



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Biotecnología Microbiana: mejoras en la
producción de antibióticos β -lactámicos**

Autor: Francisco Javier Gómez-Martinho González

Fecha: Junio 2020

Tutor: María Molina Martín

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	2
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	4
3. METODOLOGÍA	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
<u>4.1. PRODUCCIÓN CLÁSICA DE B-LACTÁMICOS: <i>Penicillium chrysogenum</i></u>	5
4.1.1. Ruta biosintética de penicilinas en <i>P. chrysogenum</i>	5
<u>4.2. OPTIMIZACIÓN DE CEPAS</u>	8
4.2.1. El Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) de penicilina.....	9
4.2.2. Ingeniería genética del BGC de penicilina y sus reguladores	10
4.2.2.1. Reguladores globales.....	10
4.2.2.2. Regulación sobre la cromatina	11
4.2.3. Ingeniería de los procesos de transporte.....	12
4.2.4. Ingeniería del metabolismo secundario.....	12
4.2.5. Ingeniería del medio de cultivo.....	14
<u>4.3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA</u>	14
4.3.1. <i>Penicillium chrysogenum</i> como donador	14
4.3.2. <i>Penicillium chrysogenum</i> como hospedador	15
<u>4.4. BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS</u>	16
5. CONCLUSIONES	16
6. BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN.

Los antibióticos han tenido un impacto innegable en el tratamiento de las enfermedades infecciosas desde el descubrimiento de la penicilina en 1928. Sin embargo, en los últimos años se enfrentan a importantes retos en los que debe mejorar el sistema de producción, garantizando la productividad y la eficiencia. El objetivo de este trabajo es revisar las utilidades que ofrece la Biotecnología Microbiana para dar respuesta a estos retos, a través del ejemplo de la producción de β -lactámicos en *Penicillium chrysogenum*.

P. chrysogenum ha visto aumentado su rendimiento de penicilinas a lo largo de los años, sometiendo a sucesivas cepas a mutagénesis aleatorias y seleccionando las que mejoraran, pasando así de 150 mg/L a más de 50 g/L. Mediante el estudio de estas cepas, se identifican múltiples modificaciones de alto impacto, que permiten además su réplica mediante ingeniería inversa.

Las enzimas responsables de la biosíntesis de penicilinas están codificadas por los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, agrupados en un Clúster Biosintético de Genes (BGC). La amplificación de este BGC ha demostrado ser uno de los principales factores que aumentan la producción de penicilina, junto a diversas modificaciones en la regulación de su transcripción. Un papel importante lo ejerce también la manipulación de los mecanismos de transporte celular, pues la biosíntesis de penicilina está compartimentada en varios espacios como los peroxisomas. También es posible aumentar la eficiencia del proceso mediante la represión de rutas alternativas que consumen recursos metabólicos, o mediante el ajuste de las condiciones de cultivo, tanto parámetros físicos como suplementos químicos.

Finalmente, se estudia el uso de otros microorganismos como fábrica celular, mediante expresión heteróloga del BGC de penicilina; pero también en el sentido contrario, aprovechando la adaptación industrial de *P. chrysogenum* para expresar en él la maquinaria biosintética de otras sustancias de interés, como cefalosporinas o nuevos compuestos. Esto último, junto con las herramientas de la metagenómica, permiten explorar el descubrimiento de nuevos principios activos.

Palabras clave: *biotecnología, Penicillium chrysogenum, penicilina, ingeniería genética, optimización de cepas, ingeniería metabólica.*

1 INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, se han aislado más de 12.000 antibióticos de varios microorganismos con diferentes especificaciones y mecanismos de acción. Es innegable su enorme impacto en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, quedando éstas relegadas por las enfermedades crónicas como principal causa de mortalidad a nivel mundial (World Health Organization, 2018a), y colaborando al avance de países en desarrollo. Su impacto económico es también considerable: al año se producen más de **100.000 toneladas de antibióticos**, incluyendo los veterinarios, con ventas anuales de 65.000 millones de dólares en 2014. Los cuatro grupos de mayor impacto económico (más del 80% de las ventas) son: cefalosporinas (27%), macrólidos (20%), quinolonas (17%) y penicilinas (17%). La mayoría de los antibióticos más importantes se aíslan de las bacterias Gram-positivas *Streptomyces*, pero también de otras bacterias Gram positivas o negativas y de hongos filamentosos como *Penicillium* o *Acremonium* (Glick & Pattern, 2017).

El valor de estos antibióticos se encuentra amenazado por el desarrollo de cepas de microorganismos resistentes a ellos, poniendo en riesgo gran parte de la medicina moderna que depende de ellos: trasplante de órganos, oncología, obstetricia, e importantes cirugías. La pérdida de su efectividad supone por tanto un grave peligro tanto sanitario como social y económico. Se estima que el coste por cada uno de los 700.000 pacientes infectados en Europa por bacterias multirresistentes es de hasta 29.000 dólares. Estos prolongan como mínimo 13 días la hospitalización con el coste que ello supone para un país en términos de productividad y baja laboral, si es que no derivan en una de las **más de 33.000 muertes anuales**. Se estima que, siguiendo esta tendencia, para el año 2050 la mortalidad por esta causa ascendería a 10 millones de personas, con un descenso lógico de la natalidad (Aslam et al., 2018; Ribeiro da Cunha, 2019).

Los **β -lactámicos** constituyen el grupo más importante de antibióticos, por ser el más prescrito y el de más ventas. Por ello, es mayor la preocupación por el aumento de cepas resistentes a ellos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*: del total de muestras que se recogen en pacientes infectados por estas especies, en varios países más del 25% ya corresponden a cepas resistentes (World Health Organization, 2018b). La resistencia a β -lactámicos de bacterias Gram-positivas se debe mayormente a mutaciones en la diana (PBPs, *penicillin-binding proteins*), mientras que en el caso de Gram-negativas se debe principalmente a la adquisición de β -lactamasas, a alteraciones en la permeabilidad y la adquisición de bombas de expulsión de estas sustancias. Estas resistencias se producen y transfieren horizontalmente de manera espontánea por conjugación, transformación y transducción de los genes responsables, si bien pueden extenderse por selección natural de cepas mediante el uso de antibióticos (Tooke, 2019; Nicolaou & Rigol, 2018; Mohr, 2016).

La difusión de estas resistencias ha sido atribuida a un mal uso de los antibióticos, tanto en su prescripción en humanos como en su uso masivo como potenciadores del crecimiento en ganadería. Para hacer frente a ellas es necesario un abordaje multidisciplinar: el estudio de los mecanismos de resistencia desde las ciencias básicas, el control de su uso desde las diversas administraciones, las mejoras diagnósticas, y el **desarrollo de nuevos agentes** frente a patógenos multirresistentes. Este último elemento se encuentra estancado. En los últimos 20 años la industria farmacéutica ha reducido su inversión en este ámbito, llegando varias compañías a abandonarlo totalmente. Actualmente, de los casi 300 nuevos antibióticos descubiertos al año en todo el mundo, solo el 1-2% son incorporados al arsenal terapéutico por su potencial terapéutico y económico (Aslam et al., 2018; Glick & Pattern, 2017).

La razón de la escasa investigación es su elevado coste de desarrollo y ensayo clínico, a la vez que muchas veces no alcanzan el mercado y que inevitablemente se desarrollan resistencias a los dos o tres años de la introducción de un antibiótico (Mohr, 2016). Mientras tanto, la industria puede centrar sus recursos en aumentar la producción de antibióticos con cada vez más **demanda y problemas de desabastecimiento**. Desde 2016, la AEMPS aprecia una clara tendencia al alza en el número de notificaciones de problemas de suministro de medicamentos, alcanzándose los 1332 casos en 2018 y los 1701 en 2019. Solo en estos dos años se registraron más de 260 problemas de suministros cuya causa principal eran dificultades para conseguir el principio activo, y más de 800 asociados a problemas de capacidad por aumento en la demanda de medicamentos. De todas estas notificaciones, más de 300 corresponden a antiinfecciosos de uso sistémico (grupo J en la clasificación ATC), siendo muchas de ellas de alto impacto asistencial por no disponer de alternativas terapéuticas (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2020).

