO*\* integrado en su genoma. El gen *sle22940* codifica para la enzima (R)-metilmalonil-CoA CoA-carbonilmutasa asociada a la conversión reversible de (R)-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (rx0227; N° de reacción en KEGG: r00833) (Figura 4). Esta reacción también es parte de la ruta del metabolismo del carbono y es importante para la biosíntesis de chaxamicinas, ya que el (R)-metilmalonil-CoA puede usarse para la obtención de (S)-metilmalonil-CoA, precursor necesario para la biosíntesis de chaxamicinas.

El mutante *S. leeuwenhoekii* O22940 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p22940. El plásmido p22940, fue generado por clonación mediante Gibson Assembly en el vector integrativo pKAS2 bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO*\*.

### 3.1.7 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O22570 (M7)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O22570 contiene el gen *sle22570* clonado bajo el promotor fuerte constitutivo *kasO\** integrado en su genoma. Este gen codifica para la enzima metilmalonil-CoA/etilmalonil-CoA epimerasa y está asociado a la conversión de (R)-metilmalonil-CoA a (S)-metilmalonil-CoA (rx0228; N° de reacción en KEGG: r02765) (Figura 4) y la conversión de (2S)-etilmalonil-CoA a (2R)-etilmalonil-CoA (rx0229; N° de reacción en KEGG: r09979).

Las dos reacciones involucradas son parte de la ruta del metabolismo del carbono, específicamente en la conversión desde metilmalonil-CoA a succinil-CoA. En el caso de la biosíntesis de chaxamicinas, el compuesto (S)-metilmalonil-CoA es un precursor en su biosíntesis, por lo que la sobreexpresión de este gen fue hecha con el objetivo de aumentar la presencia de dicho compuesto.

El mutante *S. leeuwenhoekii* O22570 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p22570. Este último plásmido, p22570, fue generado por clonación con enzimas de restricción en el vector integrativo pKAS1 bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO\**.

### 3.1.8 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* O2222 (M8)

El mutante *S. leeuwenhoekii* O2222 contiene los genes *sle22570* y *sle22940* clonados en los sitios de integración  $\phi$ BT1 y  $\phi$ C31, respectivamente, bajo el promotor constitutivo fuerte *kasO\**. Se obtuvo mediante la conjugación de los vectores p22570 y p22940 en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> (Figura 4).

La expresión conjunta de estos genes fue realizada para que la mayor producción del intermediario (R)-metilmalonil-CoA pudiese ser utilizada en el incremento del precursor (S)-metilmalonil-CoA. Se esperaba que el incremento de la disponibilidad de (S)-metilmalonil-CoA tributase a un incremento del título de chaxamicinas en el mutante obtenido.

### 3.1.9 Obtención de *Streptomyces leeuwenhoekii* OP1P2 (M9)

El mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2 contiene el gen de interés *sle27500* clonado en el sitio de inserción cromosómica  $\phi$ BT1 y el gen *sle39830* inserto en el sitio  $\phi$ C31, ambos bajo el promotor *ermE\**. Ambos genes, *sle27500* y *sle39830*, son necesarios para producción de la enzima propanoil-CoA: carbón-dióxido ligasa, que cataliza la conversión de propanoil-CoA y bicarbonato a ortofosfato y (S)-metilmalonil-CoA utilizando ATP en el

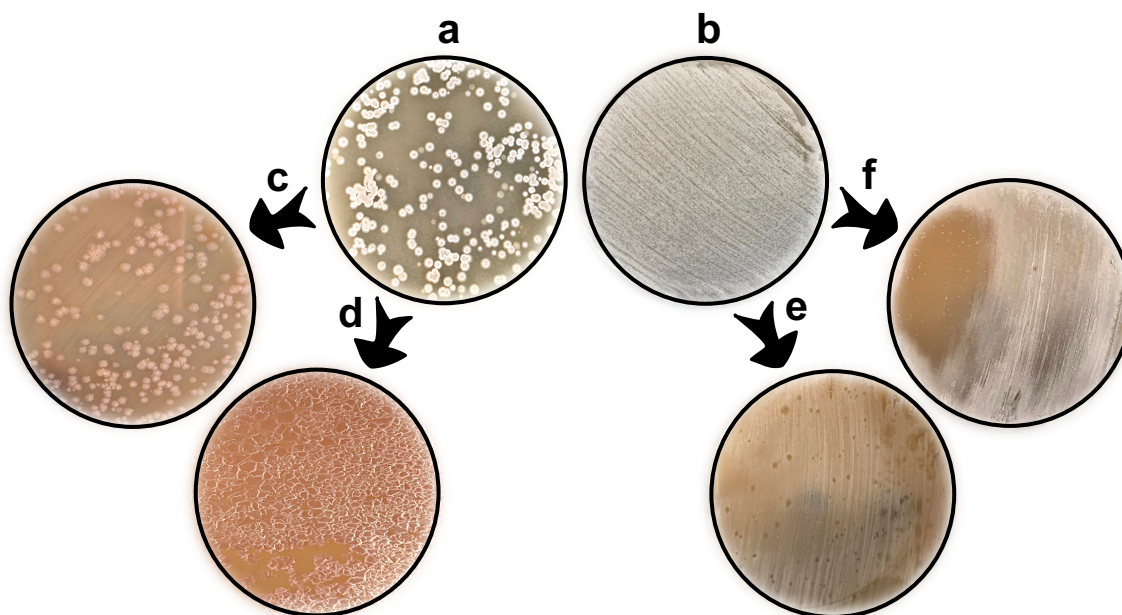


proceso (rx0406; N° de reacción en KEGG: r01859) (Figura 4). Esta es una reacción alternativa a la r02765, que permite obtener el precursor (S)-metilmalonil-CoA, necesario para la biosíntesis de chaxamicinas.

El mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2 se obtuvo mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p27500 y subsecuentemente con la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 p39830. El plásmido p27500, fue generado por clonación con enzimas de restricción del gen *sle27500* en el vector integrativo pIJ12551. Por otro lado, el plásmido p39830 fue obtenido por ligación con Gibson Assembly del gen *sle39830* en el vector integrativo pIJ10257 (Bonilla, 2021).

### 3.2 Modificaciones en el crecimiento de las cepas recombinantes derivadas de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

Durante el crecimiento en placas de Petri con medio sólido SFM, se observaron modificaciones en el crecimiento de algunos de los mutantes generados, con respecto a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> *wild-type* (Figura 5a y 5b). Cambios morfológicos y de coloración de las colonias se evidenciaron en los mutantes *S. leeuwenhoekii* O11600 (Figura 5c) y *S. leeuwenhoekii* O11610 (Figura 5d), lo que creemos corresponde a la generación de mutantes espontáneos.



**Figura 5:** Modificaciones en el crecimiento de las cepas recombinantes derivadas de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. Placa representativa del cultivo en medio sólido SFM del *wild-type* con menor (a) y mayor crecimiento (b), así como de los mutantes *S. leeuwenhoekii* O11600 (c); *S. leeuwenhoekii* O11610 (d); *S. leeuwenhoekii* O22940 (e) y *S. leeuwenhoekii* O22570 (f).

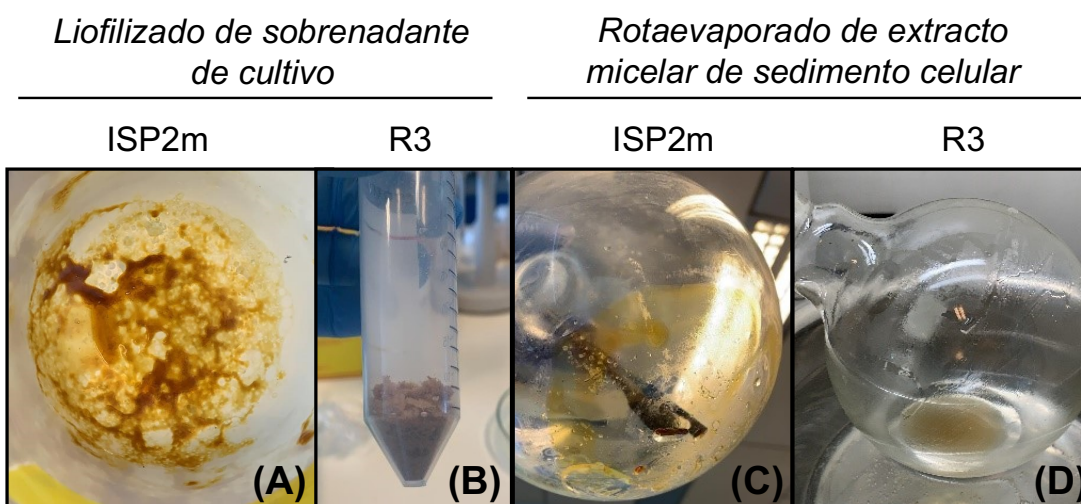
De la misma manera, en el mutante *S. leeuwenhoekii* O22940 se evidenció la presencia de pequeñas zonas de inhibición del crecimiento, con respecto al *wild-type*. La infección por bacteriófagos de las células bacterianas podría ser una explicación a este fenómeno, ya que son capaces de replicarse dentro de ellas y destruirlas, generando espacios ausentes de crecimiento (Figura 5e).

Otro mutante, *S. leeuwenhoekii* O22570, mostró zonas más grandes y puntuales de inhibición del crecimiento, nos resulta difícil suponer una causa real de este fenómeno, pero evidentemente una parte importante de las células del mutante han generado una resistencia a la selección por antibiótico empleada (Figura 5f). Dado lo anterior fue necesario realizar varios ciclos de aislamiento de colonias hasta recuperar el fenotipo normal, así como posteriores chequeos por PCR y secuenciación del DNA genómico.

### **3.3 Selección de las condiciones de cultivo para la producción y cuantificación de chaxamicinas**

Previo a la identificación de chaxamicinas por HPLC-MS/MS y a su cuantificación por HPLC, se determinó el medio de cultivo adecuado para la producción de estos metabolitos especializados. Esta evaluación incluyó: realizar cultivos de producción, concentrarlos por liofilización o rotaevaporación, evaluar la calidad de las muestras concentradas y la factibilidad de las mismas para ser inyectadas adecuadamente en el sistema cromatográfico. En este último aspecto, la inyección de las muestras procesadas en el HPLC no se realizó en aras de cuantificar las chaxamicinas, ya que se empleó un método cromatográfico previamente reportado solo para la identificación de las mismas, en medio ISP2m mediante HPLC-MS/MS. Los medios usados fueron ISP2m y R3.

La utilización del medio de cultivo reportado para la producción de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, ISP2m, no fue factible para la cuantificación mediante HPLC, ya que este medio contiene glicerol y el resultado de liofilización de 500 ml de sobrenadante, provenientes de los cultivos de producción, generó un concentrado denso y viscoso (Figura 6A). Este concentrado no pudo ser resuspendido completamente en los solventes orgánicos evaluados, entre ellos: metanol, isopropanol, acetonitrilo, heptano y dimetilsulfóxido (DMSO); por lo que su inyección en el HPLC dificultaría la obtención de un resultado real y reproducible sobre la producción de chaxamicinas. Algo similar ocurrió con los extractos micelares procesados, donde la rotaevaporación de las muestras generó un líquido viscoso (Figura 6C), difícil de separar del balón de rotaevaporación, provocando la pérdida de la mayor parte de la muestra.



**Figura 6:** Influencia del medio de cultivo de producción de chaxamicinas empleado sobre la calidad final de las muestras luego de ser concentradas por liofilización o rotaevaporación. Se muestra: liofilización del sobrenadante proveniente de 500 ml de cultivo de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, empleando (A) ISP2m y (B) R3 como medios de cultivo; rotaevaporación de 100 ml de extracto micelar, proveniente del sedimento celular de 500 ml de cultivo de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, empleando (C) ISP2m y (D) R3 como medios de cultivo. ISP2m: medio de cultivo de referencia para la producción de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. R3: medio de cultivo evaluado por primera vez para la producción de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas derivadas de esta.

Considerando los resultados anteriores, se realizó un cambio de medio de cultivo de producción, del establecido ISP2m a R3, un medio definido, más rico en ingredientes y reportado anteriormente como adecuado para el incremento de la producción heteróloga de chaxamicinas en *S. coelicolor* (Castro, 2015). A partir del uso de este medio de cultivo, los sobrenadantes concentrados por liofilización se obtuvieron en forma de polvo (Figura 6B), y el producto de la rotaevaporación de los extractos micelares fue completamente líquido (Figura 6D). Es importante destacar que si bien, era evidente la mejora en cuanto a la calidad de la muestra para ser inyectada en el sistema cromatográfico, el método cromatográfico empleado no era el adecuado para la posterior cuantificación de chaxamicinas.

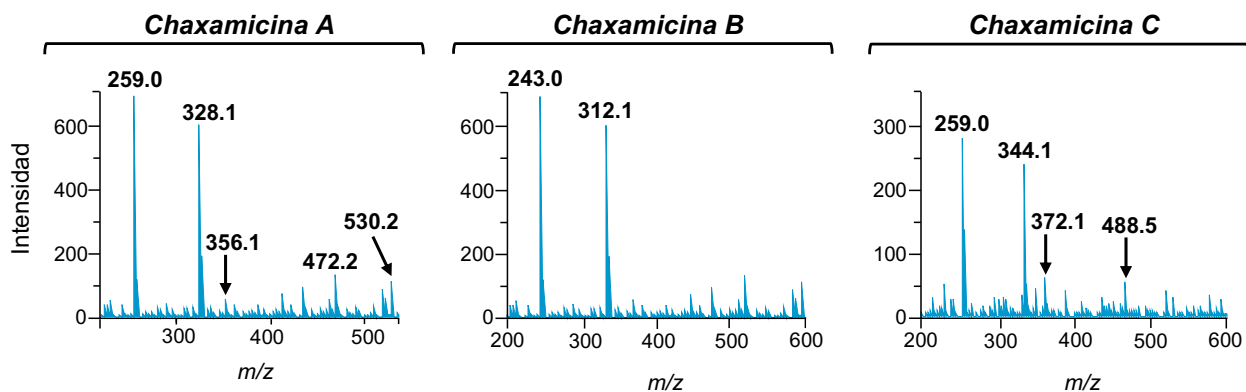
Con R3 como medio de cultivo seleccionado, posteriormente se realizaron los cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y de los diferentes mutantes generados. Los cultivos se emplearon inicialmente para la identificación de chaxamicinas mediante HPLC-MS/MS y luego para la cuantificación mediante la HPLC de estos compuestos.

### 3.4 Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS

Posterior al crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus respectivos derivados en medio R3 a 30 °C en 200 rpm de agitación durante cinco días, los cultivos fueron procesados siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3 de materiales y métodos, y liofilizados para el posterior análisis de espectrometría de masas. Los concentrados de sobrenadantes y extractos micelares resultantes se resuspendieron en metanol 100 % e inyectaron en el sistema de HPLC-MS/MS.

La comparación de los patrones de fragmentación, en modo de iones positivos y negativos, con los datos reportados para diferentes metabolitos en las librerías espectrales del MoNA, arrojaron la detección de 1455 y 818 señales en ionización positiva y negativa, respectivamente.

Las especies de chaxamicinas A-C fueron identificadas a partir de la comparación con una librería interna de los estándares. Se observó mayor sensibilidad de detección en el modo de ionización negativa  $[M - H]^-$ , en comparación con el modo positivo  $[M + H]^+$ . Las chaxamicinas se identificaron de forma simultánea: chaxamicina A (RT. 8.41 min)  $m/z$  638.29  $[M - H]^-$ ; chaxamicina B (RT. 7.46 min)  $m/z$  622.29  $[M - H]^-$  y chaxamicina C (RT. 7.2 min)  $m/z$  654.29  $[M - H]^-$ . El mutante *S. leeuwenhoekii* O11600 se empleó como mutante representativo para mostrar los patrones de MS/MS obtenidos para cada especie de chaxamicinas, los cuales se muestran en la Figura 7. El análisis de HPLC-MS/MS también se realizó para los cultivos de producción empleando el medio de cultivo ISP2m, siendo identificadas de igual manera las chaxamicinas A, B y C (resultados no mostrados).

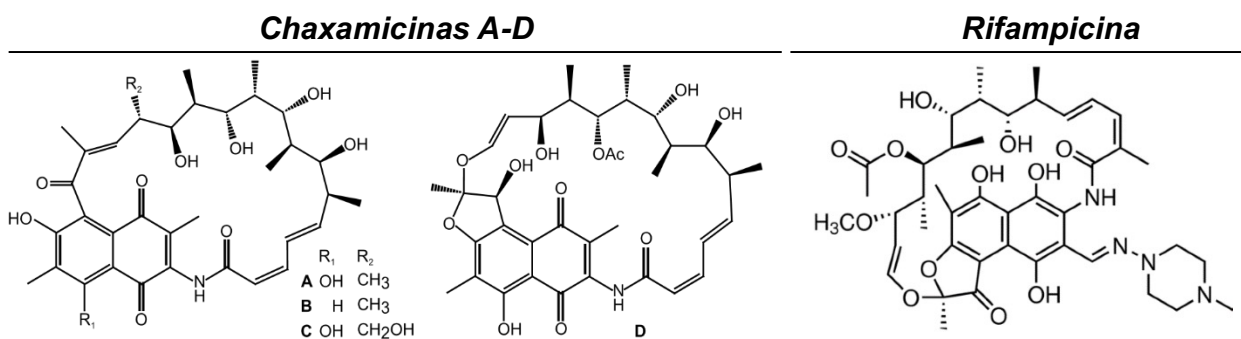


**Figura 7:** Patrones de fragmentación de las diferentes especies de chaxamicinas detectadas en la cepa recombinante *S. leeuwenhoekii* O11600, derivada de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. (A) chaxamicina A; (B) chaxamicina B y (C) chaxamicina C.

### 3.5 Detección y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC

Posterior a la identificación de chaxamicinas A, B y C mediante HPLC-MS/MS se procedió a la cuantificación de estas mediante HPLC. En esta investigación no se contaba con las cantidades necesarias de los estándares de referencia de chaxamicinas para realizar la cuantificación, por lo que se utilizó rifampicina como estándar interno. Se seleccionó el antibiótico rifampicina dada su similitud estructural con las chaxamicinas. Los estándares de chaxamicinas se usaron únicamente para confirmar la identificación cromatográfica de las distintas especies.

La rifampicina es un fármaco antibiótico semisintético y macrocíclico derivado de *Amycolatopsis mediterranei* que pertenece a la familia de las ansamicinas, al igual que las chaxamicinas. La rifampicina y las chaxamicinas se diferencian en que la primera lleva un grupo metilo en la cadena alifática junto al enlace amida (que no se encuentra en las chaxamicinas) y alberga un sustituyente iminometil-(4-metil-1-piperazino) unido al núcleo de bifenilo (Figura 8).

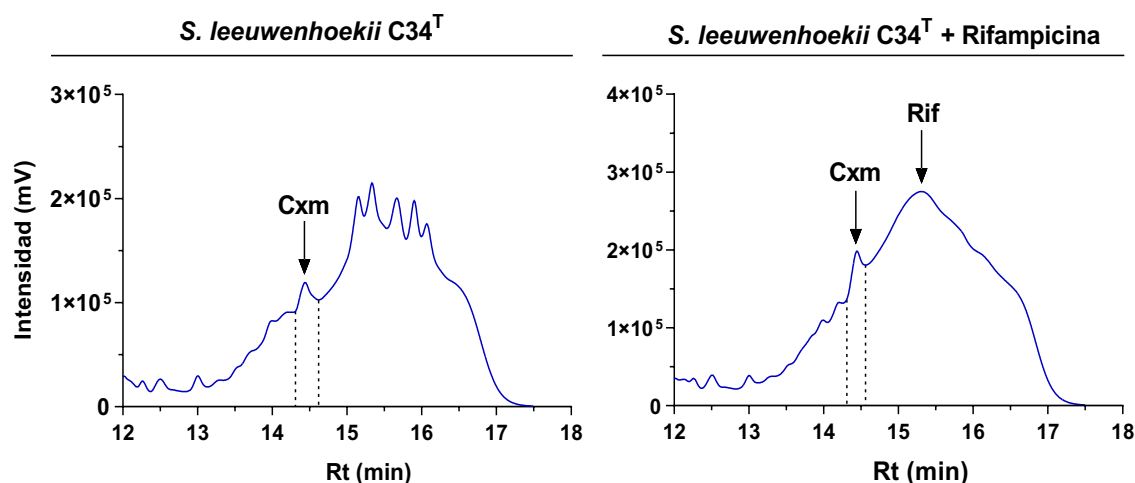


**Figura 8:** Estructura química de chaxamicinas A-D y rifampicina.

#### 3.5.1 Desarrollo de un método cromatográfico para la cuantificación relativa de chaxamicinas mediante HPLC

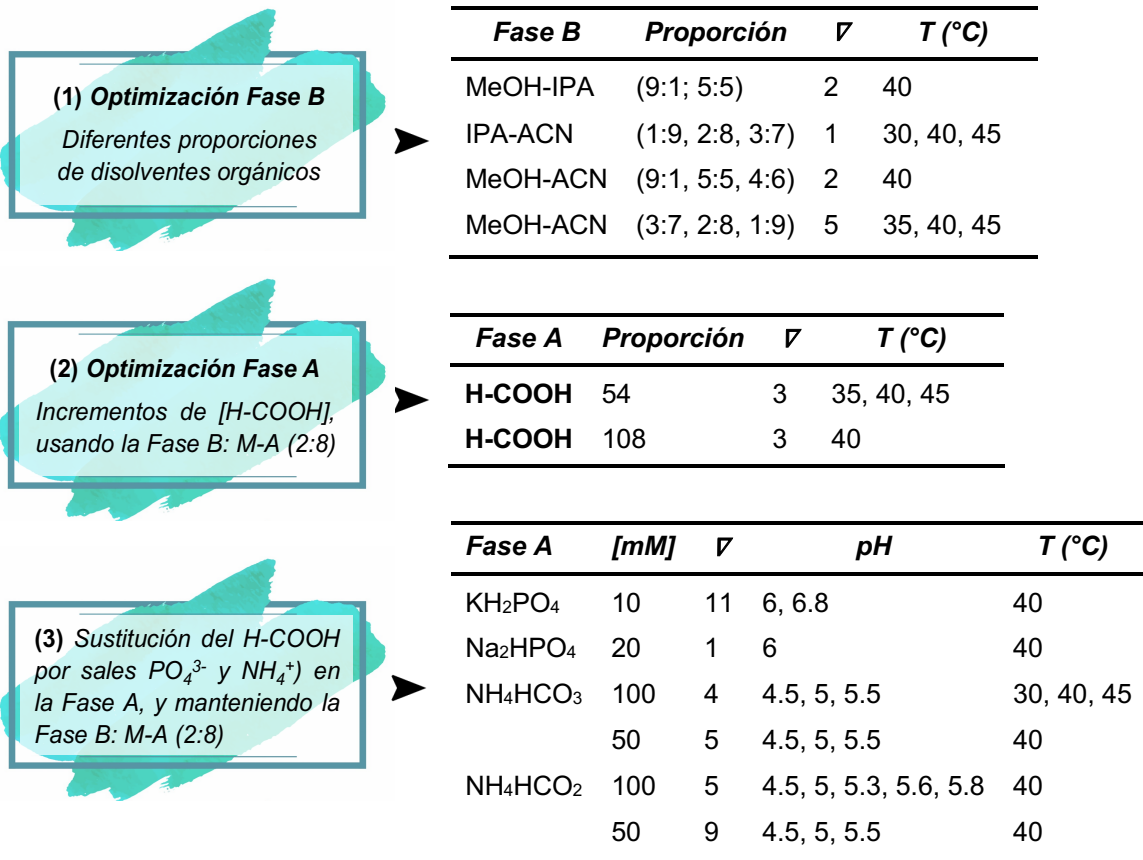
Con el fin de lograr la eficiente detección y separación por HPLC de los picos correspondientes a las chaxamicinas A, B, C y el estándar interno rifampicina, en este trabajo se hizo necesario llevar a cabo la búsqueda de las mejores condiciones cromatográficas para ello. Empleando R3, como medio de cultivo seleccionado, se realizaron cultivos de producción de 500 ml de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, a partir de los cuales, se obtuvieron las muestras procesadas, listas para la inyección en el cromatógrafo.

Inicialmente se evaluaron las condiciones de separación reportadas para la identificación por HPLC-MS/MS de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> usando el medio de cultivo ISP2m. Este método cromatográfico incluye el uso de dos fases móviles: como fase A, ácido fórmico 28 mM y como fase B, metanol 100 % (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015). Con el empleo de ambas fases móviles, los picos correspondientes a las chaxamicinas (Figura 9, izquierda) mostraron una resolución muy baja; la que empeoró en todos los picos tras añadir rifampicina (Figura 9, derecha). Resultados similares se obtuvieron al emplear diferentes métodos reportados para separar compuestos similares a rifampicina mediante HPLC (Panchagnula *et al.*, 1999; Mariappan *et al.*, 2000; Calleri *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Sachin *et al.*, 2009; Baietto *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2019).



**Figura 9:** Evaluación de las condiciones cromatográficas reportadas para la identificación de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> mediante HPLC-MS/MS usando el medio de cultivo ISP2m: ácido fórmico 28 mM como fase móvil A y metanol 100 % como fase móvil B. La muestra proviene de un concentrado por liofilización resuspendido en metanol 100 %, obtenido del sobrenadante de 500 ml de cultivo de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> empleando el medio de cultivo R3. Se muestran los cromatogramas correspondientes a la inyección de 10  $\mu$ l de: muestra sin adición del estándar interno rifampicina (izquierda), y muestra con adición del estándar interno rifampicina (derecha).

Con los resultados obtenidos, se hacía necesario desarrollar paso a paso, un método cromatográfico de separación de los analitos de interés. Inicialmente, se modificaron las fases móviles evaluadas, manteniendo una fase móvil acuosa (Fase A) y una fase móvil compuesta por disolventes orgánicos (Fase B). La Figura 10 recoge las principales variaciones cromatográficas efectuadas en este trabajo, tanto con respecto a las fases móviles, como a las modificaciones de temperatura, flujo de elución, pH y gradiente del método cromatográfico.

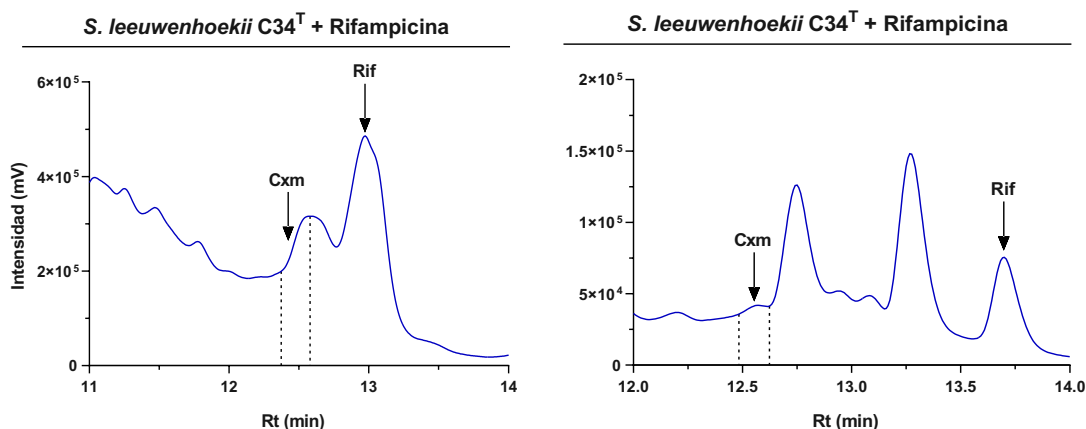


**Figura 10:** Condiciones cromatográficas evaluadas para la separación de chaxamicinas A, B, C y el estándar interno rifampicina. *Abreviaturas:* fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), formiato de amonio (NH<sub>4</sub>COOH), bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), acetonitrilo (ACN); Isopropanol (IPA), Metanol (MeOH).

Se conoce que la afinidad de un analito por la fase estacionaria y, por consiguiente, su tiempo de retención en la columna, se controla variando la polaridad de la fase móvil al agregar nuevos componentes (Farmacopea Argentina, 2004). Dado lo anterior, y manteniendo como fase acuosa el ácido fórmico a una concentración de 28 mM, mezclas de diferentes proporciones de los disolventes acetonitrilo, isopropanol y metanol se evaluaron como fase orgánica B (Figura 10). La modificación de la fase B mostró la mejor resolución de los picos al combinar metanol-acetonitrilo, en una proporción 2:8 (resultado no mostrado), siendo seleccionada para continuar la búsqueda del mejor método cromatográfico.

De igual manera, para la elección de la fase A se evaluaron incrementos en la concentración de ácido fórmico, manteniendo el uso de metanol-acetonitrilo (2:8) como la fase B seleccionada anteriormente. La modificación de la fase acuosa mostró que, el aumento de la concentración de ácido fórmico, de 28 a 54 mM resultó en un mejor rendimiento (Figura 11a), en comparación con las variantes a 28 y 108 mM evaluadas

(datos no mostrados). Pese a este avance, la separación completa de los analitos no se obtuvo.



**Figura 11:** Modificaciones de la fase móvil acuosa reportada para la identificación de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> mediante HPLC-MS/MS usando el medio de cultivo ISP2m (ácido fórmico 28 mM), manteniendo como fase móvil orgánica metanol-acetonitrilo (2:8). La muestra proviene de un concentrado por liofilización resuspendido en metanol 100 %, obtenido del sobrenadante de 500 ml de cultivo de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> empleando el medio de cultivo R3. Se representan los cromatogramas correspondientes a la inyección de 10  $\mu$ l de muestra, con adición del estándar interno rifampicina; empleando la fase móvil acuosa: ácido fórmico 54 mM (izquierda) y formiato de amonio 50 mM a pH 5.0 (derecha).

Dado lo anterior, el ácido fórmico como fase acuosa fue sustituida por fosfatos y sales de amonio. La evaluación de los cambios en la resolución de los picos, usando una solución de fosfato de potasio, fosfato de sodio, formiato de amonio y bicarbonato de amonio a diferentes pH arrojó que, la mejor resolución para los picos de las diferentes especies de chaxamicinas y del estándar interno rifampicina se encontró cuando se usó formiato de amonio 50 mM a pH 5.0 como fase A y metanol-acetonitrilo (2:8) como fase B (Figura 11b).

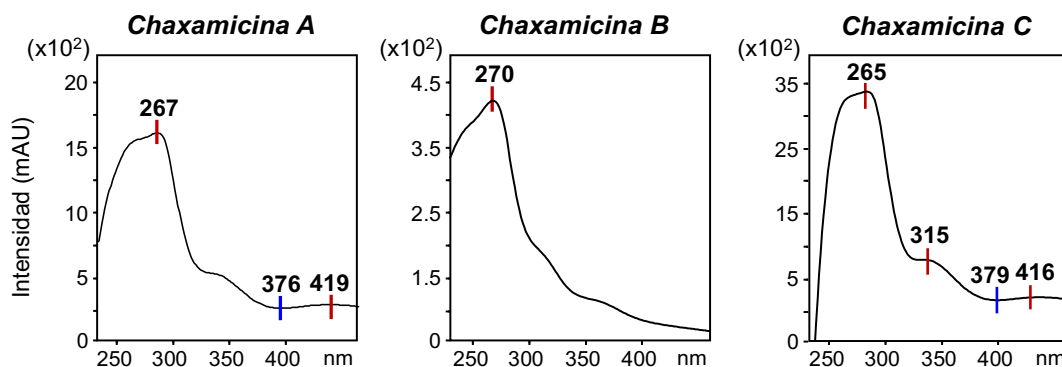
Después de aproximadamente 202 combinaciones, en el laboratorio se realizó un cambio de detector UV-vis  $\lambda$  fija a un detector de  $\lambda$  múltiple, es decir, a un detector de arreglo de diodos UV Shimadzu SPD-M20A, donde se continuó probando el formiato de amonio como fase móvil acuosa. Los cromatogramas obtenidos con el nuevo equipamiento evidenciaron un cambio significativo en el perfil de elución de los picos de las muestras inyectadas. Por primera vez, se logró separar parcialmente el pico de la rifampicina de los picos de las chaxamicinas A y C. Sin embargo, tal como se esperaba, al incrementar la concentración de rifampicina, esta comenzó a co-eluir con la chaxamicina B.



A pesar de los intentos posteriores por mejorar la separación de los picos de interés usando formiato de amonio 50 mM como fase móvil acuosa y metanol-acetonitrilo (2:8) como fase móvil B, no se lograron buenos resultados, ya que la hidrólisis de la sal formiato de amonio libera CO<sub>2</sub>, lo que resultaba en cambios drásticos del pH en cortos intervalos de tiempo, a pesar de mantener la fase acuosa en hielo durante las corridas.

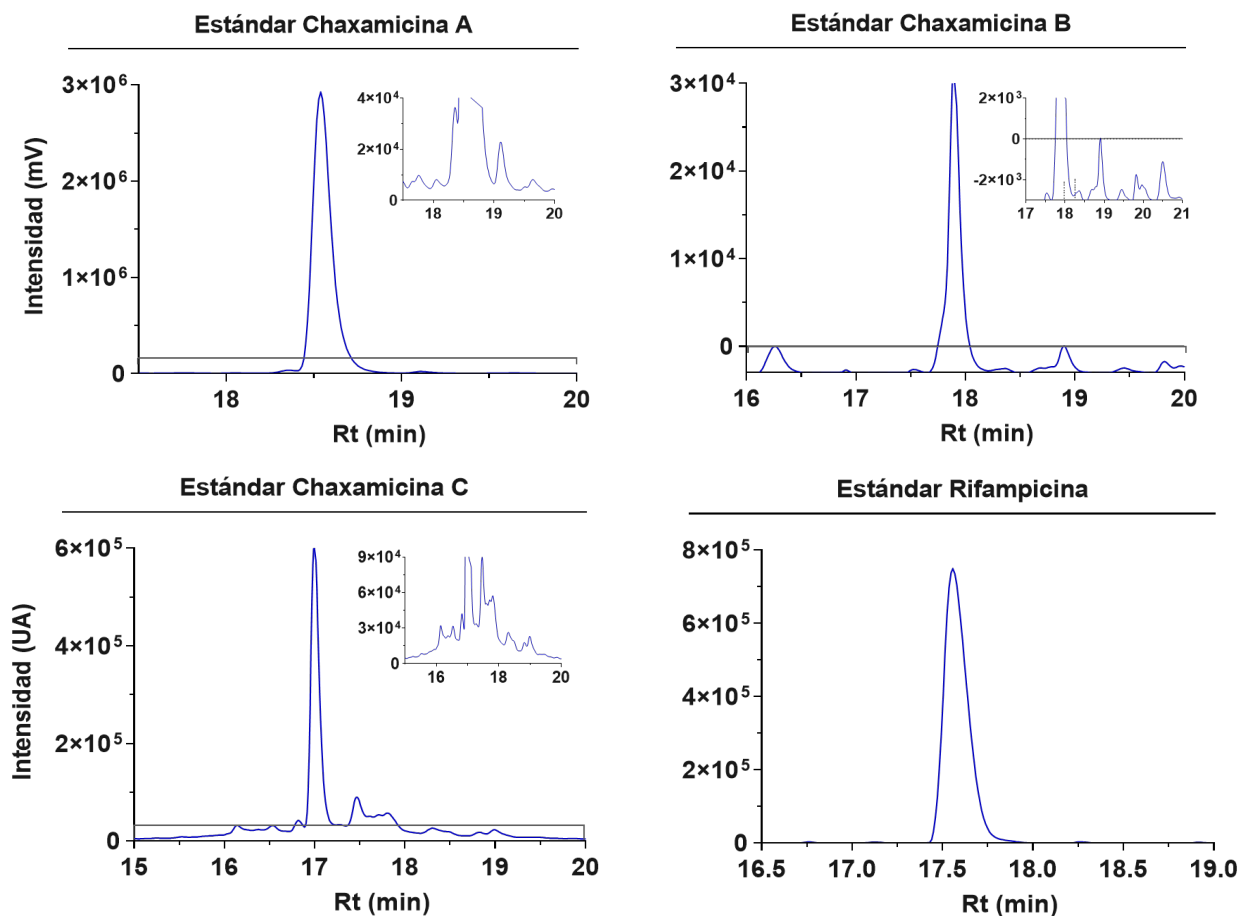
Si consideramos el brusco cambio observado en la selectividad de los picos, empleando una fase móvil ya evaluada, no se descartó la posibilidad de re-evaluar la fase móvil acuosa usada inicialmente (ácido fórmico 28 mM), con el nuevo detector instalado. El resultado fue similar al obtenido para la sal formiato de amonio, sin perder la parcial selectividad y especificidad del método, pero en este caso era una ventaja trabajar con una fase móvil a un pH estable. No obstante, el grado de separación de los picos de las chaxamicinas aún no permitía su cuantificación. Empleando ácido fórmico 28 mM como fase acuosa y manteniendo la fase orgánica metanol-acetonitrilo (2:8), aproximadamente 60 diferentes condiciones (pH, temperatura,  $\lambda$ , flujo y gradiente elución) se evaluaron para obtener la separación de los cuatro analitos de interés.

A pesar de estar trabajando hasta el momento a una  $\lambda$  de detección de 280 nm, con el nuevo detector de matriz de diodos las longitudes de onda máximas ( $\lambda_{\max}$ ) de las chaxamicinas y rifampicina se analizaron, escaneando un rango de 200 a 600 nm, para obtener la  $\lambda$  de detección óptima para la separación cromatográfica. Los espectros UV resultantes mostraron que los picos de absorbancia de las chaxamicinas A, B y C eran muy similares entre sí (Figura 12), mientras que el de la rifampicina era diferente.



**Figura 12:** Espectros de absorción UV de los estándares de chaxamicinas A, B y C

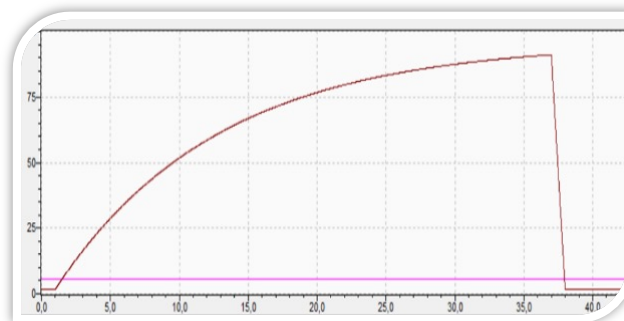
La mejor respuesta del detector para todos los estándares de interés se observó a una  $\lambda$  de 270 nm. Por lo tanto, el detector UV-vis se fijó a esta  $\lambda$  en el método final. Además del empleo de los estándares de referencia a una concentración desconocida, se utilizaron los espectros de absorción, para la identificación de las chaxamicinas. Como se muestra en la ampliación realizada en la Figura 13, los estándares mostraron picos adicionales al mayoritario.



**Figura 13:** Perfil cromatográfico de los estándares de chaxamicinas A-C y del estándar interno rifampicina. Se muestra una ampliación de los picos adicionales al mayoritario, identificado como el estándar de referencia respectivo a cada especie de chaxamicina. Tiempo de retención (Rt) de los analitos de interés: chaxamicina A=18.7, chaxamicina B=17.8 min, chaxamicina C=16.6 min y rifampicina a 17.6 min.

Para la elaboración del método cromatográfico se evaluaron los gradientes típicos usados en cromatografía de fase reversa, es decir, isocráticos y binarios, no lográndose buenos resultados. Finalmente se evaluaron gradientes convexos y cóncavos, que se utilizan ocasionalmente con fines analíticos, especialmente cuando se trata de muestras de varios componentes que requieren una resolución adicional al principio o al final del gradiente (Eriksson, 2018). A partir de lo anterior, un gradiente cóncavo fue seleccionado para la separación simultánea de los picos de interés, el cual se representa en la Figura 14, así como la proporción de cada fase móvil empleada.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0.01	2
1	2
28	3
36.5	100
37	100
38	2
60	2



**Figura 14:** Gradiente de elución cóncavo seleccionado para la separación cromatográfica de chaxamicinas A-C y el estándar interno rifampicina. Se emplearon las fases móviles ácido fórmico 28 mM (fase A) y metanol-acetonitrilo 2:8 (fase B), cuyo porcentaje se muestra en función a la fase B.

La evaluación de los resultados obtenidos en este trabajo permitió seleccionar las mejores condiciones de separación cromatográfica de los picos de interés, las que se muestran en la Tabla 6. El método desarrollado permitió la posterior detección y cuantificación de las chaxamicinas A, B y C, empleando el estándar interno rifampicina.

