



Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios

Santiago Gutiérrez^{2,3}, Javier Casqueiro² y Juan Francisco Martín^{1,2}

¹Dpto. de Ecología, Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de León, León, España, ²Instituto de Biotecnología (INBIOTEC), León, España y ³Dpto de Ecología, Genética y Microbiología, ESTIA, Universidad de León, Ponferrada, España

Resumen

La superproducción de antibióticos β -lactámicos ha sido abordada tradicionalmente por técnicas de mutagénesis clásica, método que se ha mostrado muy efectivo y que ha sido el responsable de los mayores incrementos en la producción. El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante aplicables a hongos filamentosos ha permitido la actuación directa sobre los genes implicados en la biosíntesis. En primer lugar el incremento en el número de copias de algunos genes particulares ha permitido alcanzar aumentos moderados en la producción, pero sólo en algunos casos. Por otro lado el cambio de la región promotora de algunos genes con bajo nivel de transcripción (Ej. El gen *cefG* de *A. chrysogenum*) ha llevado a mayores incrementos y finalmente la modificación del flujo de precursores de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos (Ej. Incremento del "pool" de ácido α -aminoadípico) han permitido obtener notables incrementos en la producción de penicilina. La manipulación genética de los hongos filamentosos ha llevado por tanto a obtener mejoras en la producción, aunque estas de momento no han superado a las mejoras obtenidas por mutagénesis clásica, debido fundamentalmente a que la mejora de uno de los pasos limitantes en la producción lleva a la aparición de una nueva limitación impidiendo así incrementos importantes de la misma.

β -lactamas, Dosis génica, Sobreexpresión, Precursores

Filamentous fungi as cellular factories: Biodiversity of secondary metabolites

Summary

The increase in the production of β -lactam antibiotics has been carried out traditionally by classical mutagenic techniques, this method has been shown to be very effective and it has been the responsible for high increases in production. The development of DNA recombinant techniques in filamentous fungi has allowed the direct use of the genes involved in β -lactam biosynthesis. First the increase in the gene copy number of some particular genes has allowed slight increases of β -lactam antibiotics production, thought in only some cases. In addition, the exchange of the promoter region of some genes with low level of transcription (e.g. the promoter region of the *cefG* gene of *A. chrysogenum*) has given rise to higher increases. Finally the modification of the flux of the β -lactam antibiotics biosynthesis precursors (e.g. Increase of the α -aminoadipic acid pool) has yielded the highest increase in the penicillin production. Thus the genetic manipulation of the filamentous fungi has resulted in improvements in the production, though until now they have not exceeded the increases achieved by classical mutation. When one limiting step is improved, other new, limitations of the production appear to prevent important increases in the β -lactam production.

Key words

β -lactams, Genetic dosage, Overexpression, Precursors

Dirección para correspondencia:

Dr. Santiago Gutiérrez
Dpto de Ecología, Genética y Microbiología, ESTIA,
Universidad de León, Campus de Ponferrada,
24400 Ponferrada, España
Tel.: +34 987 291509; Fax.: +34 987 291506;
E-mail: degsgm@unileon.es

Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios de interés para el hombre como son: antibióticos, ciclosporinas, ácidos mevinicos, alcaloides, compuestos antifúngicos, etc.

De todos ellos, la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos ha sido la más estudiada a nivel bioquímico y genético, así como en la que se han producido los incrementos de producción más significativos. *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acremonium*, son importantes productores de antibióticos β -lactámicos. Estructuralmente, dichos antibióticos son esencialmente péptidos modificados que tienen rutas biosintéticas muy similares. El primero de sus intermediarios es formado por complejos multienzimáticos que integran múltiples funciones catalíticas. Aunque dichas multienzimas han sido caracterizadas bioquímicamente y genéticamente, las actividades obtenidas *in vitro* han sido muy bajas, y son reconocidos como "cuellos de botella" en las fermentaciones para la producción de antibióticos.

La mayoría de los genes estructurales y algunos de los elementos de control de la ruta de biosíntesis de β -lactamas han sido ya identificados en hongos filamentosos. Sin embargo, el conocimiento limitado acerca de los mecanismos de regulación no ha permitido abordar una manipulación más directa.

