

## BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

### El catabolón del fenilacetil-CoA: Un paradigma de convergencia metabólica con múltiples aplicaciones biotecnológicas

José María Luengo Rodríguez<sup>1</sup>, Elías Rodríguez Olivera.

Área de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071 León

[jmluer@unileon.es](mailto:jmluer@unileon.es)

El término catabolón ha sido acuñado para definir una unidad funcional compleja integrada por varias rutas catabólicas independientes (rutas periféricas) que confluyen en una ruta central o ruta de convergencia (núcleo del catabolón) y que sirve para la degradación de diferentes compuestos relacionados estructuralmente. La ruta central es la encargada de transformar el intermediario común (compuesto que da nombre al catabolón) en metabolitos generales. Todas las rutas que componen los catabolones suelen regularse coordinadamente, de tal forma que la afluencia de catabolitos a la ruta central está sometida a un estricto control jerárquico. Los catabolones pueden considerarse como el primer estadio de integración metabólica por lo que su comprensión es básica para entender cómo han evolucionado las rutas catabólicas en microorganismos.

El primer modelo descrito, de ahí su calificación de paradigma, fue el catabolón del fenilacetil-CoA, que incluye todas aquellas rutas mediante las cuales se consigue la transformación de distintos compuestos aromáticos (el ácido fenilacético, sus precursores, sus derivados y algunos de sus análogos estructurales) en fenilacetil-CoA (intermediario común). Posteriormente, las enzimas que constituyen la ruta central transforman este tioéster en metabolitos generales (acetil-CoA y succinil-CoA). En este artículo describiremos la organización genética bioquímica de ese catabolón y analizaremos sus interesantes aplicaciones biotecnológicas.

#### Palabras clave:

fenilacético, catabolismo, aromáticos, integración metabólica, biotecnología.

#### Introducción

La degradación microbiana de compuestos aromáticos se lleva a cabo a través de diferentes rutas catabólicas que permiten la mineralización de esas moléculas (Timmis y Pieper, 1995). El estudio de esos procesos ha permitido la descripción de organizaciones genéticas muy particulares; la caracterización de enzimas que catalizan reacciones muy poco comunes; la identificación de nuevos

Forma de mencionar este artículo: Luengo, J.M., Olivera, E.R. 2014, El catabolón del fenilacetil-CoA: un paradigma de convergencia metabólica con múltiples aplicaciones biotecnológicas. AmbioCiencias, 12, 50-69. Revista de divulgación científica editada por la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

intermediarios catabólicos, así como la existencia de mecanismos de regulación desconocidos hasta ese momento (Luengo et al., 2004). La importancia de todos esos hallazgos ha hecho surgir nuevas disciplinas (Biodegradación e Ingeniería Metabólica) en las que se recopilan tanto los nuevos conocimientos como aquellos otros que subsistían dispersos en otras ciencias (Genética, Microbiología) (Luengo et al., 2001).

#### Características de las distintas rutas catabólicas

Todas estas rutas, a pesar de ser muy diferentes entre sí, comparten una serie de propiedades comunes. Son rutas inusuales, específicas, con localización subcelular variable e independientes.

Decimos que son inusuales o poco convencionales, porque: (i) en ellas participan enzimas, o complejos enzimáticos, con actividades poco comunes; (ii) poseen intermediarios catabólicos con estructuras químicas poco frecuentes; y/o (iii) muchas de ellas están sometidas a mecanismos de regulación sensiblemente diferentes a los descritos hasta la fecha.

Al decir que son específicas, no sólo nos referimos a que esas rutas sirven para degradar exclusivamente un determinado compuesto y no otro (u otros relacionados estructuralmente), sino a que han sido descritas en una especie concreta, o, como sucede muchas veces, en una cepa determinada. El grado de especificidad alcanzado es tan alto que, en algunos casos, esas rutas podrían ser consideradas como marcadores taxonómicos (marcadores metabólicos de estirpes) (Olivera et al., 1998).

Otra característica diferencial es que tanto los genes catabólicos como los que codifican los elementos reguladores, suelen poseer una localización subcelular variable. Así, mientras que en una determinada bacteria todos los genes son cromosómicos, en otra son plasmídicos, y en una tercera pueden aparecer tanto en el cromosoma como en plásmidos.

Finalmente, una característica adicional es su independencia. Es bastante común que las rutas responsables de la asimilación de compuestos con estructuras semejantes, no aparezcan juntas en una misma bacteria. Tanto es así que, a veces, podría llegar a pensarse que la posesión de una de ellas actúa como factor determinante de la exclusión de la otra (Luengo et al., 2001).