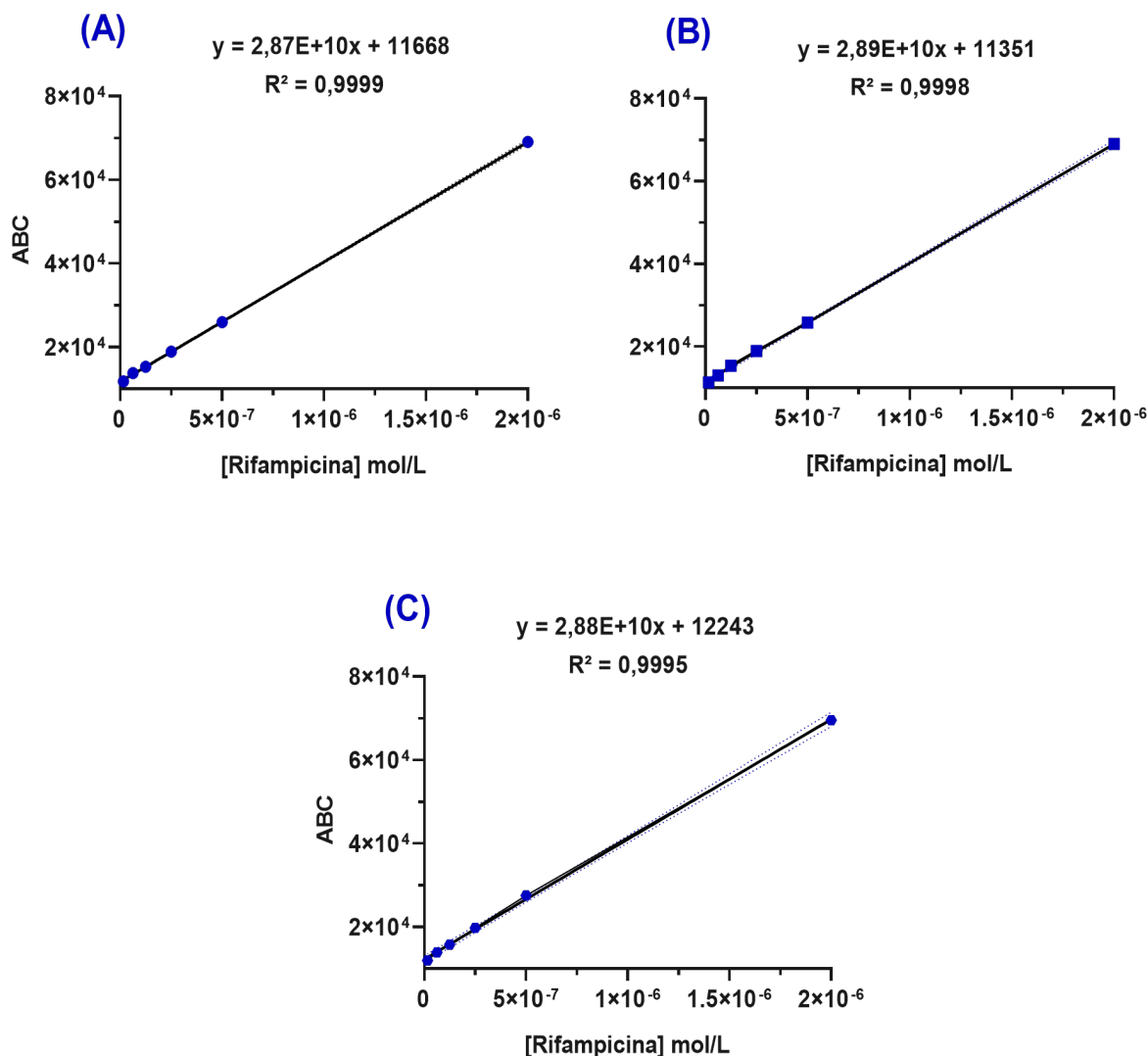
**Tabla 6:** Condiciones cromatográficas seleccionadas para la separación de los picos correspondientes a chaxamicinas A-C y el estándar interno rifampicina.

<b>Columna cromatográfica</b>	Onyx™ Monolithic C18, 130Å, 100 x 4.6 mm (Phenomenex)
<b>Fase móvil A</b>	Agua + Ácido fórmico 28 mM
<b>Fase móvil B</b>	20 % Acetonitrilo - 80% Metanol
<b>Flujo</b>	0.6 ml/min
<b>Temperatura columna</b>	40 °C
<b>Longitud de onda</b>	270 nm ( <i>bandwidth</i> = 4 nm)
<b>Volumen inyección</b>	10 µl
<b>Tiempo corrida</b>	70 min

### 3.5.2 Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

Para la determinación del LOQ y LOD se usaron los datos de tres curvas de calibración, las cuales incluían cinco concentraciones (2.0E-06, 5.0E-07, 2.5E-07, 1.3E-07, 6.3E-08 y 1.6E-08 mol/L) del estándar interno rifampicina, todas dentro del rango del LOD (Figura15).

La regresión lineal simple de los tres replicados de curvas de calibración en un rango de concentraciones de 1.60E-08 a 2.00E-06 mol/L mostró una buena correlación lineal ( $R^2$ ), de 0.9984 a 0.9994. La desviación estándar relativa (R.S.D) de los valores de integración obtenidas para las diferentes curvas de calibración tuvo un máximo de 4.7 %; asimismo las R.S.D de los valores de la pendiente y del intercepto fueron menores al 3 %. El  $p$  value fue  $<0.0001$  para todas las curvas de calibración.



**Figura 15:** Curvas de calibración dentro del rango de detección del estándar interno rifampicina para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación. Se emplearon concentraciones dentro del rango de detección ( $1.60E-08$  a  $2.00E-06$  mol/L). En el eje de las abscisas se muestran las áreas bajo la curva (ABC) del pico de rifampicina detectado en cada una de las concentraciones empleadas en la curva de calibración. Las concentraciones usadas se representan en el eje de las ordenadas, en mol/L. En la parte superior de cada curva se muestra la ecuación resultante de la regresión lineal, así como el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

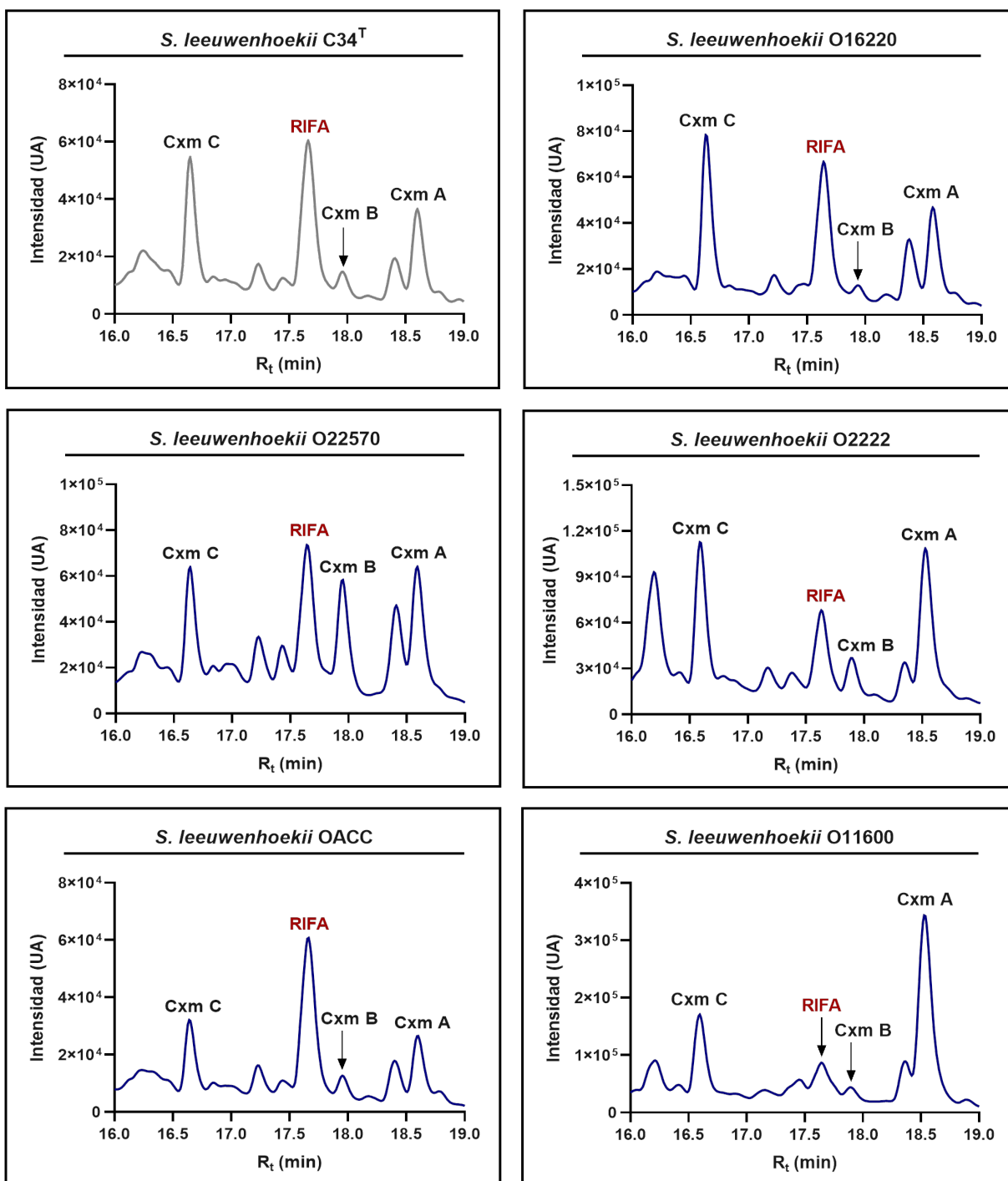
A partir de las fórmulas descritas previamente en el apartado de materiales y métodos se calcularon los parámetros analíticos, LOD y LOQ, obteniéndose para la chaxamicina A: LOD (2.11E-05 a 3.60E-05 mg/ml) y LOQ (6.38E-05 a 1.09E-04 mg/ml); chaxamicina B: LOD (2.05E-05 a 3.51E-05 mg/ml) y LOQ (6.22E-05 a 1.06E-04 mg/ml); y chaxamicina C: LOD (2.16E-05 a 3.69E-05 mg/ml) y LOQ (6.54E-05 a 1.12E-04 mg/ml), en 10µl de inyección. La Tabla 7 muestra los resultados de la regresión lineal y los valores de LOD y LOQ de las chaxamicinas A-C, todos como promedios de las tres réplicas de curvas de calibración.

**Tabla 7:** Parámetros analíticos de la regresión lineal de las curvas de calibración de rifampicina para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación de chaxamicinas A-C. Los cálculos se realizaron tomando cada punto de las curvas como un punto independiente (n=9). <sup>a</sup> Y es el área bajo la curva del pico; X es la concentración de rifampicina empleada (1.60E-08 a 2.00E-06 mol/L). R<sup>2</sup> es el coeficiente de determinación; LOD, límite de detección: 3.3\*σ/S y LOQ, límite de cuantificación: 10\*σ/S. El *p value* usado fue 0.05. SEM, es el error estándar de la media.

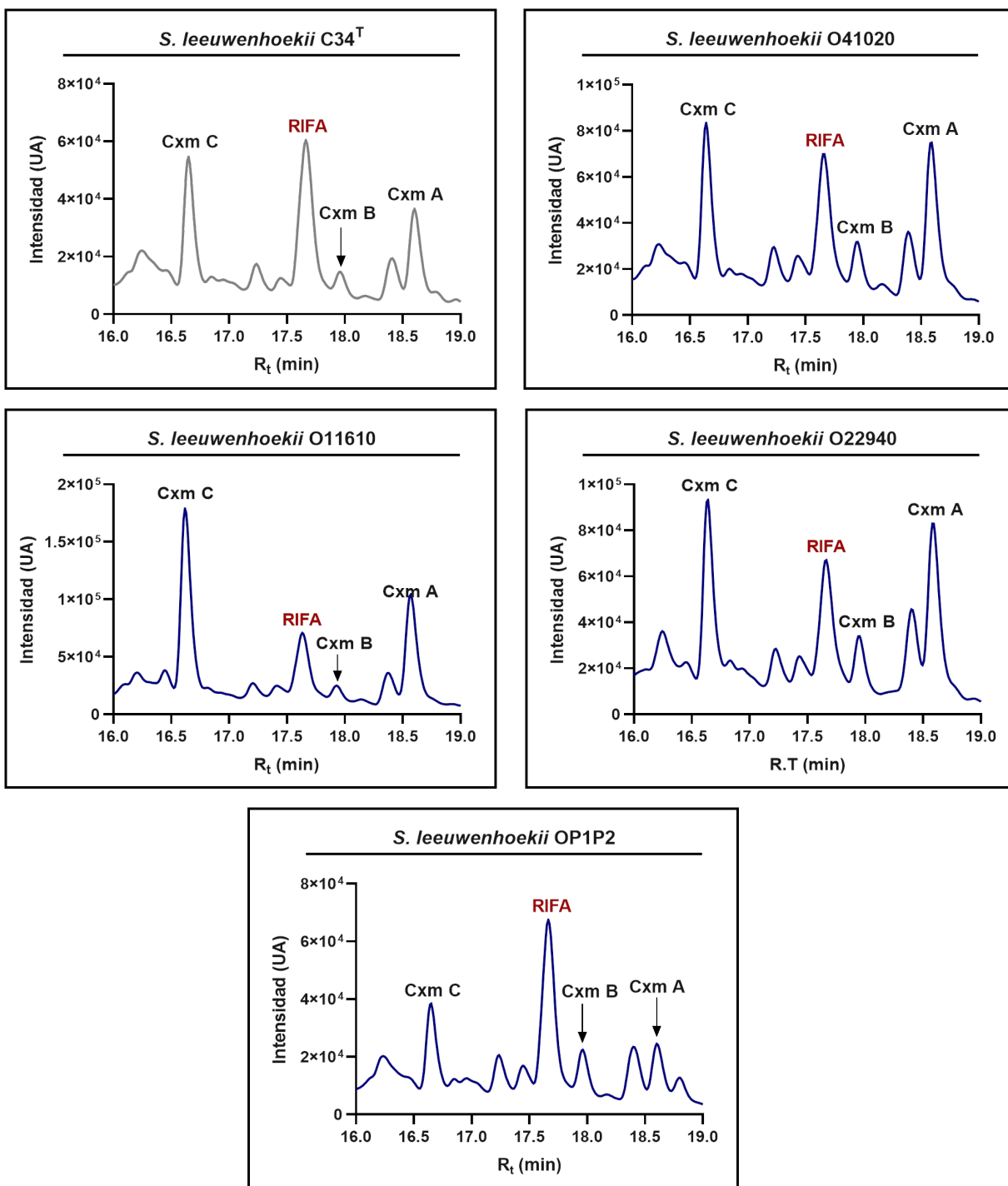
Parámetros	Valores (mg/ml)
<i>Pendiente ± SEM</i>	28768232936 ± 182525315
<i>Intercepto-y ± SEM</i>	11754 ± 155.1
<sup>a</sup> <i>Ecuación de regresión lineal</i>	Y = 28768232936*X + 11754
<i>R<sup>2</sup></i>	0.9994
<i>Runs test</i>	Desviación de la linealidad no significativa
<i>P value (runs test)</i>	0.3
<i>Cxm A</i>	LOD 1.14E-05; LOQ 3.45E-05
<i>Cxm B</i>	LOD 1.11E-05 LOQ 3.36E-05
<i>Cxm C</i>	LOD 1.17E-05 LOQ 3.54E-05

### 3.5.3 Cuantificación de chaxamicinas provenientes de sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes generados

Como se menciona anteriormente, las chaxamicinas A-C fueron identificadas en la cepa *wild-type* y en los mutantes de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, por coincidencia en los tiempos de retención y espectros de absorción UV de los estándares, con los picos desconocidos en las muestras analizadas. Los cromatogramas correspondientes a cada mutante se muestran en la Figura 16.

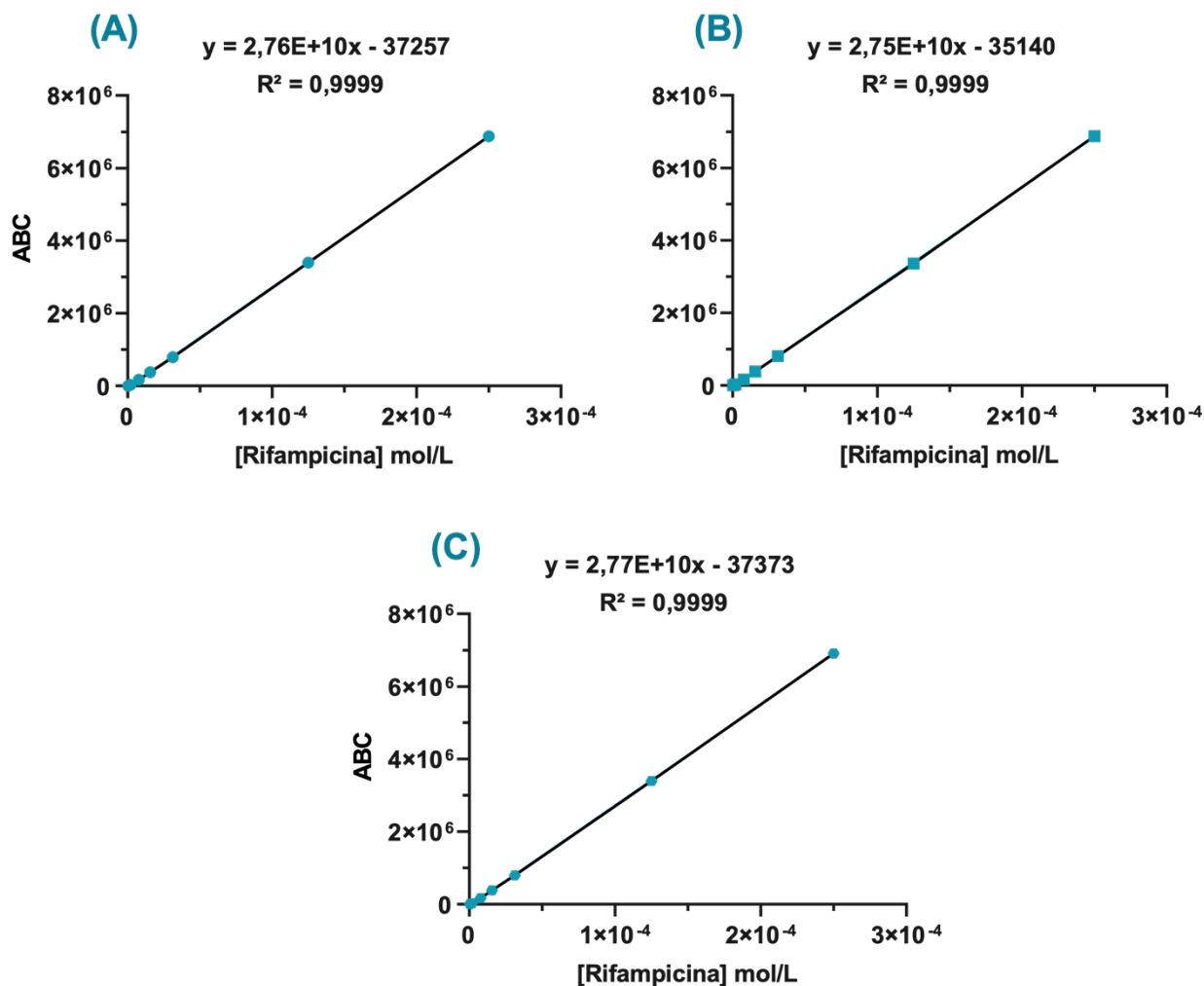


**Figura 16:** Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados. Los sobrenadantes evaluados provenientes del liofilizado de 500 ml de cultivo de producción de las cepas recombinantes generadas en este trabajo y del *wild-type*, en medio de cultivo R3. En el eje de las abscisas se muestran los tiempos de retención (min) de cada pico detectado y la intensidad (UA) de la respuesta se representa en las ordenadas. En todas las muestras 270 nm fue usada como longitud de onda de detección. RIFA; estándar interno rifampicina y Cxm, chaxamicina.



**Continuación Figura 16:** Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados. Los sobrenadantes evaluados provenientes del liofilizado de 500 ml de cultivo de producción de las cepas recombinantes generadas en este trabajo y del *wild-type*, en medio de cultivo R3. En el eje de las abscisas se muestran los tiempos de retención (min) de cada pico detectado y la intensidad (UA) de la respuesta se representa en las ordenadas. En todas las muestras 270 nm fue usada como longitud de onda de detección. RIFA; estándar interno rifampicina y Cxm, chaxamicina.

Para la extrapolación de las áreas bajo la curva obtenidas para cada uno de los picos de chaxamicinas se emplearon los datos de tres curvas de calibración, las cuales incluían cinco concentraciones ( $2.50\text{E-}04$ ,  $1.25\text{E-}04$ ,  $3.13\text{E-}05$ ,  $1.56\text{E-}05$ ,  $7.81\text{E-}06$ ,  $1.95\text{E-}06$ ,  $9.77\text{E-}07$  y  $4.88\text{E-}07$  mol/L) del estándar interno rifampicina, a partir de un *stock* preparado a  $1.0\text{E-}3$  mol/L. La Figura 17 muestra la regresión lineal de las curvas de calibración realizadas.



**Figura 17:** Curvas de calibración del estándar interno rifampicina para la determinación de las concentraciones de chaxamicinas A, B y C. En el eje de las abscisas se muestran las áreas bajo la curva (ABC) del pico de rifampicina detectado en cada una de las concentraciones empleadas en la curva de calibración. Las concentraciones usadas ( $2.50\text{E-}04$  a  $4.88\text{E-}07$  mol/L) se representan en el eje de las ordenadas, en mol/L. En la parte superior de cada curva se muestra la ecuación resultante de la regresión lineal, así como el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

A partir de la regresión lineal simple de los tres replicados de las curvas de calibración, en el rango de concentraciones mencionado anteriormente, se obtuvo un valor promedio de correlación lineal ( $R^2$ ), de 0.9999. La R.S.D de los valores de integración obtenidas



para las diferentes curvas de calibración tuvo un máximo de 4.9 %; asimismo las R.S.D de los valores de la pendiente y del intercepto fueron menores al 2 %. El *p value* fue <0.0001 para todas las curvas de calibración. La Tabla 8 recoge los parámetros analíticos obtenidos para las mismas.

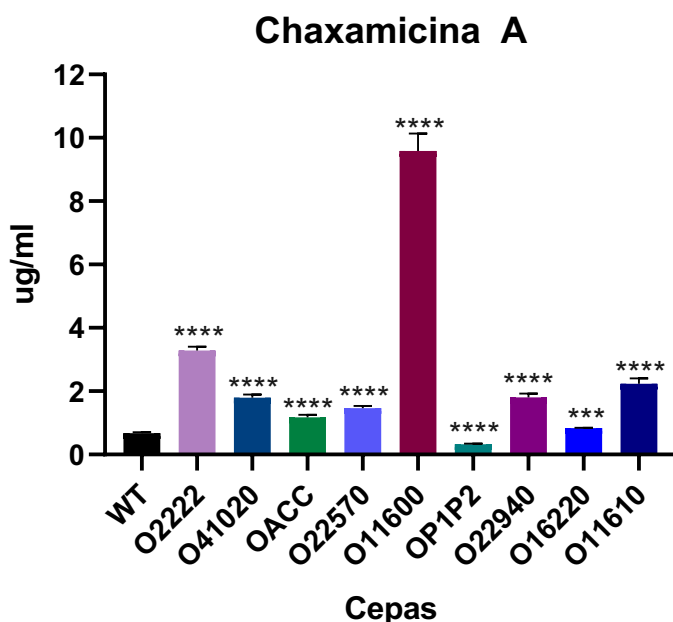
**Tabla 8:** Parámetros analíticos de la regresión lineal de las curvas de calibración de rifampicina para la determinación de las concentraciones de chaxamicinas A-C. Los cálculos se realizaron tomando cada punto de las curvas como un punto independiente (n=9). <sup>a</sup>Y es el área bajo la curva del pico; X es la concentración de rifampicina empleada (2.50E-04 a 4.88E-07 mol/L). R<sup>2</sup> es el coeficiente de determinación. El *p value* usado fue 0.05. SEM, es el error estándar de la media.

Parámetros	Valores (mg/ml)
<i>Pendiente ± SEM</i>	27617936580 ± 59103809
<i>Intercepto-y ± SEM</i>	-36468 ± 5889
<sup>a</sup> <i>Ecuación de regresión lineal</i>	Y = 27617936580*X - 36468
R <sup>2</sup>	0.9999
<i>Runs test</i>	Desviación de la linealidad no significativa
<i>P value (runs test)</i>	0.1143

Empleando la ecuación de regresión lineal obtenida para el estándar interno rifampicina, se realizó el ploteo del área bajo la curva de los picos de cada chaxamicina, obteniendo la concentración respectiva en mol/L. Usando las masas molares reportadas para cada chaxamicina, se calcularon los µg/ml presentes en el liofilizado total, correspondiente a cada mutante.

La figura y tabla que se muestran a continuación recogen los datos obtenidos para la producción de chaxamicina A, tanto de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, como de los mutantes derivados de esta. De esta manera, se evidencia que con respecto a la producción de chaxamicina A, todos los mutantes mostraron, estadísticamente hablando, valores con diferencias significativas al ser comparados con *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>; por lo que efectivamente se puede hablar de una diferencia, a pesar de los errores de medición y las dispersiones (Figura 18).

Incrementos relativos superiores al 120 % en ocho de los nueve mutantes generados se obtuvieron con respecto a la producción de chaxamicina A. Se debe destacar que el mutante *S. leeuwenhoekii* O11600 evidenció un incremento relativo de 14.2 veces la producción de esta especie de chaxamicina por la cepa de referencia, *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, con un valor de 10 µg/ml en la totalidad del cultivo de producción correspondiente (Tabla 9).

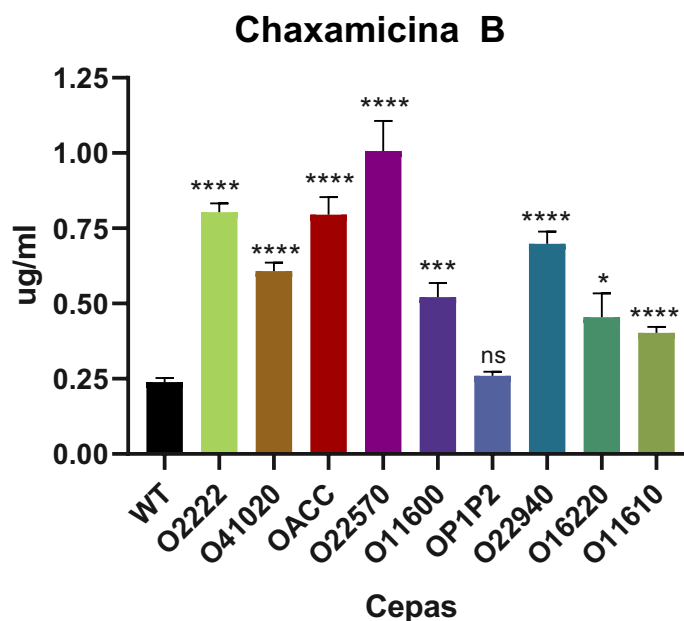


**Figura 18:** Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina A en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se calcularon a partir de los datos de tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. Se empleó cada valor como un punto independiente ( $n = 9$ ). Las barras de error representan el error estándar. El nivel de significancia estadística se estableció en un  $p < 0.05$ ; \*indicando 0.0332 (\*), 0.0021 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). WT, *wild-type*.

**Tabla 9:** Producción de chaxamicina A ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de mediciones por triplicado.

Cepas	Promedio $\pm$ SEM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incremento relativo de producción
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	0.68 $\pm$ 0.03	
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	9.58 $\pm$ 0.56	14.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	3.29 $\pm$ 0.12	4.9
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	2.24 $\pm$ 0.16	3.3
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	1.8 $\pm$ 0.12	2.7
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	1.79 $\pm$ 0.11	2.7
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	1.47 $\pm$ 0.07	2.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	1.18 $\pm$ 0.07	1.8
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	0.84 $\pm$ 0.01	1.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	0.32 $\pm$ 0.02	0.5

Por su parte, los resultados obtenidos con respecto a la producción de chaxamicina B mostraron al igual que para la chaxamicina A, diferencias estadísticas significativas con respecto a la cepa *wild-type* (Figura 19). Se obtuvo incrementos relativos de 1 a 4.2 veces, con respecto a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> (Tabla 10). A pesar de este resultado, la cantidad de  $\mu\text{g/ml}$  de chaxamicina B continúa baja, ya que la producción basal de la cepa de referencia es menor a 0.5  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 19:** Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina B en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se calcularon a partir de los datos de tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. Se empleó cada valor como un punto independiente ( $n = 9$ ). Las barras de error representan el error estándar. El nivel de significancia estadística se estableció en un  $p < 0.05$ ; \*indicando 0.0332 (\*), 0.0021 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). WT, *wild-type*.

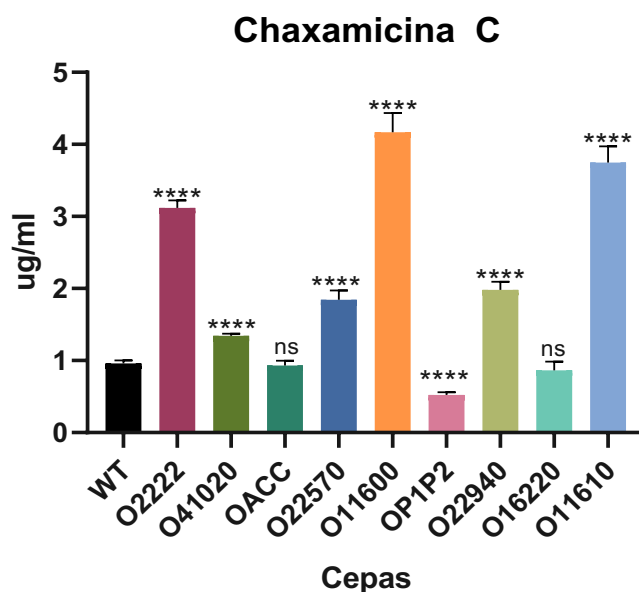
**Tabla 10:** Producción de chaxamicina B ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de las mediciones por triplicado.

Cepas	Promedio $\pm$ SEM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incremento relativo de producción
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	0.24 $\pm$ 0.01	
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	1.01 $\pm$ 0.1	4.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	0.8 $\pm$ 0.03	3.4
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	0.8 $\pm$ 0.06	3.3
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	0.7 $\pm$ 0.04	2.9
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	0.61 $\pm$ 0.03	2.5
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	0.52 $\pm$ 0.05	2.2

**Continuación Tabla 10:** Producción de chaxamicina B ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.

Cepas	Promedio $\pm$ SEM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incremento relativo de producción
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	0.24 $\pm$ 0.01	
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	0.45 $\pm$ 0.08	1.9
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	0.4 $\pm$ 0.02	1.7
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	0.26 $\pm$ 0.01	1.1

Con respecto a la producción de chaxamicina C, siete mutantes (Figura 20), mostraron la máxima diferencia estadística; sin embargo, en el caso de los mutantes *S. leeuwenhoekii* OACC y *S. leeuwenhoekii* O16220 no hubo diferencia estadística, por lo que consideraremos que no hubo ningún cambio con respecto a la producción de chaxamicina C y por lo tanto no lo abordaremos en la presente investigación. A pesar de que la cepa *wild-type* muestra valores de producción de chaxamicina C inferior a 1  $\mu\text{g/ml}$ , el mutante *S. leeuwenhoekii* O11600 incrementó este valor a 4.2  $\mu\text{g/ml}$ , lo que significó un incremento relativo de 4.4 veces lo que produce el *wild-type* (Tabla 11).



**Figura 20:** Análisis y comparación de la concentración de chaxamicina C en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se calcularon a partir de los datos de tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. Se empleó cada valor como un punto independiente ( $n = 9$ ). Las barras de error representan el error estándar. El nivel de significancia estadística se estableció en un  $p < 0.05$ ; \*indicando 0.0332 (\*), 0.0021 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). WT, *wild-type*.

**Tabla 11:** Producción de chaxamicina C ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de mediciones por triplicado.

Cepas	Promedio $\pm$ SEM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incremento relativo de producción
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	0.96 $\pm$ 0.04	
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	4.17 $\pm$ 0.26	4.3
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	3.75 $\pm$ 0.23	3.9
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	3.12 $\pm$ 0.10	3.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	1.98 $\pm$ 0.11	2.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	1.84 $\pm$ 0.13	1.9
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	1.35 $\pm$ 0.03	1.4
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	0.93 $\pm$ 0.06	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	0.87 $\pm$ 0.12	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	0.52 $\pm$ 0.04	0.3

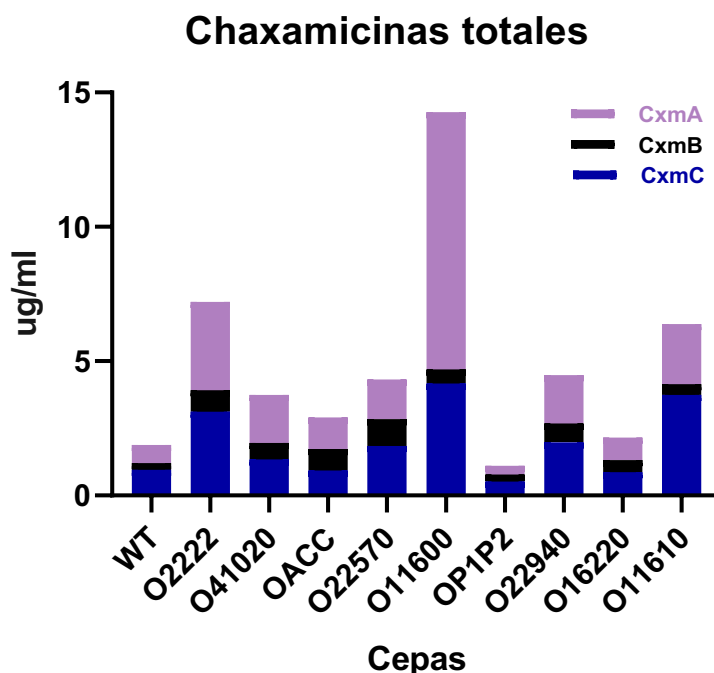
A partir de las concentraciones individuales correspondientes a cada especie de chaxamicina (A-C) se calculó el total de chaxamicinas producidas por cada mutante, los cuales se reportan en la Tabla 12.

**Tabla 12:** Producción total de chaxamicinas A-C ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo.

Cepas	Producción total ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incremento relativo de producción
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	1.88	
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	14.27	7.6
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22-22	7.21	3.8
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	6.39	3.4
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	4.48	2.4
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	4.32	2.3
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	3.74	2.0
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	2.91	1.6
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	2.16	1.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	1.11	0.6

El gráfico de barras que se muestra a continuación (Figura 21) evidencia el significativo incremento de la producción que se obtuvo con respecto a la chaxamicina A por el mutante *S. leeuwenhoekii* O11600, como habíamos comentado anteriormente. Este

mutante también fue el que produjo un mayor incremento en la producción de chaxamicina C. En contraste, el mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2 mostró un decremento del 50 % de la producción de chaxamicinas totales.



**Figura 21:** Comparación de la producción total de chaxamicinas A-C en sobrenadantes de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo. WT, *wild-type*.

Por su parte, la chaxamicina B fue la que generó una menor concentración (µg/ml) de todos los mutantes evaluados, no obstante se consideraron buenos resultados dado el importante incremento relativo de la producción de esta chaxamicina con respecto a la cepa de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. Adicional a *S. leeuwenhoekii* O11600, otros mutantes que mostraron un incremento importante en la producción de chaxamicinas totales fueron *S. leeuwenhoekii* O11610, *S. leeuwenhoekii* O22570, *S. leeuwenhoekii* O22940 y el doble mutante generado a partir de las sobreexpresiones presentes en los dos últimos genes mencionados, rindiendo el mutante *S. leeuwenhoekii* O2222.

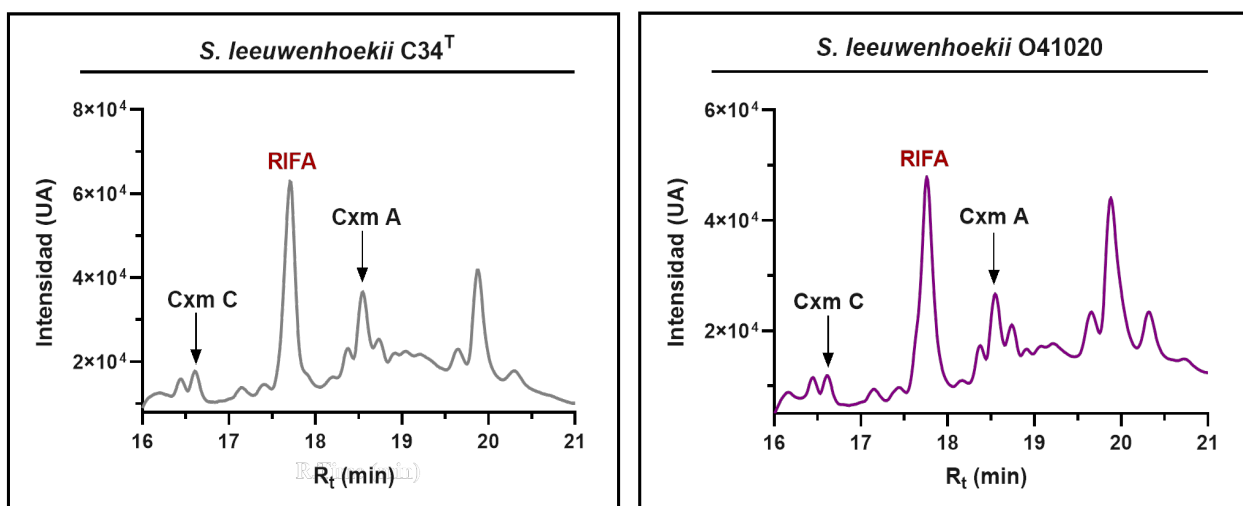
### 3.5.4 Cuantificación de chaxamicinas provenientes de extractos micelares de cultivos de producción de los mutantes generados

Adicional a la cuantificación de chaxamicinas provenientes de los sobrenadantes de los cultivos liofilizados, extractos micelares se obtuvieron a partir de los precipitados de estos cultivos de producción. Un volumen de 100 ml de 100 % metanol se añadió a los precipitados de 500 ml de cultivo, la fracción micelar fue concentrada 10 veces mediante

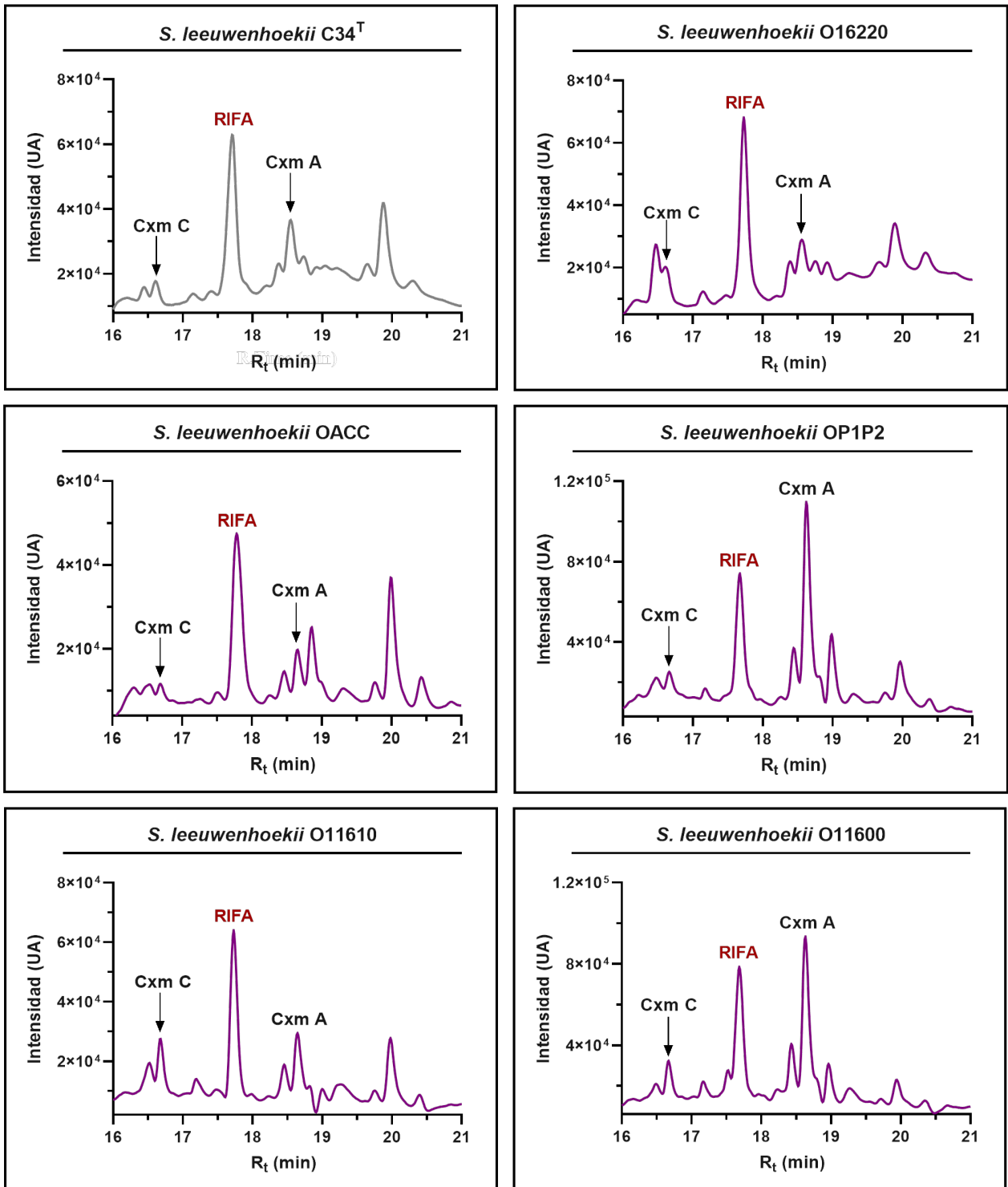
rotaevaporación. Un volumen de 10  $\mu$ l del concentrado se inyectó directamente en el HPLC.