La superproducción de este tipo de compuestos ha sido abordada habitualmente por mutagénesis clásica de las cepas de producción, un método que aunque tedioso, ha sido generalmente muy efectivo, y que ha sido además el responsable de los mayores incrementos obtenidos en la producción de dichos antibióticos. Una vía más racional para incrementar la eficiencia de los programas de mejora de cepas implicaría el uso de la tecnología de ADN recombinante. Sin embargo, la mayoría de los experimentos de incremento de dosis génica no han conducido al incremento esperado en la producción, habiéndose conseguido por esta vía incrementos modestos. Estrategias más innovadoras, estarían basadas por un lado en la eliminación de los "cuellos de botella" ya conocidos y por otro en el estudio de las redes regulatorias que controlan la eficiencia de las enzimas *in vitro*, lo cual conduciría a indicar dianas para la manipulación eficiente de las cepas. Experimentos cuyo objetivo será el incremento en la producción industrial de metabolitos secundarios. Éstos incluyen productos ya existentes, así como nuevos productos, originados de fermentaciones de diferentes organismos y de diferentes cepas que expresen las enzimas modificadas genéticamente.

De la gran cantidad de metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, los antibióticos β -lactámicos tienen una especial importancia tanto económica como social en diversos países europeos, entre ellos España, con una producción histórica que data de casi 50 años. Como resultado, las industrias europeas ocupan posiciones de liderazgo en el mercado mundial. Liderazgo que se ha traducido en un gran esfuerzo investigador, especialmente notorio en los últimos diez años.

Las tendencias de investigación más recientes, en el campo de los hongos filamentosos, tienden a considerar a dichos organismos como unidades biológicas en las que para mejorar la producción de un determinado compuesto hay que actuar, no sólo sobre la ruta de biosíntesis de ese compuesto, sino adicionalmente sobre otras rutas que indirectamente pudieran afectar a la primera. Como serían por ejemplo: rutas de secreción, transporte, regulación genética, etc. Convirtiéndose los hongos filamentosos en factorías celulares que con las modificaciones adecuadas pueden producir en cantidades económicamente significativas cualquier compuesto para el que exista o se pueda generar una ruta biosintética en dicho hongo filamentosos.

En el presente artículo se pretende dar una visión general de los distintos abordajes llevados a cabo hasta el momento, mediante el uso de técnicas de manipulación de ADN, para intentar incrementar la producción de antibióticos β -lactámicos en hongos filamentosos.

BIOSÍNTESIS DE PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS

La ruta para la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas ha sido estudiada en profundidad durante los últimos años. En ambos casos la biosíntesis comienza con la condensación no ribosomal de los tres aminoácidos precursores, ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para dar lugar al tripéptido ACV, en el segundo paso el tripéptido anterior es ciclado para formar la isopenicilina N, que es el primer intermediario de la ruta con actividad antibiótica. Desde la isopenicilina N la ruta diverge para formar la penicilina G por diferentes especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, en este caso la cadena lateral del α -aminoadípico es intercambiada por una cadena lateral hidrófoba (Ej. ácido fenilacético para dar la penicilina G) activada como derivado de Coenzima A. En la biosíntesis de cefalosporina la cadena lateral de α -aminoadípico de la isopenicilina N es isomerizada a la forma D dando lugar a la penicilina N. Este intermediario es primero expandido para formar la desacetoxicefalosporina C, que contiene el anillo dihidrotiazínico de nueva formación, e hidroxilado dando lugar a la desacetilcefalosporina C, que es finalmente acetilada resultando en la formación de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum* (syn. *Cephalosporium acremonium*) (Figura 1) [1-3].

ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN HONGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE

Incremento del número de copias de los genes

a) Incremento del número de copias de los genes *pcbC* y *penDE* de *Penicillium chrysogenum*. Mediante transformación con un fragmento *SalI* de 5,1kb que contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* [4] en la cepa Wisconsin 54-1255 de este hongo y usando la resistencia a fleomicina como marcador de selección, se consiguieron aislar varios transformantes con una capacidad incrementada para producir penicilina V en comparación con la cepa control. Sin embargo la producción en los clones individuales fue muy variable, encontrándose también transformantes con capacidad reducida para producir antibióticos. Sin embargo, la producción media de penicilina V de 26 transformantes fue mayor en un 18% que la producción en las cepas control. Los dos mejores transformantes producían alrededor de un 40% más de penicilina V que el valor medio de los transformantes control. Las diferencias en la concentración de penicilina V entre transformantes individuales pueden ser explicadas por la integración del plásmido en diferentes localizaciones cromosomales y por diferencias en el número de copias entre ellos [5].

b) Incremento del número de copias del gen *cefEF* de *A. chrysogenum*. La observación de que los genes implicados en la biosíntesis de cefalosporina C estaban en una sola copia y que la penicilina N se acumulaba en los caldos de fermentación sugería que el nivel de biosíntesis de cefalosporina C estaba limitado por la cantidad de expandasa/hidroxilasa presente en *A. chrysogenum*. Se realizaron experimentos de transformación con un vector