#### Integración funcional de esas rutas catabólicas: los catabolones

Ciertas bacterias han conseguido organizar algunas de esas rutas aisladas en unidades catabólicas complejas que funcionan como un único elemento al que, por poseer una función eminentemente asimiladora, se ha denominado

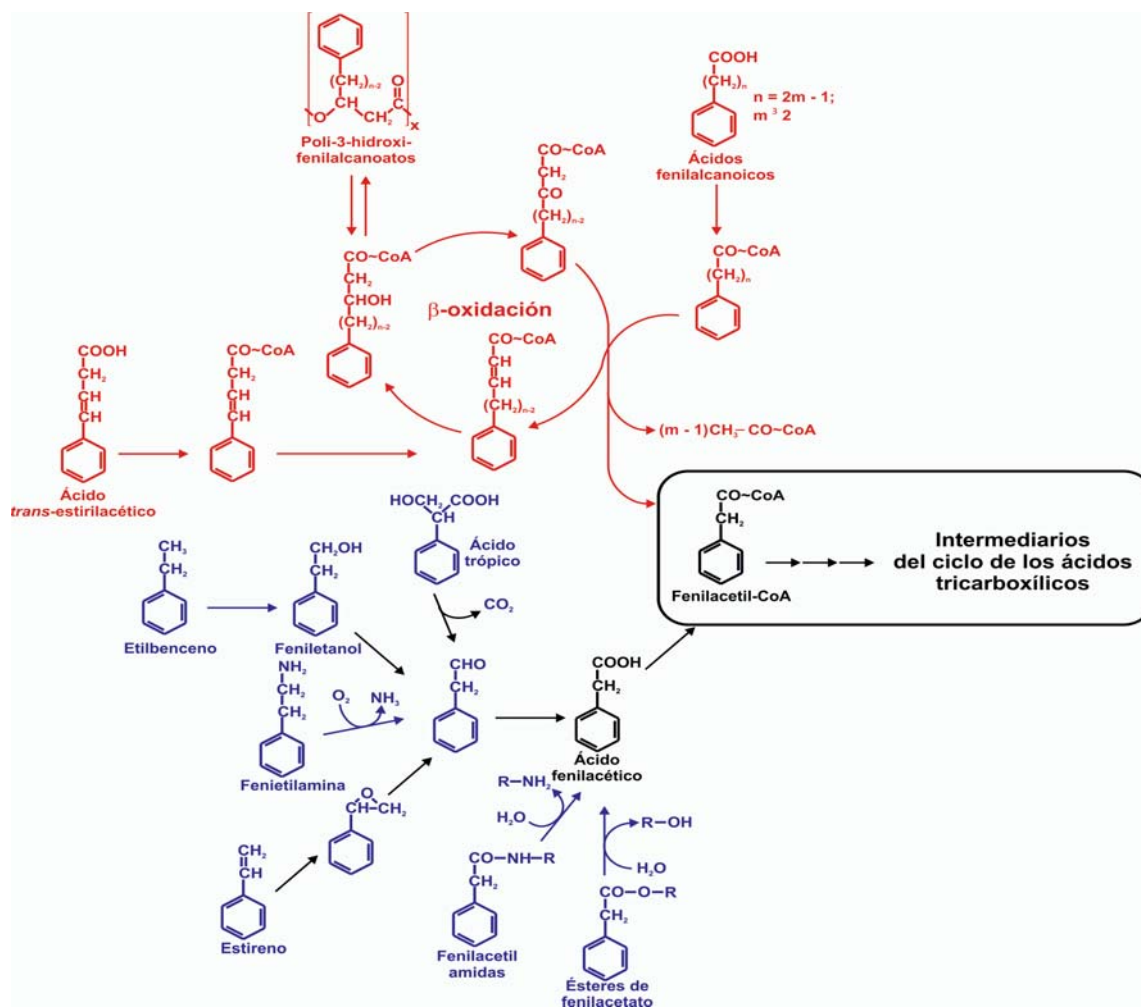
catabolón. En él, los mecanismos reguladores que controlaban el flujo de intermediarios a través de las vías originales han sufrido un proceso de jerarquización muy acusado, lo que facilita su coordinación e interconexión metabólica. Esto es, una vez encadenadas unas cuantas rutas, se establece en la bacteria una tendencia o polarización metabólica concreta que va a determinar su potencialidad catabólica futura. Como consecuencia de ello la bacteria que ha logrado encadenar adecuadamente toda esa información, adquiere una mayor, cuando no nueva, capacidad catabólica potenciando su capacidad degradadora. Esa especialización catabólica es tan marcada que, a veces, dos estirpes bacterianas podrían llegar a considerarse especies diferentes si sólo se analizase ese carácter metabólico concreto (Arcos et al., 2010).