La Figura 22 muestra los cromatogramas obtenidos para cada uno de los mutantes, donde se observa que la resolución y separación de los picos fue pobre, resultado esperado al tratarse de muestras provenientes de un sedimento celular, lo que implica la presencia de componentes celulares generados a partir de la lisis celular. Dada la falta de resolución de los picos, la determinación aproximada de las áreas bajo la curva correspondientes a la chaxamicina C se realizó empleando el patrón de espectro UV del estándar correspondiente, de ahí que no fuera precisa.

A lo anterior se suma, la dificultad para identificar la chaxamicina B, lo que especulamos se deba a que en los sobrenadantes de los cultivos de producción es la chaxamicina presente en menor cantidad en los mutantes evaluados, tendencia que podría mantenerse en las fracciones micelares. La misma suposición se puede realizar para el caso de la chaxamicina A, ya que fue la especie que se detectó con mayor precisión, posiblemente por ser la chaxamicina que más se produce en los sobrenadantes de los cultivos de producción.

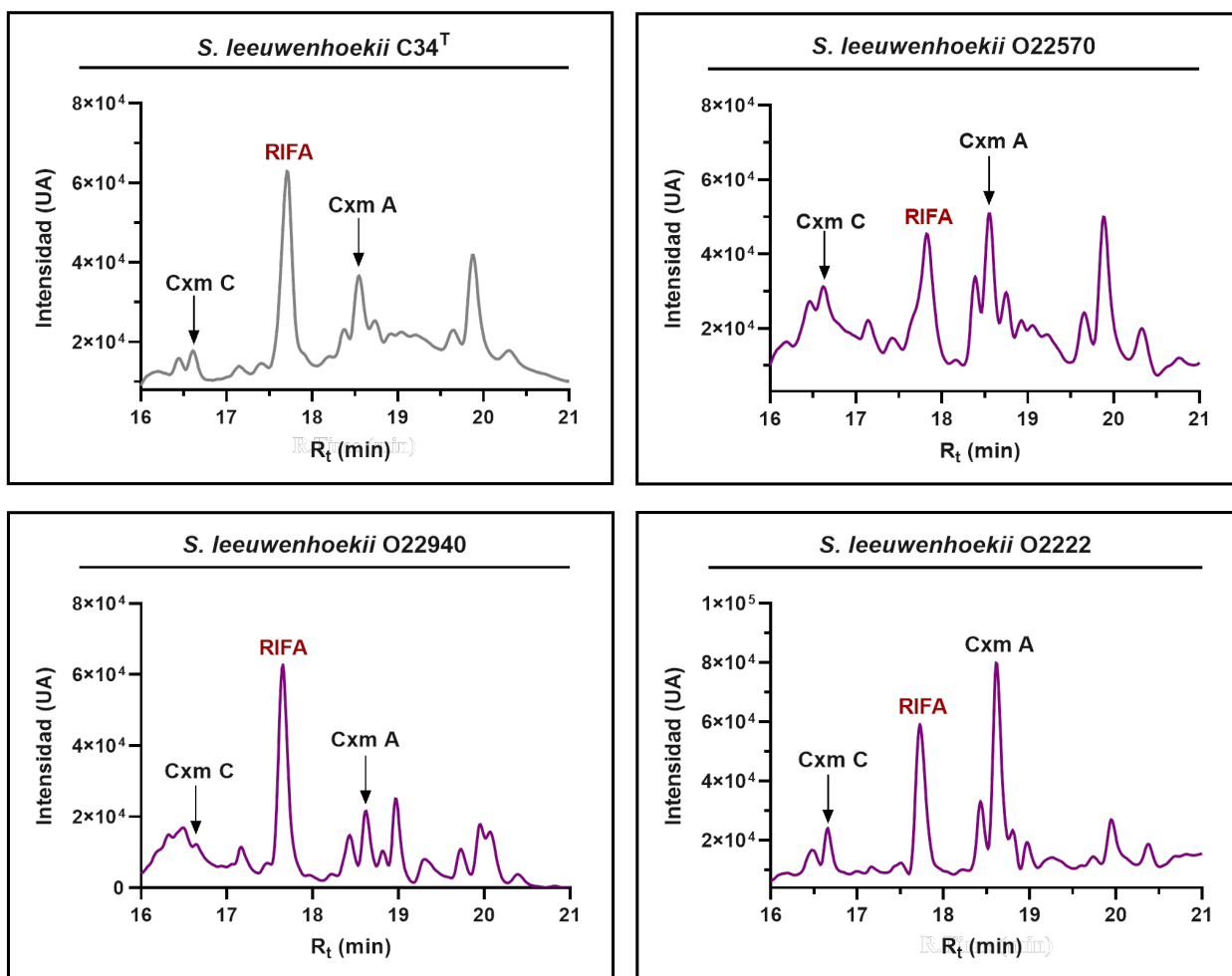


**Figura 22:** Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en extractos micelares de cultivos de producción concentrados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados, usando medio R3. En el eje de las abscisas se muestran los tiempos de retención (min) de cada pico detectado y la intensidad (UA) de la respuesta se representa en las ordenadas. En todas las muestras 270 nm fue usada como longitud de onda de detección. RIFA; estándar interno rifampicina y Cxm, chaxamicina.



**Continuación de Figura 22:** Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en extractos micelares de cultivos de producción concentrados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados, usando medio R3. En el eje de las abscisas se muestran los tiempos de retención (min) de cada pico detectado y la intensidad (UA) de la respuesta se representa en las ordenadas. En todas las muestras 270 nm fue usada como longitud de onda de detección. RIFA; estándar interno rifampicina y Cxm, chaxamicina.





**Continuación de Figura 22:** Cromatogramas representativos de la cuantificación de chaxamicinas A-C mediante HPLC en extractos micelares de cultivos de producción concentrados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y sus derivados, usando medio R3. En el eje de las abscisas se muestran los tiempos de retención (min) de cada pico detectado y la intensidad (UA) de la respuesta se representa en las ordenadas. En todas las muestras 270 nm fue usada como longitud de onda de detección. RIFA; estándar interno rifampicina y Cxm, chaxamicina.

En este trabajo se intentó desarrollar un método de cuantificación específico para el análisis de los extractos micelares, sin embargo, no fue posible concretar este objetivo al no contar con cantidades suficientes de los estándares de chaxamicinas A, B y C. Además, no lo consideramos un objetivo prometedor, ya que, usando como referencia la cuantificación aproximada que se realizó con el método empleado en los sobrenadantes, la producción de chaxamicinas totales en la cepa *wild-type* (A y C) es prácticamente nula, logrando un incremento máximo cercano al 30 % (Tabla 13), resultado muy inferior al obtenido para los sobrenadantes de los cultivos. Por este motivo, las fracciones micelares de los cultivos no se usaron para los posteriores experimentos.

**Tabla 13:** Producción total de chaxamicinas A y C ( $\mu\text{g/ml}$ ) en extractos micelares de cultivos de producción de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y las cepas recombinantes generadas en este trabajo

Cepas	Promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	0.3
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	0.2
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22940	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	0.1
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	0.3

Finalmente, en este trabajo se logró cualificar las chaxamicinas A, B y C presentes en los sobrenadantes de cultivos de producción de las diez cepas evaluadas, para lo cual se empleó un método estandarizado en este trabajo, basado en el uso del antibiótico rifampicina como estándar interno.

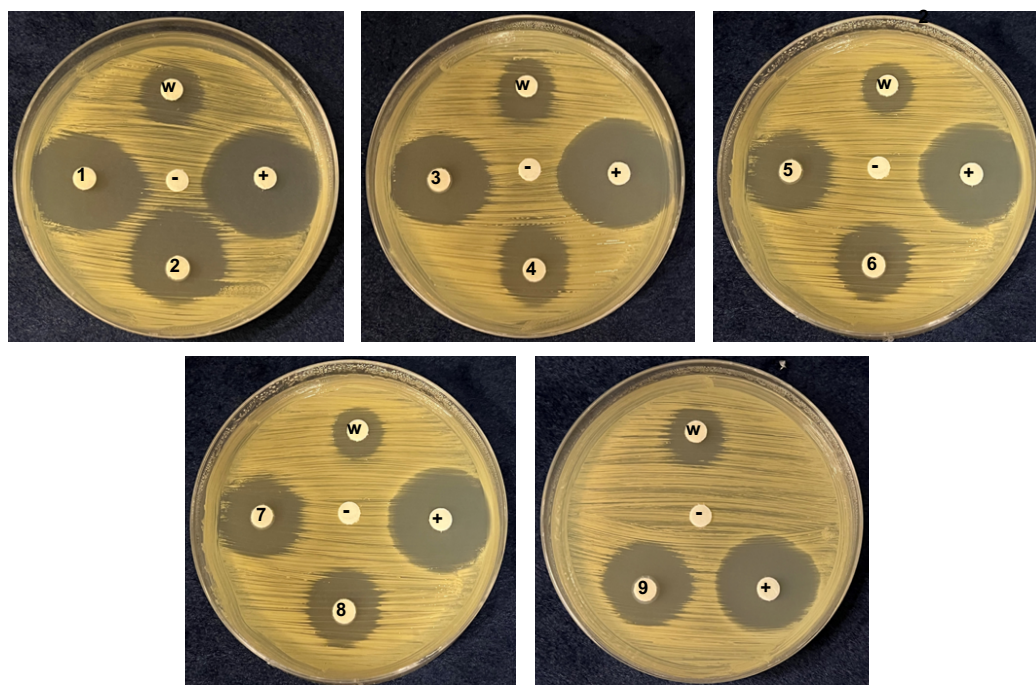
### 3.6 Ensayos de bioactividad contra *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*

Ensayos de bioactividad se llevaron a cabo con el fin de evaluar el posible efecto de las sobreexpresiones generadas en este trabajo, sobre la capacidad antibiótica de las mismas, usando como referencia la inhibición mostrada por la cepa *wild-type*. Se empleó el método de rutina difusión en agar empleando discos de sensibilidad antibiótica, basado en la técnica de Kirby-Bauer y recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos.

Las cepas empleadas para los bioensayos fueron *Micrococcus luteus* ATCC 4698 y *Bacillus subtilis* EC1524. Suspensiones de cultivos líquidos de estos microorganismos se sembraron en cada placa, a una OD<sub>625nm</sub> en el rango de 0.08-0.13, equivalente al estándar de turbidez de 0.5 McFarland. Las muestras evaluadas provenían del concentrado de los sobrenadantes de cultivos líquidos de cada una de las cepas derivadas de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> obtenidas en este trabajo y de la *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. Se empleó metanol 100 % como control negativo y el antibiótico rifampicina a una concentración de 5.0E-05 mol/L como control positivo. En cada placa se comparó la

inhibición del crecimiento generado por los mutantes evaluados con respecto al control de la cepa *wild-type* dispuesto en la misma placa. Las muestras provenientes de los extractos micelares no se usaron para estos ensayos, ya que como se explicó anteriormente, el título de chaxamicinas producido por la cepa *wild-type* y por los mutantes fue muy bajo, de ahí que fue desestimado.

Los efectos antibacterianos de los concentrados de sobrenadantes de cultivos líquidos sobre los microorganismos *M. luteus* (Figura 23) y *B. subtilis* (Figura 24), se observaron en la totalidad de los mutantes evaluados en este trabajo. Se detectó un incremento de la bioactividad de los mutantes de sobreexpresión, con respecto a la cepa *wild-type*. Con respecto a la bioactividad generada contra *M. luteus*, las zonas de inhibición muestran halos mayores a los observados para *B. subtilis* en todas las muestras y el control positivo.



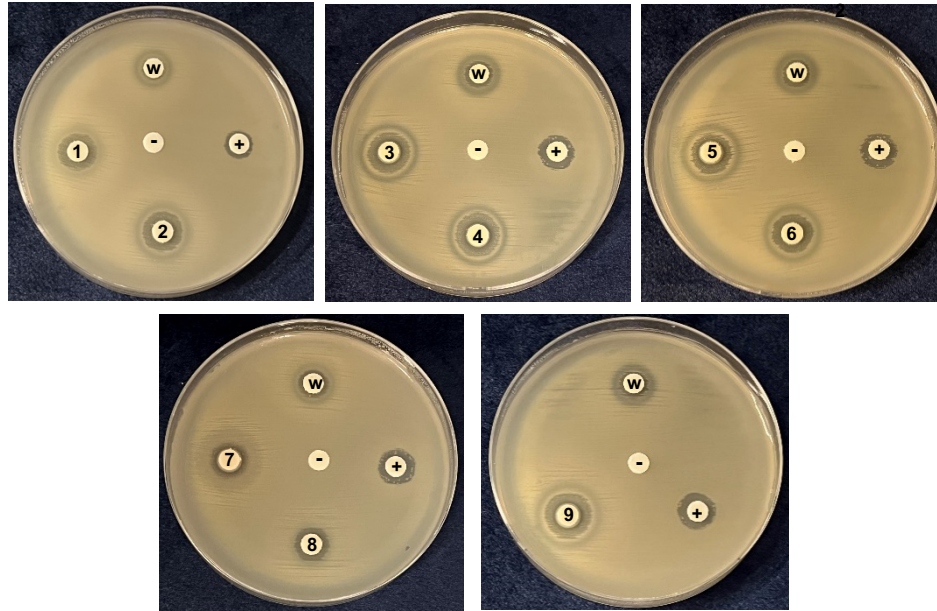
**Figura 23:** Ensayos de bioactividad contra *Micrococcus luteus* ATCC 4698 de los sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión generados, mediante el método de difusión en agar con discos de sensibilidad antibiótica. Se emplearon 10  $\mu$ l (150 mg/ml) de muestras provenientes de los concentrados de sobrenadantes de los cultivos de producción de 5 días de (w) la cepa y de los mutantes de sobreexpresión (1) *S. leeuwenhoekii* O22570; (2) *S. leeuwenhoekii* O22570 (3): *S. leeuwenhoekii* O11610; (4) *S. leeuwenhoekii* OACC; (5) *S. leeuwenhoekii* O16220; (6) *S. leeuwenhoekii* O41020; (7) *S. leeuwenhoekii* O11600; (8) *S. leeuwenhoekii* OP1P2 y (9) *S. leeuwenhoekii* O2222. Se empleó como (-) control negativo 10  $\mu$ l de metanol 100 % y como (+) control positivo 10  $\mu$ l de una solución del estándar rifampicina a 5.0E-05 mol/L.

La Tabla 14 muestra el porcentaje de incremento de los halos de inhibición de los mutantes con respecto al de cada una de las placas, por separado. La comparación solamente se realizó entre los mutantes y el *wild-type* dentro de la misma placa. Todos los mutantes mostraron un incremento en la bioactividad, variando entre un 54-81 %, con excepción de los mutantes *S. leeuwenhoekii* OP1P2 y *S. leeuwenhoekii* OACC que solo tuvieron incrementos de un 20 % más que el *wild-type*. Los mutantes con mayor grado de actividad anti-bactericida fueron *S. leeuwenhoekii* O11610, *S. leeuwenhoekii* O22570 y *S. leeuwenhoekii* O11600.

**Tabla 14:** Evaluación de la actividad antibacteriana de las muestras de sobrenadantes de los cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión, contra *Micrococcus luteus* ATCC 4698. Los valores muestran el porcentaje de incremento de la actividad antibacteriana de los mutantes, con respecto al *wild-type*.

Cepas	% inhibición en 10 µl muestra
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	56
<i>S. leeuwenhoekii</i> O22570	81
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11610	69
<i>S. leeuwenhoekii</i> OACC	20
<i>S. leeuwenhoekii</i> O16220	60
<i>S. leeuwenhoekii</i> O41020	40
<i>S. leeuwenhoekii</i> O11600	75
<i>S. leeuwenhoekii</i> OP1P2	20
<i>S. leeuwenhoekii</i> O2222	54

Como se muestra en la Figura 24, al emplear *B. subtilis* como microorganismo indicador en los ensayos de bioactividad, se observa una moderada inhibición de las muestras provenientes de los sobrenadantes de los mutantes y del *wild-type*, mostrando una inhibición igual o ligeramente mayor que la del *wild-type*. Lo mismo se observó para el control positivo rifampicina. En el caso de *B. subtilis* no se realizó el cálculo de la diferencia en porcentaje, entre los mutantes evaluados con respecto a la cepa *wild-type*, porque las diferencias eran mínimas.



**Figura 24:** Ensayos de bioactividad contra *Bacillus subtilis* EC1524 de los sobrenadantes de cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión generados, mediante el método de difusión en agar con discos de sensibilidad antibiótica. Se emplearon 10  $\mu$ l (a 150 mg/ml) de muestras provenientes de los concentrados de sobrenadantes de los cultivos de producción de 5 días de (w) la cepa *wild-type* y de los mutantes de sobreexpresión (1) *S. leeuwenhoekii* O16220; (2) *S. leeuwenhoekii* O41020 (3): *S. leeuwenhoekii* O11610; (4) *S. leeuwenhoekii* O11600; (5) *S. leeuwenhoekii* O22570; (6): *S. leeuwenhoekii* O22940; (7) *S. leeuwenhoekii* OP1P2; (8) *S. leeuwenhoekii* PACC y (9) *S. leeuwenhoekii* O2222. Se empleó como (-) control negativo 10  $\mu$ l de metanol 100 % y como (+) control positivo 10  $\mu$ l de una solución del estándar rifampicina a 5.0E-05 mol/L

## 4. Discusión

### 4.1 Selección y generación de cepas recombinantes derivadas de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>

Un GSM de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> fue diseñado, dado el interés por entender el metabolismo de esta cepa (Razmilic *et al.*, 2018). En este sentido, nueve modificaciones genéticas fueron seleccionadas para evaluar *in vivo* su efecto sobre la producción de los metabolitos especializados chaxamicinas, principalmente en el metabolismo del carbono. Ocho de las nueve modificaciones seleccionadas fueron predichas por el modelo, mientras que la novena modificación (*sle39830* y *sle27500*) fue escogida como control; ya que a pesar de estar asociada a la formación de un precursor de chaxamicinas, no fue predicha como objetivo de sobreproducción por el modelo. La mayoría de los genes seleccionados están involucrados en la ruta de las PP y en el metabolismo del acetil-CoA.

La estrategia empleada fue la sobreexpresión de genes endógenos de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> bajo el control de promotores fuertes constitutivos en un plásmido integrativo. Los clonamientos se realizaron por Gibson Assembly y el método tradicional basado en enzimas de restricción y posterior ligación con T4 ligasa. El empleo de enzimas de restricción como método inicial fue engorroso, debido a la dificultad de obtener fragmentos de DNA completamente digeridos, requiriendo una serie de intentos para obtener una tasa de positividad adecuada.

Dado lo anterior, el resto de las modificaciones genéticas se realizaron empleando la técnica de Gibson Assembly. Esta herramienta molecular, además de no depender de sitios de restricción, tiene claras ventajas sobre el método tradicional, ya que permite realizar el ensamble y ligación en una sola reacción. La sólida eficiencia de esta técnica proporciona clones con éxito, tanto para construcciones simples como más desafiantes; además es flexible, ya que las directrices de diseño permiten el ensamblaje en cualquier vector de elección (Gibson *et al.*, 2009). Como era de esperar, los clonamientos realizados usando Gibson Assembly fueron altamente eficientes, obteniéndose transformantes positivos inmediatamente.

En algunas de las cepas derivadas de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> se evidenció la presencia de mutantes espontáneos, infección por bacteriófagos, así como grandes zonas de inhibición del crecimiento sin aparente explicación. Especulamos que el incremento de la actividad de los genes que codifican para esas enzimas generó alguna alteración en el metabolismo de los mutantes correspondientes, afectando el desarrollo fisiológico de las mismas. Finalmente, todos los blancos de sobreexpresión fueron exitosamente clonados bajo promotores constitutivos fuertes en sus respectivos plásmidos integrativos, para luego ser movilizados por conjugación intergénica a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, rindiendo los mutantes finales.

#### **4.1.1 Empleo de los promotores *ermE*<sup>\*</sup> y *kasO*<sup>\*</sup> como estrategia de sobreexpresión**

Con respecto a la estrategia de obtención de los diferentes mutantes de sobreexpresión utilizada en este trabajo, el empleo de promotores fuertes constitutivos se fundamenta en el amplio conocimiento sobre el papel crítico de los mismos en el control de la expresión génica.

El control preciso de la expresión génica permite equilibrarla en las vías metabólicas y construir circuitos genéticos compatibles. Los promotores constitutivos se usan ampliamente en estudios de expresión génica en actinomicetos, incluidos estudios sobre complementación de mutaciones, sobreexpresión de genes y expresión heteróloga de genes y BGCs (Myronovskyi & Luzhetskyy, 2016). En este sentido, la fuerza del promotor es un factor limitante y clave en los sistemas de expresión.

Hasta el momento, *ermE*<sup>\*</sup> y *kasO*<sup>\*</sup> encabezan la lista de los promotores empleados en actinomicetos (Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021). Pese al descubrimiento de nuevos promotores fuertes constitutivos de mayor potencia, el promotor *ermE*<sup>\*</sup> (*ermEp*<sup>\*</sup>) continúa siendo el más reconocido en este género. *ermE*<sup>\*</sup> es un promotor constitutivo del gen de resistencia a la eritromicina (*ermE*) de *Streptomyces erythraeus*, donde el asterisco significa la presencia de una mutación de un par de bases (Bibb *et al.*, 1986). Por su parte, *kasO*<sup>\*</sup>, es un potente promotor (*kasOp*<sup>\*</sup>), diseñado mediante la eliminación de los sitios de unión de *ScbR* y *ScbR2* del promotor de *kasO* (SCO6280) en *S. coelicolor* (Wang *et al.*, 2013). *kasOp*<sup>\*</sup> es activo en una variedad de *Streptomyces* spp. a través de las polimerasas de ARN endógenas y el factor  $\sigma$  housekeeping, *HrdB* (Takano *et al.*, 2005).

En la presente investigación, inicialmente se trabajó con *ermEp*<sup>\*</sup>, sin embargo, una cuantificación exploratoria mediante HPLC de los mutantes *S. leeuwenhoekii* O41020, *S. leeuwenhoekii* O16220 y *S. leeuwenhoekii* OACC arrojó bajos niveles de detección de chaxamicinas. Esta cuantificación se realizó a partir de cultivos de producción en medio

de cultivo ISP2m, empleando las condiciones de separación reportadas para la identificación por HPLC-MS/MS de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivado en el mismo medio (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015).

Considerando lo anterior, se optó por el cambio del promotor *ermE\** al *kasOp\** para las siguientes sobreexpresiones. La decisión se basó en los estudios que reportan una significativa superioridad en la potencia de *kasOp\** con respecto a *ermE\**, evidenciando incrementos transcripcionales en el rango 5 % (*ermEp\**) a 100 % (*kasOp\**) (Moore *et al.*, 2021) y aumentos en el rango de dos a diez veces del metabolito secundario actinorrodina, en *S. coelicolor* (Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2021).

A pesar de ser ampliamente usado para la sobreexpresión de genes, *ermEp\** no ha sido completamente caracterizado y se han obtenido resultados negativos con respecto al incremento de la producción de algunos metabolitos secundarios en *Streptomyces* (Zhou *et al.*, 2011), lo cual no se ha observado con el promotor *kasO\**, debido al conocimiento de su funcionamiento y regulación (Takano *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013).

Al aumentar la potencia del promotor fuerte constitutivo que controlara los genes a sobreexpresar, esperábamos un incremento en la actividad de los mismos y por consiguiente un aumento en la producción de chaxamicinas. Efectivamente, una importante superioridad en la producción de chaxamicinas en los mutantes clonados bajo *kasOp\** fue observada, con respecto a los clonados bajo el control de *ermEp\**, consecuente con lo esperado.

Inesperadamente, el mutante *S. leeuwenhoekii* O11610, a pesar de tener *ermE\** como promotor fuerte constitutivo fue el segundo mutante que mostró un mayor incremento en la producción de los metabolitos de interés. El gen *sle11610* que codifica para una transaldolasa que es parte de la ruta de las pentosas fosfato, es importante en el redireccionamiento de precursores del metabolismo central requeridos en las vías anabólicas y catabólicas, lo que garantiza un metabolismo equilibrado entre el crecimiento celular y la formación de metabolitos secundarios. Dada la importante contribución del gen *sle11610* al metabolismo microbiano, es probable que un pequeño incremento en la actividad del promotor *ermE\** fuese suficiente para aumentar el flujo de la reacción catalizada por el gen *sle11610*, redireccionándola hacia los procesos biosintéticos característicos del metabolismo secundario, en este caso, hacia la producción de chaxamicinas. Alteraciones metabólicas similares han sido reportadas anteriormente (Ceroni *et al.*, 2015; Myronovskyi *et al.*, 2016; Tan & Liu, 2017).

Otro aspecto a considerar es que, aunque un promotor realmente fuerte y constitutivo debería impulsar la expresión génica, constantemente a lo largo de toda la fase de crecimiento, se conoce que las actividades de ciertos promotores constitutivos no son



constantes y pueden variar significativamente bajo condiciones de cultivo o etapas de crecimiento particulares. Se ha demostrado que inesperadamente, el promotor constitutivo generalmente aceptado, *ermE\**, no se expresa constantemente durante el crecimiento, alcanzando su máxima actividad durante la fase de crecimiento exponencial, para luego declinar, mostrando una actividad dependiente del crecimiento (Wang *et al.*, 2013). Es posible que la sobreexpresión del gen *sle11610* generase alguna alteración en la disponibilidad de precursores destinados al crecimiento, y por ende cambios en la actividad de *ermEp\**. No obstante, en este trabajo no se observaron diferencias visuales en el crecimiento de los mutantes en los cultivos de producción de chaxamicinas. Realizar una cinética de crecimiento de los cultivos de producción, podría aportar información sobre esta teoría.

Con respecto a las diferencias generales, observadas en la producción de los genes clonados en los plásmidos integrativos bajo el control de *kasOp\** y *ermEp\**, especulamos que pudo estar condicionada por el comportamiento de la expresión de ambos promotores en las condiciones de cultivo usadas en el presente trabajo.

Un reporte previo evaluó el efecto del control de la expresión génica de ambos promotores sobre la producción del antibiótico actinorrodina, empleando medios de fermentación diferentes, el medio líquido mínimo suplementado (SMM, por sus siglas en inglés), que contiene polietilenglicol, glicina, antiespumante, entre otros y el medio R2YE (Kieser *et al.*, 2000), este último incluye los componentes del medio R3 (usado en este trabajo). Como era de esperar, la producción de actinorrodina fue significativamente mayor en la cepa que contenía el plásmido de sobreexpresión basado en *kasOp\** en ambos medios de cultivo. De este reporte, es importante destacar que los niveles de *ermEp\** en el medio R2YE fueron bajos y significativamente menores que los obtenidos en el medio SMM (Wang *et al.*, 2013). Por lo que sería interesante la evaluación del medio SMM en los mutantes generados en este trabajo.

Si extrapolamos los resultados del estudio mencionado a los obtenidos en este trabajo, con respecto a la producción de chaxamicinas, emplear el medio de cultivo R3 para la producción de chaxamicinas pudo ser una ventaja para el incremento de la actividad del promotor *kasO\**, pero una clara desventaja para el comportamiento de los niveles de expresión del promotor *ermE\**. Ensayos de qPCR deben realizarse para determinar los niveles de expresión de ambos promotores en el tiempo.

A pesar de la evidente superioridad en el título de chaxamicinas en aquellos mutantes clonados bajo la expresión de *kasOp\**, sobre aquellos controlados por *ermEp\**, se observaron diferencias importantes en la producción total entre los mutantes bajo la acción de *kasOp\**, lo que esperamos, se deba principalmente a la contribución de cada gen al metabolismo. En este sentido, especulamos que las posibles alteraciones en el

metabolismo, generadas por cada mutación propiciara cambios en la cinética de crecimiento y por tanto diferencias en los niveles de expresión del promotor. Lo anterior se sustenta, ya que, de manera similar a *ermEp\**, se ha demostrado que la expresión de *kasOp\** y del factor  $\sigma$  *housekeeping*, *HrdB* en *Streptomyces*, depende de la fase de crecimiento (Craney *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2013).

Si quisiéramos impulsar la expresión génica constantemente a lo largo de una fase de crecimiento se necesitaría de un promotor multiplexor que pueda ser transcrito continuamente por diferentes factores  $\sigma$ . El (los) promotor (es) de ARNr en *S. coelicolor* puede ser un promotor de este tipo, ya que tienen cuatro sitios de inicio de la transcripción, probablemente iniciados por diferentes combinaciones de factor  $\sigma$  y ARN polimerasa central (van Wezel *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos sugieren que la estrategia de incorporación de un promotor fuerte constitutivo, a pesar de ser efectiva para incrementar la expresión de los genes de interés, puede variar en las diferentes cepas, independientemente de cuan fuerte sea; lo cual puede conllevar a la obtención de resultados inesperados. Resultados similares se han reportado en la evaluación de la actividad del inmunosupresor FK506 en *Streptomyces tsukubaensis* (Wu *et al.*, 2021).

## **4.2 Detección y cuantificación de chaxamicinas mediante HPLC**

### **4.2.1 Rifampicina como estándar interno y desarrollo de un método de cuantificación de chaxamicinas**

La elección del método de detección y cuantificación adecuado en HPLC es crucial, debido a la diversidad de compuestos naturales presentes en las muestras de origen microbiano, así como a la ausencia de una técnica única establecida para la detección eficiente de este tipo de analitos.

En este trabajo se desarrolló un método cromatográfico para la detección y cuantificación simultánea de las chaxamicinas A, B y C. Temperatura, tiempo de corrida, gradiente de elución,  $\lambda$  de detección y composición de las fases móviles empleadas fueron los aspectos evaluados para seleccionar las mejores condiciones de separación de los compuestos de interés usando HPLC.

La poca disponibilidad de los estándares de chaxamicinas requirió el empleo alternativo de un estándar interno, en este caso, rifampicina. Este antibiótico fue seleccionado ya que el clúster biosintético de chaxamicinas fue predicho bioinformáticamente por homología con el clúster de biosíntesis de las rifamicinas en *Amycolatopsis mediterranei*,

familia de antibióticos a la cual pertenece la rifampicina, dada su similitud estructural (Castro *et al.*, 2015). La incorporación de este estándar a las muestras a cuantificar añadió complejidad a la separación de los analitos de interés.

Un estándar interno en química analítica es una sustancia química que se agrega en una cantidad constante a las muestras, al blanco y a los estándares de calibración en un análisis químico (Cuadros-Rodríguez *et al.*, 2007). Un estándar interno es normalmente usado para la calibración, trazando la relación entre la señal del analito y la señal del estándar interno, como una función de la concentración del estándar del analito. Normalmente se ejecuta solo, como una muestra y, por lo general, a diferentes concentraciones, por lo que puede generar una curva estándar (Zenkevich & Makarov, 2007). El patrón interno a utilizar debe proporcionar una señal que sea similar a la señal del analito en la mayoría de los aspectos, pero lo suficientemente diferente para que el instrumento pueda distinguir fácilmente las dos señales (Skoog *et al.*, 1998).

Los estándares externos no corrigen las pérdidas que pueden ocurrir durante la preparación de la muestra, como extracción, centrifugación, evaporación, etc. Los patrones internos corrigen estos aspectos, si se agregan al comienzo de la preparación de la muestra (Pauls & McCoy, 1986). En nuestro caso, la adición del estándar interno fue al inicio de la preparación, debido a la serie de pasos necesarios, previo a la obtención de la muestra lista para ser inyectada en el sistema cromatográfico.

Según la Guía de Medición de Incertidumbre (Taylor & Kuyatt, 1994), la incertidumbre de la medición depende de la combinación adecuada de varias fuentes de incertidumbre y por lo tanto del modelo matemático utilizado para calcular el analito apropiado en cuestión, a partir de una curva de calibración con patrón externo o interno (Bonney *et al.*, 2002; Konieczka & Namieśnik, 2010). Una comparación del uso de calibración estándar externa e interna en HPLC confirmó la importancia de la estandarización interna, ya que permitió corregir de manera más efectiva las principales fuentes de incertidumbre, con respecto a la calibración con estándar externo (Cruz De Oliveira *et al.*, 2010).

Muchos son los estudios que usan como método de cuantificación, la relación entre la respuesta del estándar interno y el estándar externo para determinar el factor de respuesta (Isabel Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez, 1993; Agnew *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015; Müller-Sepúlveda *et al.*, 2016; Kuppusamy *et al.*, 2018). No obstante, cuando se trata de compuestos biológicos no disponibles comercialmente es usual no contar con la disponibilidad del estándar de referencia, de ahí que se emplea un estándar interno para la cuantificación. En ocasiones, si se pretende detectar varios compuestos simultáneamente en una muestra biológica compleja, y no se cuenta con el estándar de referencia para cada uno de los analitos, se usa como estándar interno uno de ellos (Balsevich *et al.*, 2009; Stavriani *et al.*, 2017).

En este trabajo, el desarrollo del método cromatográfico se realizó empleando soluciones estándares de rifampicina a diferentes concentraciones conocidas, y de la muestra proveniente del concentrado de sobrenadante celular de la cepa *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivada en medio de cultivo R3. El estudio preliminar se centró en evaluar las condiciones cromatográficas empleadas para la identificación de chaxamicinas por HPLC-MS/MS en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivada en medio de cultivo ISP2m (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015).

No se logró la separación de los picos de chaxamicinas usando el método previamente reportado, lo cual fue inesperado si consideramos las propiedades químicas de los analitos de interés. Las chaxamicinas tienen un pKa de 5.6 y el ácido fórmico a 28 mM, previamente reportado tiene un pH de 3.0, por lo que se esperaba que posterior a la inyección del sobrenadante de cultivo en la columna, las chaxamicinas estuviesen en un estado completamente no ionizado; y por lo tanto tuviesen una alta afinidad por la columna de fase inversa, eluyendo fácilmente con metanol 100 %. Sin embargo, los picos correspondientes a las chaxamicinas mostraron una resolución muy baja con este método. La que empeoró tras añadir rifampicina. Dado estos resultados, un método cromatográfico fue desarrollado para la separación y cuantificación de chaxamicinas en sobrenadantes de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> empleando R3 como medio de cultivo.

Si no se cuenta con la disponibilidad de columnas para evaluar el perfil cromatográfico inicial de las muestras, la mejora de las separaciones puede lograrse ajustando la composición de las fases móviles. Diferentes proporciones de los disolventes isopropanol, acetonitrilo y metanol se evaluaron en la fase orgánica B. La mejor resolución de los picos al combinar metanol-acetonitrilo en una proporción 2:8, sugiere que la disminución de la polaridad de la fase orgánica contribuye a una mejora en la selectividad. Dado lo anterior, se seleccionó para continuar el proceso de separación.

Por otra parte, posterior a la instalación de un detector de arreglo de diodos, la evaluación de diferentes fases móviles acuosas llevó a la selección de ácido fórmico 28 mM. El empleo de esta fase móvil resultó en una mejora de la resolución y definición de la zona donde eluyen las chaxamicinas, permitiendo una separación del patrón interno rifampicina.

Además de la evidente complejidad que supone separar cromatográficamente cuatro analitos tan similares estructuralmente, la determinación del procedimiento de separación por HPLC para el análisis cuantitativo de chaxamicinas fue particularmente complicado por varios aspectos que se mencionan a continuación. En principio se sabe, que los métodos de separación de varios compuestos dentro de una misma muestra biológica son bastantes complejos, debido a la diversidad de estructuras químicas de las moléculas

presentes, dificultando su separación de la matriz biológica. En nuestro caso, el perfil cromatográfico que se observaba en las muestras fue altamente complejo, lo cual era esperado, ya que sabemos que *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> produce otros metabolitos especializados como higromicina A, 5"-dihidrohigromicina A, chaxalactinas A, B, C y desferrioxamina E (Rateb *et al.*, 2011a). Especulamos, que ese pudo ser el motivo por el cual la evaluación de los ampliamente descritos métodos analíticos con columna C<sub>18</sub> de fase reversa para separar rifampicina y sus derivados no arrojó buenos resultados.

Como se ha mencionado anteriormente, se tenía poca cantidad de los estándares de chaxamicinas, los cuales fueron usados para determinar los picos correspondientes a cada una en las muestras. Sin embargo, dado el alto número de condiciones testeadas, fue necesario guiarse por los patrones de picos detectados en condiciones previas para determinar los picos correspondientes a chaxamicinas en los análisis posteriores. Esto en ocasiones condujo a cometer errores, ya que la complejidad de los sistemas cromatográficos en conjunto con la variación intencional de una condición del sistema, a menudo puede resultar en el cambio del orden de elución de los compuestos.

Como complemento a la identificación de los picos en cada modificación del método, se emplearon los espectros de absorción UV de cada chaxamicina y de rifampicina. Los espectros UV de las chaxamicinas son muy similares, lo que hacía más difícil la distinción entre ellas. En el caso del estándar interno rifampicina, el espectro de absorción era fácil de distinguir del resto de los analitos.

Adicionalmente, los resultados cromatográficos de las corridas de los estándares de cada chaxamicina a una concentración desconocida evidenciaron que, además de la presencia del pico principal, correspondiente al estándar, se observaron varios picos de menor magnitud cercanos. Dado lo anterior, es probable que estos compuestos sean susceptibles a algún grado de fragmentación, lo que puede ocurrir también en las muestras procedentes de los concentrados de sobrenadantes de los cultivos de producción de los mutantes de sobreexpresión, generando co-elución de picos muy cercanos y haciendo más difícil la distinción entre ellos. Especulamos que el uso de 40 °C como la temperatura de corrida podría generar algún tipo de descomposición en los estándares, si esto fuera correcto, el mismo efecto se observaría en las muestras.

Otro aspecto para evaluar fue la preparación de las muestras, la cual incluía, pesar, aforar, vortex, sonicar, centrifugar y filtrar. Todos los pasos mencionados son fuentes de propagación de error, lo que complicada obtener una reproducibilidad en los resultados cromatográficos de las réplicas biológicas y técnicas. Adicionalmente, las muestras preparadas tenían una estabilidad de aproximadamente 24 h a 4 °C, luego del cual precipitaban. Dado estos aspectos, una preparación constante de muestras complejas fue requerida para dar continuidad al proceso de elaboración del método de

cuantificación. A lo anterior, se suma la larga duración de los métodos ya que, luego de eluir los cuatro analitos de interés, era necesario garantizar la elución del resto de los compuestos retenidos en la columna.

El desarrollo del método cromatográfico requirió un especial cuidado con respecto al pH de la fase móvil acuosa, ya que la rifampicina no es muy estable químicamente en ambientes ácidos, degradándose por hidrólisis del enlace imina azometina para liberar el compuesto 1-amino-4-metilpiperazina (Prankerd *et al.*, 1992). A partir de los análisis de HPLC, durante la estandarización se pudo ver claramente una disminución progresiva de la altura del pico de rifampicina en el tiempo. Especulamos que la causa fue la descomposición química catalizada por la fase acuosa (Pelizza *et al.*, 1977), motivo por el cual se tuvo que monitorear la estabilidad de la rifampicina en diferentes pH y en diferentes tiempos, llegando a obtener una estabilidad máxima usando como fase acuosa ácido fórmico 28 mM, usada habitualmente por su capacidad tamponante de mantener pH estable entre 2.5-4.8 (Jin *et al.*, 2008).