Para hacer frente a estos dos problemas de resistencias y desabastecimiento, muchas miradas se encuentran puestas en la Biotecnología. Hasta hace poco, casi todas las mejoras implementadas en la producción de antibióticos procedían de la mutagénesis clásica y la selección de cepas. Pero en la llamada “era post-genómica” (2004–2014), la secuenciación de hasta 30.000 genomas microbianos supuso un cambio de paradigma en el desarrollo de antibióticos, identificando genes esenciales mediante genómica comparativa y su utilidad mediante técnicas de proteómica y metabolómica. Este conocimiento permite entender la fisiología microbiana de una manera integral, llevando a la caracterización de más de 50 redes metabólicas en diferentes organismos que relacionan la actividad de enzimas con su codificación y expresión. Este abordaje posibilita el desarrollo de nuevos fármacos que actúen en procesos de gran repercusión y no solo en dianas aisladas (Ribeiro da Cunha, 2019).

También permite desarrollar estrategias para modificar procesos clave en la biosíntesis de un producto determinado, como por ejemplo genes reguladores de expresión. La **tecnología del DNA recombinante** permite introducir nuevos genes o modificar los existentes en microorganismos. Esto permite abordar esta problemática de dos maneras: bien para obtener nuevas estructuras químicas de mayor actividad y menores efectos secundarios, o bien para aumentar el rendimiento de producción de antibióticos conocidos de una manera rápida y barata, incluso meramente modificando las condiciones de cultivo (Ribeiro da Cunha, 2019; Glick & Pattern, 2017).

Como resultado, un microorganismo puede ser manipulado convenientemente para transformar sustratos sencillos en compuestos comerciales de alto valor terapéutico y económico, cuya producción tradicional sea muy costosa o de baja eficiencia. Esto no aplicaría exclusivamente al desarrollo de proteínas típicamente asociadas a la Biotecnología, como anticuerpos o vacunas: la producción de compuestos de bajo peso molecular como antibióticos supone un paso más allá, alcanzable de manera relativamente sencilla. Entre los ejemplos de moléculas conseguidas con éxito por esta técnica se encuentran: alcoholes, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, biopolímeros, y muchos otros (Glick & Pattern, 2017).

Por último, cabría mencionar el impacto de la metagenómica en el **screening de productos naturales**, revelando extensos repositorios de organismos no cultivables. Además de permitir identificar secuencias de interés para clonarlas en microorganismos fácilmente manipulables, la metagenómica permite describir una aún más extensa variedad de rutas metabólicas con posibles aplicaciones terapéuticas (Ribeiro da Cunha, 2019; Guzman-Chavez et al, 2018).

2 OBJETIVOS

El presente trabajo busca evidenciar la utilidad de la Biotecnología microbiana como herramienta frente a los problemas a los que se enfrenta la producción de antibióticos presentados. Mediante una revisión bibliográfica, se estudiarán las diferentes **mejoras de productividad** conseguidas en la obtención de antibióticos, fijándose en el ejemplo de las penicilinas, a través de los siguientes objetivos específicos:

- Análisis de la ruta biosintética de penicilinas en *Penicillium chrysogenum*, el principal microorganismo de producción industrial.
- Revisión de las estrategias clásicas y de ingeniería metabólica implementadas para el aumento del rendimiento en la obtención de penicilinas.
- Presentación de los nuevos métodos biotecnológicos para el desarrollo de nuevos antibióticos y fuentes de producción.

3 METODOLOGÍA

Para elaborar el trabajo, se ha realizado una revisión consultando la bibliografía actual en medios analógicos y electrónicos. Se han consultado libros, revistas científicas a través de bases de datos actualizadas (PubMed), e informes disponibles en páginas web de organismos oficiales como la Organización Mundial de la Salud (www.who.int/es) o la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (www.aemps.gob.es). También se han consultado patentes a través de la plataforma de Google Patents.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN CLÁSICA DE B-LACTÁMICOS: *Penicillium chrysogenum*

Actualmente existen diferentes variedades de antibióticos β -lactámicos, pudiendo dividirlos en hidrofóbicos e hidrofílicos. Los **hidrofóbicos**, como la penicilina G (bencilpenicilina) o la penicilina V (fenoximetilpenicilina), constan de cadenas laterales apolares como fenilacetato o fenoxiacetato. Los **hidrofílicos** constan de la cadena lateral polar D- α -aminoadipato (D-Aaa), e incluyen la penicilina N, las cefalosporinas o las cefamicinas (Ozcengiz & Demain, 2013).

Sin embargo, ningún microorganismo puede producirlos todos por sí mismo. Los β -lactámicos hidrofílicos son producidos por hongos filamentosos, actinomicetos y bacterias unicelulares, mientras que los hidrofóbicos sólo son producidos por hongos filamentosos como *Penicillium chrysogenum*. Algunos grupos novedosos solo se han hallado en actinomicetos y bacterias unicelulares, como las clavamas, monobactamas, carbapenemas o las nocardinas. Otros grupos incluso se obtienen por semisíntesis, sometiendo a nuevas reacciones químicas estructuras moleculares producidas por fermentaciones (Ozcengiz & Demain, 2013). Todas las penicilinas semisintéticas se obtienen a partir del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). El 6-APA se produce en grandes cantidades por hidrólisis de la cadena lateral de la penicilina G o V, mediante una penicilin acilasa. Puesto que el principal productor de penicilina G, penicilina V y 6-APA es *P. chrysogenum*, este microorganismo se convierte en elemento clave para la producción de prácticamente todas las penicilinas (Weber et al., 2012).

P. chrysogenum es desde hace más de 70 años el principal organismo empleado en producción comercial de penicilinas. Si bien Fleming descubrió esta por *Penicillium notatum* en 1929, su rendimiento de 1,2 mg/L fue ampliamente superado por los 150 mg/L del *P. chrysogenum* descubierto en 1943. Desde entonces, todas las cepas usadas en la industria han sido de este microorganismo, viendo aumentada su productividad por sucesivas mutaciones. Se estima que actualmente las cepas industriales producen 100.000 veces más penicilina que el *P. notatum* aislado por Fleming (Ozcengiz & Demain, 2013). Recientemente se ha observado que las cepas empleadas a lo largo de estos años no corresponden a la especie *P. chrysogenum*, sino a *P. rubens* (Houbraken, 2011). No obstante, en este trabajo se seguirá empleando el nombre clásico de *P. chrysogenum*, como aparece en la bibliografía original.

4.1.1. Ruta biosintética de penicilinas en *P. chrysogenum*

A continuación se analiza de manera general la secuencia de síntesis de penicilinas en *P. chrysogenum*, las enzimas y genes implicados, y su localización en el interior celular. El primer paso es la síntesis de la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), por

condensación de L-cisteína (L-Cys) con ácido L-aminoadípico (L-Aaa) y valina (L-Val). Este péptido no se sintetiza en los ribosomas sino por acción de otras enzimas, por lo que se engloba dentro de los llamados péptidos “no-ribosomales” (NRP), y a estas como sintetas de NRP (NRPS) (Barreiro & García-Estrada, 2019).

El L-Aaa procede del α -cetoglutarato y acetyl-coenzima A (CoA) de la ruta de biosíntesis de la L-lisina, en la que destaca el papel de la homocitrato sintasa. La L-Cys procede en *P. chrysogenum* de una transulfuración a partir de sulfato inorgánico, por lo que depende de la captación de este a través del transportador SutB. La L-Val se forma a partir de piruvato en las mitocondrias y el L-Aaa se almacena en vacuolas, por lo que deben ser transportados al citosol para poder reaccionar con la L-Cys (Weber et al., 2012; Martín, 2020).

En primer lugar (**figura 1**), tiene lugar la condensación entre los grupos carboxilo de la L-Cys y δ -amino del L-Aaa mediante un enlace amida, formando L- α -aminoadipil-L-cisteína (AC). Después, la L-Val se epimeriza en D-Val y se une a la AC mediante un enlace peptídico, formando el tripéptido de ACV en su conformación L-,L-,D- (Ozcengiz & Demain, 2013). Ambos pasos están catalizados por una única NRPS citosólica, la **ACV sintasa (ACVS)**, formada por tres módulos (una para albergar cada aminoácido) (Weber et al, 2012; Martín, 2020).

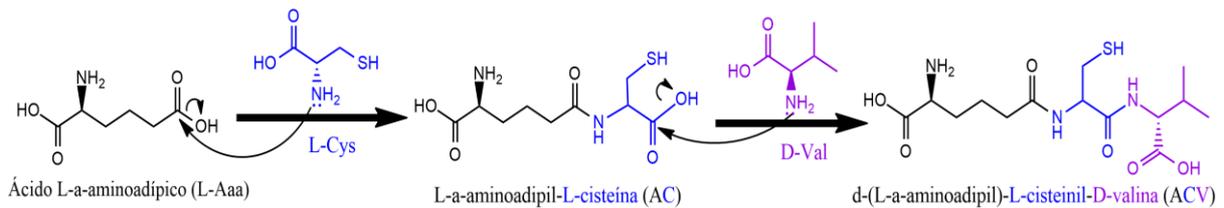


Figura 1: síntesis de la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), por condensación de L-cisteína (L-Cys) con ácido L-aminoadípico (L-Aaa) y valina (L-Val), catalizada por la ACV sintasa (ACVS).