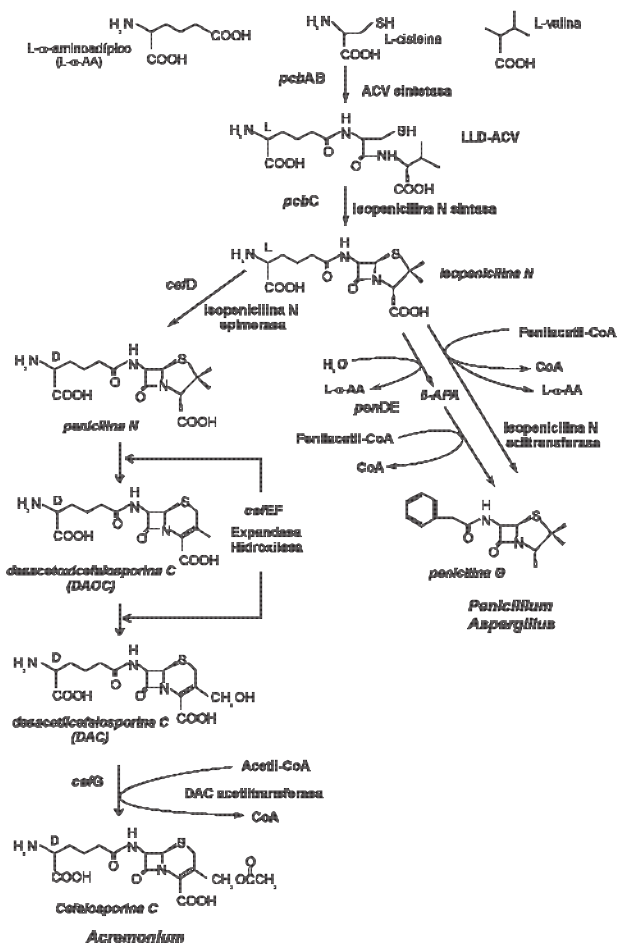


Figura 1. Ruta biosintética de antibióticos β-lactámicos en hongos filamentosos.

que contenía el gen *cefEF* y también el gen de resistencia a higromicina B como marcador de selección (se prefirió a la resistencia a ampicilina, debido a que esta última es una β-lactamasa que podría degradar la cefalosporina C sintetizada). Aproximadamente el 25% de los transformantes mostraron una capacidad mejorada para producir cefalosporina C. En el mejor transformante, se demostró una producción mejorada en un 47% con respecto a la cepa control. Dicho transformante tiene sólo una copia adicional del gen *cefEF*, que es mitóticamente estable y además no se produce acumulación de penicilina N en el caldo de fermentación. En estos experimentos el ADN transformante incluido en el vector anteriormente mencionado consistía en un fragmento *Bam*HI de 7,2 kb, el cual desde 1992 es sabido que contiene el gen *cefG* además del *cefEF* [6,7], por tanto el incremento en la producción final de cefalosporina C sería debido no sólo al incremento del número de copias del gen *cefEF*, sino también al incremento en la dosis del gen *cefG* [8].

c) *Incremento en el número de copias del gen pcbC de Acremonium chrysogenum.* El análisis de varios cientos de transformantes con copias adicionales de dicho gen no demostró ningún incremento en los niveles de producción de cefalosporina C en comparación con la cepa sin transformar. De manera que se puede concluir que el paso biosintético codificado por el gen *pcbC* no es limitante para la producción de cefalosporina [9].

d) *Incremento del número de copias del gen pcbC en una cepa industrial de P. chrysogenum.* El análisis de transformantes con copias adicionales del gen *pcbC* no resultó en un incremento en la producción de penicilina incluso en aquellos transformantes con niveles de isopenicilina N sintasa incrementados [10]. Asimismo, en este estudio se descubrió que las cepas de alta producción de *P. chrysogenum*, incluyendo la usada en este estudio, mostraban amplificación de los tres genes biosintéticos [11,12]. Así, es muy probable que el incremento en el número de copias de uno de los genes no resulte en un incremento en la producción de penicilina. Sin embargo, el incremento de la concentración de los precursores requeridos para la biosíntesis (como el α-aminoácido) podría tener un efecto estimulador tanto para las biosíntesis de penicilinas como de cefalosporinas.

Incremento de la expresión de uno o más genes de la ruta, mediante el cambio de sus regiones promotoras.

a) *Sobreexpresión del gen cefG de A. chrysogenum bajo el promotor de distintos genes de alto nivel de expresión en hongos filamentosos.* La conversión de desacetilcefalosporina C en cefalosporina C es poco eficiente en la mayoría de las cepas de *A. chrysogenum*. Dicha conversión la lleva a cabo la enzima DAC-acetiltransferasa, codificada por el gen *cefG*. Dicho gen se expresa muy pobremente en dicho hongo filamentoso en comparación con otros genes de la ruta de biosíntesis de cefalosporina. De manera que la introducción de copias adicionales del gen *cefG* con su promotor nativo no condujo a un incremento significativo del nivel de transcrito del gen *cefG*.