En resumen, la optimización de las condiciones de los cultivos de producción, del procesamiento de las muestras y el desarrollo de un método de cuantificación con estandarización interna, combinada con análisis HPLC y detección UV nos permitió determinar con éxito la presencia y la concentración de las chaxamicinas A, B y C. Esperamos que este método abra las puertas a trabajos posteriores donde se involucren las chaxamicinas, u otras ansamicinas, similares estructuralmente.

### **4.3 Comparación de perfiles metabólicos mediante HPLC-MS/MS**

La técnica de HPLC-MS/MS es una herramienta precisa y sensible, ampliamente usada en la identificación de compuestos, incluyendo metabolitos especializados de origen bacteriano, a partir de los patrones de fragmentación característicos de cada compuesto y su relación masa/carga (m/z).

En el presente trabajo se identificaron por primera vez las chaxamicinas A, B y C en la cepa *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> usando medio de cultivo R3. En un estudio previo, Castro *et al.* (2015) reportaron la identificación de las especies de chaxamicinas A-D en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> usando medio de cultivo ISP2m y en el huésped heterólogo *S. coelicolor* M1650 usando medio R3 (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015). A diferencia del reporte mencionado, en la presente investigación no se contaba con el estándar de chaxamicina D, por lo que no se pudo identificar esta especie.

En nuestra investigación también se identificaron las chaxamicinas A-C en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivada en medio ISP2m como control (resultados no

mostrados). En comparación con el medio R3, en el medio ISP2m la resolución de los picos e intensidad de la respuesta fue superior. Lo anterior se puede deber a que las muestras tuvieron diferentes procedimientos. Específicamente, la principal diferencia fue que las muestra de medio R3 estaban concentradas, mientras que las muestras de ISP2m no lo estaban. Adicionalmente, el medio R3 tiene más componentes, es por estos motivos que el procesamiento por HPLC-MS/MS de esas muestras tuvo menor resolución para la identificación de los picos de chaxamicinas.

Por otra parte, cuando se realizó la cuantificación por HPLC, se necesitó concentrar todas las muestras tanto de ISP2m como de R3. La utilización de las muestras de ISP2m concentrado no fue posible, dada la heterogeneidad y viscosidad de las mismas (ver sección 3.3). Por lo que se trabajó con las muestras concentradas de R3, y se desarrolló un método de cuantificación para obtener la separación de los picos de chaxamicinas.

#### **4.4 Evaluación y análisis de la producción de chaxamicinas en sobrenadantes de cultivo celular de los mutantes generados**

Las chaxamicinas son productos naturales pertenecientes a la familia de las ansamicinas, con propiedades antibióticas y anticancerígenas sintetizadas por *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. La cuantificación de estos metabolitos en cada una de las cepas mutantes generadas, así como de la cepa *wild-type*, se realizó a partir de concentrados de sobrenadante celular y extractos micelares, provenientes de cultivos celulares en medio líquido R3 en las condiciones descritas anteriormente.

##### **4.4.1 Influencia de la sobreexpresión de los genes *sle11600*, *sle11610* y *sle41020* en el incremento del *pool* de AHBA**

- Sobreexpresión del gen *sle41020*:

En *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el AHBA es la unidad inicial involucrada en la biosíntesis de chaxamicinas. A su vez, la UDP-glucosa es el precursor que inicia la ruta de biosíntesis de AHBA (Figura 25) (Rateb *et al.*, 2011a). El análisis *in silico* del GSM /MR1007 indica que la principal fuente de obtención de UDP-glucosa es la reacción rx1367 (KEGG: r00289, EC: 2.7.7.9), catalizada por el gen *sle41020*, el cual codifica para una UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (*galU*). Esta enzima cataliza la conversión reversible de glucosa-1-fosfato a UDP-glucosa. Consecuentes con esta predicción, decidimos aumentar la reserva intracelular de UDP-glucosa, favoreciendo su biosíntesis mediante la sobreexpresión del gen *sle41020*, rindiendo la cepa *S. leeuwenhoekii* O41020.

Anteriormente, la expresión del gen homólogo, *galU*, en *A. mediterranei* U32, asociado a la biosíntesis de rifamicina ha sido incrementada por la incorporación de nitrato al medio de cultivo (Shao *et al.*, 2015); sin embargo, pocos han sido los estudios que reportan el efecto de la sobreexpresión de esta enzima bajo un promotor fuerte constitutivo sobre la producción de AHBA. Dado lo anterior, modificar la expresión de este gen resultaba interesante.

En este trabajo, la producción total de chaxamicinas del mutante *S. leeuwenhoekii* O41020 superó al *wild-type* en un 100 %. Usando el mismo promotor fuerte *ermE\**, un resultado similar se obtuvo en *Actinosynnema pretiosum*, sobreexpresando el gen homólogo *asm0628 (ugp)* y obteniéndose una mejora del 20 % de la producción del antibiótico ansamitocina P-3, en comparación con la cepa de control (Zhou *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2016b). Al igual que las chaxamicinas, la ansamitocina P-3 es un policétido tipo ansamicina y tiene al AHBA como unidad iniciadora de su biosíntesis (Chen *et al.*, 1999).

Si consideramos que la UDP-glucosa es un metabolito altamente multifuncional, esencial para una rica variedad de procesos, como la osmotolerancia y el control del ciclo celular bacteriano, es factible suponer que la misma se estaría desviando a otros destinos metabólicos y por consiguiente no estaría tributando a la biosíntesis de AHBA. Un análisis similar se da con la glucosa-1-fosfato, la cual es precursor en la biosíntesis de polímeros a base de glucosa y de la ruta glucolítica; por lo que independientemente del incremento del flujo de esta reacción en particular, es probable que la disponibilidad del sustrato esté limitando la velocidad de esta. En este sentido, varios autores reportan que la manipulación del nodo metabólico (glucosa-6-fosfato/glucosa-1-fosfato/UDP-glucosa) es clave para lograr un incremento significativo de UDP-glucosa, ya que conecta el metabolismo primario y secundario (Zabala *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2014, 2016b, 2016a; Liu *et al.*, 2020).

Uno de los enfoques más estudiados ha sido la sobreexpresión de la enzima fosfoglucomutasa (*pgm*), la cual cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato. Se ha observado que esta modificación incrementa el *pool* de glucosa-1-fosfato, acompañada de la disminución del *pool* de glucosa-6-fosfato, lo que sugiere que la glucosa-6-fosfato se transformó eficientemente en glucosa-1-fosfato, generando altos niveles de UDP-glucosa. Un aumento significativo de la biosíntesis de mitramicina se observó cuando el gen *pgm* de *S. coelicolor* se sobreexpresó en *Streptomyces argillaceus* (Zabala *et al.*, 2013). Asimismo, en *A. pretiosum*, la biosíntesis de ansamitocina P-3 aumentó aproximadamente un 15 % en comparación con la cepa de control. Dobles mutantes de sobreexpresión (*ugp* y *pgm*) han generado un 40 % de aumento de producción de este antibiótico (Fan *et al.*, 2016b).



En *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle66460* codifica para un fosfoglucomutasa, con un 90 % de homología con el gen *SCO7443* (EC:5.4.2.2) de *S. coelicolor*. Consideramos que, canalizar la glucosa-6-fosfato hacia la síntesis de UDP-glucosa mediante la sobreexpresión del gen *pgm* en el mutante *S. leeuwenhoekii* O41020 podría tributar a un mejor resultado.

Por otra parte, en el caso de las ansamitocinas, se ha encontrado que la transcripción génica, la actividad enzimática de *pgm*, así como los niveles de glucosa-6-fosfato y glucosa-1-fosfato son variables en dependencia de las condiciones de cultivo, lo que condiciona la forma de asimilación de las fuentes de carbono, y por consiguiente la activación incrementada de una vía metabólica sobre otra (Hasan *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2014). Lo anterior puede generarse producto de un efecto de modulación equilibrada entre los procesos anabólicos y catabólicos con el objetivo de mantener un flujo elevado de carbono a través de las vías involucradas. Es probable que este efecto ocurra en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, sin embargo, la mayoría de los genes involucrados en la regulación metabólica de esta cepa son desconocidos.

Adicionalmente, es importante considerar que la glucosa-6-fosfato no solo participa en la vía de biosíntesis de UDP-glucosa, sino que desempeña un papel importante en el control del flujo central de carbono distribuido en diferentes vías, incluida la vía glucolítica y la vía de las PP (Fan *et al.*, 2016b, 2016a). Por lo que la reducción del nivel de glucosa 6-fosfato podría implicar una reducción del flujo de carbono a través de la vía glucolítica y consecuentemente una disminución en la biosíntesis de acetil- y malonil-CoA, ambos requeridos para la biosíntesis de chaxamicinas. Reducciones de concentración del 25 % para malonil-CoA y 18 % en el caso del acetil-CoA fueron detectadas por Zabala *et al.*, (2013), luego de la sobreexpresión de enzimas que desviaban el flujo de carbono hacia la producción de UDP-glucosa.

Otra alternativa para manipular el nodo (glucosa 6-fosfato/glucosa 1-fosfato/UDP-glucosa) ha sido el bloqueo de la formación de carbohidratos de almacenamiento a partir de la inactivación del gen que codifica para la ADP-glucosa pirofosforilasa (*agp*). Aunque este enfoque condujo a un aumento del 50 % de producción de mitramicina en *S. argillaceus* (Zabala *et al.*, 2013), una reducción drástica de los niveles de ansamitocina P-3 e inhibición del crecimiento celular se obtuvo en *A. pretiosum*. Los autores especulan que un posible efecto pleiotrópico ejerce la *agp* sobre el mantenimiento del crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios en esta cepa (Fan *et al.*, 2016b).

En *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle07310* codifica para una ADP-glucosa pirofosforilasa (Nombre en KEGG: glucosa-1-fosfato adenililtransferasa), con 90 % de homología con el gen *SCO0961* (*glgC*) de *S. coelicolor* (EC:2.7.7.27). Sin embargo, en el GSM *NR1007* de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, no hay reacciones involucradas en el consumo del

intermediario ADP-glucosa, por lo que, aunque la reacción que cataliza la ADP-glucosa pirofosforilasa está incorporada en el modelo, no es posible conocer el flujo a través de ella y el efecto sobre la producción de chaxamicinas.

Teniendo en cuenta los reportes en la literatura, un incremento relativo de dos veces la producción de chaxamicinas, con respecto al *wild-type*, en el mutante *S. leeuwenhoekii* O41020 es un buen rendimiento, sin embargo, el cual se podría mejorar realizando modificaciones genéticas complementarias, como las mencionadas anteriormente.

- Sobreexpresión del gen *sle11600*:

El análisis de rutas metabólicas involucradas en el metabolismo del carbono ha identificado varios metabolitos derivados de la vía de las PP, que tienen correlaciones altamente positivas con la producción de metabolitos bioactivos producidos por miembros del género *Streptomyces*, tales como el antibiótico metilfenomicina en *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Obanye *et al.*, 1996) y el inmunosupresor tacrolimus producido por *Streptomyces tsukubaensis*.

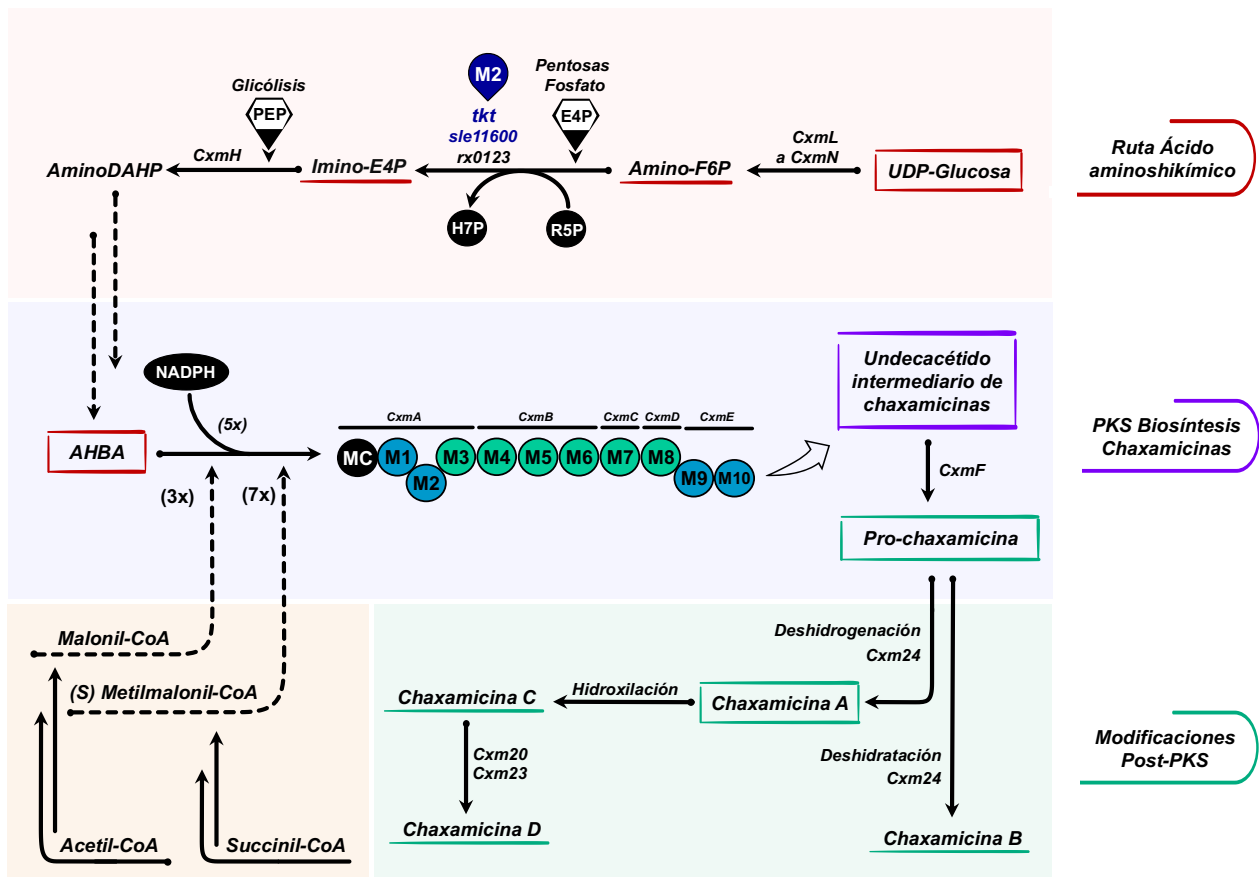
En el GMS *NR1007* de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, varios objetivos efectivos de sobreexpresión fueron predichos para potenciar el flujo de carbono a través de la vía de las PP (Razmilic *et al.*, 2018). Para esta investigación, nos centramos en los genes *sle11600* (*tkt*) y *sle11610* (*tal*), los cuales codifican para enzimas claves de la rama no oxidativa de la ruta de las PP; transcetolasa y transaldolasa, respectivamente. Estas enzimas son de especial interés porque crean un vínculo reversible entre la glicólisis y la vía de las PP. Esta ruta es importante ya que provee los intermediarios necesarios para el funcionamiento de la glicólisis y la ruta de biosíntesis de AHBA.

Adicionalmente, el funcionamiento de la ruta de las PP es necesario para garantizar el suministro de poder reductor necesario para los procesos biosintéticos. En el caso específico de la biosíntesis de chaxamicinas, el NADPH es requerido por las subunidades (*CxmA* a *CxmE*) de los módulos del clúster de biosíntesis de chaxamicinas para la síntesis del policétido intermediario (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015), por lo que a medida que el NADPH es consumido por esta ruta biosintética, el aumento en los niveles de NADP<sup>+</sup> debería estimular a la ruta de las PP para obtener más NADPH.

Además de su posible papel en el incremento de la disponibilidad de poder reductor, estudios *in vivo* han demostrado que la actividad de la transcetolasa normalmente desvía la ribosa 5-fosfato de vuelta a la glicólisis en procesos biosintéticos y que su sobreexpresión es capaz de generar un incremento de 10 veces en su actividad (Kirou *et al.*, 2001), proveyendo intermediarios glucolíticos, como la fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, a partir de la ribosa 5-fosfato, lo cual también facilita la

producción de cualquier metabolito especializado, ya que toda modificación en cualquiera de estas vías afecta directamente a la otra debido a la interrelación entre la ruta de las PP y la vía de la glicólisis (Olano *et al.*, 2008). Dado lo anterior, nos pareció interesante intervenir sobre su capacidad de desviar la ribosa 5-fosfato hacia la glicólisis.

De todos los blancos de sobreexpresión evaluados en este trabajo, el gen *sle11600* era el candidato más prometedor, ya que, además de catalizar tres reacciones de la ruta de las PP (rx1093, rx1094 y rx1095), donde la rx1095 es blanco de sobreexpresión, está relacionado directamente a la ruta de biosíntesis del precursor de chaxamicinas AHBA (rx0123, N° de reacción en KEGG: r06590) (Figura 25).



**Figura 25:** Rutas involucradas en la biosíntesis de chaxamicinas A-D. (A): Paso 1, vía del ácido aminoshikímico o biosíntesis de ansamicinas; (B): Paso 2, clúster PKS de biosíntesis de chaxamicinas; (C): Paso 3, modificaciones post-PKS de biosíntesis de chaxamicina. En rojo se destaca la reacción catalizada por el gen *sle11600* (mutante *S. leeuwenhoekii* O11600) *Abreviaturas:* UDPG, UDP- $\alpha$ -D-Glucosa; cxm, chaxamicina; *tkt*, transcetolasa; PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; imino-E4P, iminoeritrosa 4-fosfato; amino-F6P, aminofructosa 6-fosfato; AminoDAHP, 4-dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato; AHBA, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico; y TCA, ciclo del ácido tricarbóxico; MC: módulo de carga de la PKS, M1-M10: módulos de la PKS de biosíntesis de chaxamicinas.

Como se observa en la figura anterior, en la ruta de biosíntesis AHBA, la reacción rx0123, cataliza la formación de imino-E4P a partir de amino-F6P. Luego la reacción catalizada por *cxmH* (DAHP sintasa) genera 4-dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (AminoDAHP). Este metabolito es necesario para iniciar la ruta del ácido shikímico, culminando con la biosíntesis de AHBA.

En otros organismos se ha visto que la disponibilidad *in vivo* de D-eritrosa 4-fosfato y fosfoenolpiruvato limita la actividad catalítica de la DAHP sintasa, así como que la sobreexpresión de la transcetolasa que genera imino-E4P es capaz de incrementar la disponibilidad de D-eritrosa 4-fosfato y aumentar el flujo de carbono a través de la ruta del ácido shikímico, incluso a niveles sustancialmente superiores a los alcanzados con la sobreexpresión de DAHP sintasa (Draths & Frost, 1990; Draths *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1999).

En este trabajo, una copia del gen endógeno de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle11600* fue integrado en el genoma de esta cepa, rindiendo el mutante *S. leeuwenhoekii* O11600. Esta sobreexpresión resultó en un aumento de la producción de chaxamicinas A y C, con incrementos de hasta 13.2 y 3.3 veces, respectivamente, cuando se compara con la cepa *wild-type*. Este resultado fue consistente con los reportados previamente en la literatura.

*S. leeuwenhoekii* O11600 fue el mutante que mostró un mayor incremento de la producción de chaxamicinas totales con respecto a la cepa *wild-type*, entre todos los mutantes generados y evaluados. En la búsqueda bibliográfica no se encontraron reportes del efecto de la sobreexpresión de la transcetolasa específicamente sobre la producción de ansamicinas, por lo que este trabajo es el primero en reportar un incremento en la producción de este tipo de compuestos al sobreexpresar dicho gen.

Al estar el gen *sle11600* asociado a varias reacciones, no se puede afirmar que la producción se haya visto aumentada por el efecto específico en alguna de las ellas. Sin embargo, es probable que la reacción que está directamente relacionada a la producción de chaxamicinas sea la que haya contribuido en mayor grado a aumentar su producción, lo que se asociaría con flujos mayores en la ruta de biosíntesis de AHBA, como ha sido reportado para otros microorganismos.

- Sobreexpresión del gen *sle11610*:

El mutante *S. leeuwenhoekii* O11610, al igual que *S. leeuwenhoekii* O11600 potencia el flujo metabólico de una de las reacciones de la ruta de las PP. Específicamente la reacción rx1090 (N° de reacción en KEGG: r01827), asociada al gen *sle11610* (*tal1*), el cual codifica para una transaldolasa. Esta reacción está involucrada en la obtención de los intermediarios eritrosa 4-fosfato y  $\beta$ -fructosa 6-fosfato.

La actividad de la transaldolasa está conectada con la de la transcetolasa; en conjunto permiten a las células transportar la ribosa 5-fosfato y los intermediarios glucolíticos entre la ruta de las PP y glicólisis. Si bien, esta reacción está relacionada indirectamente con la producción de chaxamicinas, se ha demostrado que su nivel de expresión (Lu & Liao, 1997), junto con el de transcetolasa (Draths & Frost, 1990; Draths *et al.*, 1992) es un factor limitante sobre la actividad *in vivo* de la DAHP sintasa, al determinar la disponibilidad de D-eritrosa 4-fosfato necesaria para la actividad de esta enzima, la cual es parte de la ruta de biosíntesis de AHBA. El mutante *S. leeuwenhoekii* O11610 fue el tercero que más incrementó la concentración de chaxamicinas, superando en 2.4 veces la producción total del *wild-type*; consistente con lo esperado.

Las modificaciones individuales de los genes *sle11600* y *sle11610* sugieren, que la integración de plásmidos recombinantes en la cepa original condujo a un aumento del flujo metabólico a través de la ruta de las PP, generando disponibilidad de compuestos necesarios para la ruta de biosíntesis de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>.

#### **4.4.2 Influencia de la sobreexpresión del complejo acetil-CoA carboxilasa y el gen *sle16220* en el incremento del *pool* de malonil-CoA**

- Sobreexpresión del complejo acetil-CoA carboxilasa (ACC):

La sobreexpresión de los genes que codifican el complejo ACC ha demostrado ser útil para lograr la sobreproducción de varios metabolitos especializados. Algunos ejemplos son: doble producción del policétido flaviolina en *Streptomyces venezuelae* YJ028; aumento en seis veces la producción de actinorrodina en *Streptomyces coelicolor* M600; un incremento en cuatro veces en la producción de floroglucinol en *E. coli*, en este último caso también se incluyeron otras modificaciones en la cepa; (Ryu *et al.*, 2006; Zha *et al.*, 2009; Maharjan *et al.*, 2010, 2012), un incremento del 34 % más que la cepa de referencia *Streptomyces rimosus* M527 de producción de rimocidina (Liao *et al.*, 2022); y un incremento del 35 % en la producción del antibiótico antineoplásico mitramicina en *Streptomyces argillaceus* (Zabala *et al.*, 2013).

Guiados por las predicciones del modelo metabólico *IVR1007* y teniendo en cuenta la efectividad observada en otros microorganismos al sobreexpresar el complejo de la ACC, en el presente trabajo llevamos a cabo la sobreexpresión de los genes *sle27560* y *sle47660*, que son parte de este complejo en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. El objetivo de estas sobreexpresiones era incrementar la cantidad intracelular de malonil-CoA disponible para los posteriores procesos biosintéticos del metabolismo secundario. Específicamente, la PKS modular tipo I del clúster biosintético de chaxamicinas requiere tres unidades extensoras de malonil-CoA (Castro *et al.*, 2015).

En nuestra investigación, un incremento del 55 % de la producción de chaxamicinas totales de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> fue evidenciado en el mutante *S. leeuwenhoekii* OACC. Si bien, no es un mal incremento y es superior a otros reportes (Kong *et al.*, 2022), considerando la implicancia de esta modificación en el metabolismo primario y secundario, esperábamos un mejor resultado. Sin embargo, a diferencia del precursor AHBA que tributa exclusivamente a la producción de chaxamicinas, el precursor malonil-CoA está asociado a la producción de otros metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii*, como las chaxalactinas.

Dado lo anterior, especulamos que la obtención de una moderada producción global de chaxamicinas pudiera indicar que el mayor flujo de malonil-CoA se podría estar dividiendo entre los distintos compuestos que usan este precursor. Por otro lado, la disponibilidad de malonil-CoA podría no estar limitando la producción de chaxamicinas, pudiendo ser que el cuello de botella esté corriente abajo de la acción del complejo ACC; ya que la velocidad de reacción o la capacidad catalítica en procesos posteriores, como por ejemplo la integración de la unidad de malonil-CoA en el policétido, podrían estar limitando la producción de chaxamicinas.

Adicionalmente, la generación del mutante *S. leeuwenhoekii* OACC implicó el clonamiento simultáneo de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la ACC, ambas corriente abajo de un solo promotor fuerte constitutivo *ermE*<sup>\*</sup>, por lo que es posible que la segunda subunidad no se lograra sobreexpresar adecuadamente. En este sentido sería recomendable clonar cada subunidad bajo su propio promotor, además de realizar un posterior análisis de qPCR para evaluar el nivel de transcripción de ambos genes, y poder determinar si la falta de sobreexpresión de la segunda subunidad fue un impedimento para el incremento de la producción de chaxamicinas generada por este mutante.

Otro elemento a considerar es que, las subunidades  $\alpha$  (gen *sle27560*) y  $\beta$  (gen *sle47660*) de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> son homólogos a los genes *SCO4921* y *SCO5535*, en *S. coelicolor*, cepa en la cual se ha reportado que la sobreexpresión adicional de una tercera subunidad (*accE*, subunidad  $\epsilon$ ), codificada por el gen *SCO5536* ha generado un incremento significativo en la producción de actinorrodina (Ryu *et al.*, 2006). La subunidad *accE* muestra un 90 % de homología con el gen *sle21190* en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, dicho gen está identificado como una proteína hipotética, la cual no está incorporada en el GSM NR1007, usado para identificar los blancos de sobreexpresión evaluados en este trabajo. La incorporación de la subunidad *accE* al mutante *S. leeuwenhoekii* OACC debería implicar un aumento en la producción de chaxamicinas.

En el caso de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, modificaciones adicionales reportadas en la literatura pudieran evaluarse con el fin de incrementar aún más la producción de metabolitos especializados, en este caso, de chaxamicinas. Una posible combinación

podiera ser la sobreexpresión de la ACC con la inactivación de la enzima acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (Figura 4), responsable del paso final en la biosíntesis de triacilglicéridos (TGA, por sus siglas en inglés), la cual ha mostrado previamente generar un incremento considerable de la producción de metabolitos especializados (Zabala *et al.*, 2013). Esta enzima es importante en la redirección de los diferentes precursores, ya que entre los actinomicetos, el TGA es un compuesto de almacenamiento de carbono muy común, el cual usa también los precursores malonil- y acetil-CoA (Alvarez & Steinbüchel, 2002). Dados estos antecedentes, intentar el aumento de la concentración intracelular de malonil-CoA y, por consiguiente, de la producción de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, mediante modificaciones en la ruta de biosíntesis de TGA pudiera resultar una interesante estrategia a evaluar.

- Sobreexpresión del gen *sle16220*:

El mutante *S. leeuwenhoekii* O16220 sobreexpresa el gen *sle16220*. Este gen está asociado a la producción de bicarbonato, compuesto requerido para la producción de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, mediante la acción de la ACC. De acuerdo al modelo metabólico la sobreexpresión de este gen aumentaría la producción de chaxamicinas, por lo que esperábamos que un incremento de la disponibilidad de bicarbonato se tradujera en un aumento de malonil-CoA, y por ende de chaxamicinas. Sin embargo, el mutante generado produce un 15 % más de chaxamicinas totales que el *wild-type*.

Los motivos por los cuales el mutante *S. leeuwenhoekii* O16220 no logró una mayor producción de chaxamicinas pueden ser variados, por ejemplo: motivos asociados al complejo ACC explicados anteriormente, desvío de bicarbonato a otras reacciones, o algún otro reactante limitando los flujos de reacción. Para poder dilucidar y entender mejor el efecto de la sobreexpresión del gen *sle16220* en el metabolismo de *S. leeuwenhoekii* es necesario realizar más estudios, como qPCR.

#### **4.4.3 Influencia de la sobreexpresión de los genes *sle22570*, *sle22940* y una combinación de ambos en el incremento del *pool* de (S)-metilmalonil-CoA**

En las especies de *Streptomyces*, el compuesto (S)-metilmalonil-CoA es una de las dos unidades extensoras de cadena más comunes para la biosíntesis de antibióticos policétidos (Hopwood & Sherman, 1990; Moore & Hertweck, 2002; Chan *et al.*, 2009). Dado lo anterior, las rutas metabólicas que tributan a la síntesis de (S)-metilmalonil-CoA son de gran interés, representando un paso limitante en el flujo de metabolitos primarios hacia la formación de policétidos (Donadio *et al.*, 1991; Robinson, 1991).

En el caso de la biosíntesis de chaxamicinas por *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, se predice que además de AHBA y malonil-CoA, siete unidades extensoras de (S)-metilmalonil-CoA son

el sustrato necesario para las reacciones de condensación involucradas en esta ruta, catalizada por el sistema de PKS (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015). Por lo tanto, si se consigue incrementar la disponibilidad de este precursor, se podría lograr incrementar la producción de los compuestos de interés.

Se han descrito varias rutas que conducen a la generación de metilmalonil-CoA en bacterias (Gottschalk, 1986). En *Streptomyces*, por ejemplo, el metilmalonil-CoA puede sintetizarse a partir de la isomerización reversible de succinil-CoA proveniente del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), mediante la carboxilación de propionil-CoA por propionil-CoA carboxilasa (*PCC*) (Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Bramwell *et al.*, 1996; Donadio *et al.*, 1996), así como puede derivarse del catabolismo de los aminoácidos valina, metionina o treonina (Studier & Moffatt, 1986) o del n-butilil-CoA a través de la enzima isobutilil-CoA mutasa (Zerbe-Burkhardt *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004).

En este trabajo nos enfocamos en la vía de suministro de metilmalonil-CoA a partir de succinil-CoA proveniente del TCA. La enzima responsable de esta reacción es una metilmalonil-CoA mutasa. El primer informe sobre la manipulación de esta enzima para aumentar la producción de antibióticos fue realizado por Zhang *et al.*, 1999, donde los genes endógenos de *Amycolatopsis mediterranei* U32, cepa productora de rifamicina SV fueron expresados heterológicamente en *Streptomyces cinnamonensis*, cepa productora del policétido monensina. Los resultados mostraron que la manipulación a nivel enzimático de la metilmalonil-CoA mutasa a través de un enfoque genético podría ser un método útil para aumentar la producción de antibióticos policétidos (Weiwen Zhang *et al.*, 1999).

- Sobreexpresión del gen *sle22940*:

Como parte de la ruta de obtención de (S)-metilmalonil-CoA, a partir del succinil-CoA, el GSM *NR1007* desarrollado para *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> arrojó que la rx0227 (N° de reacción en KEGG: r00833) estaba catalizada por una metilmalonil-CoA mutasa, codificada por los genes *sle28060*, *sle22410* o *sle22940*, la cual fue seleccionada como blanco de sobreexpresión para aumentar la producción de las diferentes especies de chaxamicinas. Estos genes muestran un 70 % de homología con la subunidad  $\beta$  de la metilmalonil-CoA mutasa con función conocida en *S. cinnamonensis* (*mutb*) y *A. mediterranei* U32 (*mcmB*). En el genoma de referencia, *S. coelicolor*, se observa el mismo grado de identidad con los genes SCO4869 (*mutA2*) y SCO6832 (*mutA*).

Para dar cumplimiento al objetivo propuesto, se clonó el gen endógeno de la subunidad  $\beta$  de metilmalonil-CoA mutasa de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle22940*. La cepa *wild-type* y el mutante que sobreexpresa metilmalonil-CoA mutasa se sometieron a cultivos de producción en matraz de agitación. Los resultados mostraron que la producción total de



chaxamicinas aumentó en un 1.4 veces en comparación con la cepa *wild-type*. No hubo diferencia significativa en el crecimiento entre la cepa recombinante y la cepa *wild-type*.

Este resultado se condice con el incremento del 150 % en el título del compuesto antineoplásico FK506 en la cepa *S. clavuligerus* CKD1119, obtenido a partir de la sobreexpresión de metilmalonil-CoA mutasa empleando el promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Un triple aumento en el nivel de metilmalonil-CoA y una disminución de aproximadamente 3.5 veces en el nivel de succinil-CoA, en comparación con los niveles presentes en la cepa salvaje se obtuvieron en este previo reporte (Mo *et al.*, 2009). Un resultado más modesto se ha reportado en la cepa *S. gilvosporeus* ATCC 13326, mostrando un incremento del 21 % en la producción de natamicina (Kong *et al.*, 2022). De la misma forma, la sobreexpresión de los genes endógenos de *A. mediterranei* U32 en *S. cinnamonensis*, condujo a un 32 % de incremento de la producción del antibiótico monensina (Weiwen Zhang *et al.*, 1999).

Diferentes análisis de las vías de obtención de metilmalonil-CoA han demostrado que la ruta del succinil-CoA es la principal fuente de generación de este compuesto en la biosíntesis de diferentes antibióticos (Kellermeyer *et al.*, 1964; Hunaiti & Kolattukudy, 1984; Weiwen Zhang *et al.*, 1999; Vlasie & Banerjee, 2003; Reeves *et al.*, 2007). En el genoma de referencia, *S. coelicolor*, adicionalmente se evidencia un alto grado de identidad del gen *SCO5415* con la enzima isobutiril-CoA mutasa A (*icmA*) de función conocida, involucrada en una de las rutas de obtención de metilmalonil-CoA mediada por el n-butil-CoA. En *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> no se encontró evidencia de la existencia de la ruta anterior de biosíntesis de metilmalonil-CoA. Adicionalmente, al forzar el GSM a incrementar la producción de chaxamicinas se destaca la rx0225 (N° de reacción en KEGG: r00405; EC: 6.2.1.5), la cual codifica para la succinil-CoA sintetasa subunidad  $\alpha/\beta$  y tiene un flujo aumentado de succinato, proveniente del metabolismo del piruvato, hacia succinil-CoA, a partir del cual se sintetiza metilmalonil-CoA. Lo anterior sugiere que durante la fase activa de producción de chaxamicinas hay un redireccionamiento del succinil-CoA hacia la ruta de obtención de metilmalonil-CoA, en lugar de continuar hacia el TCA.

La sobreexpresión de la enzima succinil-CoA sintetasa presente en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> pudiera ser interesante, ya que la manipulación del metabolismo del piruvato no solo puede aumentar el metilmalonil-CoA, sino también el malonil-CoA; ya que el piruvato puede controlar la síntesis de acetil-CoA en el metabolismo central del carbono, que a su vez es un nodo importante para la síntesis del importante precursor malonil-CoA.

- Sobreexpresión del gen *sle22570*:

Adicionalmente realizamos la sobreexpresión de la enzima metilmalonil-CoA epimerasa, la cual es codificada por el gen *sle22570* (rx0228, N° de reacción en KEGG: r02765; EC: 5.1.99.1) y es la segunda enzima involucrada en la obtención de metilmalonil-CoA a partir de succinil-CoA. Si bien la metilmalonil-CoA mutasa, mencionada anteriormente, cataliza la transformación de succinil-CoA en (R)-metilmalonil-CoA, otra enzima, la metilmalonil-CoA epimerasa es necesaria para transformar (R)-metilmalonil-CoA en (S)-metilmalonil-CoA, que es el sustrato con la conformación correcta reconocida por la PKS de biosíntesis de chaxamicinas. Estudios bioquímicos y fisiológicos anteriores en determinadas cepas han demostrado que la actividad de la metilmalonil-CoA epimerasa está al mismo nivel de importancia que la metilmalonil-CoA mutasa en la generación de metilmalonil-CoA (Weiwen Zhang *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, la modificación de la actividad de la metilmalonil-CoA epimerasa en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, generó un incremento en la producción del 130 % en comparación con el *wild-type*. En la literatura no encontramos reportes sobre la modificación individual de esta enzima, con el objetivo de incrementar la producción de metabolitos especializados.

Si consideramos que ambas reacciones involucradas en la ruta de síntesis del intermediario (S)-metilmalonil-CoA son reversibles, especulamos que al sobreexpresar la metilmalonil-CoA mutasa (succinil-CoA hacia (R)-metilmalonil-CoA) se está forzando a una preferencia del succinil-CoA a convertirse en (R)-metilmalonil-CoA, el cual pareciera estarse convirtiendo adecuadamente en (S)-metilmalonil-CoA. De igual manera, al sobreexpresar solamente la reacción catalizada por la metilmalonil-CoA epimerasa deberíamos estar incrementando el flujo a través de esa reacción, en la dirección a la síntesis de (S)-metilmalonil-CoA. De esta manera, en ambos casos se estaría beneficiando la dirección del succinil-CoA hacia (S)-metilmalonil-CoA. Adicionalmente, sería interesante evaluar la influencia del medio de cultivo R3, empleado en este trabajo, sobre el comportamiento de estas enzimas; el cual ha demostrado estar condicionado a las diferentes condiciones de cultivo (Reeves *et al.*, 2006).

- Sobreexpresión conjunta de los genes *sle22940* y *sle22570*:

Para evaluar si ambas modificaciones genéticas tenían un efecto sinérgico, decidimos construir un doble mutante, que tuviese ambos genes sobreexpresados, lo cual rindió el mutante *S. leeuwenhoekii* O2222. El resultado tributó a un incremento de aproximadamente 2.8 veces, con respecto a *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> *wild-type*. Dicho resultado refuerza la hipótesis de que la sobreexpresión conjunta de estos genes tiene

un efecto sinérgico para aumentar la producción de chaxamicinas, ya que pareciera que ambas enzimas tienen similar importancia en la obtención de (S)-metilmalonil-CoA.

El doble mutante *S. leeuwenhoekii* O2222 fue el mutante más productor de chaxamicinas totales, después del mutante *S. leeuwenhoekii* O11600, este último involucrado en una reacción directa de la vía de producción de pro-chaxamicina. Encontramos lógica en este resultado ya que el (S)-metilmalonil-CoA es la principal unidad extensora de la PKS de biosíntesis de chaxamicinas. Sin embargo, como la reserva intracelular del precursor metilmalonil-CoA pareciera estar regulada dinámicamente, esta hipótesis requiere validación, con análisis de qPCR y mediante una medición precisa del flujo metabólico.

#### 4.4.4 Influencia de la sobreexpresión del complejo propionil-CoA carboxilasa en el incremento del *pool* de (S)-metilmalonil-CoA

- Sobreexpresión conjunta de los genes *sle27500* y *sle39380*:

Como se mencionó anteriormente, una de las vías de obtención de metilmalonil-CoA es la carboxilación de propionil-CoA por la PCC, sin embargo, las predicciones *in silico* en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> arrojaron que el incremento de la actividad de este complejo no era requerido para la producción de chaxamicinas. Considerando lo anterior, decidimos generar como control negativo un mutante que contuviese los genes codificantes para el complejo de la PCC, resultando en el mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2. Para la obtención de este mutante se clonaron los genes *sle27500* y *sle39830*, los cuales muestran un 90 % y 85 % de identidad con los genes *SCO4926* (*pccB*) y *SCO4381* (*putativa acetil/propionil CoA carboxilasa*) en *S. coelicolor*; sin embargo, se ha reportado que el complejo PCC en *S. coelicolor* requiere, además de la participación del *pccB*, la participación de la enzima del complejo ACC, *accA1/A2*, y del gen *pccE* (*SCO4925*). *pccE* codifica para una proteína hipotética SCK13.17c denominada posible acil-CoA carboxilasa subunidad  $\epsilon$ , la cual tiene un 70 % homología con el gen *sle27510*, anotado como una proteína hipotética y no incluido en el GSM NR1007.

En el mutante usado como control negativo, solamente se pudo establecer una comparación con respecto a la chaxamicina A, ya que los valores obtenidos para las chaxamicinas B y C no mostraron diferencias estadísticas significativas. Se obtuvo un 41 % menos de producción total de chaxamicinas, que el *wild-type*. Este resultado puede deberse a que el propionil-CoA sea un reactante limitante de la reacción, al ser el único sustrato usado para producir (S)-metilmalonil-CoA en esa reacción. El flujo de propionil-CoA podría encontrarse desviado hacia otras rutas del metabolismo primario y secundario como el metabolismo de los ácidos grasos, aminoácidos (valina, leucina, isoleucina y alanina), metano, propanoato y del piruvato. El resultado obtenido en este trabajo es consistente con una previa observación donde la sobreexpresión de la vía PCC

no aumentó la producción de FK506 en *S. clavuligerus* CKD1119 luego de sobreexpresar heterológicamente los genes de *S. coelicolor* en esa cepa (Mo *et al.*, 2009).