La ACV es ciclada por la **isopenicilina N sintasa (IPNS)**. Esta enzima es soluble y citosólica, estimulada por Fe^{2+} y agentes reductores, y cataliza la reacción por un mecanismo singular: forma primero un anillo β -lactámico y luego un anillo tiazolidínico, característicos de las penicilinas. Esta compleja ciclación requiere además oxígeno (Ozcengiz & Demain, 2013).

Casi todos los productores de β -lactámicos comparten estos primeros pasos, los que generan la estructura de la isopenicilina N. Sin embargo, sobre ella puede tener lugar una amplia variedad de modificaciones: tanto en las cadenas laterales hidrofóbica e hidrofílica, como en el anillo tiazolidínico para dar lugar a las cefalosporinas. Que tengan lugar unas u otras depende tanto de la maquinaria enzimática del microorganismo productor, como de los precursores presentes en el medio. Influye por supuesto la capacidad del microorganismo para absorberlos e incorporarlos.

En el caso de *P. chrysogenum*, es capaz de incorporar fenilacetato a la cadena hidrofóbica para formar penicilina G o natural (**figura 2**). También es posible obtener cientos de penicilinas “biosintéticas” como la penicilina V, añadiendo al medio fenoxiacetato en su caso o múltiples sustratos. Estos derivados acéticos parecen ser activados por acetyl-CoA ligasas, como es la **fenilacetil-CoA ligasa (PCL)** en el caso de la penicilina G, localizada en los peroxisomas (Ozcengiz & Demain, 2013; Van Den Berg, 2010).

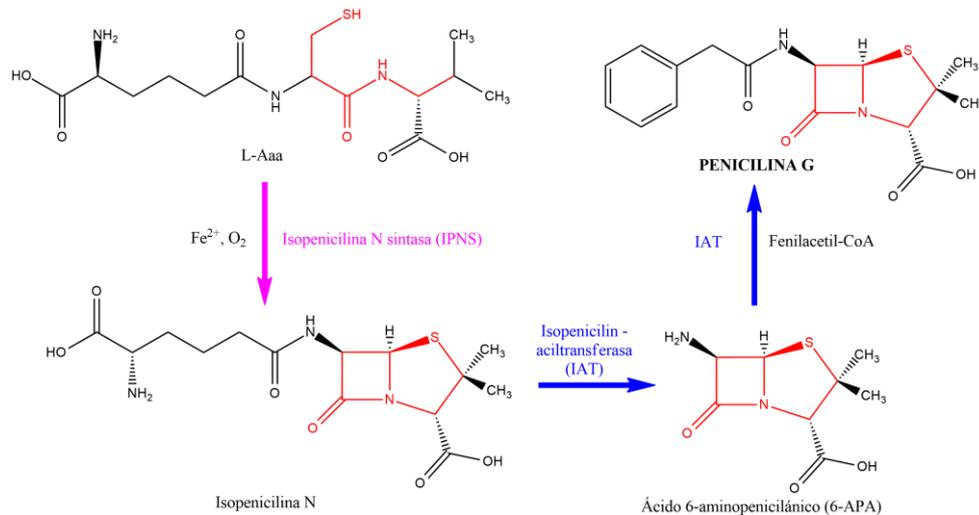


Figura 2: Síntesis de la penicilina G en *P. chrysogenum* por las enzimas isopenicilina N sintasa (IPNS) e isopenicilin-aciltransferasa (IAT).

La razón por la que solo los hongos *Penicillium* y *Aspergillus* pueden realizar estas transformaciones en la cadena hidrofóbica, es la presencia de la enzima heterodimérica **isopenicilin-aciltransferasa (IAT)**. Esta enzima hidroliza en un primer lugar la isopenicilina N, dejando el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (**6-APA**), y en un segundo paso condensa los ésteres de CoA activados. De entre estos, la IAT reconoce como sustratos ésteres de fenilacetato, fenoxiacetato, octanoato, hexanoato y heptanoato. No parece realizar esta acción sobre otros β -lactámicos, como la propia penicilina G, el ácido 7-amino-cefalosporánico (**7-ACA**) o la cefalosporina C. También tiene actividad penicilin-transacilasa (interconvirtiendo penicilinas hidrofóbicas) y penicilin-amidasa (hidrolizando penicilina G en 6-APA). Para obtener solo el 6-APA, necesario para la semisíntesis, sería necesaria la ausencia de cualquier tipo de precursor (Ozcengiz & Demain, 2013; Weber et al., 2012).

A diferencia de *Aspergillus nidulans*, en *P. chrysogenum* la IAT se encuentra solo en **peroxisomas**, de tal manera que aumentar su número repercute en la tasa de producción (Ozcengiz & Demain, 2013). Esto no quita que la IAT conserve mínimamente su actividad en el citosol, como se ha visto al expresarla en mutantes sin peroxisomas (Gidijala et al., 2009). La IAT tendría una secuencia PTS1 de señalización que le permitiría reconocer y alcanzar los peroxisomas para incorporar las cadenas laterales (Weber et al., 2012).

Finalmente, la **secreción del producto final** al exterior celular es un proceso incierto. Se sospecha de un mecanismo de secreción activa, puesto que la penicilina G se encuentra diez veces más concentrada en el exterior celular que en el interior, mientras que si se produjera por difusión pasiva se observaría el caso contrario (Weber et al., 2012). Esta teoría se ve reforzada por la sensibilidad observada en *P. chrysogenum* al verapamilo, aumentando su secreción (The Netherlands Patente nº WO/2001/032904, 2001). Sin embargo, no se ha encontrado ningún gen codificante de transportadores en el clúster de genes propio de esta ruta. Fuera del clúster, sí que se han caracterizado 830 supuestos genes que codifican proteínas transportadoras, posiblemente del extendido grupo MDR (*multidrug resistance*). De estas, 416 serían de tipo MFS (*major facilitator superfamily*), de acción simporte, antiporte o uniporte, dependientes de gradiente químico. Otros 51 serían de tipo ABC (*ATP-binding cassette*), dependientes de ATP. Ambos grupos son numerosos en cepas superproductoras, por lo que es muy posible que sean responsables de la secreción de penicilina, pero no los únicos (Weber et al., 2012).

4.2. OPTIMIZACIÓN DE CEPAS

La primera y principal estrategia para aumentar el rendimiento de *P. chrysogenum* ha sido, desde su descubrimiento en 1943, la llamada “mejora clásica de cepas” (CSI por sus siglas en inglés). A través de él, varias compañías lo han sometido a sucesivas mutaciones de tipo aleatorio, sometiendo a diferentes cepas a radiación, gas mostaza y metil-nitro-nitrosoguanidina, entre otros, para luego seleccionar aquellos individuos que hubieran visto aumentada su producción de penicilina. Como resultado, esta se ha podido ver aumentada desde 0,5 g/L en los años 50 hasta más de 100 g/L en las cepas más modernas (Barreiro & García-Estrada, 2019). Algunas de las cepas más conocidas desarrolladas por este método son:

Tabla 1: Listado de las principales cepas de *Penicillium chrysogenum* obtenidas por CSI, ordenadas por productividad.

CEPA	PRODUC-TIVIDAD (g/L)	Nº DE CLÚS-TERES*	DESARROLLADOR	MÉTODO DE OBTENCIÓN	REFERENCIA
NRRL 1951	0,150 mg/L	1	Cepa original	Aislado de un melón cantalupo mohoso	Šmidák et al., 2010 Barreiro et al., 2012 Jami et al., 2010 Fierro et al., 1995
X1612	0,3	**	Carnegie Institution, Nueva York	Mutagénesis de NRRL 1951 por rayos X	Jami et al., 2010
Wis Q176	0,55	**	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de X1612 por rayos UV	Barreiro et al., 2012
Wis 48-701	0,65	**	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de Q176 por mostaza nitrogenada	Barreiro et al., 2012
Wis.54-1255 (cepa de referencia)	0,550-0,8	1	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de Q176 por rayos UV (16 generaciones)	Jami et al., 2010 Fierro et al., 1995 Barreiro et al., 2012
DS04825	0,98	5-6	DSM N.V. (Países Bajos)	<i>Desconocido</i> , a partir de Wis54-1255 (9 generaciones)	Barreiro et al., 2012
NMU2/40	6	4	Biotika a.s., Slovenská L'upêa	<i>Desconocido</i> , a partir de Wis54-1255	Šmidák et al., 2010
P2	7,4	5-6	Panlabs (Taiwán)	<i>Desconocido</i> , a partir de Q176	Fierro et al., 1995
AS-P-78	4,8	5-6	Antibióticos SA (España)	<i>Desconocido</i> , a partir de Wis54-1255	Jami et al., 2010 Fierro et al., 1995
E1	**	12-14	Antibióticos SA (España)	<i>Desconocido</i> , a partir de Wis54-1255	Fierro et al., 1995
BW1952	≈10	50	Beecham Pharmaceuticals UK	<i>Desconocido</i> , a partir de X1612	Newbert et al., 1997

*Número de copias del Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) de penicilina (ver apartado 4.2.1.)