Debido a los resultados comentados anteriormente, se abordó la expresión del gen *cefG* a partir de los siguientes promotores: (i) del gen (*gpd*) que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*, (ii) (*gla*) que codifica para la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, (iii) (*gdh*) que codifica para la glutamato deshidrogenasa de *P. chrysogenum* y (iv) (*pcbC*) que codifica para la isopenicilina N sintasa también de *P. chrysogenum*. Dos transformantes obtenidos en la cepa *A. chrysogenum* C10 con cada uno de los plásmidos conteniendo los promotores mencionados, fueron analizados inicialmente por su nivel de transcripción del gen *cefG*, observándose que todos ellos habían incrementado muy significativamente el nivel de dicho transcrito con respecto a la cepa control transformada con un plásmido sin inserto. Posteriormente en esos mismos transformantes se determinó, mediante inmunodetección, el nivel de proteína DAC-acetiltransferasa, observándose que dicho nivel se había incrementado significativamente en los transformantes obtenidos con los plásmidos que contenían los promotores *gpd*(p) y *gdh*(p), lo cual se correlacionaba con el nivel de actividad DAC-acetiltransferasa que también se había incrementado notablemente en dichos transformantes. Y finalmente se determinó la producción de cefalosporina en medio definido de fermentación (Figura 2). Aquellos transformantes en los que el gen *cefG* se expresó a partir de los promotores *gdh*(p) y *gpd*(p) producen niveles muy superiores de cefalosporina C en comparación con la cepa control. El análisis por HPLC demostró que ese incremento en el nivel de producción de cefalosporina C era el reflejo de una conversión más eficiente de DAC en CPC [13].

b) *Sobreexpresión del gen pcbAB de A. nidulans bajo el promotor del gen alcA.* En este caso el promotor del gen *acvA* de *A. nidulans* se reemplazó por el promotor del gen que codifica para la etanol deshidrogenasa de *A. nidulans* (*alcA*). El nivel de expresión, como se demos-

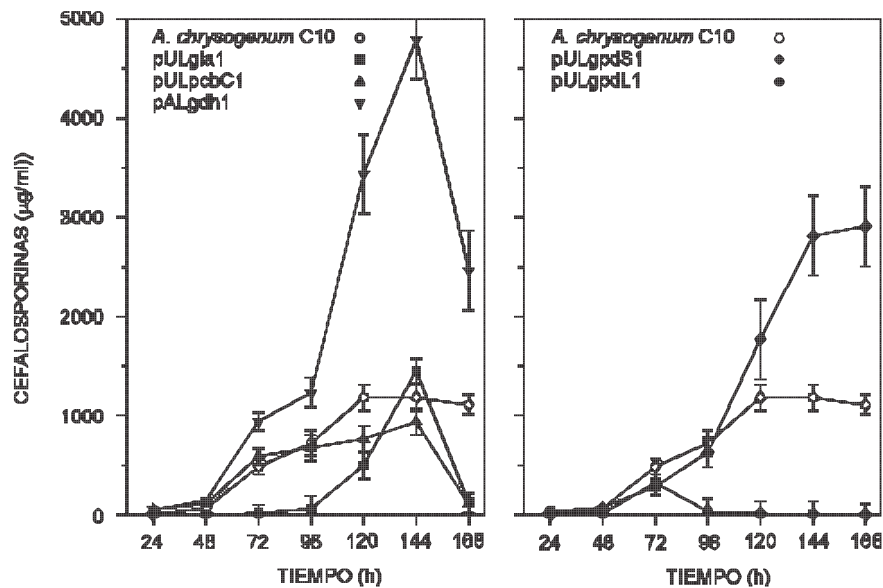


Figura 2. Producción de cefalosporinas por transformantes de la cepa *A. chrysogenum* C10 obtenidos con plásmidos conteniendo el gen *cefG* bajo el control de diferentes promotores de alto nivel de expresión en hongos filamentosos. pULgla.- Promotor del gen *gla* de *Aspergillus niger*; pULpcbC.- Promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*; pALgdh.- Promotor del gen *gdh* de *P. chrysogenum*; pULgpdS y pULgpdL.- Promotor del gen *gpd* de *A. nidulans*.