Con los resultados obtenidos para los mutantes *S. leeuwenhoekii* O22940, *S. leeuwenhoekii* O22570 y *S. leeuwenhoekii* OP1P2, especulamos que la enzima metilmalonil-CoA mutasa sobreexpresada en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> es funcionalmente activa y que la ruta metilmalonil-CoA mutasa/epimerasa es la principal vía de obtención de metilmalonil CoA en esta cepa. No obstante, la modificación de esta ruta pudiera estar alterando otros nodos que convergen en la producción de metilmalonil-CoA, por lo que es necesario realizar análisis de qPCR.

#### **4.4.5 Otros compuestos producidos por *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y su posible relación con los mutantes generados**

Si bien el presente trabajo está enfocado en la sobreproducción de los metabolitos especializados chaxamicinas A, B y C, no se puede dejar de lado que las sobreexpresiones generadas también pudiesen estar teniendo un efecto en la producción de otros metabolitos especializados. Lo anterior se especula, porque siete de las nueve modificaciones genéticas realizadas en este trabajo también fueron encontradas, por el GSM NR1007 como blancos de sobreexpresión para el incremento de la producción de chaxalactinas. El gen *sle41020* es el único blanco que tributa solamente a la producción de chaxamicinas, al estar involucrado únicamente en la biosíntesis de la unidad iniciadora de la biosíntesis de chaxamicinas, AHBA (Razmilic *et al.*, 2018).

En su ruta biosintética, las chaxamicinas y chaxalactinas comparten los precursores malonil-CoA y (S)-metilmalonil-CoA, de ahí que es posible, que el aumento de la disponibilidad de estos compuestos generada por las sobreexpresiones realizadas en este trabajo se desviara a la síntesis de chaxalactinas; lo cual afectaría considerablemente la producción de chaxamicinas. Específicamente, consideramos que esta puede ser una de las razones más fuertes por la cual no se obtuvo un significativo incremento de la producción de chaxamicinas al sobreexpresar los genes codificantes para la ACC. Considerando lo anterior los genes involucrados en la biosíntesis de ambos metabolitos deberían sobreexpresarse en una cepa que tuviera delecionado el clúster de biosíntesis de chaxalactinas.

En los resultados expuestos anteriormente se observa una importante diferencia en la proporción de cada chaxamicina generada por los mutantes, lo que puede deberse a la forma de biosíntesis de cada especie. Se ha propuesto que la generación de chaxamicina B es una ruta alternativa a la biosíntesis del resto de las chaxamicinas, iniciándose a partir de la pro-chaxamicina, al igual que la chaxamicina A. En términos generales los mutantes evidenciaron títulos mayores de chaxamicina A, que de

chaxamicina B; sin embargo los mutantes *S. leeuwenhoekii* O22570, *S. leeuwenhoekii* O2222 y *S. leeuwenhoekii* OACC mostraron un elevado incremento de la producción de chaxamicina B, lo que creemos se debe al desvío de la pro-chaxamicina hacia la síntesis de esta especie.

Considerando que la chaxamicina C se deriva de la chaxamicina A, la proporción de chaxamicina A que se convierte en C puede estar condicionada al tiempo en el que se realiza la colecta de los cultivos celulares para ser procesados. Para evaluar esta hipótesis es aconsejable realizar cultivos de producción con diferentes tiempos de incubación y evaluar si estas proporciones cambian, asimismo, esto pudiera ser determinante en el incremento del título de chaxamicinas, ya que es probable que estos valores fluctúen en el tiempo, ya sea por la escasez de nutrientes, toxicidad, entre otros aspectos, que desconocemos en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>. Un aspecto que también puede influir es la resistencia a la presencia de chaxamicinas que ha mostrado *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> en un estudio previo (Castro, 2015), lo que indica la presencia de mecanismos de resistencia, que deben ser estudiados para una mejor comprensión del funcionamiento del metabolismo secundario en esta cepa.

#### **4.5 Posible efecto de la regulación génica en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> sobre la producción de chaxamicinas**

Como se ha mencionado anteriormente, suponemos que la producción de chaxamicinas puede variar en dependencia del tiempo y las condiciones de cultivo, este comportamiento diferente podría reflejar la diversidad de mecanismos reguladores metabólicos involucrados en su biosíntesis.

La producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* generalmente coincide con el desarrollo del micelio aéreo, en medio sólido y con la entrada en fase estacionaria de crecimiento resultado de la limitación de nutrientes en medio líquido. La expresión de los genes del metabolismo secundario está controlada por diferentes familias de proteínas reguladoras, algunas de las cuales solo se encuentran en Actinomicetos y son inducidas por moléculas de señalización intra y extracelulares. A su vez, todos los estudios realizados hasta el momento sostienen que el nivel de expresión de estos activadores transcripcionales es el factor principal que determina el nivel de expresión de los genes de síntesis y consecuentemente la cantidad de metabolito secundario producido (Bibb, 2005; Van Wezel & McDowall, 2011).

Existen distintos niveles de regulación: en el más alto, se encuentran los genes de regulación global o pleiotrópicos, genes localizados fuera de los BGCs, pero relacionados con su biosíntesis, que codifican reguladores globales y actúan incrementando o

disminuyendo los niveles de expresión (Li *et al.*, 2006); en el nivel intermedio se ubican los genes que afectan varias rutas de biosíntesis distintas; por último, en el nivel más bajo están los genes reguladores localizados dentro del clúster de biosíntesis del compuesto (Lombó *et al.*, 1999; Garcia-Bernardo *et al.*, 2000).

En *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> existen genes con alto porcentaje de identidad con reguladores de respuesta, como el *afsS*. En *S. coelicolor*, la proteína *AfsR* es un regulador pleiotrópico que posee un dominio SARP (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein) y juega un papel importante como integrador de múltiples señales fisiológicas y ambientales, que se traducen mediante cascadas de fosforilación. *AfsR* fosforilada activa la transcripción de *afsS* que codifica para una proteína que aumenta la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina (*red*) y un antibiótico dependiente de calcio (CDA) producidos por *S. coelicolor* (Atsushi *et al.*, 1994; Lian *et al.*, 2008). Por su parte, se ha visto que, en *S. argillaceus* la inactivación de este gen generó un efecto negativo sobre la producción del clúster biosintético de interés. Asimismo, se encuentran en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> genes que codifican para los reguladores *bldA*, *bldB*, *bldC* y *bldG*, los cuales son genes de regulación global en *S. coelicolor* y controlan tanto la diferenciación morfológica, como la biosíntesis de antibióticos (Li *et al.*, 2006). El regulador de la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* más conocido, *ActIIORF4* no se encontró en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>.

El BGC de chaxamicinas de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> codifica para dos supuestas proteínas reguladoras transcripcionales, *CxmY* y *CxmZ*. *CxmY* parece funcionar como un dominio de unión al ADN específico de secuencia y comparte homología de secuencia aminoacídica con los reguladores transcripcionales *Rif-Orf36* de *A. mediterranei* y *Orf5* de *Streptomyces* sp. CS, los cuales producen rifamicinas y naftomicinas, respectivamente. Hasta el momento no se ha determinado la función de estos reguladores de respuesta en la biosíntesis de los antibióticos de interés (Galperin, 2010).

Por su parte, *CxmZ* es otra proteína reguladora, homóloga a la encontrada en los sistemas reguladores de dos componentes de histidina quinasa, en *S. coelicolor*. Sin embargo, no contiene los aminoácidos fosforilados característicos de los dominios receptores de un regulador de respuesta típico. Al no contar con todos los residuos de aminoácidos conservados para ser fosforilados como un dominio receptor típico se sugiere que pertenece a los reguladores de respuesta atípicos. En principio, los reguladores atípicos pueden activarse al unirse al producto final o a intermediarios biosintéticos tardíos de metabolitos secundarios, como los antibióticos (Liu *et al.*, 2013). El papel regulador de las proteínas *CxmY* y *CxmZ* en la biosíntesis de chaxamicinas debe determinarse experimentalmente, lo cual sería determinante para controlar la producción de los diferentes metabolitos especializados producidos por esta cepa.

## 4.6 Ensayos de bioactividad contra *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*

En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de actividad antibiótica como experimento complementario a los resultados obtenidos mediante la cuantificación por HPLC de cada chaxamicina. Con este experimento se esperaba ver un incremento en la capacidad antibacteriana de los mutantes derivados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>.

Como control positivo se empleó rifampicina, por la similitud estructural a las chaxamicinas. El mecanismo de acción de la rifampicina es unirse a la ARN polimerasa e interferir durante el proceso de replicación y síntesis del ácido nucleico (Quirós-Roldán *et al.*, 2001; Kocagoz *et al.*, 2005; Said-Fernández *et al.*, 2005). La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente, siendo *rpoB* el gen sensible al efecto de la rifampicina (Campbell *et al.*, 2001).

En los resultados obtenidos en este trabajo se observa que, el grado de inhibición generado por los mutantes derivados de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> al emplear *B. subtilis* es significativamente inferior, al generado al usar *M. luteus*; lo cual debe estar relacionado a los mecanismos de resistencia que genera cada microorganismo indicador ante la presencia de chaxamicinas y rifampicina.

Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por la rifampicina y otorgando resistencia al fármaco (WHO Report, 2008; Zenteno-Cuevas *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005). En el caso de *M. luteus*, este no tiene los residuos de aminoácidos necesarios para la resistencia a la rifampicina en las posiciones esperadas, siendo un microorganismo indicador para este antibiótico (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2015). Por lo anterior, los resultados obtenidos eran esperables.

Además del clásico mecanismo de resistencia a rifampicina, mediante alteraciones en su blanco directo, el gen *rpoB* se han descrito mecanismos de resistencia en diferentes cepas de *B. subtilis* mediante desfosforilación, decoloración (Dabbs *et al.*, 1995), o por la inducción de la respuesta de estrés general dependiente del factor regulador  $\sigma^B$  (Bandow *et al.*, 2002). Los mecanismos moleculares por los cuales ocurre la resistencia no se han dilucidado completamente, pero variantes de rifampicina con ningún efecto antibactericida se han aislado de diferentes especies de *B. subtilis* y similares, como *B. cereus*, luego del tratamiento con este antibiótico (Dabbs *et al.*, 1995).

Con respecto a la bioactividad observada en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, un incremento en el tamaño de los halos de inhibición se observa en las muestras provenientes de

sobrenadantes de las cepas modificadas. Lo anterior sugiere el incremento del título de chaxamicinas en los mutantes con respecto al *wild-type*. Sin embargo, estos incrementos no se condicen con los resultados obtenidos mediante la cuantificación de chaxamicinas por HPLC, lo cual puede estar relacionado con varios factores a destacar a continuación.

En primer lugar, la cepa *wild-type* de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> produce, además de las chaxamicinas, otros metabolitos especializados con actividad antibiótica, como la higromicina A, la 5"-dihidrohigromicina A y las chaxalactina A–C (Rateb *et al.*, 2011b). Es probable que estos compuestos estén contribuyendo al incremento de los halos de inhibición del crecimiento observado en las cepas recombinantes de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> evaluadas en este trabajo.

Específicamente, las chaxalactinas A-C comparten dos precursores biosintéticos con las chaxamicinas, y los blancos de sobreexpresión usados en este trabajo para generar los diferentes mutantes, también fueron predichos como necesarios para el incremento de la producción de chaxalactinas. Dado lo anterior, especulamos que el incremento de la bioactividad que se observa en los resultados de este trabajo está condicionado principalmente por el incremento de la producción de chaxamicinas, y el posible incremento en la producción de chaxalactinas en los mutantes generados. En este sentido, las mutaciones realizadas en este trabajo deben evaluarse en una cepa que tenga delecionado el clúster de chaxalactinas, de manera que no ocurran desvíos de precursores hacia esa ruta biosintética. Adicionalmente, la purificación de los estándares de chaxalactinas mediante HPLC-MS/MS, NMR y HPLC preparativa permitiría evaluar, además del incremento del título de chaxamicinas, cuál es el comportamiento de la producción de chaxalactinas en los mutantes generados.

Adicionalmente, es importante destacar, que en este trabajo no fue posible cuantificar la chaxamicina D ya que no contábamos con el estándar requerido. Dado lo anterior, en los bioensayos realizados estamos viendo una sumatoria del efecto de las chaxamicinas A, B, C y D, siendo esta última la chaxamicina con la mayor actividad antibiótica reportada (Rateb *et al.*, 2011a), lo cual puede explicar el por qué no se observó una correlación entre los resultados obtenidos mediante HPLC con el grado de inhibición observado en cada mutante de sobreexpresión generado. Para dar respuesta al problema anterior, a partir de una muestra de sobrenadante de cultivo altamente concentrado de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, debe ser identificada y purificada la chaxamicina D mediante HPLC-MS/MS, NMR y HPLC preparativo, con el objetivo de poder usarla como estándar.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la prueba de difusión con discos de sensibilidad antibiótica es una herramienta cualitativa, indicadora de los posibles pasos a seguir para darle continuidad a la presente investigación.



## 5. Conclusiones

1. Los resultados de esta investigación permiten concluir que es posible incrementar la producción de los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C por *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivado en medio R3. Asimismo, el método cromatográfico desarrollado en este trabajo permitió determinar y cuantificar las compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C desde el sobrenadante de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> en medio R3.
2. En este trabajo se desarrolló un método por HPLC que permitió separar los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C de otros metabolitos secundarios presentes en el sobrenadante de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cuando es cultivado en medio R3. Asimismo, este método permitió efectuar una cuantificación relativa de los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C empleando rifampicina como estándar interno.
3. Cabe señalar que durante el desarrollo de este trabajo, se contó con una escasa cantidad de estándares de chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C, cuya concentración era desconocida, de manera que no fue posible emplearlos para cuantificar los compuestos chaxamicinas desde el medio de cultivo. Sin embargo, el uso de los estándares de chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C fue crítico en el desarrollo del método de cuantificación por HPLC, ya que permitió identificar el patrón de absorbancia de los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C en diferentes longitudes de onda, además del tiempo de retención de estos compuestos en diferentes fases móviles. Por otro lado, los estándares de chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C sin concentración conocida permitieron conocer el patrón de fragmentación de los mismos mediante la técnica de HPLC-MS/MS, lo que permitió identificar los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C en el medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> y de sus mutantes mediante esta técnica.

4. En este trabajo se demostró que es posible correlacionar la cantidad de chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C presente en el medio de cultivo empleando cantidades conocidas de rifampicina. Rifampicina es un compuesto que presenta similitudes a nivel de estructura molecular y de polaridad con las chaxamicinas estudiadas. El método cromatográfico desarrollado en este trabajo permitió separar rifampicina de los compuestos chaxamicinas y otros compuestos secretados por *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> cultivado en medio R3. De esta forma, la cuantificación relativa de chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C se ejecutó correlacionando las áreas bajo la curva de los picos de las chaxamicinas, respecto de las áreas bajo la curva de una curva de calibración de rifampicina
5. En los sobrenadantes de cultivo de los mutantes *S. leeuwenhoekii* O11600, *S. leeuwenhoekii* O11610, *S. leeuwenhoekii* O41020, *S. leeuwenhoekii* O22570, *S. leeuwenhoekii* O22940 y *S. leeuwenhoekii* O2222 se evidencia un incremento en la producción de los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C. Por otro lado, en el sobrenadante de cultivo de los mutantes *S. leeuwenhoekii* OACC, *S. leeuwenhoekii* O16220 y *S. leeuwenhoekii* OP1P2 se observó un menor título de chaxamicina C. Asimismo, en el medio de cultivo del mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2 se observó una disminución en el título de chaxamicina A; así como una disminución de la producción de chaxamicinas totales con respecto al *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo.
6. La sobreexpresión del gen *sle11600* en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> fue la mutación más efectiva en incrementar la producción de chaxamicinas A y C, así como de chaxamicinas totales. Esta mutación aumentó la producción de chaxamicinas totales 6.6 veces, respecto de la producción basal observada en el *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Asimismo, esta mutación incrementó la producción de chaxamicina A en 13.2 veces; de chaxamicina B en 1.2 veces, y de chaxamicina C en 3.3 veces. Esta mutación fue predicha *in silico* por el GSM NR1007 como promisorio para aumentar la producción de chaxamicinas. Estos resultados sugieren que esta mutación genera un incremento de los intermediarios  $\beta$ -fructosa 6-fosfato, gliceraldehído 3-fosfato y eritrosa 4-fosfato, este último importante en la biosíntesis del precursor de chaxamicinas, AHBA. Además, el incremento del intermediario de la ruta de biosíntesis de AHBA, iminoeritrosa 4-fosfato, genera un incremento de la producción de chaxamicinas. Por lo tanto, la predicción del modelo NR1007 respecto de esta mutación fue acertada para aumentar la producción de chaxamicinas.
7. La sobreexpresión del gen *sle11610* incrementó 2.3 veces la producción de chaxamicina A, 0.7 de chaxamicina B y 2.9 de chaxamicina C, superando la producción total de chaxamicinas del *wild-type* en 2.4 veces al ser cultivados en las mismas condiciones. El GSM NR1007 predijo que este gen era promisorio para aumentar la producción de chaxamicinas. Los resultados sugieren que esta mutación

genera un incremento de los intermediarios  $\beta$ -fructosa 6-fosfato y eritrosa 4-fosfato, este último importante en la biosíntesis del precursor de chaxamicinas, AHBA, generando un incremento de la producción de chaxamicinas. El mutante *S. leeuwenhoekii* O11610 fue el tercero que más incrementó la concentración de chaxamicinas, por lo tanto, la predicción del modelo *VR1007* respecto de esta mutación fue acertada.

8. La sobreexpresión del gen *sle41020* incrementó 1.7 veces la producción de chaxamicina A, 1.5 veces de chaxamicina B y 0.4 veces de chaxamicina C; mostrando un incremento del 100 % de la producción total de chaxamicinas, respecto a la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Esta mutación fue predicha por el GSM *VR1007* como prometedor para aumentar la producción de chaxamicinas. Los resultados sugieren que esta modificación genera un incremento del intermediario UDP-glucosa, sustrato inicial de la ruta de biosíntesis del precursor de chaxamicinas, AHBA, incrementándose la concentración de chaxamicinas. Por lo anterior la predicción de esta mutación por el modelo *VR1007* fue acertada para aumentar la producción de chaxamicinas.
9. La sobreexpresión del gen *sle22940* incrementó 1.7 veces la producción de chaxamicina A, 1.9 veces de chaxamicina B y 1.1 veces de chaxamicina C, respecto a la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo, con un incremento del título total de chaxamicinas de 1.4 veces. Esta modificación fue predicha por el GSM *VR1007* como promisor para la optimización de la producción de chaxamicinas. Los resultados sugieren que esta mutación incrementa el intermediario (R)-metilmalonil-CoA, aumentando la producción del precursor de chaxamicinas, (S)-metilmalonil-CoA y por tanto la producción de chaxamicinas. Respecto a esta mutación se valida la predicción del GSM *VR1007*.
10. La sobreexpresión del gen *sle22570* incrementó 1.2 veces la producción de chaxamicina A, 3.2 veces de chaxamicina B y 0.9 veces de chaxamicina C, con un incremento de 1.3 veces la producción total de chaxamicinas, respecto a la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Esta mutación fue predicha por el GSM *VR1007* como efectiva para mejorar la producción de chaxamicinas. Los resultados sugieren que esta mutación incrementa directamente la producción de (S)-metilmalonil-CoA, precursor de la biosíntesis de chaxamicinas, incrementando la producción de las mismas. La predicción de esta mutación por el modelo *VR1007* fue acertada para aumentar la producción de chaxamicinas.
11. El mutante *S. leeuwenhoekii* O2222, que contiene los genes *sle22940* y *sle22570* incrementó 3.9 veces la producción de chaxamicina A, 2.4 veces de chaxamicina B y 2.2 veces de chaxamicina C, con incremento de 2.8 veces la producción total de

chaxamicinas, respecto a la producción basal del *wild-type* cultivado en las mismas condiciones. El incremento de la producción de chaxamicinas de este doble mutante de sobreexpresión, respecto a las mutaciones individuales, sugiere un efecto sinérgico de las mismas, lo que potencia la formación del precursor de chaxamicinas, (S)-metilmalonil-CoA, incrementando la producción de chaxamicinas y validando las predicciones del modelo *VR1007*.

12. La sobreexpresión del complejo de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) incrementó la producción de chaxamicina A en un 80 % y de chaxamicina B en un 230 %, no observándose cambios en la producción de chaxamicina C. Un incremento del 60 % de la producción total de chaxamicinas se observó, respecto a la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Esta mutación fue predicha por el modelo *VR1007* como prometedora para aumentar la producción de chaxamicinas. Los resultados obtenidos sugieren que la sobreexpresión del complejo ACC incrementa la producción del precursor de chaxamicinas, malonil-CoA, aumentando la producción de las mismas. La predicción del modelo *VR1007* respecto de esta mutación fue acertada para aumentar la producción de chaxamicinas.
13. El mutante *S. leeuwenhoekii* O16220 incrementó la producción de chaxamicina A en un 24 %, de chaxamicina B en un 90 %, mientras que la chaxamicina C disminuyó un 10 % su producción, respecto de la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Un incremento del 15 % se observó en la producción de chaxamicinas totales. De acuerdo al GSM *VR1007* la sobreexpresión de este gen aumentaría la producción de chaxamicinas. Los resultados sugieren que el incremento del bicarbonato tiene un efecto positivo en la producción del precursor de chaxamicinas, malonil-CoA, generando un incremento en la producción de las mismas. La capacidad predictiva *in silico* del GSM *VR1007* se validó con este resultado.
14. El mutante *S. leeuwenhoekii* OP1P2 generó un incremento del 10 % de chaxamicina B, y decrementos del 50 % de las chaxamicina A y C; con una disminución del 41 % del título de chaxamicinas totales, respecto a la producción basal del *wild-type* en las mismas condiciones de cultivo. Los resultados sugieren que, a pesar de ser una mutación importante en la obtención del precursor de chaxamicinas, S-metilmalonil-CoA, esta influye negativamente en la producción de las mismas. Esta modificación no estaba contemplada en las predicciones del GSM *VR1007*, lo cual permitirá añadir información al mismo, reafirmando su efectividad para seleccionar blancos de sobreexpresión que permitan mejorar el título de chaxamicinas en *S. leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>.

15. Como resultado de la cuantificación mediante HPLC de los compuestos chaxamicina A, chaxamicina B y chaxamicina C se observó menor concentración de estos analitos en las muestras provenientes de extractos micelares, que las presentes en el sobrenadante de cultivo, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura para compuestos con actividad antibiótica.
  
16. Un incremento moderado de la bioactividad de los concentrados de sobrenadante de cultivo sobre los microorganismos *Micrococcus luteus* ATCC 4698 y *Bacillus subtilis* EC1524 se evidenció en todos los mutantes de sobreexpresión, con respecto al *wild-type*, siendo observado mejor en los bioensayos contra *Micrococcus luteus* ATCC 4698. Estos resultados sugieren que el aumento de la producción de chaxamicinas observado mediante HPLC genera un incremento en la bioactividad de los mutantes obtenidos; sin embargo, se evidencia que este tipo de ensayo no cuenta con la sensibilidad necesaria para arrojar diferencias de bioactividad certeras entre los mutantes generados y el *wild-type*.

# Bibliografía

**LISTA DE PUBLICACIONES GENERADAS:** Rubio, A., Razmilic, V., Brain-Isasi, S., Bonilla, M., Andrews, B., and Asenjo, J.A. Engineering of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup> to increase chaxamycin production based on a genome scale model. En preparación.

Adamek M, Alanjary M, Sales-Ortells H, Goodfellow M, Bull AT, Winkler A, Wibberg D, Kalinowski J, and Ziemert N. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in Amycolatopsis species. *BMC Genomics* 2018;19:426. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4809-4>.

Agnew EB, Wilson RH, Grem JL, Neckers L, Bi D, and Takimoto CH. Measurement of the novel antitumor agent 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001;755:237–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00113-X).

Ahmed J, Preissner S, Dunkel M, Worth CL, Eckert A, and Preissner R. SuperSweet—a resource on natural and artificial sweetening agents. *Nucleic Acids Research* 2011;39:D377–82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq917>.

Alam MT, Merlo ME, Hodgson DA, Wellington EM, Takano E, and Breitling R. Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. 2010.

Alvarez HM, and Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002;60:367–76. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1135-0>.

Amara A, Takano E, and Breitling R. Development and validation of an updated computational model of *Streptomyces coelicolor* primary and secondary metabolism 2018. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4905-5>.

AMR Industry Alliance. AMR 2020 Progress Report. Geneva: 2020.

Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, Harris NL, Stevens RL, Maslov S, Dehal P, Ware D, Perez F, Canon S, et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nature Biotechnology* 2018;36:566–9. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, Barreca D, Weckwerth W, Bauer R, Bayer EA, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021;20:200–16. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.

Atsushi M, Soon-Kwang H, Hiroshi I, Sueharu H, and Teruhiko B. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 1994;146:47–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90832-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90832-X).

Baietto L, D'Avolio A, De Rosa FG, Garazzino S, Michelazzo M, Ventimiglia G, Siccardi M, Simiele M, Sciandra M, and Di Perri G. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010;396:791–8. <https://doi.org/10.1007/S00216-009-3263-1/TABLES/5>.

Balachandran C, Duraipandiyar V, Arun Y, Sangeetha B, Emi N, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S, Inaguma Y, Okamoto A, and Perumal PT. Isolation and characterization of 2-hydroxy-9,10-anthraquinone from *Streptomyces olivochromogenes* (ERINLG-261) with antimicrobial and antiproliferative properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2016;26:285–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.12.003>.

Baloni P, Funk CC, Yan J, Yurkovich JT, Kueider-Paisley A, Nho K, Heinken A, Jia W, Mahmoudiandehkordi S, Louie G, et al. Metabolic Network Analysis Reveals Altered Bile Acid Synthesis and Metabolism in Alzheimer's Disease. *Cell Reports Medicine* 2020;1:100138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100138>.

Balsevich JJ, Bishop GG, and Deibert LK. Use of digitoxin and digoxin as internal standards in HPLC analysis of triterpene saponin-containing extracts. *Phytochemical Analysis* 2009;20:38–49. <https://doi.org/10.1002/pca.1095>.

- Bandow JE, Brötz H, and Hecker M. Bacillus subtilis tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the  $\sigma$ B-dependent general and multiple stress response. *Journal of Bacteriology* 2002;184:459–67. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.459-467.2002>.
- Baron SA, Devaux C, Colson P, Raoult D, and Rolain J-M. Teicoplanin: an alternative drug for the treatment of COVID-19? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020;55:105944. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105944>.
- Barthelmes J, Ebeling C, Chang A, Schomburg I, and Schomburg D. BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007. *Nucleic Acids Research* 2007;35:D511–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl972>.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, and Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 1966;45:493–6.
- Belknap KC, Park CJ, Barth BM, and Andam CP. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in Streptomyces bacteria. *Scientific Reports* 2020;10:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58904-9>.
- Bengoechea JA, and Bamford CGG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19? *EMBO Molecular Medicine* 2020;12:e12560. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emmm.202012560>.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature* 2002;417:141–7. <https://doi.org/10.1038/417141a>.
- Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics* 2012;65:385–95. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>.
- Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *The Journal of Antibiotics* 2005;58:1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>.
- Bergey. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed.). Volume 5: The Actinobacteria. 2012.
- Bernal FA, Hammann P, and Kloss F. Natural products in antibiotic development: is the success story over? *Current Opinion in Biotechnology* 2022;78:102783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102783>.



- Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 2005;8:208–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>.
- Bibb MJ, Janssen GR, and Ward JM. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 1986;41:215–26. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90122-8).
- Bonilla M. Tesis de Magister: SOBREENPRESIÓN DE GENES EN STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII C34 PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS. Universidad de Chile, 2021.
- Bonnefoy C, Menudier A, Moesch C, Lachatre G, and Mermet JM. Validation of the determination of lead in whole blood by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2002;17:1161–5. <https://doi.org/10.1039/b201889f>.
- Bordbar A, Monk JM, King ZA, and Palsson BO. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics* 2014;15:107–20. <https://doi.org/10.1038/nrg3643>.
- Borodina I, Krabben P, and Nielsen J. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research* 2005;15:820–9. <https://doi.org/10.1101/gr.3364705>.
- Borodina I, Siebring J, Zhang J, Smith CP, Van Keulen G, Dijkhuizen L, and Nielsen J. Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mediated by phosphofructokinase deletion. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:25186–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803105200>.
- Boston Consulting Group. The Case for a Subscription Model to Tackle Antimicrobial Resistance 2022. <https://www.bcg.com/publications/2022/model-for-tackling-antimicrobial-resistance> (accessed May 9, 2023).
- Bramwell H, Hunter IS, Coggins JR, and Nimmo HG. Propionyl-CoA carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): Cloning of the gene encoding the biotin-containing subunit. *Microbiology* 1996;142:649–55. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-649>.
- Buehrle D, Decker B, Wagener M, Adalja A, Singh N, McEllistrem M, Nguyen MH, and Clancy C. Antibiotic Consumption and Stewardship at a Hospital outside of an Early Coronavirus Disease 2019 Epicenter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2020;64:10.1128/aac.01011-20. <https://doi.org/10.1128/aac.01011-20>.

- Bull AT, and Asenjo JA. Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013;103:1173–9. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9911-7>.
- Bull AT, Asenjo JA, Goodfellow M, and Gómez-Silva B. The Atacama Desert: Technical Resources and the Growing Importance of Novel Microbial Diversity. *Annual Review of Microbiology* 2016;70:215–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095236>.
- Bull AT, and Goodfellow M. Dark, rare and inspirational microbial matter in the extremobiosphere: 16 000 m of bioprospecting campaigns. *Microbiology (Reading, England)* 2019;165:1252–64. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000822>.
- Bull AT, Idris H, Sanderson R, Asenjo J, Andrews B, and Goodfellow M. High altitude, hyper-arid soils of the Central-Andes harbor mega-diverse communities of actinobacteria. *Extremophiles* 2018;22:47–57. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0976-5>.
- Busarakam K. Novel Actinobacterial Diversity in Arid Atacama Desert Soils as a Source of New Drug Leads 2014.
- Busarakam K, Bull AT, Girard G, Labeda DP, Van Wezel GP, and Goodfellow M. *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2014;105:849–61. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0139-y>.
- Busarakam K, Bull AT, Trujillo ME, Riesco R, Sangal V, van Wezel GP, and Goodfellow M. *Modestobacter caceresii* sp. nov., novel actinobacteria with an insight into their adaptive mechanisms for survival in extreme hyper-arid Atacama Desert soils. *Systematic and Applied Microbiology* 2016;39:243–51. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.03.007>.
- Calleri E, De Lorenzi E, Massolini G, Caccialanza G, and Furlanetto S. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002;29:1089–96. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00150-4).
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, and Darst SA. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 2001;104:901–12. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0).

- Cane DE, Walsh CT, and Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science* 1998;282:63–8. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.63>.
- Carro L, Golinska P, Nouioui I, Bull AT, Igual JM, Andrews BA, Klenk H-P, and Goodfellow M. *Micromonospora acroterricola* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a high altitude Atacama Desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2019;69:3426–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003634>.
- Carro L, Razmilic V, Nouioui I, Richardson L, Pan C, Golinska P, Asenjo JA, Bull AT, Klenk H-P, and Goodfellow M. Hunting for cultivable *Micromonospora* strains in soils of the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018;111:1375–87. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1049-1>.
- Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Mueller LA, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research* 2016;44:D471–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>.
- Castro J. Identification of the chaxamycin and chaxalactin biosynthesis genes through genome mining of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 and heterologous production of chaxamycins in *Streptomyces coelicolor* M1152. 2015.
- Castro JF, Razmilic V, Gomez-Escribano JP, Andrews B, Asenjo JA, and Bibb MJ. Identification and Heterologous Expression of the Chaxamycin Biosynthesis Gene Cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Applied and Environmental Microbiology* 2015;81:5820–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.01039-15>.
- Centers for Disease Control U.S. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, Georgia: 2019. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- Ceroni F, Algar R, Stan G-B, and Ellis T. Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden. *Nature Methods* 2015;12:415–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3339>.
- Chan YA, Podevels AM, Kevany BM, and Thomas MG. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports* 2009;26:90–114. <https://doi.org/10.1039/b801658p>.

- Chang E, and Kim C. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Molecules* 2019;24:1157. <https://doi.org/10.3390/molecules24061157>.
- Chater KF. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2006;361:761–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1758>.
- Chater KF. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology* 1993;47:711.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, and Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*: REVIEW ARTICLE. *FEMS Microbiology Reviews* 2010;34:171–98. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>.
- Chen D, Zhang Qi, Zhang Qinglin, Cen P, Xu Z, and Liu W. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Applied and Environmental Microbiology* 2012;78:5093–103. <https://doi.org/10.1128/AEM.00450-12>.
- Chen S, Von Bamberg D, Hale V, Breuer M, Hardt B, Müller R, Floss HG, Reynolds KA, and Leistner E. Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin: Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tu 1892. *European Journal of Biochemistry* 1999;261:98–107. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00244.x>.
- Chen X, Liao B, Cheng L, Peng X, Xu X, Li Y, Hu T, Li J, Zhou X, and Ren B. The microbial coinfection in COVID-19. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2020;104:7777–85. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10814-6>.
- Craney A, Hohenauer T, Xu Y, Navani NK, Li Y, and Nodwell J. A synthetic luxCDABE gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria. *Nucleic Acids Research* 2007;35:e46–e46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm086>.
- Crits-Christoph A, Robinson CK, Barnum T, Fricke WF, Davila AF, Jedynek B, McKay CP, and DiRuggiero J. Colonization patterns of soil microbial communities in the Atacama Desert. *Microbiome* 2013;1:28. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-28>.
- Cruz De Oliveira E, Muller EI, Abad F, Dallarosa J, Adriano C, Cruz S, Frederico A, and Ritter A. INTERNAL STANDARD VERSUS EXTERNAL STANDARD CALIBRATION:

AN UNCERTAINTY CASE STUDY OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS.  
vol. 33. 2010.

- Cuadros-Rodríguez L, Bagur-González MG, Sánchez-Viñas M, González-Casado A, and Gómez-Sáez AM. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A* 2007;1158:33–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.030>.
- Dabbs ER, Yazawa K, Tanaka Y, Mikami Y, Miyaji M, Andersen SJ, Morisaki N, Iwasaki S, Shida O, Takagi H, et al. Rifampicin Inactivation by *Bacillus* species. vol. 48. 1995.
- Dagan-Wiener A, Di Pizio A, Nissim I, Bahia MS, Dubovski N, Margulis E, and Niv MY. BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic Acids Research* 2019;47:D1179–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gky974>.
- Dang L, Liu J, Wang · Cheng, Liu H, and Wen J. Enhancement of rapamycin production by metabolic engineering in *Streptomyces hygrosopicus* based on genome-scale metabolic model. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2017;44:259–70. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1880-1>.
- DeJongh M, Formsma K, Boillot P, Gould J, Rycenga M, and Best A. Toward the automated generation of genome-scale metabolic networks in the SEED. *BMC Bioinformatics* 2007;8:139. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-139>.
- D’huys P-J, Lule I, Vercaemmen D, Anné J, Van Impe JF, and Bernaerts K. Genome-scale metabolic flux analysis of *Streptomyces lividans* growing on a complex medium. *Journal of Biotechnology* 2012;161:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.010>.
- Donadio S, Staver MJ, and Katz L. Erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. *Molecular Microbiology* 1996;19:977–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.439969.x>.
- Donadio S, Staver MJ, Mcalpine JB, Swanson SJ, and Katz L. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 1991;252:675–9. <https://doi.org/10.1126/science.2024119>.
- Doroghazi JR, and Metcalf WW. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* 2013;14:611. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>.

- Draths KM, and Frost JW. Synthesis Using Plasmid-Based Biocatalysis: Plasmid Assembly and 3-Deoxy-D-ara6/no-heptulosonate Production. *Journal of the American Chemical Society* 1990;112:1657–9. <https://doi.org/10.1021/ja00160a071>.
- Draths KM, Pompliano DL, Conley DL, Frost JW, Berry A, Disbrow GL, Staversky RJ, and Lievens JC. Biocatalytic Synthesis of Aromatics from d-Glucose: The Role of Transketolase. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114:3956–62. <https://doi.org/10.1021/ja00036a050>.
- Du L, and Lou L. PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports* 2010;27:255–78. <https://doi.org/10.1039/b912037h>.
- Dunkel M, Schmidt U, Struck S, Berger L, Gruening B, Hossbach J, Jaeger IS, Effmert U, Piechulla B, Eriksson R, et al. SuperScent—a database of flavors and scents. *Nucleic Acids Research* 2008;37:D291–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn695>.
- Durand GA, Raoult D, and Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019;53:371–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.
- Edwards JS, and Palsson BO. Systems properties of the Haemophilus influenzae Rd metabolic genotype. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:17410–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17410>.
- Eriksson KO. Reversed Phase Chromatography. *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* 2018:433–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00022-0>.
- Fan Y, Gao Y, Zhou J, Wei L, Chen J, and Hua Q. Process optimization with alternative carbon sources and modulation of secondary metabolism for enhanced ansamitocin P-3 production in Actinosynnema pretiosum. *Journal of Biotechnology* 2014;192:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.020>.
- Fan Y, Hu F, Wei L, Bai L, and Hua Q. Effects of modulation of pentose-phosphate pathway on biosynthesis of ansamitocins in Actinosynnema pretiosum. *Journal of Biotechnology* 2016a;230:3–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.010>.
- Fan Y, Zhao M, Wei L, Hu F, Imanaka T, Bai L, and Hua Q. Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in Actinosynnem pretiosum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016b;100:2651–62. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7148-2>.

- Farmacopea Argentina. Farmacopea Argentina OCTAVA EDICIÓN. *Farmacopea Argentina* 2004;284:99–119.
- Feist AM, and Palsson BO. The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology* 2010;13:344–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.03.003>.
- Fisch KM. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv* 2013;3:18228–47. <https://doi.org/10.1039/C3RA42661K>.
- Fleming A. Penicillin Nobel Prize. 1945.
- Fondi M, Pinatel E, Talà A, Damiano F, Consolandi C, Mattorre B, Fico D, Testini M, De Benedetto GE, Siculella L, et al. Time-Resolved Transcriptomics and Constraint-Based Modeling Identify System-Level Metabolic Features and Overexpression Targets to Increase Spiramycin Production in *Streptomyces ambofaciens*. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00835>.
- Frioux C, Singh D, Korcsmaros T, and Hildebrand F. From bag-of-genes to bag-of-genomes: metabolic modelling of communities in the era of metagenome-assembled genomes. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020;18:1722–34. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.028>.
- Galperin MY. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology* 2010;13:150–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- Gao Y, Fan Y, Nambou K, Wei L, Liu Z, Imanaka T, and Hua Q. Enhancement of ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* by a synergistic effect of glycerol and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2014;41:143–52. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1374-3>.
- Garcia-Bernardo J, Braña AF, Méndez C, and Salas JA. Insertional inactivation of *mtrX* and *mtrY* genes from the mithramycin gene cluster affects production and growth of the producer organism *Streptomyces argillaceus*. *FEMS Microbiology Letters* 2000;186:61–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09082.x>.
- Gianchandani EP, Chavali AK, and Papin JA. The application of flux balance analysis in systems biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine* 2010;2:372–82. <https://doi.org/10.1002/wsbm.60>.

- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA 3rd, and Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 2009;6:343–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Girão M, Ribeiro I, Ribeiro T, Azevedo IC, Pereira F, Urbatzka R, Leão PN, and Carvalho MF. Actinobacteria Isolated From *Laminaria ochroleuca*: A Source of New Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology* 2019;10:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00683>.
- Gomez-Escribano JP, Castro JF, Razmilic V, Chandra G, Andrews B, Asenjo JA, and Bibb MJ. The *Streptomyces leeuwenhoekii* genome: De novo sequencing and assembly in single contigs of the chromosome, circular plasmid pSLE1 and linear plasmid pSLE2. *BMC Genomics* 2015;16:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1652-8>.
- Gomez-Pinilla F, and Nguyen TTJ. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience* 2012;15:127–33. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000035>.
- Goodfellow M, Nouioui I, Sanderson R, Xie F, and Bull AT. Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018;111:1315–32. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1088-7>.
- Goodfellow M, and Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 1983;37:189–216.
- Grant SGN, Jesseet J, Bloomt FR, and Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants (bacterial restriction/DNA methylation/cloning mammalian DNA/heterogeneous transgene expression/insulin gene regulation). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4645–9.
- Greenhalgh K, Ramiro-Garcia J, Heinken A, Ullmann P, Bintener T, Pacheco MP, Baginska J, Shah P, Frachet A, Halder R, et al. Integrated In Vitro and In Silico Modeling Delineates the Molecular Effects of a Synbiotic Regimen on Colorectal-Cancer-Derived Cells. *Cell Reports* 2019;27:1621-1632.e9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.001>.
- Gregory MA, Till R, and Smith MCM. Integration Site for *Streptomyces* Phage BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 2003;185:5320–3. <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5320-5323.2003>.