**No estudiado o publicado

Aunque este método sea empírico, conforme han aumentado los conocimientos de genómica y proteómica se han podido desentrañar las transformaciones clave que conducen al aumento del rendimiento. La secuenciación del genoma completo de Wis.54-1255, a pesar de no ser de las cepas más productivas actualmente, ha permitido identificar estas alteraciones críticas en *P. chrysogenum* para poder emularlas de manera dirigida mediante ingeniería inversa. A continuación se exponen los hallazgos y estrategias más relevantes.

4.2.1. El Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) de penicilina

Los genes relacionados con la biosíntesis de penicilina se encuentran agrupados formando un clúster en *P. chrysogenum* (**figura 3**). Estos genes son *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, que codifican las enzimas ACVS, IPNS y IAT respectivamente. Se cree que este clúster pudo ser incorporado por transferencia horizontal desde una fuente bacteriana hace 370 millones de años, puesto que los genes *pcbAB* y *pcbC* presentan características de procariontes como la ausencia de intrones. El tercer gen *penDE* parece tener origen fúngico por su homología a otras aciltransferasas, si bien incorpora aquella señal única que dirige la IAT a los peroxisomas (Gidijala et al., 2009). El clúster se encuentra flanqueado por una secuencia conservada de seis nucleótidos TTTACA en repetición (Deepika et al., 2016).



Figura 3. Representación esquemática del clúster de genes biosintéticos β -lactámicos de *Penicillium chrysogenum*. Adaptado de: van den Berg (2011).

Otras características encontradas en el genoma de 32 Mb de *P. chrysogenum* son, por un lado, genes de enzimas relacionadas con la síntesis de otros β -lactámicos y, por otro, elementos transponibles. En el primer caso, se encontraron homólogos de isopenicilin-N epimerasas y β -lactama acilasas **propias de cefalosporinas**, codificadas en marcos abiertos de lectura (ORF). Esto abre una puerta a que varias rutas compitieran entre sí, pero que fueran inactivadas por mutaciones puntuales en los procesos de mejora antes comentados (van den Berg, 2011). En cuanto a los homólogos de **transposones**, parecen estar relacionados con la síntesis de penicilina y con la pérdida de regiones genómicas durante el proceso de CSI. Fueron identificados al ocasionar dificultades en la secuenciación de varios gaps pequeños entre los 49 supercontigs de la cepa Wisconsin.54-1255 (van den Berg, 2011).

El análisis genético de las cepas obtenidas por CSI ha permitido identificar, como principal responsable del aumento de producción, la **amplificación del BGC** de penicilina en tándem. En la **tabla 1** aparece recogido el número de clústeres presente en las diferentes cepas de *P. chrysogenum*. Puede observarse, sin embargo, que este número no guarda relación lineal con el rendimiento de penicilina, por lo que se deduce que **otras alteraciones** son también de gran importancia. Se ha comprobado, al introducir copias adicionales de manera directa, que la transcripción de sus genes se satura al introducir números elevados, y que efectivamente al eliminarlas se sigue conservando una producción mayor que la del ancestro original (Weber et al., 2012).

Las otras principales alteraciones responsables son: la desregulación de la transcripción del clúster; la desregulación de varios transportadores; y la optimización del metabolismo celular, mejorando la síntesis de precursores y limitando otras rutas secundarias. Se estudia a continuación su impacto, y cómo se pueden aplicar a estrategias de ingeniería genética.

4.2.2. Ingeniería genética del BGC de penicilina y sus reguladores

Una de las herramientas más útiles que puede ofrecer la biotecnología es la edición genética, a partir de la cual se pueden inducir múltiples transformaciones en el genoma que permitan comprender el funcionamiento de genes, o incluso modificarlo a voluntad para introducir mejoras, como el aumento de dosis génicas, la optimización de la secuencia aminoacídica de las enzimas, o la alteración de la expresión de genes específicos.

En *P. chrysogenum*, la manera predominante para integrar genes es la unión de extremos no-homólogos (NHEJ), frente a la recombinación homóloga (HR). Para la NHEJ, el complejo proteico **ku70/80** actúa de puente en el proceso de fusión, de manera que la delección de sus genes ha favorecido el desarrollo de cepas con preferencia por la recombinación homóloga, que es más sencilla y ha facilitado los procesos de edición genética (Weber et al., 2012). Aún más recientemente, se ha desarrollado un sistema basado en la tecnología **CRISPR/Cas9**, que ha permitido eliminar y clonar clústeres enteros con esfuerzos mínimos (Pohl et al., 2018). Estas facilidades para manipular *P. chrysogenum* permiten diseñar en él rutas sintéticas enteras (heterólogas o nuevas), y disponer de él como una fábrica celular.

Mediante estas técnicas se ha intentado identificar, por delección de sus genes, qué enzimas ejercían un papel limitante en la ruta biosintética de la penicilina, para proceder a aumentar su dosis génica. Sin embargo, se apreciaron resultados sorprendentes.

Se observó que, a lo largo del proceso de CSI, la enzima limitante cambiaba en cada cepa, pasando de ser la ACVS en las cepas más antiguas, a ser la IAT en las cepas mejoradas superproductoras (Douma et al., 2010). Por tanto, a pesar de amplificarse el BGC de penicilina completo, otras modificaciones en el genoma hacen que unas enzimas se expresen más que otras o que cambie su actividad. Son particularmente interesantes tanto el aumento de la actividad de la IAT al pasar de laboratorio a escala industrial, posiblemente debido a los niveles de CO₂ (Cao et al., 2011), como el aumento de los niveles de IPNS al expresarse algunos genes homólogos a los de la biosíntesis de cefalosporinas (van den Berg, 2011).

Por otro lado, al intentar suplementar genes de estas enzimas por transformación, se observó que transformar genes individuales no suponía excesiva mejoría, que transformar genes a pares hasta disminuía la producción de penicilina a veces, y que el mejor resultado se obtenía al transformar los tres genes. La mejor combinación resultó de transformar tres copias de *pcbAB*, una copia de *pcbC* y dos copias de *penDE*, mejorando la productividad de la Wis.54-1555 en un 299% (Ozcengiz & Demain, 2013).

El desarrollo de la **transcriptómica** ha permitido elaborar una explicación a estos hechos. De la misma manera que no hay linealidad entre el número de copias del BGC y la producción de penicilina, la transcriptómica confirma que tampoco la hay con los niveles de transcripción y de enzima. No se expresa de igual manera cada gen en cada cepa, encontrándose niveles de mRNA muy variados en cada caso (Ozcengiz & Demain, 2013).

Para aplicar este conocimiento a la mejora de cepas, un campo de trabajo muy prometedor que ofrece la ingeniería genética es la manipulación de los diferentes reguladores de la expresión de los BGCs (Guzman-Chavez et al., 2018). Podemos distinguir dos estrategias principales: o bien modificando reguladores globales, o bien mediante cambios epigenéticos que afecten a la estructura de la cromatina.

4.2.2.1. Reguladores globales

El BGC de penicilina, a diferencia de otros, no tiene un factor de transcripción propio identificado, ni en el mismo clúster ni en otro lugar del genoma. En su lugar, su transcripción

sería regulada por otros factores generales comunes a varios hongos filamentosos, que interactuarían en una región promotora bidireccional, de 1,16-kb, situada entre los genes *pcbAB* y *pcbC* (Martin, 2017). Algunos de ellos son: la proteína **PacC**, un regulador dependiente de pH; el regulador **AreA**, relacionado con la represión del metabolismo del nitrógeno y con la biosíntesis de β -lactámicos; **CreA**, el principal regulador negativo por carbono; los elementos antagónicos AnCF y AnBH1; y el activador transcripcional PTA1 (Domínguez-Santos et al., 2012). La manipulación de su expresión o de las secuencias de DNA donde se anclan puede resultar de gran utilidad (Deepika et al., 2016).