tró por fusiones con el gen *lacZ*, fue más de 100 veces superior que el demostrado por el promotor del gen *acvA* en condiciones de fermentación. El reemplazamiento del promotor fue hecho por integración homóloga en el locus *acvA* y la producción de penicilina en transformantes monocopia se incrementó más de 30 veces. Las fermentaciones que fueron llevadas a cabo con uno de los transformantes (JKEX6) y con la cepa no transformada (G191) con y sin adición del inductor (ciclopentanona 100 mM), demostraron que bajo condiciones de inducción, la cepa de sobreexpresión producía alrededor de 30 veces más penicilina que la cepa parental. Incluso sin inducción la cepa con el promotor del gen *alcA* todavía produjo más penicilina que la cepa parental (ocho veces), reflejando niveles de expresión elevados. Los niveles de crecimiento de ambas cepas no mostraron grandes diferencias. La expresión del promotor *alcA* bajo condiciones de represión fue probada por crecimiento de los transformantes monocopia llevando la fusión *alcAp::lacZ* en medio conteniendo o bien glucosa o bien lactosa. Cuando la glucosa está presente en el medio a elevadas concentraciones (condiciones represivas), la expresión de la proteína de fusión fue baja (<30 U/mg de proteína por ml). En las etapas tardías de la fermentación, la proteína de fusión se acumula más rápidamente pero sin alcanzar los niveles obtenidos con cultivos crecidos en lactosa (condiciones no represivas). La producción de penicilina en glucosa en la cepa de sobreexpresión (JKEX6) y en la cepa receptora (G191) fue baja en las primeras 48 h de fermentación. Después de este tiempo, el título de penicilina en la cepa JKEX6 se incrementó (1,6 mg/ml a las 96 h de fermentación) mientras que en la cepa G191 permaneció bajo (< 0,1 mg/ml). Este incremento en el título de penicilina en la cepa JKEX6 después de 48 h de fermentación es por tanto consecuencia de la desrepresión del promotor *alcA* [14].

c) *Sobreexpresión de los genes ipnA y act en A. nidulans bajo el promotor del gen alcA.* Monocopias de estas fusiones transcripcionales fueron dirigidas al locus *argB* y se optimizaron las condiciones para permitir simultáneamente la inducción de *alcA(p)* y la biosíntesis de penicilina. La inducción transcripcional de los genes

quiméricos *alcA(p):ipnA* o *alcA(p):acyA* en las cepas recombinantes resultó en niveles de transcrito de los genes *ipnA* y *acyA* 10 veces superiores a los resultantes de la transcripción de los genes endógenos correspondientes. Este incremento causa un aumento de 40 veces en la actividad IPNS y de 8 veces en la actividad AAT. Más allá de estos aumentos en los niveles enzimáticos, la expresión forzada del gen *ipnA* resultó en un incremento sólo modesto en los niveles de penicilina producida (los cuales fueron un 25% mayores que aquellos obtenidos con la cepa control). Así, el gran incremento en la actividad IPNS resulta en un leve incremento en la producción de antibiótico. En contraste, niveles elevados de la actividad AAT reducen la producción de penicilina. De este modo, se puede concluir que la cantidad de actividad AAT no es limitante para la biosíntesis de penicilina, posiblemente debido a la incorrecta localización subcelular en microcuerpos [15,16].

d) *Producción de penicilinas en A. chrysogenum.* Los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* fueron expresados en la cepa mutante N2 de *A. chrysogenum*, que presenta una mutación puntual en el gen *pcbC* y carece de actividad IPNS [17]. Como resultado los transformantes crecidos en cultivos suplementados con ácido fenilacético producen penicilina G además de cefalosporina. La penicilina formada fue identificada como benzilpenicilina por estudios de HPLC y NMR. El gen *penDE* de *P. chrysogenum* se expresó en *A. chrysogenum* formando un transcrito de 1.15 kb. El transcrito es procesado y traducido en *A. chrysogenum* resultando en la formación de acil CoA:isopenicilina N aciltransferasa. Cuando el gen *penDE* fue introducido en la cepa productora de cefalosporina *A. chrysogenum* CW-19, el título total de antibióticos β -lactámicos, comprende distintas proporciones de penicilina y cefalosporina en diferentes transformantes, pero en general producen el mismo nivel total de antibióticos β -lactámicos que la cepa sin transformar, aunque parte del intermediario isopenicilina N es dirigido hacia la producción de penicilina G [18]. Las proporciones relativas de benzilpenicilina y cefalosporina producidas por los transformantes son probablemente determinadas por la afinidad por el sustrato de las dos enzimas en competi-

ción, así la K_M de la isopenicilina N aciltransferasa de *P. chrysogenum* por la isopenicilina N es 23 mM [19], mientras que la K_M de la epimerasa de *A. chrysogenum* por la isopenicilina N no ha sido determinada.