- Gu C, Kim GB, Kim WJ, Kim HU, and Lee SY. Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology* 2019;20:121. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>.
- Guo X, Liu N, Li X, Ding Y, Shang F, Gao Y, Ruan J, and Huang Y. Red Soils Harbor Diverse Culturable Actinomycetes That Are Promising Sources of Novel Secondary Metabolites 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.03859-14>.
- Gutierrez JM, Feizi A, Li S, Kallehauge TB, Hefzi H, Grav LM, Ley D, Baycin Hizal D, Betenbaugh MJ, Voldborg B, et al. Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nature Communications* 2020;11:68. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y>.
- Hasan MR, Rahman M, Jaques S, Purwantini E, and Daniels L. Glucose 6-phosphate accumulation in mycobacteria implications for a novel f420-dependent anti-oxidant defense system. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:19135–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074310>.
- Hastings J, Mains A, Virk B, Rodriguez N, Murdoch S, Pearce J, Bergmann S, Le Novère N, and Casanueva O. Multi-Omics and Genome-Scale Modeling Reveal a Metabolic Shift During *C. elegans* Aging. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2019;6:2. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00002>.
- Hertweck C. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angewandte Chemie International Edition* 2009;48:4688–716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>.
- Hiltner JK, Hunter IS, and Hoskisson PA. Tailoring specialized metabolite production in streptomyces. *Advances in Applied Microbiology* 2015;91:237–55. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.02.002>.
- Hodgson DA. Primary metabolism and its control in Streptomyces: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 2000;42:47–238. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(00\)42003-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(00)42003-5).
- Hoe C-H, Raabe CA, Rozhdestvensky TS, and Tang T-H. Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *International Journal of Medical Microbiology* 2013;303:217–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.002>.
- Hopwood D a, and Sherman DH. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 1990;24:37–62.

- Hopwood DA. Soil To Genomics: TheStreptomycesChromosome. *Annu Rev Genet* 2006;40:1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090639>.
- Huang D, Li S, Xia M, Wen J, and Jia X. Genome-scale metabolic network guided engineering of Streptomyces tsukubaensis for FK506 production improvement. *Microbial Cell Factories* 2013a;12:52. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-52>.
- Huang D, Wen J, Wang G, Yu G, Jia X, and Chen Y. In silico aided metabolic engineering of Streptomyces roseosporus for daptomycin yield improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012;94:637–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3773-6>.
- Huang D, Xia M, Li S, Wen J, and Jia X. Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of Streptomyces tsukubaensis and exogenous feeding strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2013b;40:1023–37. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1301-7>.
- Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih C-J, Kao CM, Buttner MJ, et al. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of Streptomyces coelicolor. *Molecular Microbiology* 2005;58:1276–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04879.x>.
- Hunaiti AA, and Kolattukudy PE. Source of methylmalonyl-coenzyme A for erythromycin Synthesis: Methylmalonyl-coenzyme a mutase from Streptomyces erythreus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1984;173–178:173–8. <https://doi.org/10.1128/aac.25.2.173>.
- Hunaiti AR, and Kolattukudy PE. Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing Streptomyces erythreus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1982;216:362–71. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90222-3).
- Husain S, and Singh N. The impact of novel immunosuppressive agents on infections in organ transplant recipients and the interactions of these agents with antimicrobials. *Clinical Infectious Diseases* 2002;35:53–61. <https://doi.org/10.1086/340867>.
- Hutchings MI, Truman AW, and Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 2019;51:72–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

- Huttner BD, Catho G, Pano-Pardo JR, Pulcini C, and Schouten J. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020;26:808–10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.024>.
- Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, Palsson BT, and Lee SY. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2014;32:255–68. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>.
- ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland: 2005.
- Idris H, Goodfellow M, Sanderson R, Asenjo JA, and Bull AT. Actinobacterial Rare Biospheres and Dark Matter Revealed in Habitats of the Chilean Atacama Desert. *Scientific Reports* 2017;7:8373. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08937-4>.
- Iqbal M, Mast Y, Amin R, Hodgson DA, Wohlleben W, and Burroughs NJ. Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: Characterizing key regulators of nutrient depletion responses in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research* 2012;40:5227–39. <https://doi.org/10.1093/nar/gks205>.
- Isabel Mínguez-Mosquera M, and Hornero-Méndez D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. vol. 41. 1993.
- Jensen PR. Natural Products and the Gene Cluster Revolution. *Trends in Microbiology* 2016;24:968–77. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.006>.
- Jiang H, and Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplantation Proceedings* 1999;31:1978–80. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(99\)00235-3](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(99)00235-3).
- Jin Y, Xiao Y, Zhang F, Xue X, Xu Q, and Liang X. Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008;46:418–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.036>.

- Joginder Singh, and Ajar Nath Yadav. Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture. 1st ed. Springer Nature Singapore Pte Ltd.; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1>.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, and Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 2017;45:D353–61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>.
- Kanehisa M, and Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 2000;28:27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Karp PD, Billington R, Caspi R, Fulcher CA, Latendresse M, Kothari A, Keseler IM, Krummenacker M, Midford PE, Ong Q, et al. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics* 2019;20:1085–93. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>.
- Karp PD, Latendresse M, Paley SM, Krummenacker M, Ong QD, Billington R, Kothari A, Weaver D, Lee T, Subhraveti P, et al. Pathway Tools version 19.0 update: software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in Bioinformatics* 2016;17:877–90. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv079>.
- Karp PD, Paley S, and Romero P. The Pathway Tools software. *Bioinformatics* 2002;18:S225–32. [https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl\\_1.S225](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.S225).
- Kavvas ES, Yang L, Monk JM, Heckmann D, and Palsson BO. A biochemically-interpretable machine learning classifier for microbial GWAS. *Nature Communications* 2020;11:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16310-9>.
- Kellermeyer RW, Allen SHG, Stjernholm R, and Wood HG. Methylmalonyl Isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 1964;239:2562–9. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93888-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93888-3).
- Khalifa SAM, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegazy M-EF, Moustafa MS, Abd El-Wahed A, Al-Mousawi SM, Musharraf SG, et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. *Marine Drugs* 2019;17. <https://doi.org/10.3390/md17090491>.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, and Hopwood DA. PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS. The John Innes Foundation, Norwich, UK; 2000. <https://doi.org/10.4016/28481.01>.

- Kim M, Sang Yi J, Kim J, Kim JN, Kim MW, and Kim BG. Reconstruction of a high-quality metabolic model enables the identification of gene overexpression targets for enhanced antibiotic production in streptomyces coelicolor A3(2). *Biotechnology Journal* 2014;9:1185–94. <https://doi.org/10.1002/biot.201300539>.
- Kim M, Yi JS, Lakshmanan M, Lee DY, and Kim BG. Transcriptomics-based strain optimization tool for designing secondary metabolite overproducing strains of *Streptomyces coelicolor*. *Biotechnology and Bioengineering* 2016;113:651–60. <https://doi.org/10.1002/bit.25830>.
- Kim Y, Kim GB, and Lee SY. Machine learning applications in genome-scale metabolic modeling. *Current Opinion in Systems Biology* 2021;25:42–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.03.001>.
- Kittikunapong C, Ye S, Magadán-Corpas P, Pérez-Valero Á, Villar CJ, Lombó F, and Kerkhoven EJ. Reconstruction of a Genome-Scale Metabolic Model of *Streptomyces albus* J1074: Improved Engineering Strategies in Natural Product Synthesis. *Metabolites* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/metabo11050304>.
- Kleessen S, Irgang S, Klie S, Giavalisco P, and Nikoloski Z. Integration of transcriptomics and metabolomics data specifies the metabolic response of *Chlamydomonas* to rapamycin treatment. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 2015;81:822–35. <https://doi.org/10.1111/tpj.12763>.
- Kocagoz T, Saribas Z, and Alp A. Rapid Determination of Rifampin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:6015–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6015-6019.2005>.
- Kong D, Li H, Li X, Xie Z, and Liu H. Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology* 2022;38:4630–43. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.220351>.
- Konieczka P, and Namieśnik J. Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* 2010;1217:882–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.078>.
- Kumar S, Bouic PJ, and Rosenkranz B. A validated stable HPLC method for the simultaneous determination of rifampicin and 25-O-desacetyl rifampicin – evaluation of in vitro metabolism. *Acta Chromatographica* 2019;31:92–8. <https://doi.org/10.1556/1326.2018.00361>.

- Kumelj T, Sulheim S, Wentzel A, and Almaas E. Predicting Strain Engineering Strategies Using iKS1317: A Genome-Scale Metabolic Model of *Streptomyces coelicolor*. *Biotechnology Journal* 2019;14:1800180 (1-10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.201800180>.
- Kuppusamy P, Lee KD, Song CE, Ilavenil S, Srigopalram S, Arasu MV, and Choi KC. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2018;28:282–8. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>.
- Kurapova AI, Zenova GM, Sudnitsyn II, Kizilova AK, Manucharova NA, Norovsuren Zh, and Zvyagintsev DG. Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone. *Microbiology* 2012;81:98–108. <https://doi.org/10.1134/S0026261712010092>.
- Laity JJ. *Deserts and desert environments*. John Wiley & Sons,; 2009.
- Lee N, Kim W, Hwang S, Lee Y, Cho S, Palsson B, and Cho B-K. Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Scientific Data* 2020;7:55. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0395-9>.
- Lewis K. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* 2020;181:29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>.
- Li C, Florova G, Akopiants K, and Reynolds KA. Crotonyl-coenzyme A reductase provides methylmalonyl-CoA precursors for monensin biosynthesis by *Streptomyces cinnamomensis* in an oil-based extended fermentation. *Microbiology* 2004;150:3463–72. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27251-0>.
- Li K, Fan Y, Wang H, Fu Q, Jin Y, and Liang X. Qualitative and quantitative analysis of an alkaloid fraction from *Piper longum* L. using ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015;109:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.012>.
- Li K, Mikola MR, Draths KM, Worden RM, and Frost JW. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 1999;64:61–73. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990705\)64:1<61::AID-BIT7>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990705)64:1<61::AID-BIT7>3.0.CO;2-G).

- Li L-Y, Yang Z-W, Asem MD, Fang B-Z, Salam N, Alkhalifah DHM, Hozzein WN, Nie G-X, and Li W-J. *Streptomyces desertarenae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a desert sample. *Antonie van Leeuwenhoek* 2019;112:367–74. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1163-0>.
- Li S, Wang J, Xiang W, Yang K, Li Z, and Wang W. An Autoregulated Fine-Tuning Strategy for Titer Improvement of Secondary Metabolites Using Native Promoters in *Streptomyces*. *ACS Synthetic Biology* 2018;7:522–30. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00318>.
- Li W, Ying X, Guo Y, Yu Z, Zhou X, Deng Z, Kieser H, Chater KF, and Tao M. Identification of a Gene Negatively Affecting Antibiotic Production and Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 2006;188:8368–75. <https://doi.org/10.1128/JB.00933-06>.
- Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, Mehra S, Glod F, Kyung Y-S, Sherman DH, and Hu W-S. Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics* 2008;9:56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-56>.
- Liao Z, Zhang J, Shi Y, Zhang Y, Ma Z, Bechthold A, and Yu X. Improvement of Rimocidin Biosynthesis by Increasing Supply of Precursor Malonyl-CoA via Over-expression of Acetyl-CoA Carboxylase in *Streptomyces rimosus* M527. *Current Microbiology* 2022;79:1–9. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02867-9>.
- Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, and Tan H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 2013;77:112–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>.
- Liu J, Sun J, Zhang W, Gao K, and He Z. HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008;46:405–9. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2007.10.025>.
- Liu R, Deng Z, and Liu T. *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metabolic Engineering* 2018;50:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.015>.
- Liu T, Jin Z, Wang Z, Chen J, Wei LJ, and Hua Q. Metabolomics analysis of *Actinosynnema pretiosum* with improved AP-3 production by enhancing UDP-glucose

biosynthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2020;130:36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.013>.

Lombó F, Braña AF, Méndez C, and Salas JA. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *Journal of Bacteriology* 1999;181:642–7. <https://doi.org/10.1128/jb.181.2.642-647.1999>.

López-Agudelo VA, Baena A, Ramirez-Malule H, Ochoa S, Barrera LF, and Ríos-Estepa R. Metabolic adaptation of two in silico mutants of *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *BMC Systems Biology* 2017;11:107. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0496-z>.

Lu JL, and Liao JC. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnology and Bioengineering* 1997;53:132–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970120\)53:2<132::AID-BIT2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<132::AID-BIT2>3.0.CO;2-P).

Machado D, Andrejev S, Tramontano M, and Patil KR. Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research* 2018;46:7542–53. <https://doi.org/10.1093/nar/gky537>.

MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, and MacNeil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 1992;111:61–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90603-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90603-M).

Mahajan GB, and Balachandran L. Antibacterial agents from Actinomycetes-A Review. vol. 4. 2012.

Maharjan S, Koju D, Lee HC, Yoo JC, and Sohng JK. Metabolic engineering of *Nocardia* sp. CS682 for enhanced production of nargenicin A1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2012;166:805–17. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9470-1>.

Maharjan S, Park JW, Yoon YJ, Lee HC, and Sohng JK. Metabolic engineering of *Streptomyces venezuelae* for malonyl-CoA biosynthesis to enhance heterologous production of polyketides. *Biotechnology Letters* 2010;32:277–82. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0152-9>.

Mahesh SK, Fathima J, and Veena VG. Cosmetic Potential of Natural Products: Industrial Applications BT - Natural Bio-active Compounds: Volume 2: Chemistry,



- Pharmacology and Health Care Practices. In: Swamy MK, and Akhtar MS, editors. *Natural Bio-active Compounds*, Singapore: Springer Singapore; 2019, p. 215–50. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6_10).
- Mao D, Okada BK, Wu Y, Xu F, and Seyedsayamdost MR. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2018;45:156–63. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2018.05.001>.
- Mariappan TT, Singh B, and Singh S. A validated reversed-phase (C18) HPLC method for simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in USP dissolution medium and simulated gastric fluid. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 2000;6:345–9. <https://doi.org/10.1211/146080800128736187>.
- Martín JF, and Liras P. Molecular mechanisms of phosphate sensing, transport and signalling in streptomyces and related actinobacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>.
- Matsumura E, Nakagawa A, Tomabechei Y, Ikushiro S, Sakaki T, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Sato F, and Minami H. Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Scientific Reports* 2018;8:7980. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26306-7>.
- McCloskey D, Gangoiti JA, King ZA, Naviaux RK, Barshop BA, Palsson BO, and Feist AM. A model-driven quantitative metabolomics analysis of aerobic and anaerobic metabolism in *E. coli* K-12 MG1655 that is biochemically and thermodynamically consistent. *Biotechnology and Bioengineering* 2014;111:803–15. <https://doi.org/10.1002/bit.25133>.
- McCormick JR, and Flärdh K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews* 2012;36:206–31. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x>.
- Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, et al. The Sequence of a 1.8-Mb Bacterial Linear Plasmid Reveals a Rich Evolutionary Reservoir of Secondary Metabolic Pathways. *Genome Biology and Evolution* 2010;2:212–24. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq013>.
- Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brönstrup M, Hammann P, Halby L, Arimondo PB, Glaser P, Aigle B, Bode HB, et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry* 2021;5:726–49. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>.

- Mirza S, Bokhari H, and Fatmi M. Exploring Natural Products from the Biodiversity of Pakistan for Computational Drug Discovery Studies: Collection, Optimization, Design and Development of A Chemical Database (ChemDP). *Current Computer Aided-Drug Design* 2015;11:102–9. <https://doi.org/10.2174/157340991102150904101740>.
- Mo S, Ban Y-H, Park JW, Yoo YJ, and Yoon YJ. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2009;36:1473–82. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0635-7>.
- Mohan B, Sharda N, and Singh S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003;31:607–12. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00715-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00715-X).
- Mohite OS, Weber T, Kim HU, and Lee SY. Genome-Scale Metabolic Reconstruction of Actinomycetes for Antibiotics Production. *Biotechnology Journal* 2019;14:1800377. <https://doi.org/10.1002/biot.201800377>.
- Moore BS, and Hertweck C. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Natural Product Reports* 2002;19:70–99. <https://doi.org/10.1039/b003939j>.
- Moore SJ, Lai HE, Chee SM, Toh M, Coode S, Chengan K, Capel P, Corre C, De Los Santos ELC, and Freemont PS. A *Streptomyces venezuelae* Cell-Free Toolkit for Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology* 2021;10:402–11. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00581>.
- Müller-Sepúlveda A, Letelier ME, San Martín B, and Saavedra-Saavedra I. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DIFFERENT FLAVONOIDS IN HUMAN PLASMA BY A SIMPLE HPLC ASSAY. *Journal of the Chilean Chemical Society* 2016;61:3164–9. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072016000400003>.
- Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, and Gray A. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)* 2022;399:629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- Myronovskiy M, Brötz E, Rosenkränzer B, Manderscheid N, Tokovenko B, Rebets Y, and Luzhetskyy A. Generation of new compounds through unbalanced transcription of landomycin A cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016;100:9175–86. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7721-3>.

- Myronovskiy M, and Luzhetskyy A. Native and engineered promoters in natural product discovery. *Natural Product Reports* 2016;33:1006–19. <https://doi.org/10.1039/c6np00002a>.
- Naveja JJ, Rico-Hidalgo MP, and Medina-Franco JL. Analysis of a large food chemical database: chemical space, diversity, and complexity [version 2; peer review: 3 approved]. *F1000Research* 2018;7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15440.2>.
- Newman DJ, and Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020;83:770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- Newman DJ, and Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 2016;79:629–61. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Norsigian CJ, Pusarla N, McConn JL, Yurkovich JT, Dräger A, Palsson BO, and King Z. BiGG Models 2020: multi-strain genome-scale models and expansion across the phylogenetic tree. *Nucleic Acids Research* 2020;48:D402–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1054>.
- Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, Pukall R, Klenk HP, Goodfellow M, and Göker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum actinobacteria. *Frontiers in Microbiology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>.
- Obanye AIC, Hobbs G, Gardner DCJ, and Oliver SG. Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 1996;142:133–7. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-1-133>.
- Ochi K, and Hosaka T. New strategies for drug discovery: Activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013;97:87–98. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9>.
- Okoro CK, Brown R, Jones AL, Andrews BA, Asenjo JA, Goodfellow M, and Bull AT. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek* 2009;95:121–33. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>.

- Okoro CK, Bull AT, Mutreja A, Rong X, Huang Y, and Goodfellow M. *Lechevalieria atacamensis* sp.nov., *Lechevalieria deserti* sp. nov. and *lechevalieria roselyniae* sp. nov., isolated from hyperarid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010;60:296–300. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009985-0>.
- Ōmura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. vol. 98. 2001.
- O'Neill J. Tackling Drug-Resistance Infections Globally: Final Report and Recommendations. The review on Antimicrobial Resistance. 2016.
- Orth JD, Thiele I, and Palsson BO. What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* 2010;28:245–8. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>.
- Otani H, Higo A, Nanamiya H, Horinouchi S, and Ohnishi Y. An alternative sigma factor governs the principal sigma factor in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology* 2013;87:1223–36. <https://doi.org/10.1111/mmi.12160>.
- Ouchari L, Boukeskase A, Bouizgarne B, and Ouhdouch Y. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biology Open* 2019;8. <https://doi.org/10.1242/bio.035410>.
- Pacheco MP, Bintener T, Ternes D, Kulms D, Haan S, Letellier E, and Sauter T. Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction. *EBioMedicine* 2019;43:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.046>.
- Pacios O, Blasco L, Bleriot I, Fernandez-Garcia L, González Bardanca M, Ambroa A, López M, Bou G, and Tomás M. Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. *Antibiotics* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020065>.
- Palazzotto E, Tong Y, Lee SY, and Weber T. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery. *Biotechnology Advances* 2019;37. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.005>.
- Panchagnula R, Sood A, Sharda N, Kaur K, and Kaul CL. Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method. vol. 18. 1999.

- Paradkar A. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: Biogenesis, regulation and strain improvement. *Journal of Antibiotics* 2013;66:411–20. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.26>.
- Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, and Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today* 2016;21:204–7. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>.
- Paukner S, Gelone SP, Arends SJR, Flamm RK, and Sader HS. Antibacterial Activity of Lefamulin against Pathogens Most Commonly Causing Community-Acquired Bacterial Pneumonia: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2015–2016). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019;63:10.1128/aac.02161-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02161-18>.
- Paukner S, and Riedl R. Pleuromutilins: Potent drugs for resistant bugs-mode of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2017;7:a027110. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027110>.
- Pauls RE, and McCoy RW. Testing Procedures for Liquid Chromatographic Columns. *Journal of Chromatographic Science* 1986;24:66–9. <https://doi.org/10.1093/chromsci/24.2.66>.
- Pelizza G, Nebuloni M, Ferrari P, and Gallo GG. Polymorphism of rifampicin. *Il Farmaco; Edizione Scientifica* 1977;32:471—481.
- Peñalver Bernabé B, Thiele I, Galdones E, Siletz A, Chandrasekaran S, Woodruff TK, Broadbelt LJ, and Shea LD. Dynamic genome-scale cell-specific metabolic models reveal novel inter-cellular and intra-cellular metabolic communications during ovarian follicle development. *BMC Bioinformatics* 2019;20:307. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2825-2>.
- Pfeifer BA, and Khosla C. Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001;65:106–18. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.1.106-118.2001>.
- Pidot SJ, Coyne S, Kloss F, and Hertweck C. Antibiotics from neglected bacterial sources. *International Journal of Medical Microbiology* 2014;304:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.011>.
- Prankerd RJ, Walters JM, and Parnes JH. Kinetics for degradation of rifampicin, an azomethine-containing drug which exhibits reversible hydrolysis in acidic solutions.

*International Journal of Pharmaceutics* 1992;78:59–67.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90355-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90355-6).

Pye CR, Bertin MJ, Lokey RS, Gerwick WH, and Linington RG. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017;114:5601–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614680114>.

Quinn GA, Banat AM, Abdelhameed AM, and Banat IM. Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology* 2020;69:1040–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>.

Quirós-Roldán E, Airoldi M, Moretti F, and Carosi G. Bases moleculares de resistencia de Mycobacterium tuberculosis. *Revista de Diagnóstico Biológico* 2001;50:200–3.

Rateb ME, Ebel R, and Jaspars M. Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018;111:1467–77. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1030-z>.

Rateb ME, Houssen WE, Arnold M, Abdelrahman MH, Deng H, Harrison WTA, Okoro CK, Asenjo JA, Andrews BA, Ferguson G, et al. Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a Hyper-arid Desert Streptomyces sp. *Journal of Natural Products* 2011a;74:1491–9. <https://doi.org/10.1021/np200320u>.

Rateb ME, Houssen WE, Harrison WTA, Deng H, Okoro CK, Asenjo JA, Andrews BA, Bull AT, Goodfellow M, Ebel R, et al. Diverse Metabolic Profiles of a Streptomyces Strain Isolated from a Hyper-arid Environment. *Journal of Natural Products* 2011b;74:1965–71. <https://doi.org/10.1021/np200470u>.

Rausch H, and Lehmann M. Structural analysis of the actinophage C31 attachment site. *Nucleic Acids Research* 1991;19:5187–9. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5187>.

Rawson TM, Ming D, Ahmad R, Moore LSP, and Holmes AH. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18:409–10. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0395-y>.

Razmilic V. Metabolism analysis of Streptomyces leeuwenhoekii C34 with a genome scale model and identification of biosynthetic genes of specialised metabolites by genome mining. 2017.

- Razmilic V, Castro JF, Andrews B, and Asenjo JA. Analysis of metabolic networks of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 by means of a genome scale model: Prediction of modifications that enhance the production of specialized metabolites. *Biotechnology and Bioengineering* 2018;115:1815–28. <https://doi.org/10.1002/bit.26598>.
- Rebets Y, Brötz E, Tokovenko B, and Luzhetskyy A. Actinomycetes biosynthetic potential: how to bridge in silico and in vivo? *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014;41:387–402. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1352-9>.
- Reeves AR, Brikun IA, Cernota WH, Leach BI, Gonzalez MC, and Mark Weber J. Engineering of the methylmalonyl-CoA metabolite node of *Saccharopolyspora erythraea* for increased erythromycin production. *Metabolic Engineering* 2007;9:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.02.001>.
- Reeves AR, Brikun IA, Cernota WH, Leach BI, Gonzalez MC, and Weber JM. Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2006;33:600–9. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0094-3>.
- Risdian C, Mozef T, and Wink J. Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms* 2019;7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050124>.
- Robinson JA. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 1991;332:107–14. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0038>.
- Rossiter SE, Fletcher MH, and Wuest WM. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. *Chemical Reviews* 2017;117:12415–74. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>.
- Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, and Lee KJ. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:7132–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.01308-06>.
- Sachin BS, Bhat V, Koul M, Sharma SC, Tikoo MK, Tikoo AK, Satti NK, Suri KA, and Johri RK. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of rifampicin and a flavonoid glycoside - A novel bioavailability enhancer of rifampicin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2009;8:531–7. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v8i6.49400>.

- Saha R, Chowdhury A, and Maranas CD. Recent advances in the reconstruction of metabolic models and integration of omics data. *Current Opinion in Biotechnology* 2014;29:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.011>.
- Said-Fernández S, Becerril-Montes P, Molina-Salinas GM, Barrios-García H, and Vargas-Villareal J. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enfermedades Emergentes* 2005;7:13–9.
- Salerno P, Larsson J, Bucca G, Laing E, Smith CP, and Flärdh K. One of the Two Genes Encoding Nucleoid-Associated HU Proteins in *Streptomyces coelicolor* Is Developmentally Regulated and Specifically Involved in Spore Maturation †. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 2009;191:6489–500. <https://doi.org/10.1128/JB.00709-09>.
- Salwan R, and Sharma V. Bioactive compounds of *Streptomyces*: Biosynthesis to applications. vol. 64. 1st ed. Elsevier Inc.; 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00015-2>.
- Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Santhanam R, Okoro CK, Rong X, Huang Y, Bull AT, Weon H-Y, Andrews BA, Asenjo JA, and Goodfellow M. *Streptomyces atacamensis* sp. nov., isolated from an extreme hyper-arid soil of the Atacama Desert, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012;62:2680–4. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038463-0>.
- Santhanam R, Rong X, Huang Y, Andrews BA, Asenjo JA, and Goodfellow M. *Streptomyces bullii* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2013;103:367–73. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9816-x>.
- Sayed AM, Hassan MHA, Alhadrami HA, Hassan HM, Goodfellow M, and Rateb ME. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology* 2020;128:630–57. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>.
- Schellenberger J, Park JO, Conrad TM, and Palsson BØ. BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions. *BMC Bioinformatics* 2010;11:213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-213>.



- Scherlach K, and Hertweck C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2009;7:1753–60. <https://doi.org/10.1039/b821578b>.
- Schulz D, Beese P, Ohlendorf B, Erhard A, Zinecker H, Dorador C, and Imhoff JF. Abenquines A–D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *The Journal of Antibiotics* 2011;64:763–8. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.87>.
- Shah P, Pandya T, Gohel M, and Thakkar V. Development and Validation of HPLC method for simultaneous estimation of Rifampicin and Ofloxacin using experimental design. *Journal of Taibah University for Science* 2019;13:146–54. <https://doi.org/10.1080/16583655.2018.1548748>.
- Shao HZ, Ren SX, Liu QX, Xu J, Yan H, Zhao GP, and Wang J. A preliminary study of the mechanism of nitrate-stimulated remarkable increase of rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* U32 by RNA-seq. *Microbial Cell Factories* 2015;14:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0264-y>.
- Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003;7:285–95. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6).
- Shima J, Hesketh A, Okamoto S, Kawamoto S, and Ochi K. Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 1996;178:7276–84. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7276-7284.1996>.
- Shirling EB, and Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1966;16:313–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
- Singer AC, Kirchhelle C, and Roberts AP. (Inter)nationalising the antibiotic research and development pipeline. *The Lancet Infectious Diseases* 2020;20:e54–62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30552-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30552-3).
- Sivalingam P, Hong K, Pote J, and Prabakar K. Extreme environment streptomyces: Potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? *International Journal of Microbiology* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>.

- Skoog DA, Holler FJ, and Crouch SR. Principles of instrumental analysis: introduction. Seventh Ed. Cengage Learning Inc.; 1998.
- Sodhi M, and Etminan M. Therapeutic Potential for Tetracyclines in the Treatment of COVID-19. *Pharmacotherapy* 2020;40:487—488. <https://doi.org/10.1002/phar.2395>.
- Sparks TC, Wessels FJ, Lorsbach BA, Nugent BM, and Watson GB. The new age of insecticide discovery-the crop protection industry and the impact of natural products. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2019;161:12–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.002>.
- Stavrianidi A, Stekolshchikova E, Porotova A, Rodin I, and Shpigun O. Combination of HPLC–MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017;132:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.041>.
- Stone MJ, and Williams DH. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Molecular Microbiology* 1992;6:29–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00834.x>.
- Studier FW, and Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 1986;189:113–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- Sulheim S, Sa Kumelj T, Van Dissel D, Almaas E, Wentzel A, and Kerkhoven EJ. Enzyme-Constrained Models and Omics Analysis of *Streptomyces coelicolor* Reveal Metabolic Changes that Enhance Heterologous Production. *IScience* 2020;23:101525. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101525>.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 2018;18:318–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, and Chater K. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 2005;56:465—479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04543.x>.

- Tan GY, and Liu T. Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in actinobacteria. *Metabolic Engineering* 2017;39:228–36. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.12.006>.
- Tang B, Xie F, Zhao W, Wang J, Dai S, Zheng H, Ding X, Cen X, Liu H, Yu Y, et al. A systematic study of the whole genome sequence of *Amycolatopsis methanolica* strain 239T provides an insight into its physiological and taxonomic properties which correlate with its position in the genus. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2016;1:169–86. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.05.001>.
- Taylor BN, and Kuyatt CE. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. *Technology* 1994.
- Thakare R, Kesharwani P, Dasgupta A, Srinivas N, and Chopra S. Chapter 1 - Antibiotics: past, present, and future. In: Kesharwani P, Chopra S, and Dasgupta ABT-DDTD-RB, editors., Academic Press; 2020, p. 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818480-6.00001-1>.
- Thiele I, and Palsson BØ. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols* 2010;5:93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>.
- Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, and Dzobo K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>.
- Tiukova IA, Prigent S, Nielsen J, Sandgren M, and Kerkhoven EJ. Genome-scale model of *Rhodotorula toruloides* metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 2019;116:3396–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.27162>.
- Tiwari K, Upadhyay DJ, Mösker E, Süßmuth R, and Gupta RK. Culturable bioactive actinomycetes from the Great Indian Thar Desert. *Annals of Microbiology* 2015;65:1901–14. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1028-3>.
- Toro L, Pinilla L, Avignone-Rossa C, and Ríos-Esteva R. An enhanced genome-scale metabolic reconstruction of *Streptomyces clavuligerus* identifies novel strain improvement strategies. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2018;41:657–69. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1900-9>.

- Turner WB. Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 1973;2:209–17.
- Valverde JR, Gullón S, and Mellado RP. Modelling the metabolism of protein secretion through the Tat route in *Streptomyces lividans*. *BMC Microbiology* 2018;18. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1199-3>.
- Vlasie MD, and Banerjee R. Tyrosine 89 Accelerates Co-Carbon Bond Homolysis in Methylmalonyl-CoA Mutase. *Journal of the American Chemical Society* 2003;125:5431–5. <https://doi.org/10.1021/ja029420+>.
- Wang C, Liu J, Liu H, Liang S, and Wen J. Combining metabolomics and network analysis to improve tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* using different exogenous feedings. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2017a;44:1527–40. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1974-4>.
- Wang C, Liu J, Liu H, Wang J, and Wen J. A genome-scale dynamic flux balance analysis model of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 to predict the targets for increasing FK506 production. *Biochemical Engineering Journal* 2017b;123:45–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.03.017>.
- Wang H, Marcišauskas S, Sánchez BJ, Domenzain I, Hermansson D, Agren R, Nielsen J, and Kerkhoven EJ. RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on *Streptomyces coelicolor*. *PLOS Computational Biology* 2018;14:e1006541. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006541>.
- Wang Q, Xie F, Tong Y, Habisch R, Yang B, Zhang L, Müller R, and Fu C. Dual-function chromogenic screening-based CRISPR/Cas9 genome editing system for actinomycetes. *APPLIED GENETICS AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY Applied Microbiology and Biotechnology* 2020;104:225–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10223-4>.
- Wang W, Li X, Wang J, Xiang S, Feng X, and Yang K. An engineered strong promoter for streptomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 2013;79:4484–92. <https://doi.org/10.1128/AEM.00985-13>.
- Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, and Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: Meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *British Medical Journal* 2005;331:810–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.38569.471007.AE>.

- Weiwen Zhang, Yang L, and Jiang W. Molecular Analysis and Heterologous Expression of the Gene Encoding Methylmalonyl–Coenzyme A Mutase from Rifamycin SV–Producing Strain *Mycolatopsis mediterranei* U32. *Applied Biochemistry And Biotechnology* 1999;82.
- Wellcome Trust. What are drug-resistant infections? 2019. <https://wellcome.org/news/what-are-drug-resistant-infections> (accessed June 3, 2023).
- Van Wezel GP, and McDowall KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: New links and experimental advances. *Natural Product Reports* 2011;28:1311–33. <https://doi.org/10.1039/c1np00003a>.
- van Wezel GP, Vijgenboom E, and Bosch L. A comparative study of the ribosomal RNA operons of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and sequence analysis of *rrnA*. *Nucleic Acids Research* 1991;19:4399—4403. <https://doi.org/10.1093/nar/19.16.4399>.
- Wink J, Mohammadipanah F, and Hamedi J. Biology and biotechnology of Actinobacteria. 2017. <https://doi.org/10.1201/b16136-9>.
- Wook lee J, na dokyun, myoung Park J, lee J, choi sol, and yup lee sang. systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals 2012. <https://doi.org/10.1038/nchembio.970>.
- World Health Organization. 2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development an overview and analysis. 2021.
- World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: early implementation 2020. 2020.
- Wu Q Bin, Zhang XY, Chen XA, and Li YQ. Improvement of FK506 production via metabolic engineering-guided combinational strategies in *Streptomyces tsukubaensis*. *Microbial Cell Factories* 2021;20:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01660-w>.
- Yang D, Eun H, Prabowo CPS, Cho S, and Lee SY. Metabolic and cellular engineering for the production of natural products. *Current Opinion in Biotechnology* 2022;77:102760. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102760>.
- Yates PA, Newman SA, Oshry LJ, Glassman RH, Leone AM, and Reichel E. Doxycycline treatment of high-risk COVID-19-positive patients with comorbid pulmonary disease.

- Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2020;14:1753466620951053.  
<https://doi.org/10.1177/1753466620951053>.
- Yue Y, Chu G-X, Liu X-S, Tang X, Wang W, Liu G-J, Yang T, Ling T-J, Wang X-G, Zhang Z-Z, et al. TMDB: A literature-curated database for small molecular compounds found from tea. *BMC Plant Biology* 2014;14:243. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0243-1>.
- Zabala D, Braña AF, Flórez AB, Salas JA, and Méndez C. Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metabolic Engineering* 2013;20:187–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.10.002>.
- Zarins-Tutt JS, Barberi TT, Gao H, Mearns-Spragg A, Zhang L, Newman DJ, and Goss RJM. Prospecting for new bacterial metabolites: A glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Natural Product Reports* 2016;33:54–72.  
<https://doi.org/10.1039/c5np00111k>.
- Zenkevich IG, and Makarov ED. Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation: Application of the modified method of double internal standard. *Journal of Chromatography A* 2007;1150:117–23.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.083>.
- Zerbe-Burkhardt K, Ratnatilleke A, Philippon N, Birch A, Leiser A, Vrijbloed JW, Hess D, Hunziker P, and Robinson JA. Cloning, sequencing, expression, and insertional inactivation of the gene for the large subunit of the coenzyme B12-dependent isobutyryl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:6508–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6508>.
- Zha W, Rubin-Pitel SB, Shao Z, and Zhao H. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 2009;11:192–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.01.005>.
- Zhang J, Zhang D, Zhu J, Liu H, Liang S, and Luo Y. Efficient Multiplex Genome Editing in *Streptomyces* via Engineered CRISPR-Cas12a Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2020;8:1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00726>.

Zhou P, Liu Z, Chen Y, Xiao Y, Huang X, and Fan X-G. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2020;41:1124–5. <https://doi.org/DOI: 10.1017/ice.2020.156>.

Zhou Xiang, Wu H, Li Z, Zhou Xiufen, Bai L, and Deng Z. Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase increases validamycin A but decreases validoxylamine A production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* 5008. *Metabolic Engineering* 2011;13:768–76. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.10.001>.

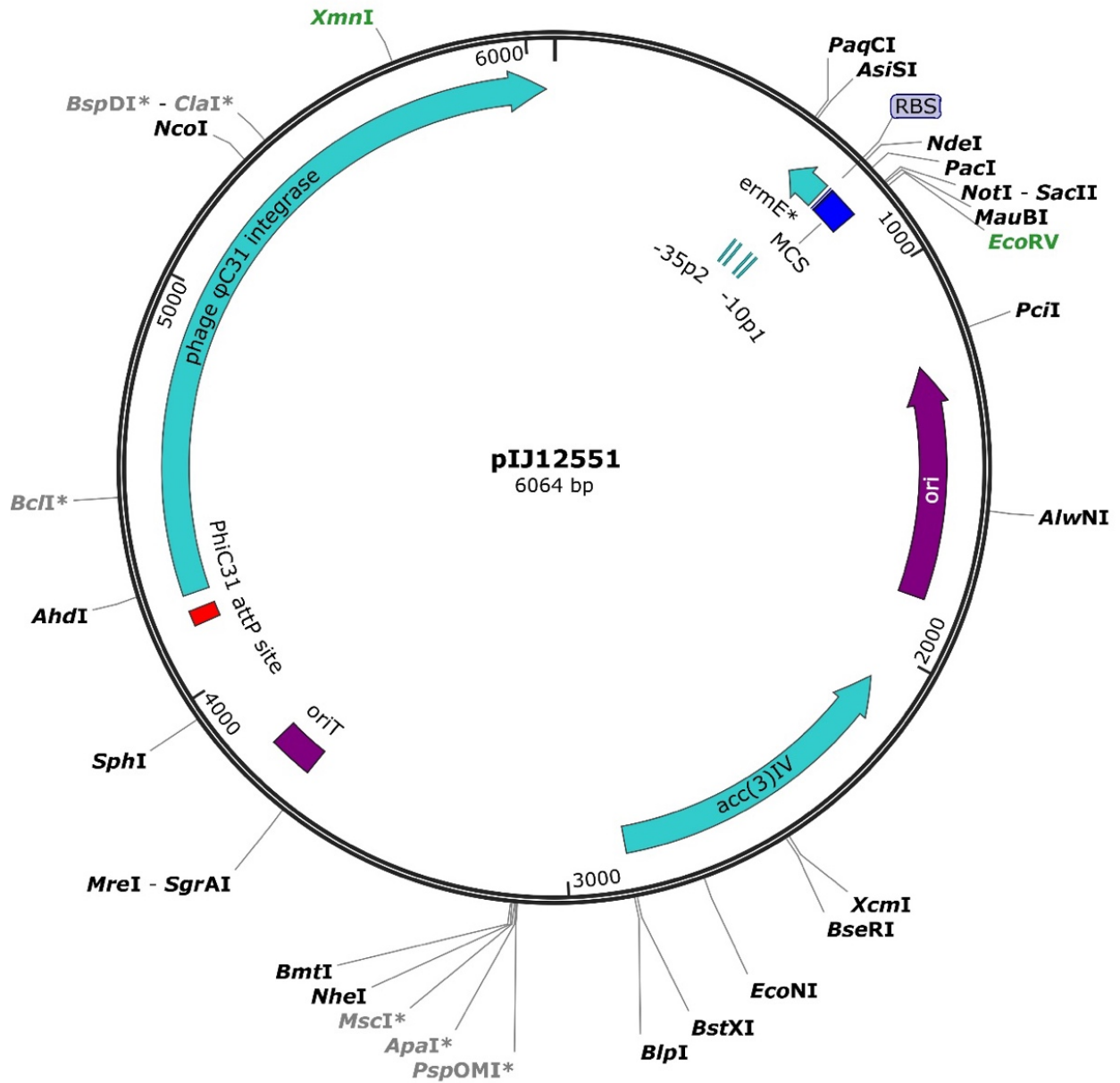
Ziemert N, Alanjary M, and Weber T. The evolution of genome mining in microbes-a review. *Natural Product Reports* 2016;33:988–1005. <https://doi.org/10.1039/c6np00025h>.