Aunque el BGC de penicilina no tenga reguladores específicos, otros BCGs en *P. chrysogenum* sí los tienen, como los clústeres de péptidos no-ribosomales (NRPs) o de policétidos (PKs). Se está estudiando la posibilidad de modificar la afinidad y selectividad de sus reguladores para dirigirlos al BCG de penicilina. Mientras que los clústeres de NRPS tienen reguladores más diversos, la mayoría de los clústeres de PKS contienen un regulador de la familia del **Zn₂Cys₆**. Estos constan de un dominio de unión al DNA con los llamados “dedos de zinc”, un dominio ácido y un dominio regulador. Su actividad depende de su grado de fosforilación, despejando el sitio de unión (Guzman-Chavez et al., 2018).

Las principales estrategias de manipulación de elementos regulatorios para aumentar la producción de penicilina serían las siguientes. Primero, la **delección** de genes relacionados con la represión, bien de manera dirigida una vez identificados, o bien de manera masiva seguida de HPLC o LC-MS para reconocerlos. En segundo lugar, el **reemplazo de promotores** por otros más fuertes o que sean fácilmente inducibles, como un reciente sistema sintético modulable para 795 utilidades diferentes (Mózsik et al., 2019). Y por último, la **sobreexpresión** de reguladores positivos, aunque suele usarse en combinación con la estrategia del reemplazo de promotores (Guzman-Chavez et al., 2018).

4.2.2.2. Regulación sobre la cromatina

Ampliando un poco el foco, también la **epigenética** tiene un papel importante en la expresión de los genes de la penicilina G. En los hongos como *P. chrysogenum* la cromatina se estructura por nucleosomas, consistentes en superhélices de DNA compactado por octámeros de histonas (dos pares de H2A, H2B, H3 y H4). Esta estructura obstaculiza el acceso de los factores de transcripción y regulación al DNA, aunque se diferencian dos conformaciones: una más densa (**heterocromatina**), y otra más relajada (**euromatina**). Así, la primera presenta actividades transcripcionales bastante más bajas que la segunda. Por tanto, su modificación puede tener importantes repercusiones en el rendimiento de la síntesis de penicilina y otros metabolitos de interés (Guzman-Chavez et al., 2018).

La diana más importante la constituyen las histonas nucleosomales, cuyas modificaciones postraduccionales regulan los dos niveles de compactación. Se trata sobre todo de acetilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones, etilaciones, propilaciones, butilaciones y fosforilaciones. La euromatina estaría asociada a un alto grado de **acetilación** de las histonas, mientras que la **metilación** ha mostrado diferente efecto dependiendo de la propia histona: es típica en H3K9, H3K27 y H4K20, en el caso de la heterocromatina, y típica en H3K4, en el caso de la euromatina (Guzman-Chavez et al., 2018). La manipulación de estos procesos tiene entonces extensas consecuencias, pudiendo realizarse también por tratamientos químicos. Un ejemplo es una enzima histona-desacetilasa (HDAC), cuya sobreexpresión ha demostrado, contra todo pronóstico, favorecer la activación de clústeres de genes silentes como los biosintéticos de sorbicilinoídes. También su inactivación ha revelado la producción de nuevos metabolitos secundarios, e incluso aumentado la de otros ya conocidos (Williams et al., 2008).

Un papel muy relevante en epigenética lo ostenta el llamado **complejo Velvet**, formado por las proteínas LaeA/VeA/VeB. Este complejo heterotrimérico es un importante regulador global que entra y sale del núcleo celular en respuesta a la luz, pues esta inhibe la expresión de VeA (Martin, 2017). La proteína **LaeA** es una metiltransferasa que actúa en las histonas, y su sobreexpresión en *P. chrysogenum* ha demostrado aumentar el rendimiento de penicilina en un 20–25% (Guzman-Chavez et al., 2018), mientras que la inactivación del gen *laeA* lo reduce en un 40–50% (Hoff, 2010).

Mencionamos aquí también la **ingeniería de ribosomas**, que busca modificar diferentes proteínas ribosomales, RNA polimerasas y factores de traducción para optimizar el proceso homónimo (Ochi & Hosaka, 2013).

4.2.3. Ingeniería de los procesos de transporte

La compartimentalización del proceso parece suponer una ventaja para la síntesis de penicilinas en *P. chrysogenum*, pues esta disminuye notablemente al bloquear la expresión de determinados compartimentos (Weber et al., 2012). Recordamos que la ruta empieza con la síntesis de los precursores en el citosol y mitocondrias; se forma el núcleo β -lactámico en el citosol (por la enzima IPNS); y termina con la activación e intercambio de cadenas laterales en los peroxisomas (enzimas PCL e IAT).

En cuanto a los **peroxisomas**, estos orgánulos membranosos se han encontrado en un elevado número en cepas industriales de alto rendimiento (Meijer, 2010). En diferentes experimentos se ha logrado aumentar sus niveles en *P. chrysogenum* e inhibir su degradación: para lo primero, se ha sobreexpresado el gen ***pex11***, codificante de una peroxina que estimula la formación de peroxisomas (Kiel et al., 2005); para lo segundo, se ha provocado la delección del gen ***atg1***, relacionado con el proceso de autofagia y degradación de los peroxisomas (Bartoszewska, 2011). En ambos casos se aumentó notablemente la producción de penicilina, llegando al doble en el caso del gen ***pex11*** (Martín, 2020).

El aumento de superficie total de peroxisomas maximizaría el flujo de los precursores de cadenas laterales, puesto que son mayormente ácidos orgánicos débiles y acceden a los peroxisomas por difusión pasiva. Las enzimas IAT y PCL también verían aumentado su rendimiento por encontrarse más concentradas en el lumen que en el citosol, evitando reacciones secundarias no deseadas, y por presentar un pH ligeramente alcalino (7'5-8'0) próximo al pH óptimo de estas enzimas (8'0 y 8'5, respectivamente) (Weber et al., 2012).

Aunque no se ha definido todavía ningún gen para transportadores en ningún clúster de *Penicillium* o *Aspergillum*, recientemente se han identificado dos transportadores MFS relacionados con la entrada del PAA y la isopenicilina N: el PenM y PaaT respectivamente. La sobreexpresión del gen ***penM*** ha permitido aumentar el rendimiento hasta en un 236% en la cepa Wis54-1255, mientras que su silenciamiento provocó un descenso del 90% (Martín, 2020). Se sospecha también del papel de **transportadores ABC en la secreción** de la penicilina, a raíz de un método de estimulación con verapamilo (The Netherlands Patente n^o WO/2001/032904, 2001), que confirma que es un proceso activo. La expulsión natural de penicilina en levaduras al expresar en ellas su BGC refuerza la teoría de que la llevan a cabo transportadores inespecíficos (van den Berg, 2011).

4.2.4. Ingeniería del metabolismo secundario

Una de las consecuencias más importantes del proceso de CSI, que hace de *P. chrysogenum* una excelente fábrica biológica, es la represión de la expresión de genes relacionados con otras rutas metabólicas, que no harían sino desviar la síntesis de penicilina

hacia otros metabolitos secundarios. Se estima que, incluso en cepas comerciales, solo el 10% del carbono acaba formando parte de penicilina, y que para producir 1 mol de esta son necesarios 73 moles de ATP para todos los procesos de transporte, secreción, etcétera (Ozcengiz & Demain, 2013). La represión de rutas alternativas, por tanto, supone un ahorro de recursos que aumenta el rendimiento del proceso. Este es el caso por ejemplo de la degradación de aminoácidos (Wu et al., 2020) o del **ácido fenilacético (PAA)**: este es naturalmente metabolizado por una citocromo P450 monooxigenasa, codificada por el gen *phacA*. La mutación de la cepa Wis.48-701 a Wis.49-133 supuso la delección de este gen, viendo aumentado el rendimiento de penicilina en un 100% (Ozcengiz & Demain, 2013). Este avance podría implementarse entonces de manera dirigida en otras cepas comerciales en las que la ruta no esté optimizada, aumentando si cabe su rendimiento.

Siguiendo el principio opuesto, es posible aumentar la expresión de la proteína **Pga1**, que regula positivamente a las enzimas involucradas en la síntesis de ATP, NADPH y cisteína, todas ellas necesarias en la síntesis de penicilina (Carrasco-Navarro et al., 2016).