Incremento de la eficiencia de la ruta por modificación del flujo de precursores de la biosíntesis

a) Incremento del pool de α -aminoadípico en *P. chrysogenum* mediante interrupción del gen *lys2*. En *P. chrysogenum* las rutas de biosíntesis de lisina y penicilina tienen diversos pasos en común (Figura 3). El ácido α -aminoadípico constituye el punto de ramificación donde ambas rutas divergen; en la ruta de lisina el ácido α -aminoadípico es convertido en α -aminoadipato- δ -semialdehído por la enzima α -aminoadipato reductasa [20], mientras en la ruta de biosíntesis de penicilina es condensado en el tripéptido ACV (Figura 1). El ácido α -aminoadípico tiene una función clave en la biosíntesis de penicilina, ya que la adición de α -aminoadipato exógeno [21] u otras condiciones que incrementen el pool de ácido α -aminoadípico [22] incrementan la biosíntesis de penicilina.

Sería posible incrementar el pool de α -aminoadípico disponible para la biosíntesis de penicilina mediante la disrupción del gen *lys2* que codifica para la α -aminoadipato reductasa [23] (Figura 3). Para ello se construyó el plásmido pDL10 en el cual un fragmento interno de 200 bp del gen *lys2* fue sustituido por el gen *pyrG* (Figura 4A). Un fragmento lineal de 8.8 kb procedente de dicho plásmido fue usado para transformar la cepa *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 *pyrG*. Dicho fragmento contiene dos regiones (de 4,3 y 3 kb) homólogas a la región genómica donde se encuentra el gen *lys2* flanqueando el gen *pyrG*. El cambio del gen *lys2* endógeno por el fragmento que contiene el gen *lys2* mutado produjo un cambio en el patrón de restricción (Figura 4B). Como se esperaba, en el transformante disrupcionado TD10-195, la banda de hibridación de 8.0 kb de la cepa parental se convirtió en una banda de 2,1 kb (Figura 4b, carril 2).

El transformante TD10-195 demostró carecer de actividad α -aminoadipato reductasa en comparación con la cepa parental Wis. 54-1255.

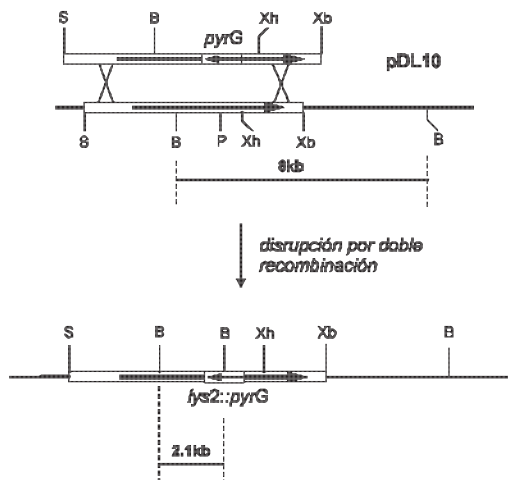


Figura 3. Esquema de las rutas de biosíntesis de penicilina y lisina en *P. chrysogenum*. Divergencia de dichas rutas a partir del ácido α -aminoadípico.

Finalmente, el mutante disrupcionado mostró niveles de producción de penicilina, en medio definido de producción con lisina 4 mM, que fueron el doble de los observados en la cepa parental a las 96, 120, y 144 h y aproximadamente tres veces superiores a las 168 h. (Figura 4C) [24].

b) Expresión intracelular de la hemoglobina de *Vitreoscilla*. La biosíntesis de cefalosporina C incluye tres reacciones de oxidación. Así el incremento de la concentración de oxígeno intracelular, por expresión del gen de la hemoglobina de *Vitreoscilla* (*VHb*), podría llevar a mayores títulos de cefalosporina: i) por incorporación

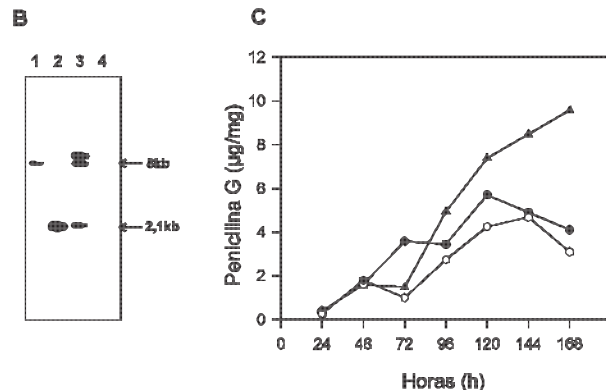


Figura 4. A. Esquema del plásmido pDL10 y del proceso de doble recombinación que debe ocurrir para obtener transformantes disrupcionados en el gen *lys2*. B. Patrón de hibridación obtenido por diversas cepas utilizando como sonda un fragmento interno al gen *lys2*. Carril 1. Cepa *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 sin transformar; carril 2. transformante disrupcionado TD10-195 y carril 3. transformante con múltiples copias del fragmento utilizado para la transformación. C. Producción de penicilina G de la cepa sin transformar con (○) o sin (●) lisina 4 mM y del transformante TD10-195 (▲).

directa de este oxígeno a la ruta de biosíntesis de cefalosporina o ii) por incremento del flujo de oxígeno hacia el aparato respiratorio, proporcionando concentraciones internas de oxígeno más altas, alterando el estado de redox interno, o funcionando como una oxidasa terminal eficiente, con incremento final en el metabolismo general, incluyendo el metabolismo secundario.