Zorro-Aranda A, Escorcía-Rodríguez JM, González-Kise JK, and Freyre-González JA. Curation, inference, and assessment of a globally reconstructed gene regulatory network for *Streptomyces coelicolor*. *Scientific Reports* 2022;12:2840. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06658-x>.

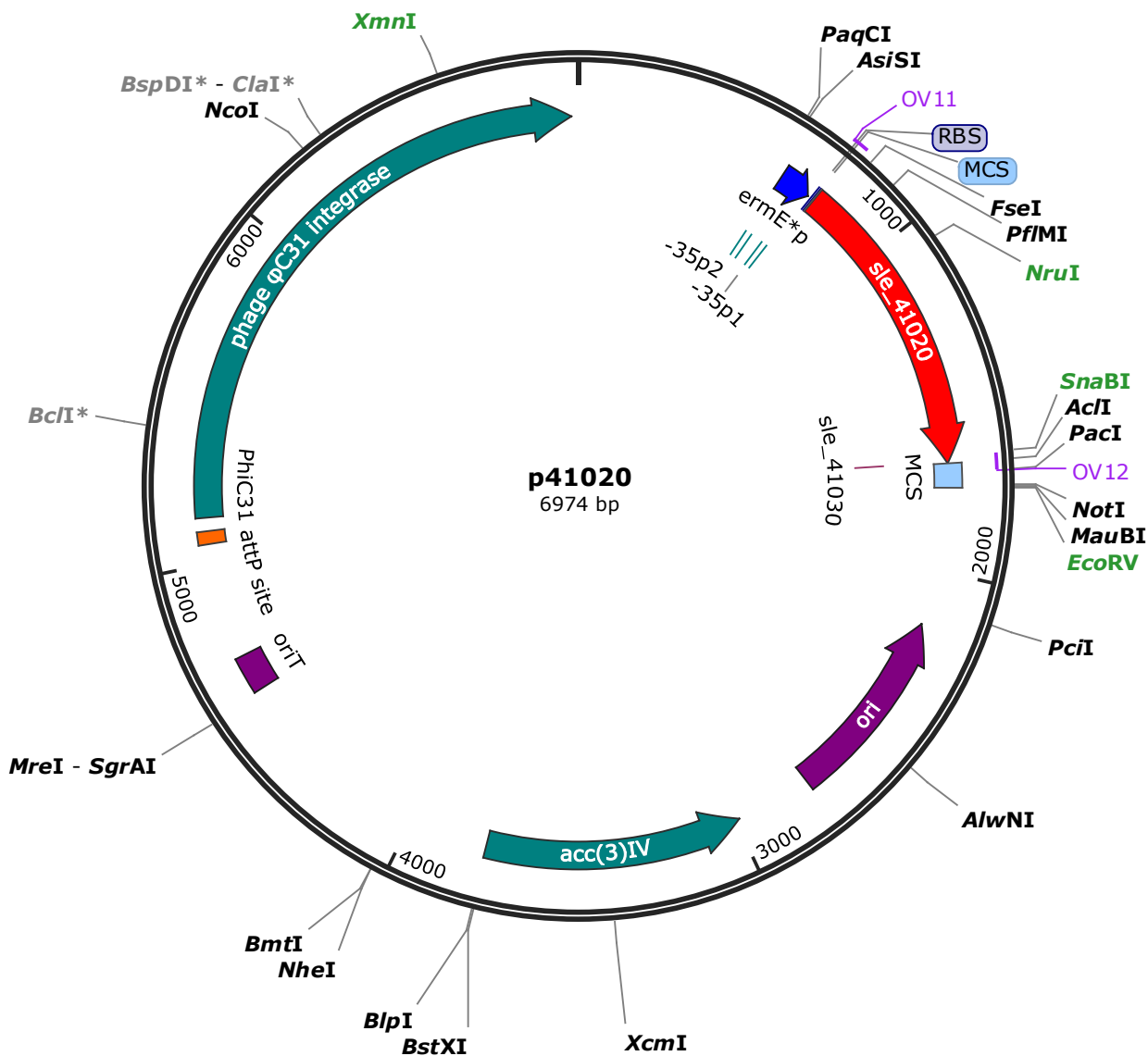
**Anexo**

**Mapa de vectores y construcciones**

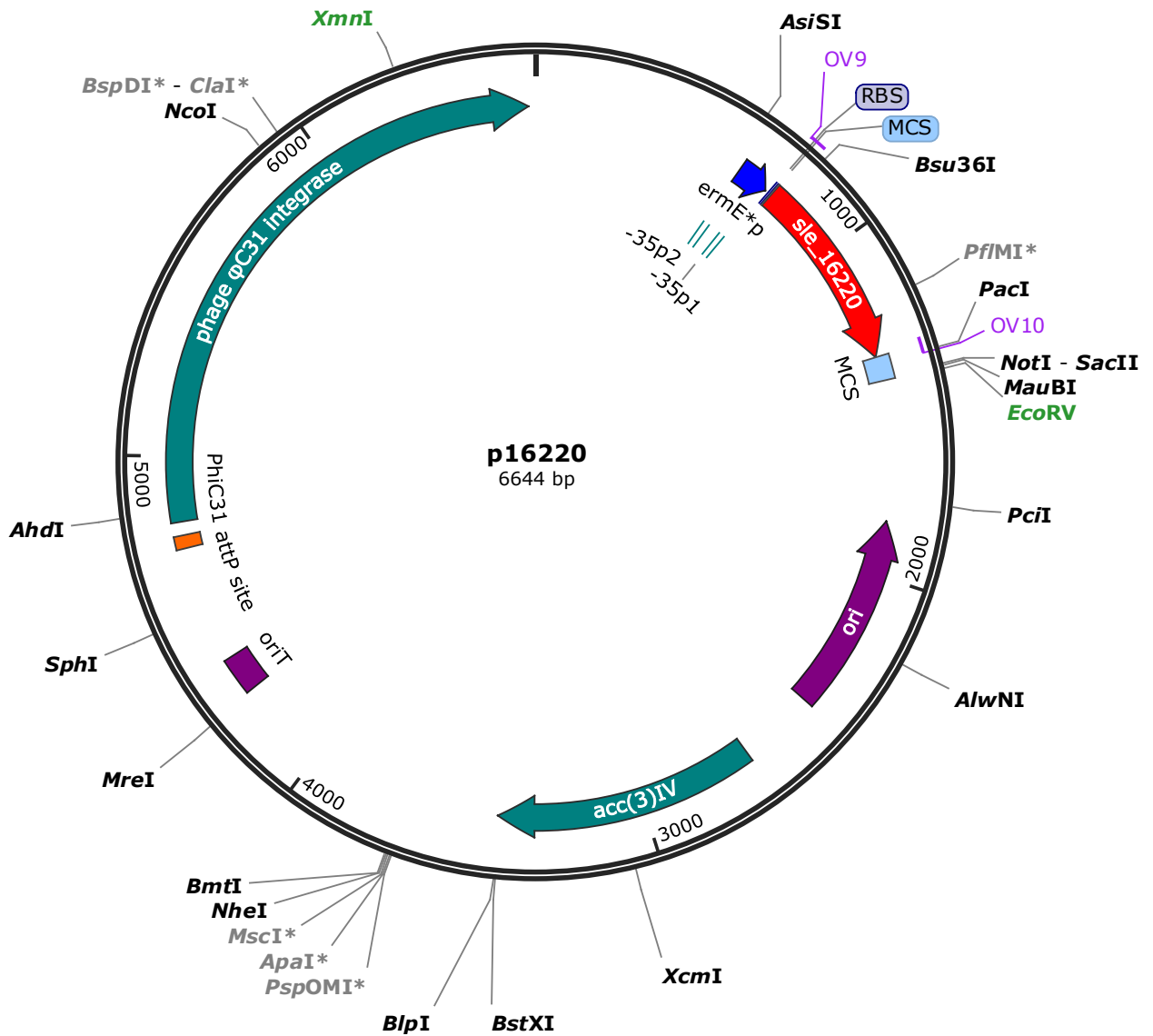




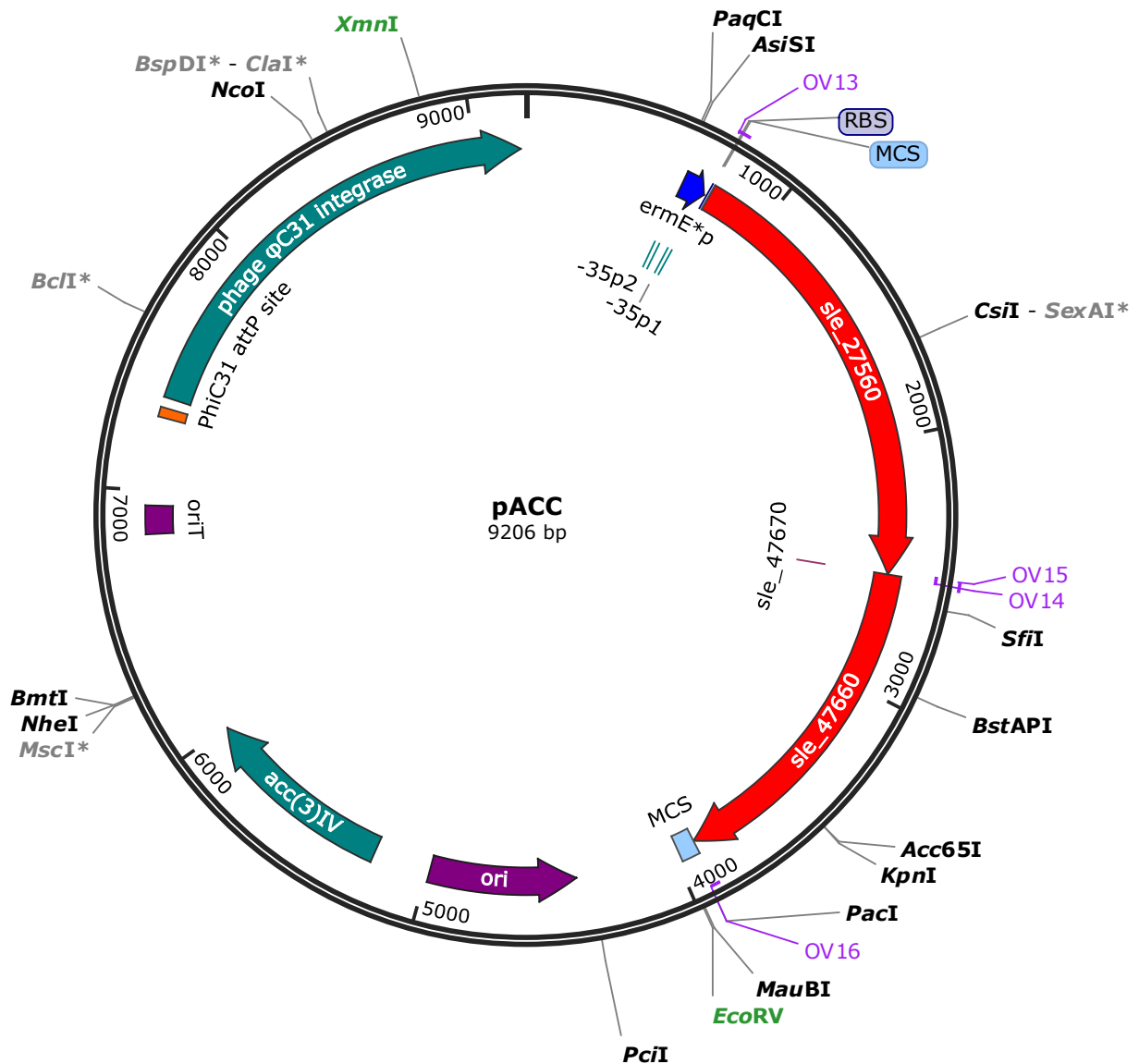
**Figura A1:** Mapa del plásmido integrativo pIJ12551. Se utiliza para la clonación de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\** y selección por resistencia al antibiótico apramicina. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde.



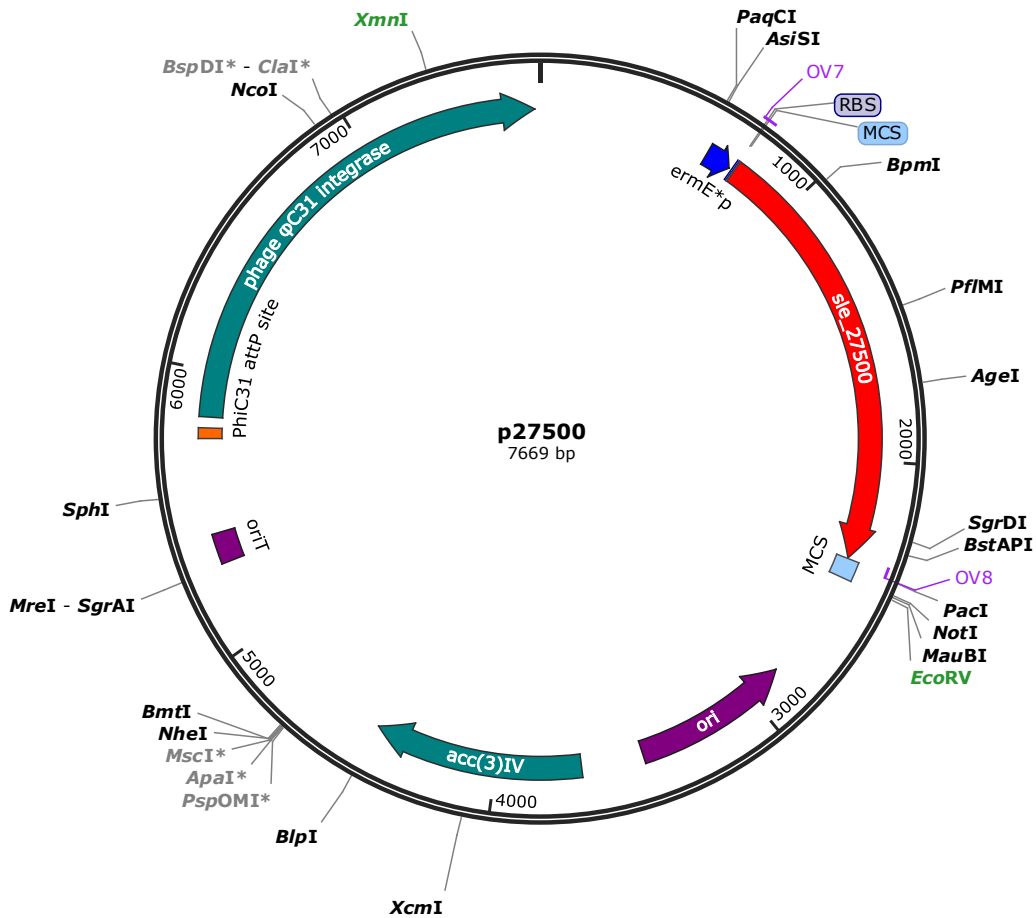
**Figura A2:** Mapa del constructo p41020, derivado de pIJ12551. El plásmido p41020 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle41020*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



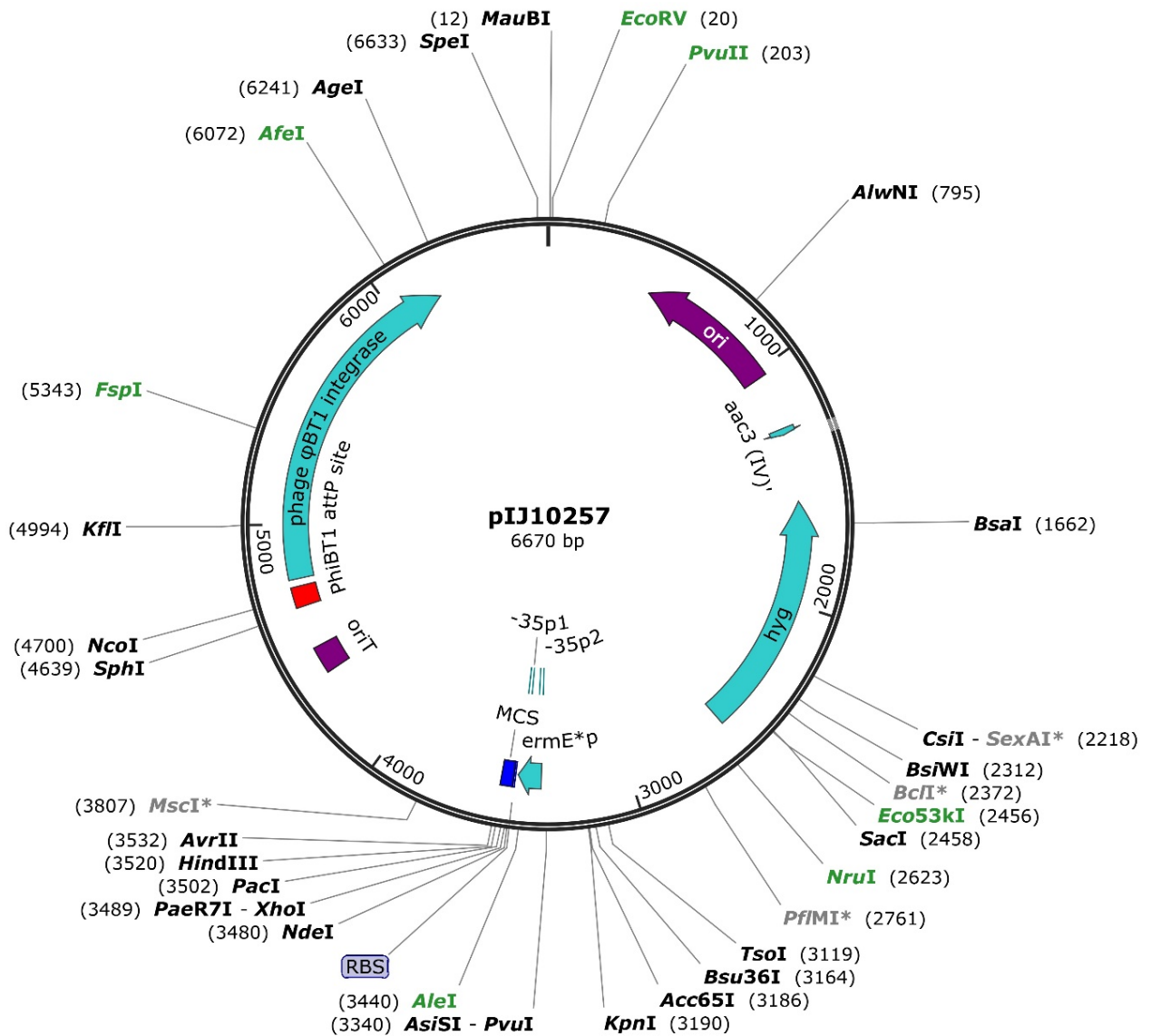
**Figura A3:** Mapa del constructo p16220, derivado de pIJ12551. El plásmido p16220 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle16220*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



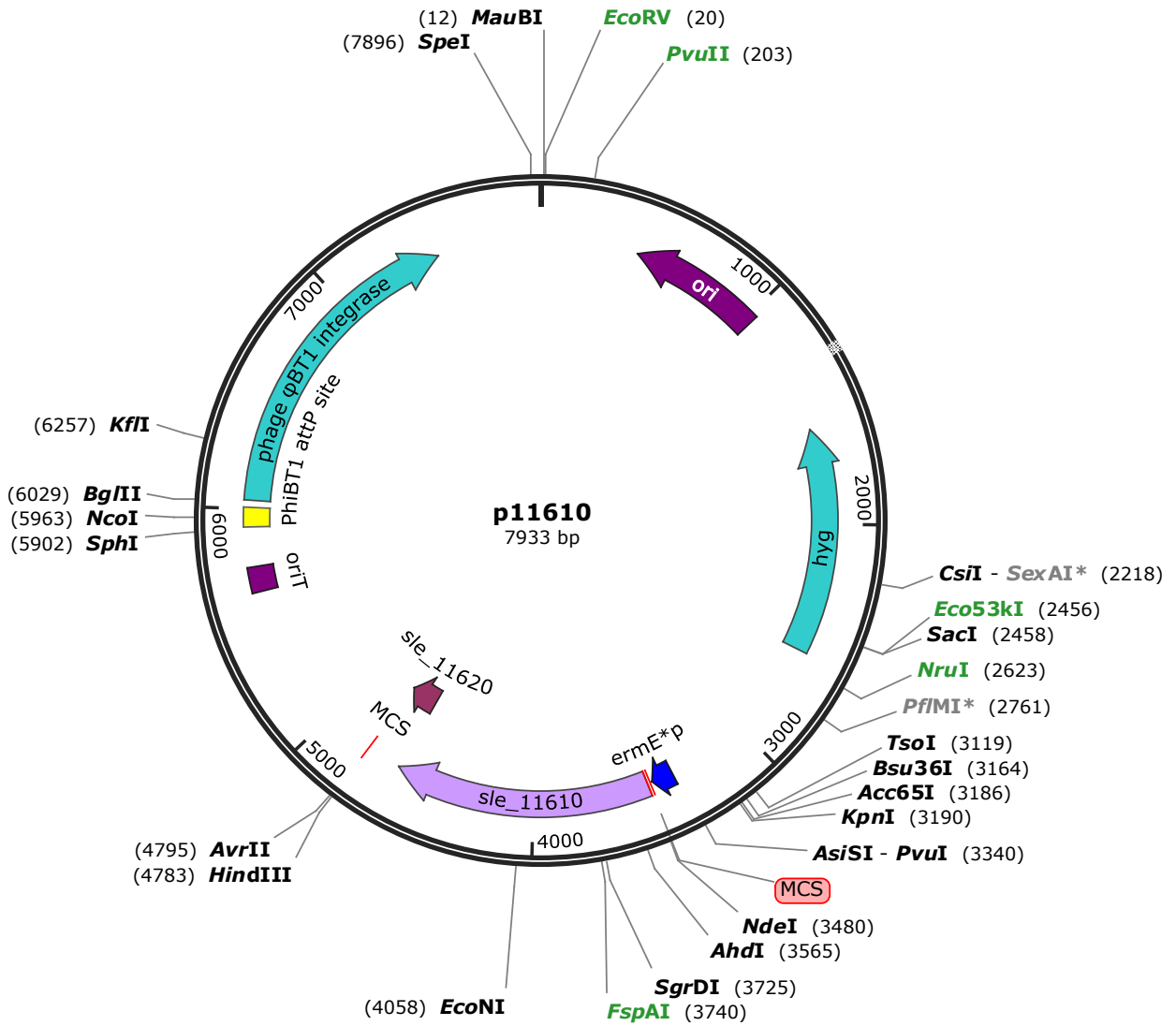
**Figura A4:** Mapa del constructo pACC derivado de pIJ12551. El plásmido pACC contiene los genes endógenos de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle47660* y *sle27560*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



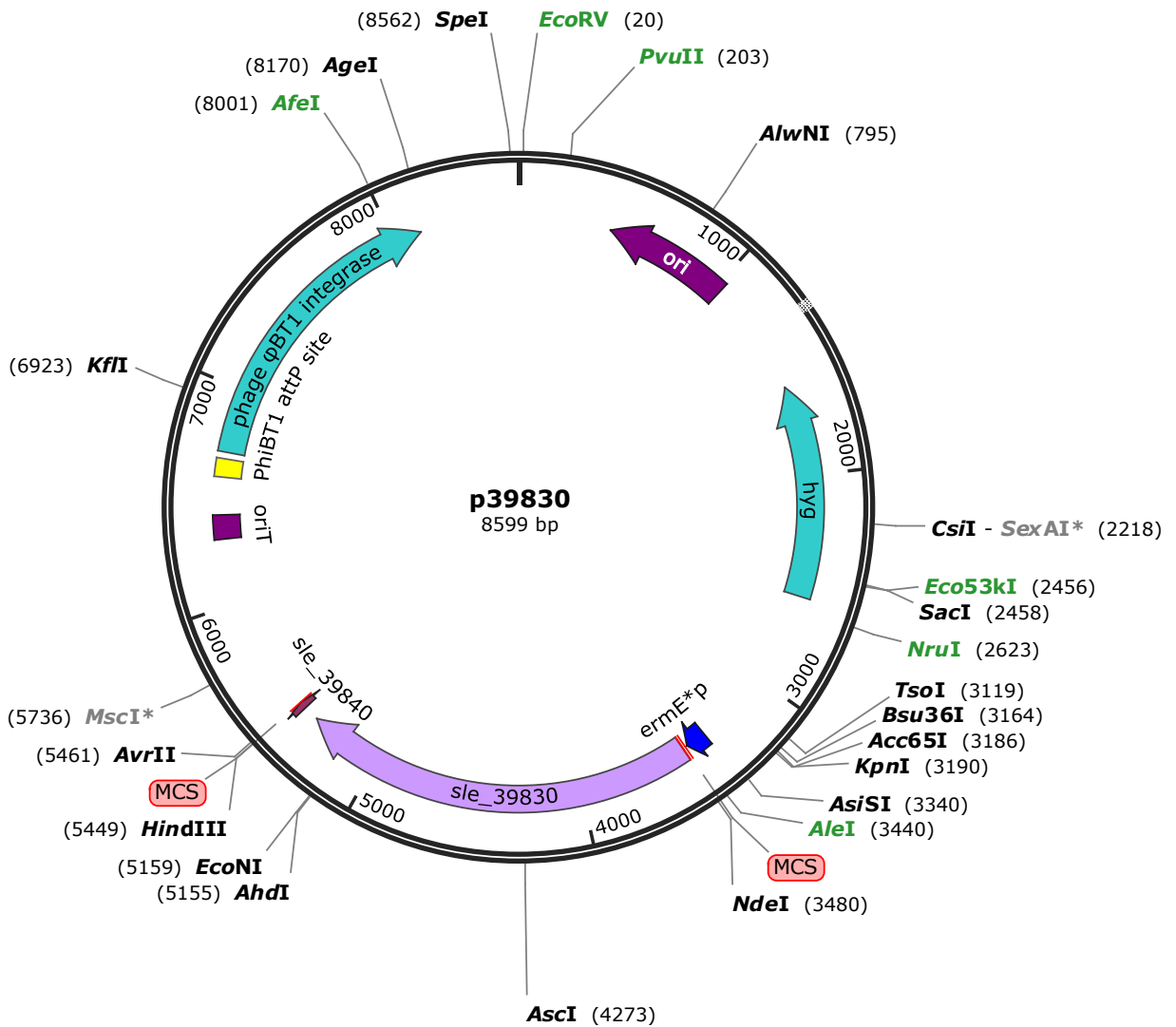
**Figura A5:** Mapa del constructo p27500 derivado de pIJ12551. El plásmido p27500 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle27500*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde.



**Figura A6:** Mapa del plásmido integrativo pIJ10257. Se utiliza para la clonación de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\** y selección por resistencia al antibiótico higromicina. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde.

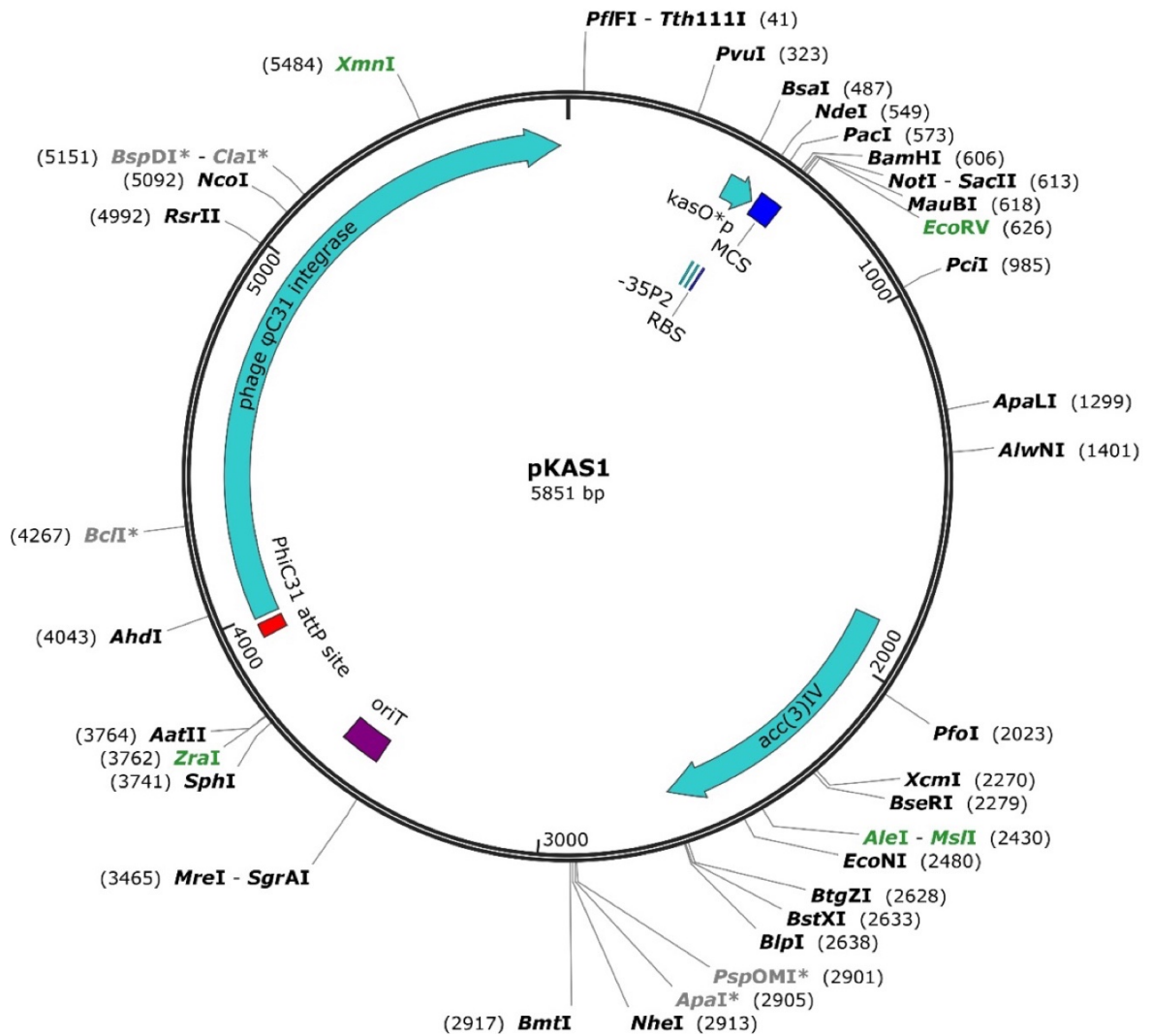


**Figura A7:** Mapa del constructo p11610, derivado de pIJ10257. El plásmido p11610 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, sle11610, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo ermE\*. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde

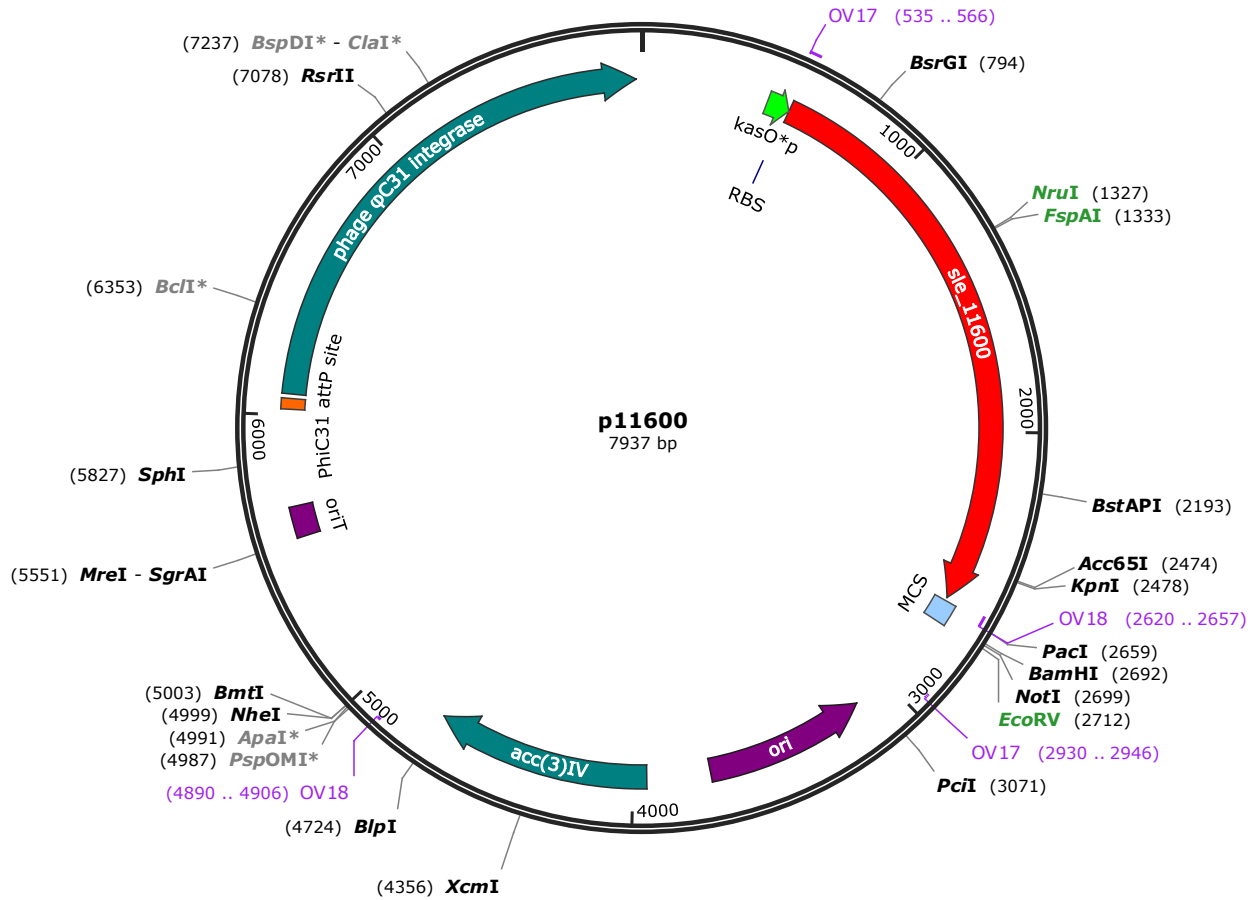


**Figura A8:** Mapa del constructo p39830 derivado de pIJ10257. El plásmido p39830 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle39830*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde

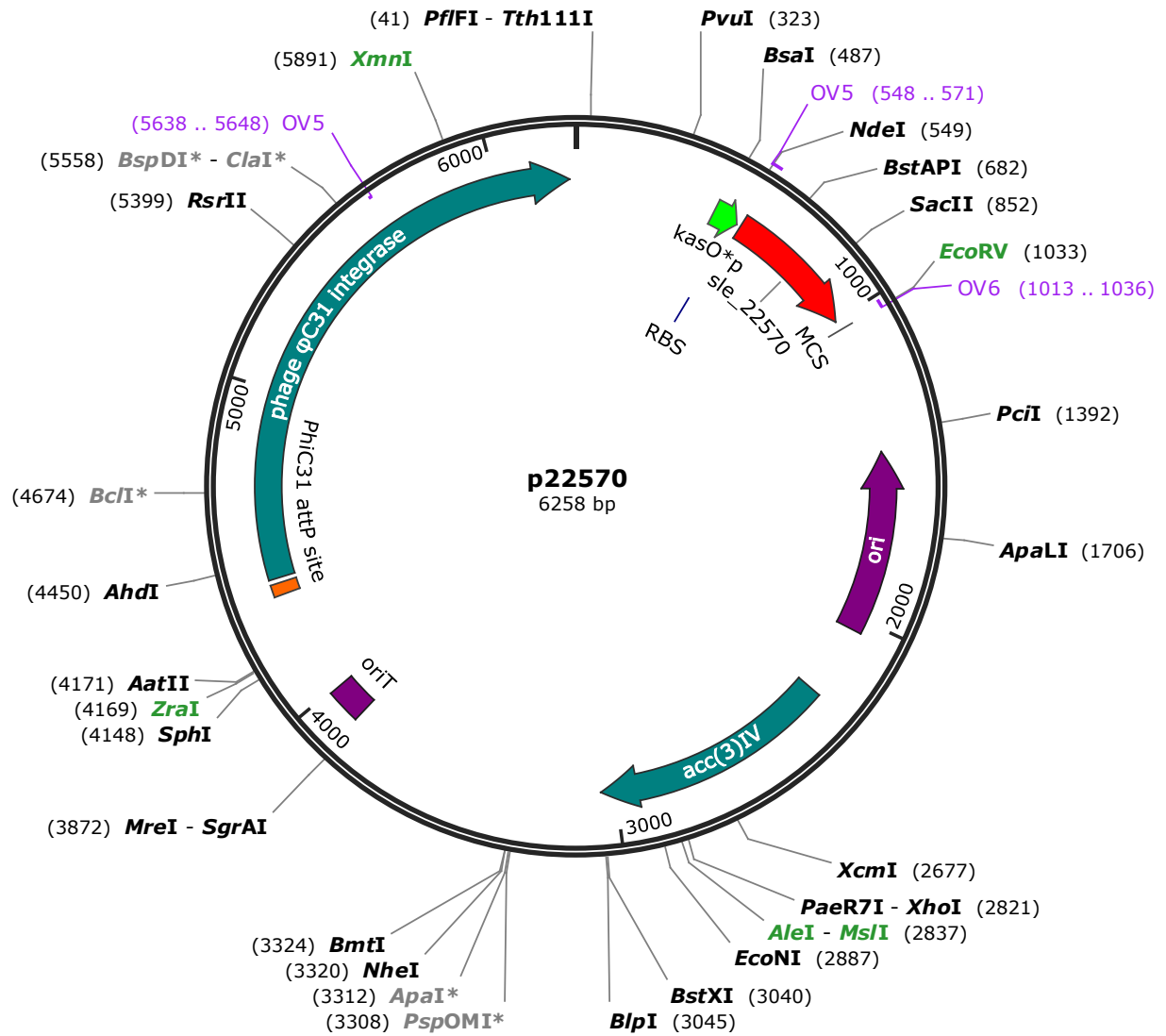




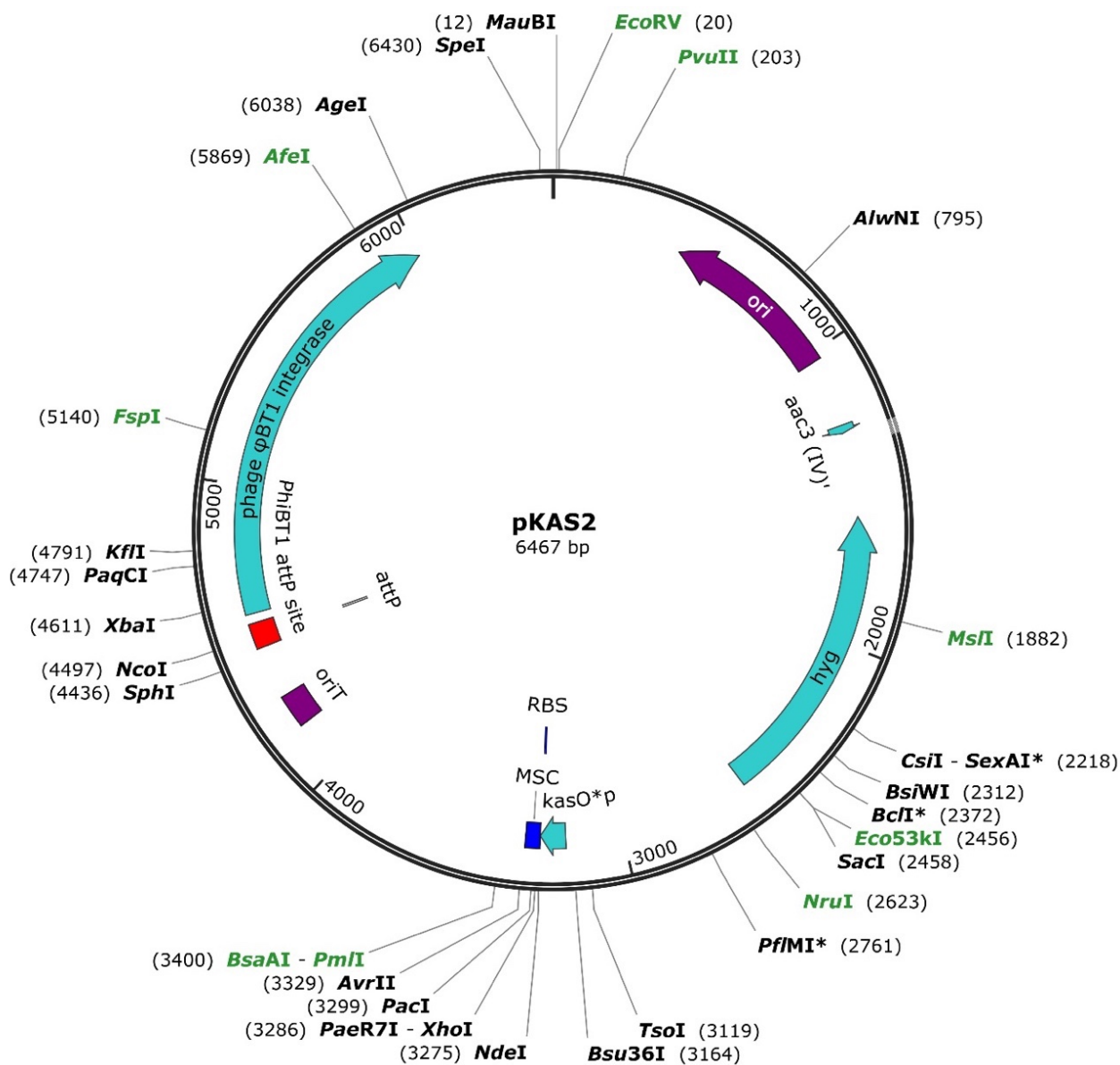
**Figura A9:** Mapa del plásmido integrativo pKAS1. Se utiliza para la clonación de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *kasO\** y selección por resistencia al antibiótico apramicina. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde.