Otro grupo importante de enzimas que no pertenecen al clúster biosintético de penicilina, son las **CoA ligasas peroxisomales**. Incluyendo la fenilacetil-CoA ligasa (PCL) de la ruta de la penicilina G, se han identificado ocho genes de enzimas de esta familia, de las cuales unas colaboran al rendimiento del proceso y otras lo perjudican gastando CoA en otros sustratos. Tres de estos genes tienen una expresión muy reducida en las cepas seleccionadas por CSI, por lo que no deben de estar implicados en la ruta de la penicilina G; y otros tres sí que se expresan a niveles significativos (pero menores que los de PCL), pudiendo ser los responsables de que se conserve mínimamente la producción de penicilina G al eliminar el gen *phl* de la PCL (Weber et al., 2012). Se desconocen los sustratos de estas seis CoA ligasas. Sí se conoce que las dos restantes, la PCL y la AclA, son específicos para ácidos grasos de cadena media y larga respectivamente. El hallazgo de que AclA puede activar el ácido adípico, permite que se pueda aprovechar un microorganismo tan preparado para el uso industrial como es *P. chrysogenum* en la síntesis de ácido adipoil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (ad-7-ADCA), precursor de cefalosporinas (Koetsier et al., 2010).

La secuenciación del genoma de Wis54-1255 evidenció la presencia, además de los BGCs de penicilina, de clústeres que codifican varias sintasas: 10 sintasas de péptidos no-ribosomales (**NRPSs**), 20 sintasas de policétidos (**PKSs**) y 2 híbridos NRPS-PKSs (van den Berg, 2011). Algunas están relacionadas con la síntesis de compuestos de interés, como la griseofulvina o la melanina, aunque en condiciones normales no se expresen en cantidad (Cao et al., 2011). Sabiendo esto, es posible eliminar estos clústeres para evitar la competición por los demandados NADPH y ATP y mejorar el rendimiento de penicilina, del mismo modo que también puede resultar de interés eliminar el clúster biosintético de ésta si lo que interesa es producir en *P. chrysogenum* alguno de estos otros compuestos.

Algunos grupos de investigación han intentado producir nuevos principios activos modificando la función de estas NRPS y PKS, debido a las posibilidades que ofrece su gran y complicada estructura. Sin embargo, esta misma dificulta enormemente el proceso, habiéndose intentado sustituir diferentes unidades, subunidades, dominios y subdominios, con diferentes grados de éxito. Las estrategias con mayor grado de éxito han sido las más directas, frente a las técnicas de mutagénesis aleatoria. Un ejemplo es la modificación de los dominios que conforman el sitio activo de la NRPS A548, consiguiendo con éxito alterar su especificidad, aunque sacrificando su velocidad catalítica (Guzman-Chavez et al., 2018).

A pesar del éxito de la ingeniería de NRPS y PKS en varios hongos filamentosos, no hay todavía estudios de su efectividad en *P. chrysogenum*.

4.2.5. Ingeniería del medio de cultivo

Cabe por último destacar la posibilidad de optimizar la producción de penicilina en *P. chrysogenum* mediante ingeniería del medio de cultivo, modificando su composición y otros parámetros como luz y temperatura.

De manera **inespecífica**, es posible optimizar diferentes condiciones de luz, temperatura, pH, estrés oxidativo y disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno. La combinación de las herramientas de *high-throughput screening*, con un array de condiciones de cultivo, y herramientas de bioinformática, permiten encontrar rápidamente las condiciones ideales, además del valor añadido de detectar la producción de nuevos metabolitos con potencial antibiótico, como fue el caso de aspoquinolonas en *A. nidulans* (Scherlach & Hertweck, 2006). Sin embargo, aunque han sido un éxito para este segundo propósito, es cierto que aún faltan por definir algunos parámetros físicos y químicos (Guzman-Chavez et al., 2018).

De manera **específica**, está demostrado que añadir determinadas sustancias al medio de cultivo funciona como estimulador o represor de la producción. Por ejemplo, está establecido que altas concentraciones de glucosa, fosfato o amonio reprimen el metabolismo secundario, mientras que concentraciones limitadas de hierro y nitrógeno lo estimulan (Guzman-Chavez et al., 2018); pero un paso más allá sería el caso de la 4'-fosfopanteteína u oligosacáridos como los mananos, que aumentan la actividad de la IAT. Se ha comprobado que la primera es sintetizada de manera endógena por la PPTasa, por lo que una estrategia para aumentar la producción de isopenicilina N y bencilpenicilina es amplificar el gen *ppt* (Ozcengiz & Demain, 2013). Otra sustancia clave sería el ácido L- α -aminoadípico, cuya adición supone una mejora significativa en la productividad (demostrando que su disponibilidad es limitante en la ruta) (Weber et al., 2012). También el 1,3-diaminopropano ha demostrado inducir la transcripción de los genes *pcbAB*, *pcbC*, y *penDE* en un 100% (Martin, 2017).

Por último, se ha implantado un modelo de **co-cultivo** llamado comúnmente "*crosstalk*", por el cual se establece una relación simbiótica entre diferentes especies. En esta, los metabolitos secundarios producidos por uno servirían al otro como intermediarios aprovechables, o bien lo protegerían del crecimiento de un tercer organismo indeseado. Esta estrategia ha permitido descubrir moléculas normalmente no producidas por clústeres silenciados, como fue el caso de los PK antibacterianos fumiciclinas A y B (Adnani et al., 2017).

4.3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA

La expresión heteróloga consiste en introducir un gen procedente de una especie y expresarlo en otra diferente. Esta estrategia puede ser aprovechada para *P. chrysogenum* en los dos sentidos posibles.

4.3.1. *Penicillium chrysogenum* como donador

Por un lado, se han realizado varios intentos de transferir el BGC de penicilina a levaduras por su capacidad de fermentación. Destacan los experimentos en *Saccharomyces cerevisiae* (Awan et al., 2016) y en *Hansenula polymorpha*, si bien en este último se añadieron además los genes *phl* para la activación del PAA y el *sfp* de *Bacillus subtilis* para la activación de la ACVS (Gidijala et al., 2009). Sin embargo, los principales obstáculos de esta estrategia son el gran tamaño del fragmento de DNA (> 40 kbp) que debe clonarse, lograr una expresión y activación efectiva de las enzimas deseadas, y la toxicidad de los productos para el organismo hospedador (Rutledge & Challis, 2015). Por otro lado, se ha explorado la utilidad de enzimas

concretas para biocatálisis, siendo el principal objeto de ello la isopenicilin N aciltransferasa para producir 6-APA (Fernández et al., 2003).

4.3.2. *Penicillium chrysogenum* como hospedador

También se puede emplear la expresión heteróloga para introducir genes de otra especie en *P. chrysogenum* y aprovechar su conocimiento y optimización industrial. Esta estrategia estaría facilitada por el desarrollo de una biología sintética, con un sistema de promotores y terminadores optimizados para *P. chrysogenum* y una producción relativamente barata de DNA sintético (Polli et al., 2016). Así, sería posible programar rutas sintéticas enteras en él a un coste relativamente bajo. Actualmente se ha conseguido desarrollar una cepa base sin BGC de penicilina, roquefortina, crisogenina ni fungisporina, para optimizar el aprovechamiento del carbono y el nitrógeno, y que sirva de fábrica para un amplio arsenal de BGCs heterólogos (Pohl et al., 2020). Es de especial utilidad para BGCs de otros hongos filamentosos o incluso de levaduras, que no producen NRPs y PKs de manera natural. Esta estrategia ya ha tenido éxito en otras cepas industriales capaces de producir compuestos novedosos (como la pravastatina) a altas concentraciones en poco tiempo (McLean et al., 2015).

La similitud en sus rutas biosintéticas ha permitido aprovechar a *P. chrysogenum* para producir otros β -lactámicos, como el caso de las cefalosporinas. La obtención de cefalosporina C (**figura 3**) y otros precursores en grandes cantidades es de especial interés, pues se emplean en semisíntesis para generar una grandísima variedad de cefalosporinas semisintéticas.