La expresión del gen de la hemoglobina de *Vitreoscilla* (*VHb*) en la cepa C10 de *A. chrysogenum*, bajo el promotor del gen *TRI* de *Trichoderma reesei* y usando el gen de resistencia a fleomicina como marcador resultó en la obtención de algunos transformantes con mayor capacidad para producir cefalosporina C que la cepa sin transformar. Diversos transformantes y cepas control fueron probadas por su crecimiento y producción de cefalosporina C en medio definido de producción. Usando matraces indentados, dos transformantes produjeron 4 g/l de cefalosporina C, lo cual representa alrededor de 2 veces la producción de la cepa control. La reducción de la aireación mediante el uso de matraces lisos resulta en menor producción de cefalosporina en todas las cepas, indicando que los cultivos estaban en condiciones de oxígeno limitante con respecto a la producción de cefalosporina. Bajo estas condiciones, la cepa VHb produjo cinco veces más cefalosporina C que las cepas control (3 g/l vs 0,6 g/l). Estos últimos resultados sugieren que el gen *VHb* mejora la productividad del antibiótico bajo condiciones de baja aireación [25].

De esta manera se puede concluir que el oxígeno juega un papel importante en la biosíntesis de cefalosporina C. Los pasos de ciclación del tri péptido, expansión del anillo e hidroxilación de la desatoxicefalosporina C requieren todos ellos oxígeno. Además la regulación por oxígeno podría ser más significativa en los últimos pasos de la ruta debido a la acumulación de penicilina N en cultivos pobres en oxígeno. Es posible que el producto del gen *VHb* beneficie directamente estas reacciones debido a su capacidad para proporcionar altos niveles de oxígeno intracelular.

Para determinar finalmente el efecto de la sobreexpresión del gen *VHb* sobre las rutas de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos podría ser interesante elucidar este efecto sobre la producción de penicilina.

c) *Producción de intermediarios de la biosíntesis de cefalosporina por cepas recombinantes de P. chrysogenum*. Las cefalosporinas tienen mayor calidad terapéutica que las penicilinas, sin embargo los procesos para la producción de 7-ADCA y 7-ACA (intermediarios que son modificados mediante la unión de diferentes cadenas laterales para obtener cefalosporinas semisintéticas) son complejos y costosos. Además la eliminación de la cadena

lateral natural de D- α -amino adipil es ineficiente. Así Cantwell *et al.* [26] propusieron que una expandasa (de *Streptomyces* o *Acremonium*) podría ser modificada para expandir la penicilina G a fenilacetil-7-ADCA, a partir del cual la cadena lateral aromática puede ser eliminada con una penicilina acilasa. Últimamente se ha demostrado que la DAOC podría ser producida por transformantes de *Penicillium* conteniendo los genes para la expandasa y epimerasa de *S. clavuligerus*. Basado en estos experimentos podría ser posible producir intermediarios de cefalosporinas con cadenas laterales de adipilo a partir de cepas de *P. chrysogenum* expresando la expandasa de *S. clavuligerus* o la expandasa-hidroxilasa de *A. chrysogenum* cuando se añade ácido adípico en el caldo de fermentación. Cuando el adipato fue añadido a la cepa parental no transformada, se produjo adipil-6-APA en niveles del 47% con respecto al nivel de penicilina V añadiendo fenoxiacetato. Los transformantes conteniendo las construcciones con el gen de la expandasa de *S. clavuligerus* (pPenFT50) bajo el promotor de los genes *pcbC* o β -tubulina (pTS-2) produjeron un 14% de 6-APA y 17% adipil-7-ADCA (relativo al título de penicilina V producida por la cepa parental cuando se añade ácido fenoxiacético). Por otro lado, transformantes conteniendo las construcciones con el gen de la expandasa hidroxilasa de *A. chrysogenum* (pPen/Ceph-1) bajo el promotor del gen *pcbC* y con los genes de la expandasa-hidroxilasa y acetil-transferasa de *A. chrysogenum* (pT8) ambos bajo el promotor del gen *pcbC*, también produjeron adipil-cefalosporinas. Transformantes con el pPen/Ceph-1 produjeron, relativo a la penicilina V como antes, las siguientes adipil-cefalosporinas: 15% adipil-6-APA, 2,6% adipil-7-ADCA y 6,7% adipil-7-ADCA y transformantes con pT8 produjeron 15% adipil-6-APA, 2,1% adipil-7-ADCA, 1,4% adipil-7-ADCA y 0,6% adipil-7-ACA.