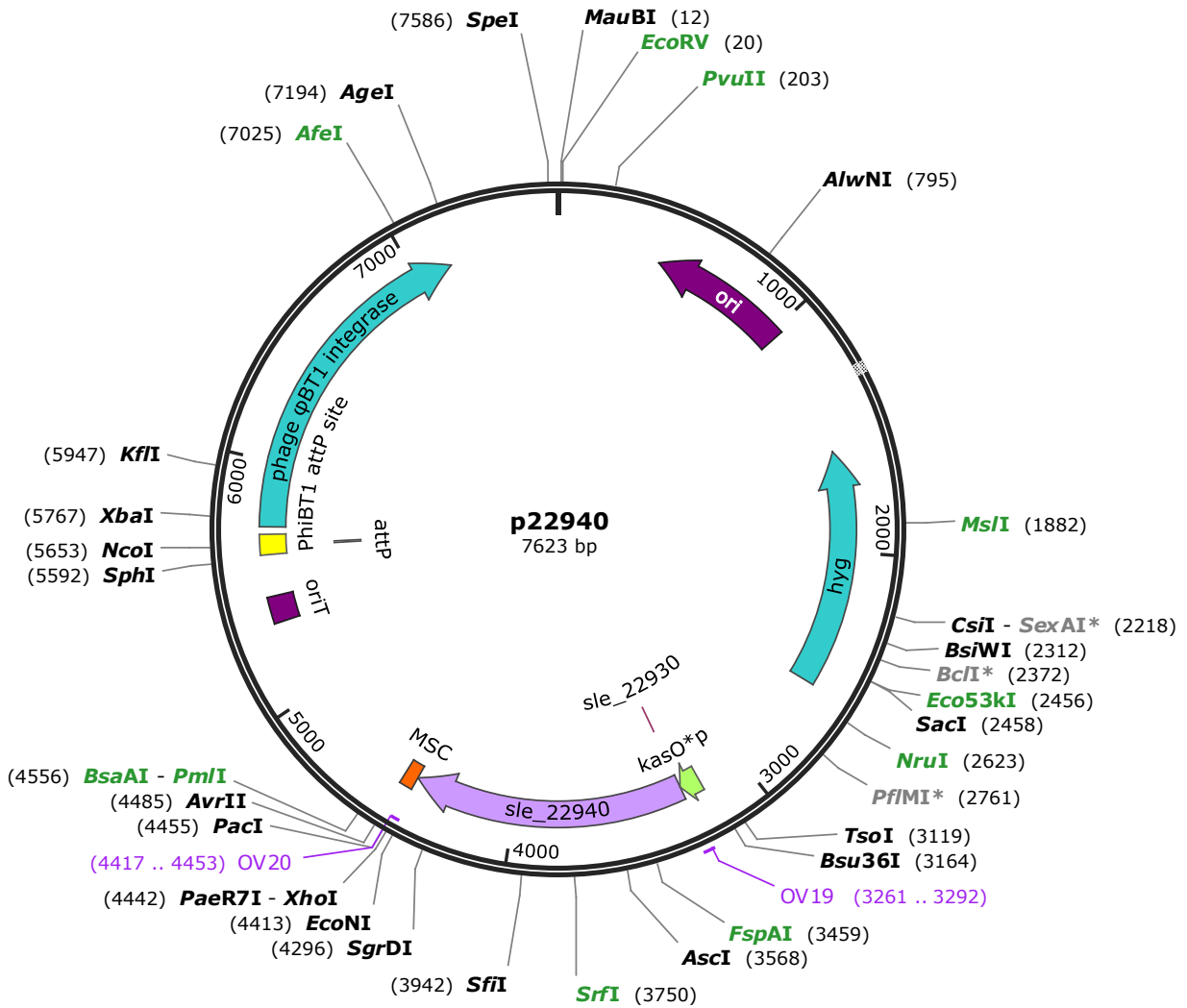
**Figura A10:** Mapa del constructo p11600, derivado de pKAS1. El plásmido p11600 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle11600*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *kasO\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



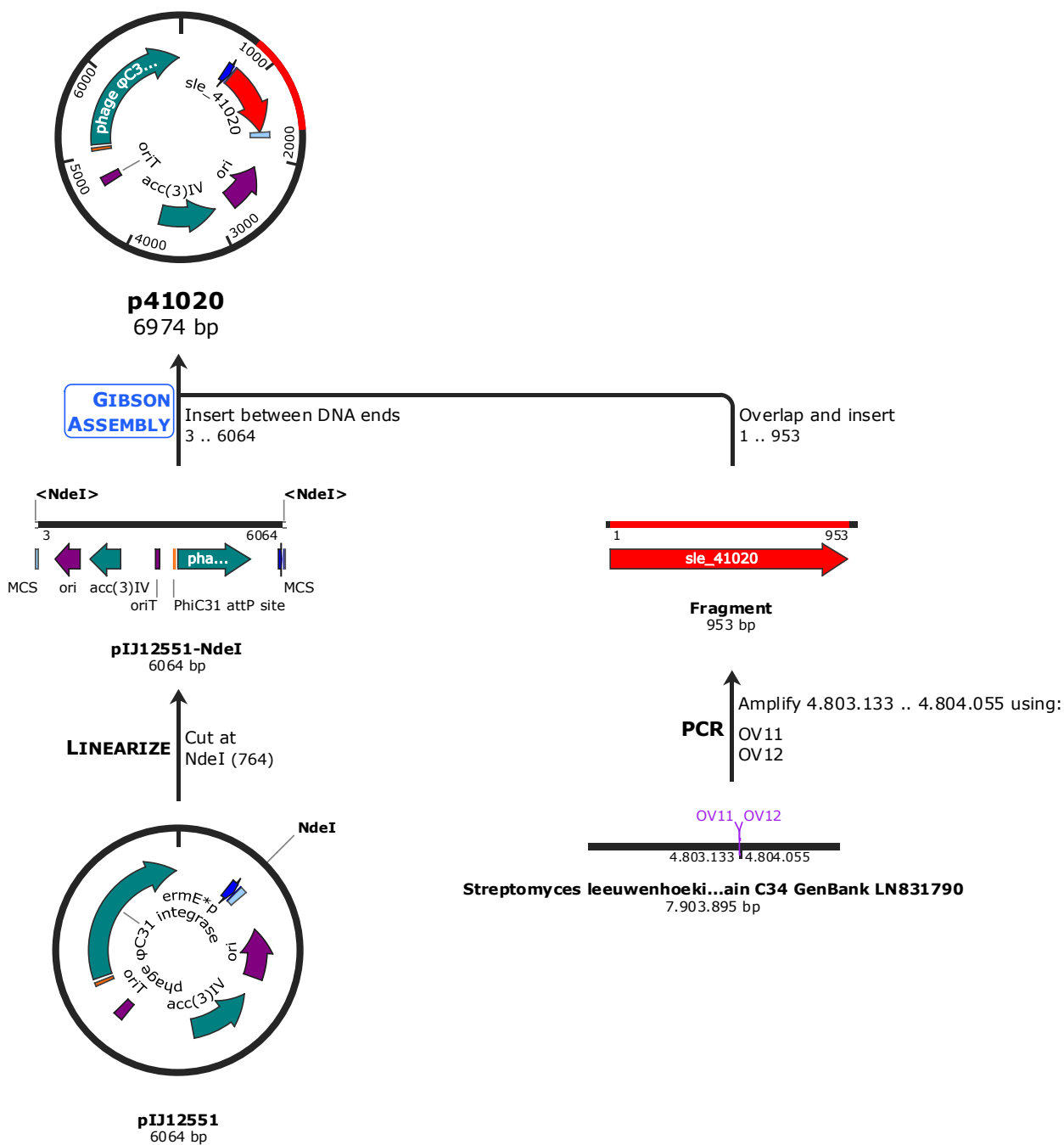
**Figura A11:** Mapa del constructo p22570 derivado de pKAS1. El plásmido p22570 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle22570*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *ermE*\*. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



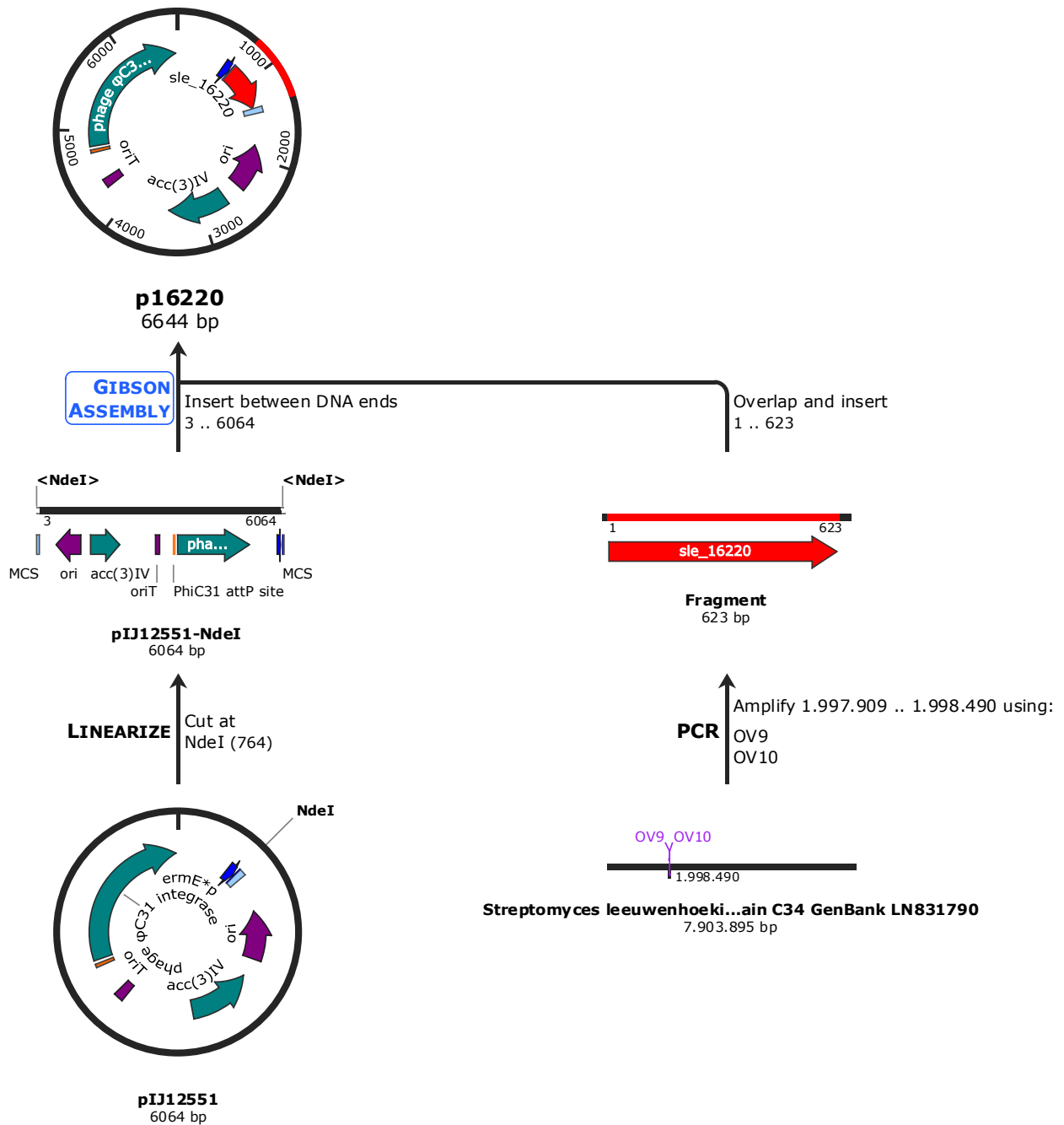
**Figura A12:** Mapa del plásmido integrativo pKAS2. Se utiliza para la clonación de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *kasO\** y selección por resistencia al antibiótico higromicina. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde.



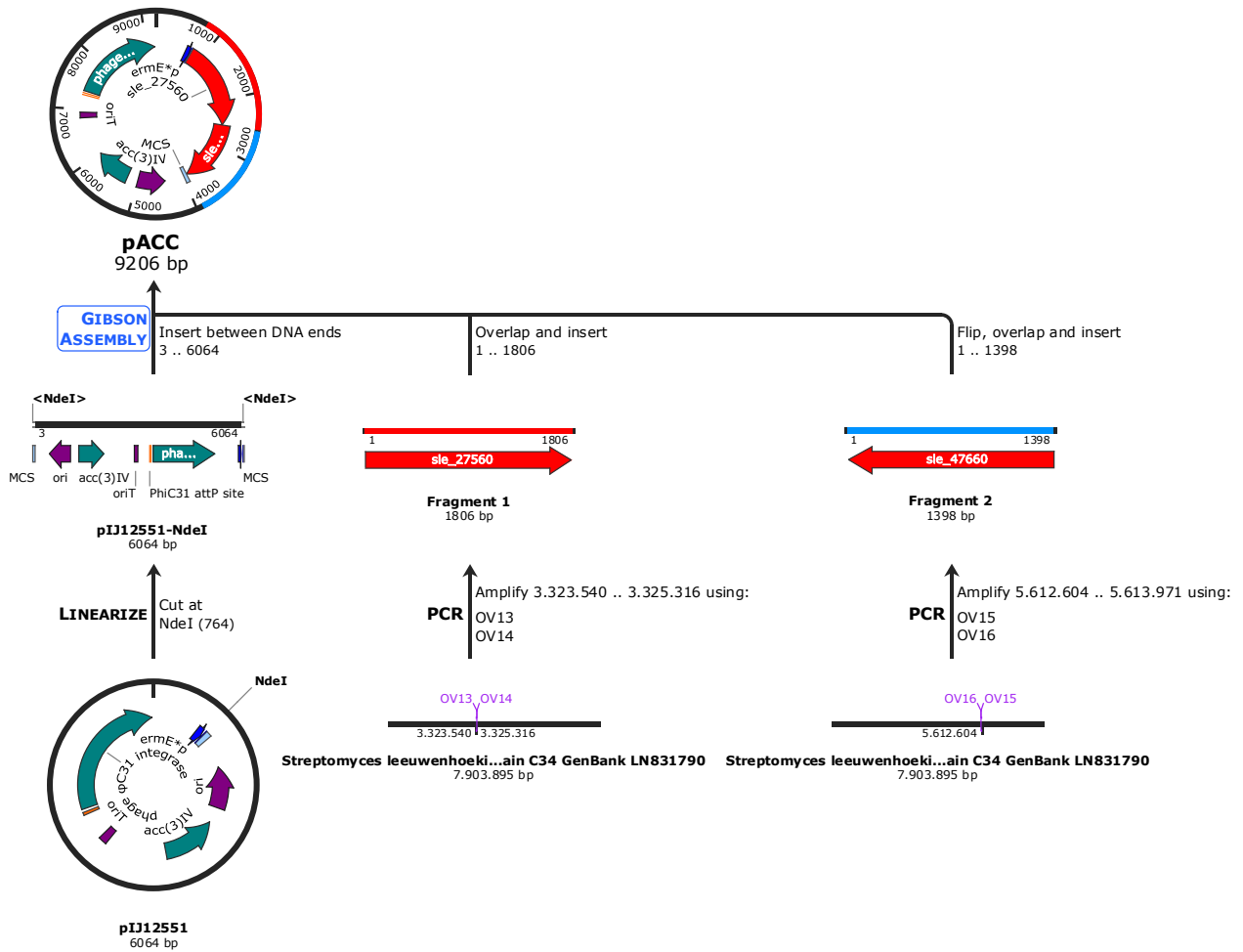
**Figura A13:** Mapa del constructo p22940 derivado de pKAS2. El plásmido p22940 contiene el gen endógeno de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, *sle22940*, bajo el control transcripcional del promotor fuerte constitutivo *kasO\**. Se resaltan en negro y cursivas los nombres de las enzimas que reconocen sitios únicos de escisión. En gris se representan los sitios de restricción bloqueados por metilación. Los sitios de corte romos se resaltan en verde



**Figura A14:** Secuencia de construcción del plásmido p41020. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle41020* fue amplificado con los cebadores OV11-OV12 e insertado en el plásmido pIJ12551, previamente linealizado con la enzima de restricción *NdeI*, mediante la técnica de Gibson Assembly. Este constructo se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O41020.

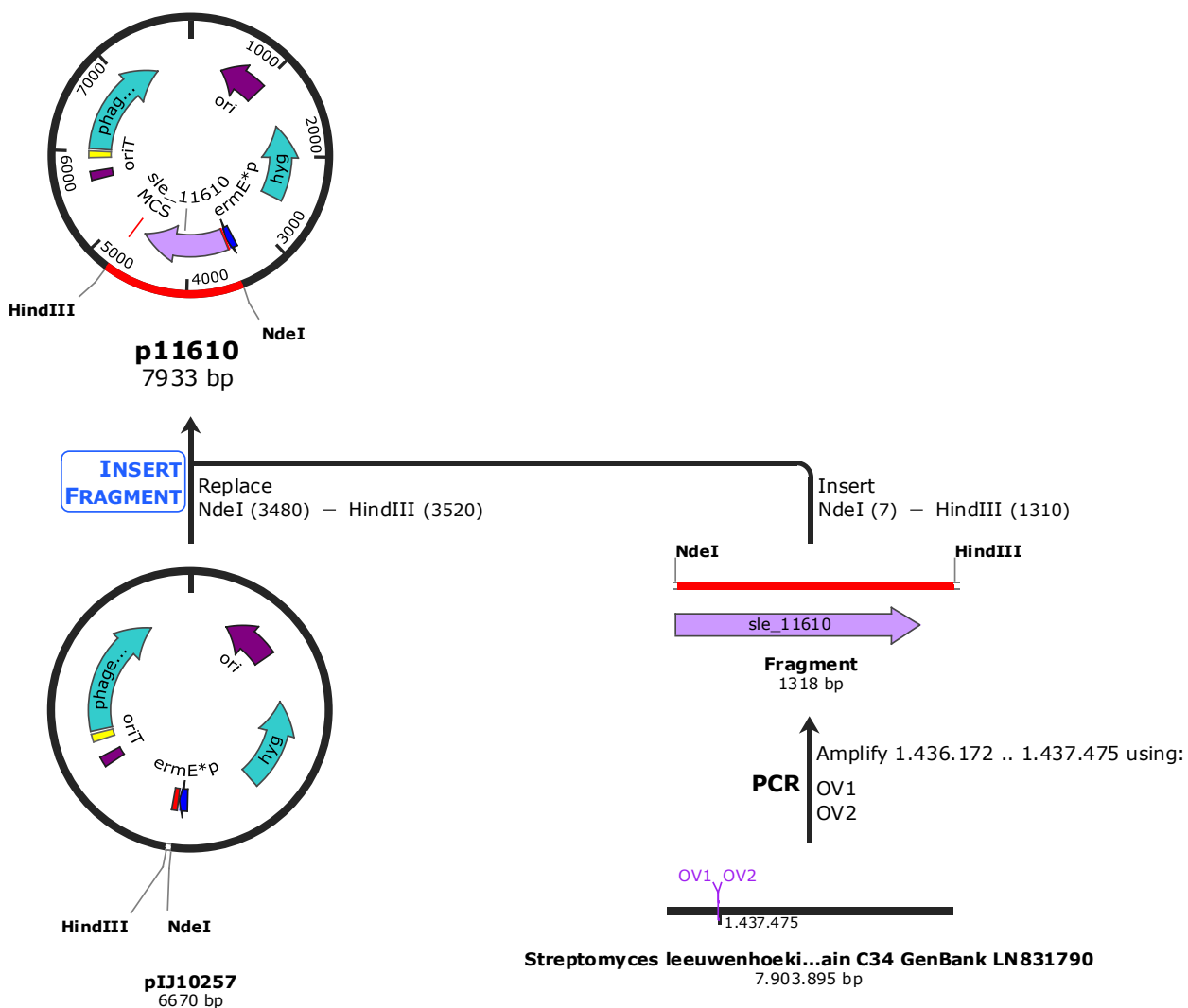


**Figura A15:** Secuencia de construcción del plásmido p16220. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle16220* fue amplificado con los cebadores OV9-OV10 e insertado en el plásmido pIJ12551, previamente linealizado con la enzima de restricción *NdeI*, mediante la técnica de Gibson Assembly. Este constructo se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O16220.

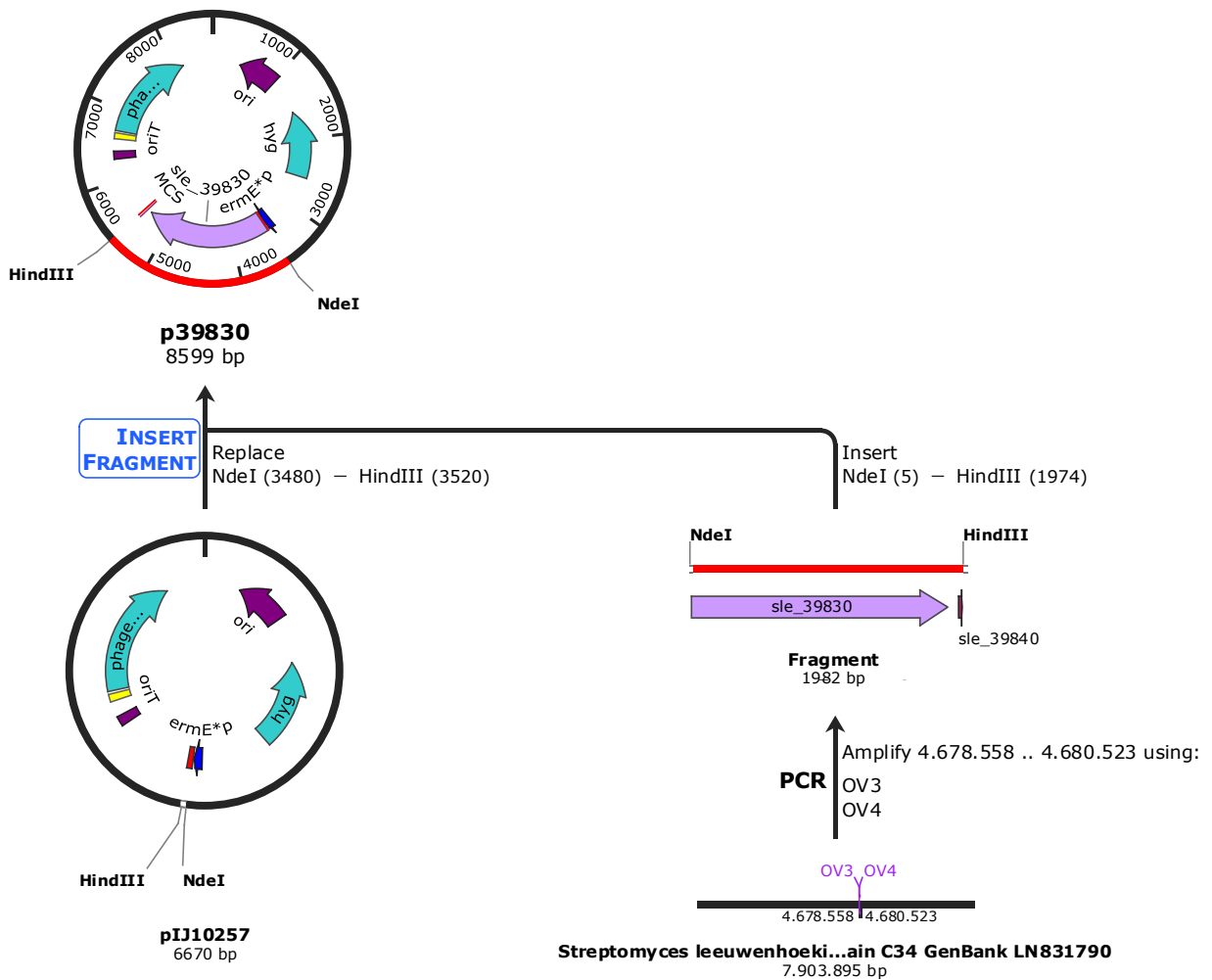


**Figura A16:** Secuencia de construcción del plásmido pACC. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, los genes *sle27560* y *sle47660* fueron amplificados con los cebadores OV13-OV14 y OV15-OV16, respectivamente, e insertados en el plásmido pIJ102551, previamente linealizado con la enzima de restricción NdeI, mediante la técnica de Gibson Assembly. Este constructo se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O11600.

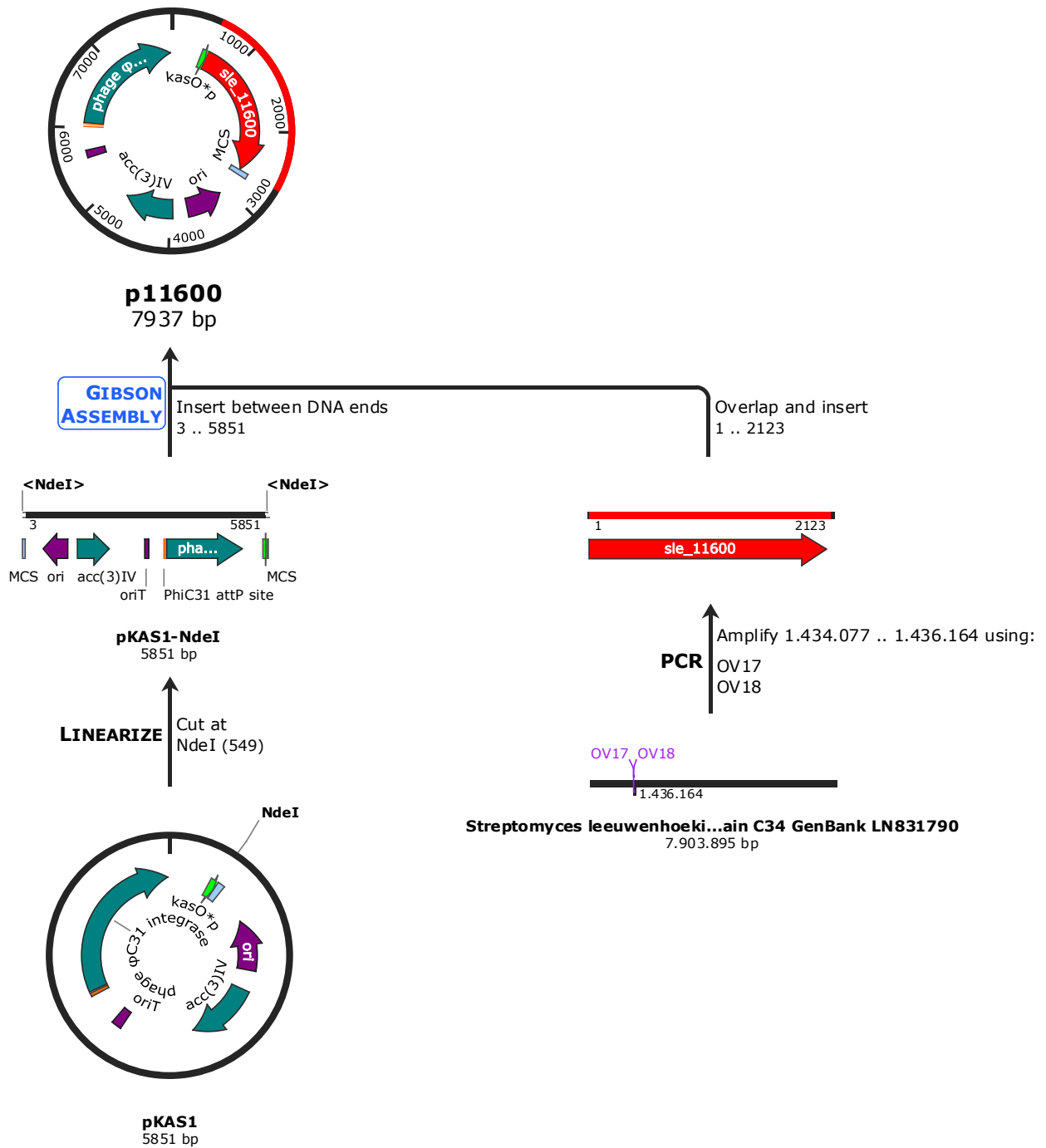




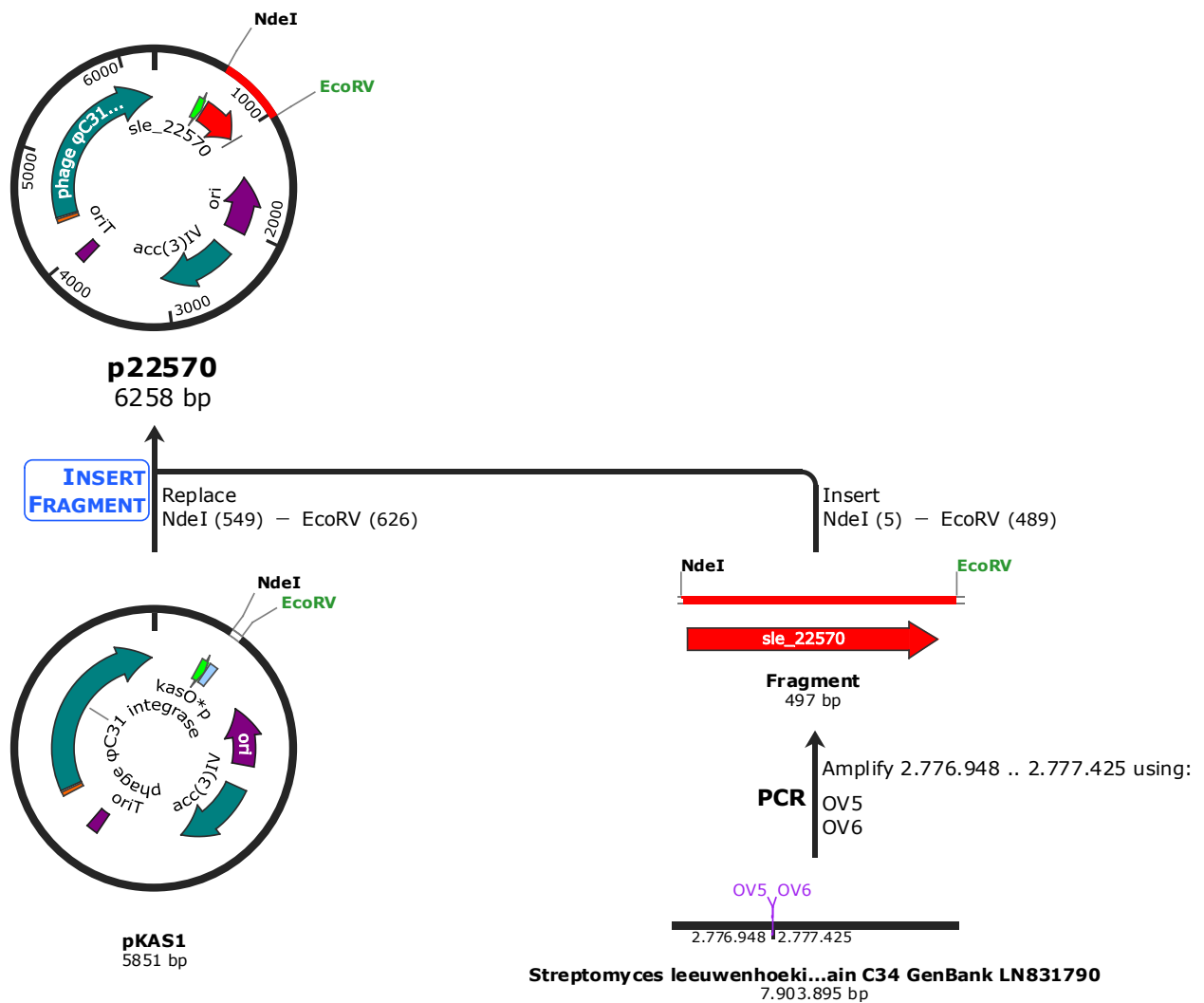
**Figura A17:** Secuencia de construcción del plásmido p11610. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle11610* fue amplificado con los cebadores OV1-OV2 y ligado al plásmido p10257, previamente digerido con las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Este constructo se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O11610.



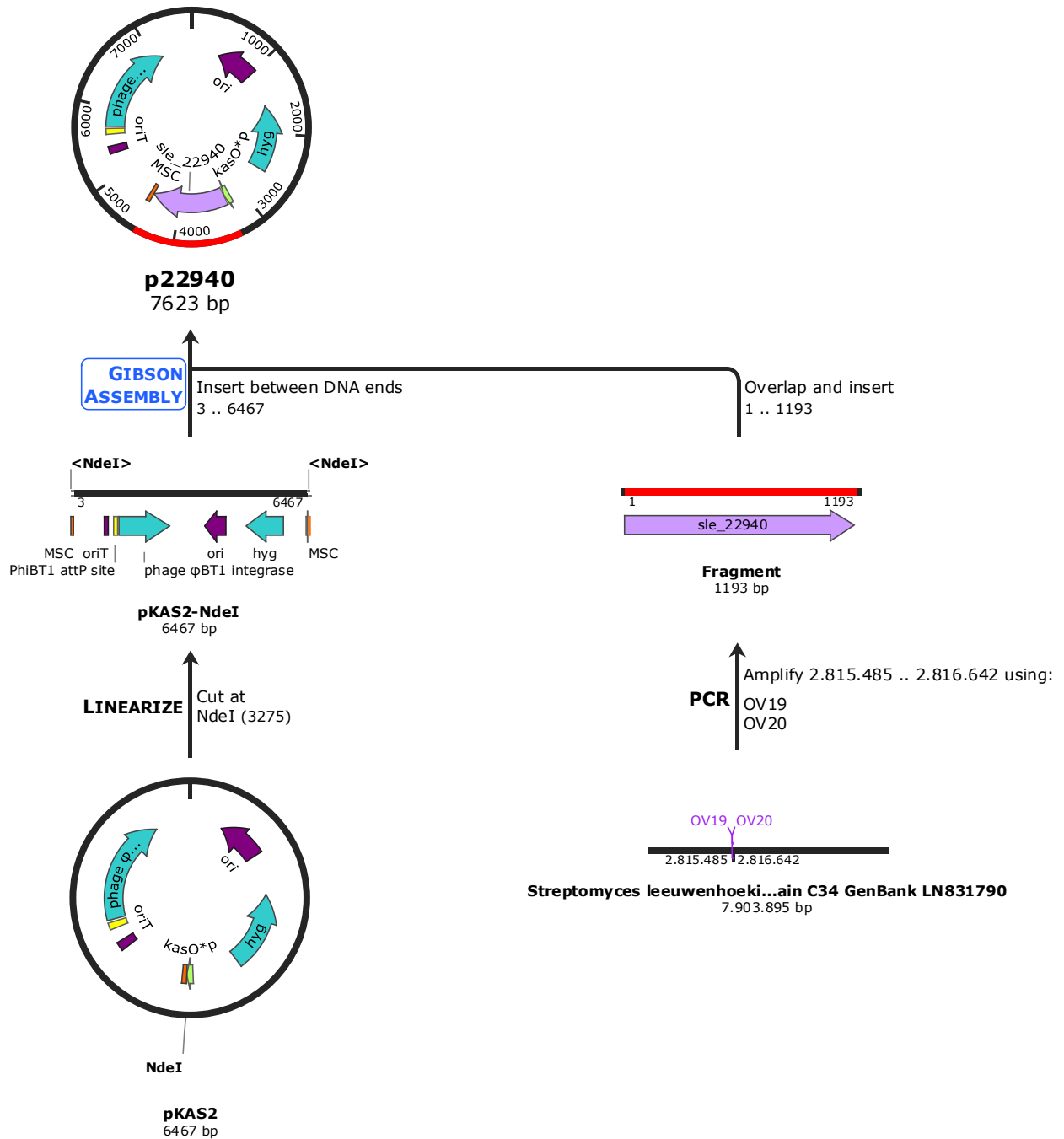
**Figura A18:** Secuencia de construcción del plásmido p39830. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle39830* fue amplificado con los cebadores OV3-OV4 y ligado al plásmido pIJ10257, previamente digerido con las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Este constructo, junto con el p27500 se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* OP1P2.



**Figura A19:** Secuencia de construcción del plásmido p11600. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle11600* fue amplificado con los cebadores OV17-OV18 e insertado en el plásmido pKAS1, previamente linealizado con la enzima de restricción *NdeI*, mediante la técnica de Gibson Assembly. Este constructo se empleó para la generación de la cepa recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O11600.



**Figura A20:** Secuencia de construcción del plásmido p22570. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle22570* fue amplificado con los cebadores OV5-OV6 y ligado al plásmido pKAS1, previamente digerido con las enzimas de restricción NdeI y EcoRV. Este constructo se empleó para la generación del mutante *Streptomyces leeuwenhoekii* O22570 y del doble recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O2222.



**Figura 21:** Secuencia de construcción del plásmido p22940. A partir del DNA genómico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>, el gen *sle22940* fue amplificado con los cebadores OV19-OV20 e insertado en el plásmido pKAS2, previamente linealizado con la enzima de restricción *NdeI*, mediante la técnica de Gibson Assembly. Este constructo se empleó para la generación del mutante *Streptomyces leeuwenhoekii* O22940 y del doble recombinante *Streptomyces leeuwenhoekii* O2222.

# Abreviaturas y símbolos

2x YT	Dos veces extracto de levadura-triptona
A	Adenina
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AHBA	Ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico
Amino-F6P	Aminofructosa 6-fosfato
AminoDAHP	4-dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMR	Resistencia antimicrobiana
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
<i>attB</i>	Sitio de unión bacteriana
<i>attP</i>	Sitio de unión al fago
BCC	Burítol-CoA carboxilasa
BGC	Grupo de genes biosintéticos
C	Cisteína
CoA	Coenzima A
COVID-19	Coronavirus 2019
Da	Dalton
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos

EC	Enzyme Commission
G	Guanina
<i>g</i>	Gravedades
GSM	Modelo a Escala Genómica
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use
<i>icmA</i>	Isobutirilsobutiril-CoA mutasa A
IDT	Integrated DNA Technologies
Imino-E4P	Iminoeritrosa 4-fosfato
ISP2m	Proyecto 2 internacional de <i>Streptomyces</i> modificado
kb	kilobases
KEGG	Kyoto Encyclopedia Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Luria-Bertani
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
m/z	masa/carga
<i>MCE</i>	Metilmalonil-CoA epimerasa
<i>MMC</i>	Metilmalonil-CoA mutasa
MoNA	MassBank of North America
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NAC	Neumonía bacteriana adquirida en la comunidad
NADH <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NMR	Resonancia magnética nuclear
NP	Producto natural
NRPS	Sintetasas de péptidos no ribosomales
OD	Densidad óptica
OSMAC	Una cepa, muchos compuestos
<i>PCC</i>	Propionil-CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	2-fosfoenolpiruvato

<i>pgm</i>	Fosfoglucomutasa
PKS	Policétido sintasa
PP	Pentosas fosfato
qPCR	PCR en tiempo real cuantitativo
R.S.D	Desviación estándar relativa
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación
R3	Regeneración 3
rpm	Revoluciones por minuto
SARP	<i>Streptomyces</i> Antibiotic Regulatory Protein
SFM	Soya flour-mannitol
T	Timina
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{\max}$	Longitud de onda máxima
TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
TES	Ácido N-tris (hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TGA	Triacilglicérido
<i>tkt</i>	Transcetolasa
TYG	Triptona-extracto de levadura-glucosa agar
UDP	Glucosa uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
WHO	Organización Mundial de la Salud
RT	Tiempo de retención
Cxm	Chaxamicina
ABC	Área bajo la curva
UA	Unidades de absorbancia
SEM	Error estándar de la media