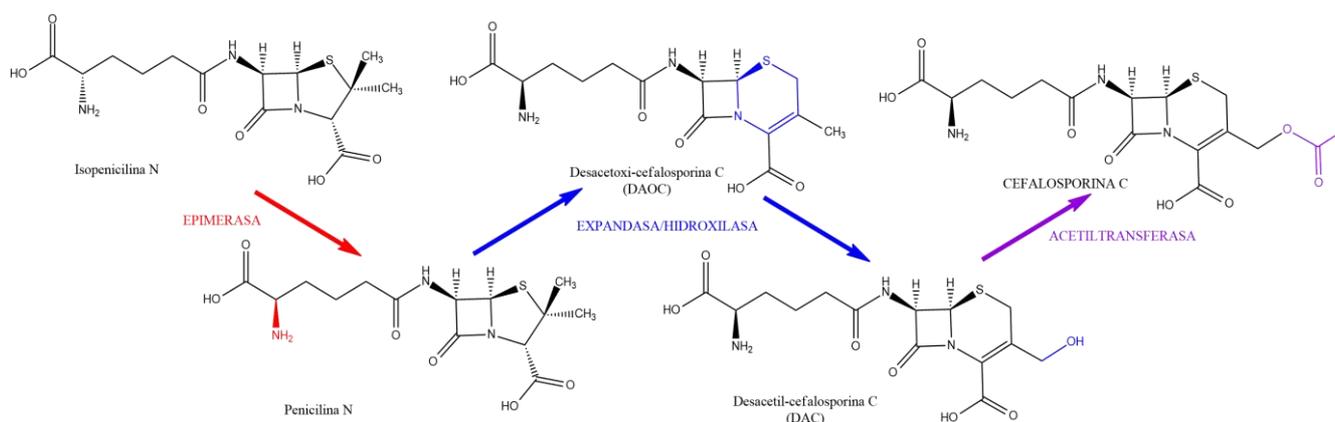


Figura 3. Ruta biosintética de la cefalosporina C a partir de la isopenicilina N en *Acremonium chrysogenum*.

Una **isopenicilin N epimerasa** (genes *cefD1/2* en *Acremonium chrysogenum*) catalizaría la isomerización de la isopenicilina N en penicilina N, aunque se ve limitada en *A. chrysogenum* por el transporte de la isopenicilina N hasta los orgánulos en los que se encuentra. Después, una enzima con doble actividad **expandasa/hidroxilasas** (gen *cefEF*) ampliaría el anillo tiazolidínico, formando la desacetoxicefalosporina C (DAOC), y seguidamente la hidroxilaría produciendo desacetilcefalosporina C (DAC). En *A. chrysogenum*, la ruta termina con una acetilación por la **DAC acetiltransferasa** (*cefG*), paso limitado por un débil promotor del gen. El producto final es la cefalosporina C (Ozcengiz & Demain, 2013).

La expresión del gen *cefEF* de *A. chrysogenum* en *P. chrysogenum* permite la producción de ácido adipoil-7-amino-desacetilcefalosporánico (ad-7-ADAC). Este es un sintón de elevada utilidad para la semisíntesis de cefalosporinas, pues se puede convertir en ácido 7-amino-desacetilcefalosporánico (7-ADCA) por biocatálisis con una glutarilacilasa. Lo mismo ocurriría

cointegrando además el gen *cefG*: el ad-7-ADAC se acetilaría en ácido adipoil-7-aminocefalosporánico (ad-7-ACA), convertible en ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA) por otra glutarilacilasa. El 7-ACA es uno de los sustratos más empleados en la semisíntesis de cefalosporinas (Weber et al., 2012). La suplementación de ácido adípico y la delección del gen codificante de Pc20g07920 (proteína relacionada con su catabolismo) permite multiplicar hasta 8 veces el rendimiento de este proceso (Veiga et al., 2012).

4.4. BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS

Recientemente, la necesidad de encontrar nuevos antibióticos y otras sustancias activas ha devuelto la atención al *screening* de productos naturales en plantas y microorganismos. Esta vuelta al enfoque tradicional, después de haber vivido una época dorada de desarrollo químico semisintético, se debe de nuevo a la biotecnología e ingeniería genética, junto con las técnicas de *high-throughput screening* (HTS).

En primer lugar, todas las estrategias tratadas anteriormente para el caso de la penicilina se pueden aplicar a otros BGCs, incluso muchos de ellos silentes, para estimular su expresión y analizar los productos. Así se han podido conocer en *P. chrysogenum* los sorbicilinoideos o la viridicatumtoxina, entre otros (Weber et al., 2012). Las últimas tecnologías como el sistema CRISPR/Cas9 hacen estas manipulaciones relativamente sencillas.

En segundo lugar, el desarrollo de la **metagenómica** amplía aún más el espectro de búsqueda de nuevas sustancias, permitiendo estudiar el genoma de microorganismos no cultivables introduciéndolo en otros más domesticados, como *P. chrysogenum* o *A. nidulans* (Ribeiro da Cunha, 2019). De esta manera se pueden identificar enzimas capaces de producir nuevas reacciones o nuevos productos de compleja obtención química, generando extensas bibliotecas de genes de manera rápida y sistemática (Coughlan et al., 2015; United States Patente nº US9988624B2, 2016). Siendo el principal obstáculo de la bioinformática la falta de validación de estos hallazgos en organismos reales, contar con estas herramientas arroja muchas esperanzas, y ya se han encontrado varios antibióticos por este método (aunque no se hayan llegado aún a comercializar) (Guzman-Chavez et al., 2018).

Por último, cabe mencionar una última tecnología, la de la **lipidómica**. Esta permite estudiar por ejemplo la composición de las membranas y paredes celulares de un microorganismo o el uso metabólico de diferentes lípidos. Por un lado, este sistema desentraña nuevas dianas antibióticas, como las enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos FabI, FabH, FabF o la acetil-CoA carboxilasa, conservadas en varios patógenos altamente relevantes como micobacterias (Ribeiro da Cunha, 2019). Pero también, por otro lado, conocer la estructura de las membranas y paredes celulares de patógenos permite desarrollar modelos sintéticos, como liposomas, sobre los que ensayar nuevos fármacos y estudiar su interacción o farmacocinética (Pinheiro et al., 2019).

5 CONCLUSIONES

La Biotecnología se presenta como una poderosa herramienta para mejorar constantemente la producción de antibióticos. A lo largo del último siglo, tuvo una gran repercusión en el desarrollo de cepas industriales de *Penicillium chrysogenum*, mediante mutagénesis aleatoria. Este proceso ha llevado a la consolidación de *P. chrysogenum* como

fábrica celular, y al abaratamiento de la producción de penicilinas en grandes cantidades como se consumen hoy en día.

Las técnicas de ingeniería genética han podido confirmar el amplio margen de mejora que tiene la biosíntesis de penicilinas. A la vez que permiten obtener un conocimiento básico de los microorganismos, su genoma y proteoma, suponen una herramienta para aplicar dicho conocimiento en la mejora de la salud pública. Por un lado, aumentar el rendimiento de producción garantiza el abastecimiento y el acceso de la población a estos medicamentos. También facilita el desarrollo de alternativas terapéuticas frente a resistencias de maneras muy variadas: impulsando el *screening* de nuevos productos naturales no caracterizados, permitiendo el diseño racional de antibióticos contra dianas específicas, o simplemente aprovechando la maquinaria optimizada de *P. chrysogenum* para producir otras sustancias. En este sentido, el potencial inmediato más interesante es la obtención de cefalosporinas en *P. chrysogenum*, de más amplio espectro que las penicilinas y por tanto más útiles frente a patógenos resistentes.

Es destacable, a pesar de la relativa sencillez de la ruta biosintética de penicilinas, dependiente de solo tres genes principales, la gran variedad de factores que pueden condicionar su desempeño y sobre los que la Biotecnología puede actuar: la regulación de su expresión de múltiples maneras, la optimización de los procesos de transporte celular, e incluso todo el resto del metabolismo microbiano. Lo más emocionante es que la aplicación de cada una de estas estrategias conlleva por sí misma la multiplicación de la productividad, en ocasiones en varios órdenes de magnitud. Resultaría interesante intentar aplicarlas todas en una misma cepa, tanto por el beneficio que supone desarrollar una cepa superproductora, como por el estudio de los límites en el potencial de la Biotecnología. Este, de momento, resulta prometedor.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adnani, N., Rajski, S. R., & Tugni, T. S. (2017). Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Natural product reports*.(34), 784–814. doi:10.1039/C7NP00009J
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (Enero de 2020). *Problemas de suministro de los medicamentos en España*. Obtenido de aemps.gob.es/distribucion-de-medicamentos/problemas-de-suministro-de-medicamentos/
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M., Baloch, Z et al. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 1645-1658. doi:10.2147/IDR.S173867
- Awan, A., Shaw, W., & Ellis, T. (2016). Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. *Advanced drug delivery reviews*.(105(Pt A)), 96-106. doi:10.1016/j.addr.2016.04.010
- Barreiro, C., & García-Estrada, C. (2019). Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: Unveiling the secrets behind penicillin production. *Journal of Proteomics*(198), 119-131. doi:10.1016/j.jprot.2018.11.006
- Barreiro, C., Martín, J., & García-Estrada, C. (2012). Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 105109. doi:10.1155/2012/105109
- Bartoszewska, M. K. (2011). Autophagy deficiency promotes beta-lactam production in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology*(77(4)), 1413–1422. doi:10.1128/AEM.01531-10