Estos resultados demuestran que el adipato es incorporado realmente como precursor de la cadena lateral de la penicilina y que el resultante adipil-6-APA es eficientemente usado por la expandasa o por la expandasa-hidroxilasa heterólogas. Sin embargo la producción de adipil-cefalosporinas a partir de los transformantes oscila desde niveles indetectables a muy altos niveles, probablemente debido a la influencia del locus de integración, así puede ser interesante comercialmente aplicar tecnologías clásicas de mejora de cepas para incrementar el título de adipil-cefalosporinas producidas.

Bibliografía

1. Martín JF, Aharonowitz Y. Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *Antibiotics Containing the β -lactam Structure I* (pp. 229-254). AL Demain AL, Solomon NA (Eds.) Berlín, Springer-Verlag, 1983.
2. Martín JF, Liras P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 173-206.
3. Martín JF, Gutiérrez S, Demain AL. " β -Lactams". En: *Fungal Biotechnology*. (Chapter 5.1). Anke T (Ed.). Weinheim, Chapman & Hall GmbH, 1997: 91-117.
4. Díez B, Barredo JL, Alvarez E, et al. Two genes involved in penicillin biosynthesis are linked in a 5.1 kb *Sall* fragment in the genome of *Penicillium chrysogenum*. *Mol Gen Genet* 1989; 218: 572-576.
5. Veenstra AE, van Solingen P, Bovenberg RAL, Van der Voort LHM. Strain improvement of *Penicillium chrysogenum* by recombinant DNA techniques. *J Biotechnol* 1991; 17: 81-90.
6. Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Martín JF. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol* 1992; 174:3056-3064.
7. Matsuda A, Sugiura H, Matsuyama K, Matsumoto H, Ichikawa S, Komatsu K-I. Molecular cloning of acetyl coenzyme A:deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase cDNA from *Acremonium chrysogenum*: Sequence and expression of catalytic activity in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182:995-1001.
8. Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, et al. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* 1989; 7:476-485.
9. Skatrud PL, Fisher D, Ingolia TD, Queener SW. Improved transformation of *C. acremonium*. In "Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms". M. Alacevic, D Hranueli, Z Toman (Eds.) Washington, DC, American Society for Microbiology, 1986: 11119.
10. Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. Efficient integrative transformation of *C. acremonium*. *Curr Genet* 1987; 12:337-348.
11. Barredo JL, Díez B, Alvarez E, Martín JF. Large amplification of a 35 kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet* 1989; 16:453-459.
12. Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutiérrez S, Fernández FJ, Martín JF. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6200-6204.
13. Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, et al. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997; 48:606-614.
14. Kennedy J, Turner G. δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 1996; 253: 189-197.
15. Fernández-Cañón JM, Peñalva MA. Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 1995; 246: 110-118.
16. Müller WH, Bovenberg RAL, Groothuis MH, Kattenvilder F, Smaal EB, Verkleij AJ. Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1116:210-213.
17. Ramsden M, McQuade BA, Saunders K, Turner MK, Haford S. Characterization of a loss-of-function mutation in the isopenicillin N synthetase gene of *Acremonium chrysogenum*. *Gene* 1989; 85:267-273.
18. Gutiérrez S, Díez B, Alvarez E, Barredo JL, Martín JF. Expression of the *penDE* of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol Gen Genet* 1991; 225: 56-64.
19. Alvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Díez B, Martín JF. Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *P. chrysogenum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1675-1682.
20. Sagisaka S, Shimura K. Mechanism of activation and reduction of (α -aminoadipic acid by a yeast enzyme. *Nature (London)* 1960; 188:1189-1190.
21. Friedrich GC, Demain AL. Uptake and metabolism of α -aminoadipate by *Penicillium chrysogenum*. *Arch Microbiol* 1978; 119:43-47.
22. Hönlinger C, Kubicek CP. Regulation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the α -aminoadipate pool size. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 65:71-76.
23. Casqueiro J, Gutiérrez S, Fierro F, Bañuelos O, Velasco J, Martín JF. Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding α -aminoadipic acid reductase. *Mol Gen Genet* 1998; 259:549-556.
24. Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Hijarrubia MJ, Martín JF. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: Disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J Bacteriol* 1999; 181: 1181-1188.
25. DeModena JA, Gutiérrez S, Velasco J, et al. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 1993; 11:926-929.
26. Cantwell CA, Beckmann RJ, Dotzlar JE, et al. Cloning and expression of a hybrid *Streptomyces clavuligerus cefE* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet* 1990; 17:213-221.