- Cao, Y., Qiao, B., Lu, H., Chen, Y., & Yuan, Y. (2011). Comparison of the secondary metabolites in *Penicillium chrysogenum* between pilot and industrial penicillin G fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*(89), 1193–1202. doi:10.1007/s00253-010-2910-y
- Carrasco-Navarro, U., Vera-Estrella, R., Barkla, B., Zúñiga-León, E., Reyes-Vivas, H., Fernández, F., & Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric G α protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial cell factories*(15(1)), 173. doi:10.1186/s12934-016-0564-x
- Coughlan, L., Cotter, P., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in microbiology*(6), 672. doi:10.3389/fmicb.2015.00672
- Deepika, V., Murali, T., & Satyamoorthy, K. (2016). Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. *Microbiological research*.(182), 125-140. doi:10.1016/j.micres.2015.10.009
- Domínguez-Santos, R., Martín, J., Kosalková, K., Prieto, C., Ullán, R., & García-Estrada, C. (2012). The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of β -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal genetics and biology*(49(11)), 866-881. doi:10.1016/j.fgb.2012.08.002
- Douma, R., Verheijen, P., de Laat, W., Heijnen, J., & van Gulik, W. (2010). Dynamic gene expression regulation model for growth and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering* (106), 608–618. doi:10.1002/bit.22689
- Fernández, F., Cardoza, R., Montenegro, E., Velasco, J., Gutiérrez, S., & Martín, J. (2003). The isopenicillin N acyltransferases of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* differ in their ability to maintain the 40-kDa alphabeta heterodimer in an undissociated form. *European journal of biochemistry*.(270(9)), 1958-1968. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03561.x.
- Fierro, F., Barredo, J., Díez, B., Gutierrez, S., Fernández, F., & Martín, J. (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*(92(13)), 6200–6204. doi:10.1073/pnas.92.13.6200
- Gidijala, L., Kiel, J., Douma, R., Seifar, R., van Gulik, W., Bovenberg, R., & al., e. (2009). An Engineered Yeast Efficiently Secreting Penicillin. *Public Library of Science*(4(12)), e8317. doi:10.1371/journal.pone.0008317
- Glick, B. R., & Pattern, C. L. (2017). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 5th edition*. Washington, DC: ASM Press.
- Guzman-Chavez, F., Zwahlen, R., Bovenberg, R., & Driessen, A. (2018). Engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* as cell factory for natural products. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.02768
- Hoff, B. K. (2010). Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryotic cell*.(9), 1236–1250. doi:10.1128/EC.00077-10
- Houbraken, J. F. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *International Mycological Association* (2(1)), 87–95. doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.12

- Jami, M., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular & cellular proteomics : MCP*(9(6)), 1182–1198. doi:10.1074/mcp.M900327-MCP200
- Kiel, J. A., van der Klei, I. J., van den Berg, M. A., & Bovenberg, R. A. (2005). Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology* (42), 154-164. doi:10.1016/j.fgb.2004.10.010
- Koetsier, M., Gombert, A., Fekken, S., & al., e. (2010). The *Penicillium chrysogenum* *aclA* gene encodes a broad-substrate-specificity acyl-coenzyme A ligase involved in activation of adipic acid, a side-chain precursor for cephem antibiotics. *Fungal Genetics and Biology* (47(1)), 33-42. doi:10.1016/j.fgb.2009.10.003
- Martin, J. (2017). Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* (44), 525–535. doi:10.1007/s10295-016-1830-y
- Martín, J. (2020). Transport systems, intracellular traffic of intermediates and secretion of β -lactam antibiotics in fungi. *Fungal biology and biotechnology*(7, 6). doi:10.1186/s40694-020-00096-y
- McLean, K., Hans, M., Meijrink, B., & al, e. (2015). Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.(112(9)), 2847-2852. doi:10.1073/pnas.1419028112
- Meijer, W. H. (2010). Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology* (76), 5702–5709. doi:10.1128/AEM.02327-09
- Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*(398), 237-272. doi:10.1007/82_2016_499
- Mózsik, L., Büttel, Z., Bovenberg, R., Driessen, A., & Nygård, Y. (2019). Synthetic control devices for gene regulation in *Penicillium chrysogenum*. *Microbial cell factories*(18(1)), 203. doi:10.1186/s12934-019-1253-3
- Newbert, R., Barton, B., Greaves, P., & al., e. (1997). Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* (19), 18–27. doi:10.1038/sj.jim.2900411
- Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*(71), 153–184. doi:10.1038/ja.2017.62
- Ochi, K., & Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied microbiology and biotechnology* (97(1)), 87-98. doi:10.1007/s00253-012-4551-9
- Ozcengiz, G., & Demain, A. L. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnology Advances*(31), 287-311. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.12.001
- Pinheiro, M., Magalhães, J., & Reis, S. (2019). Antibiotic interactions using liposomes as model lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids*(222), 36-46. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.05.002
- Pohl, C., Mózsik, L., Driessen, A., Bovenberg, R., & Nygård, Y. (2018). Genome Editing in *Penicillium chrysogenum* Using Cas9 Ribonucleoprotein Particles. *Methods in molecular biology* (1772), 213-232. doi:10.1007/978-1-4939-7795-6_12

- Pohl, C., Polli, F., Schütze, T., & al., e. (2020). A *Penicillium rubens* platform strain for secondary metabolite production. *Scientific reports* (10, 7630). doi:10.1038/s41598-020-64893-6
- Polli, F., Meijrink, B., Bovenberg, R., & Driessen, A. (2016). New promoters for strain engineering of *Penicillium chrysogenum*. *Fungal genetics and biology* (89), 62-71. doi:10.1016/j.fgb.2015.12.003
- Ribeiro da Cunha, B. F. (2019). Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics*, 8(2), 45. doi:doi.org/10.3390/antibiotics8020045
- Rutledge, P., & Challis, G. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature reviews. Microbiology* (13(8)), 509-523. doi:10.1038/nrmicro3496
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2006). Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Organic & biomolecular chemistry*. (4(18)), 3517-3520. doi:10.1039/b607011f
- SERBER, & al., e. (2016). *United States Patente n° US9988624B2*.
- Šmidák, R., Jopčík, M., Kralovičová, M., & al., e. (2010). Core promoters of the penicillin biosynthesis genes and quantitative RT-PCR analysis of these genes in high and low production strain of *Penicillium chrysogenum*. *Folia Microbiologica* (55), 126–132. doi:10.1007/s12223-010-0019-4
- Tooke, C. L. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500. doi:doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002
- Van Den Berg M, G. L. (2010). Biosynthesis of active pharmaceuticals: β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology & genetic engineering reviews* (27), 1-32. doi:10.1080/02648725.2010.10648143
- van den Berg, M. (2011). Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. *Applied microbiology and biotechnology* (92), 45–53. doi:10.1007/s00253-011-3476-z
- VAN DEN BERG, M. A., BOVENBERG, R. A., DRIESSEN, A. J., KONINGS, W. N., SCHUURS, T. A., NIEBOER, M., & WESTERLAKEN, I. (2001). *The Netherlands Patente n° WO/2001/032904*.
- Veiga, T., Gombert, A., Landes, N., & al., e. (2012). Metabolic engineering of β -oxidation in *Penicillium chrysogenum* for improved semi-synthetic cephalosporin biosynthesis. *Metabolic engineering* (14(4)), 437-448. doi:10.1016/j.ymben.2012.02.004
- Weber, S. S., Bovenberg, R. A., & Driessen, A. J. (2012). Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Journal*(7), 225-236. doi:10.1002/biot.201100065
- Williams, R., Henrikson, J., Hoover, A., Lee, A., & Cichewicz, R. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & biomolecular chemistry*.(6(11)), 1895-1897. doi:10.1039/b804701d
- World Health Organization. (2018a). *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva.
- World Health Organization. (2018b). *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018*. Geneva.
- Wu, M., Crismaru, C., Salo, O., Bovenberg, R., & Driessen, A. (2020). Impact of classical strain improvement of *Penicillium rubens* on amino acid metabolism during β -lactam production. *Applied and Environmental Microbiology* (86), e01561-19. doi:doi.org/10.1128/AEM.01561-19