Una ventaja adicional, surgida como consecuencia de la integración metabólica de varias vías, es que las bacterias que lo han logrado pueden asimilar un mayor número de productos y por consiguiente colonizar nuevos hábitats, o sobrevivir en aquellos otros en los que las condiciones físico-químicas (reducciones, oxidaciones, descarboxilaciones etc.) han favorecido la transformación de un producto en otro. Más aún, algunos estudios han puesto de manifiesto que aquellas bacterias que poseen catabolones, incorporan en su maquinaria metabólica nuevas actividades (genes y enzimas catabólicos) con más facilidad que aquellas otras bacterias en las que las rutas existen aisladamente (Arias et al., 2008).

En este artículo analizaremos el catabolón del fenilacetil-CoA, un modelo de integración catabólica que puede servir como ejemplo para entender como diferentes rutas catabólicas pueden llegar a convergir. Además, describiremos las interesantes aplicaciones biotecnológicas de las enzimas que pertenecen al mismo.

### **Organización estructural y análisis funcional del catabolón del fenilacetil-CoA**

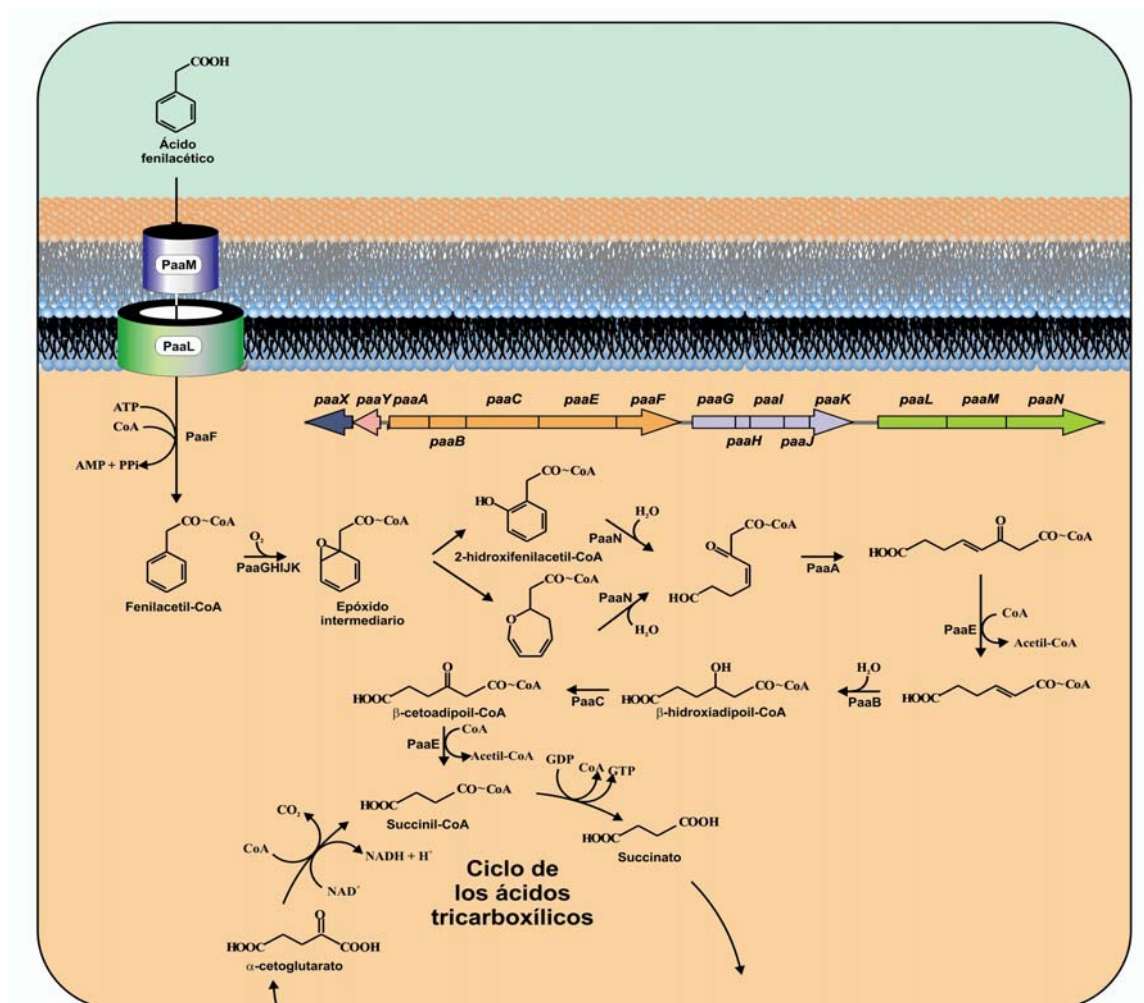
El catabolón del fenilacetil-CoA es una unidad funcional compleja que incluye todas aquellas rutas metabólicas responsables de la transformación de diferentes compuestos aromáticos en fenilacetil-CoA (**Fig. 1**). Todas estas vías catabólicas, denominadas rutas periféricas, convergen en una ruta central (núcleo del catabolón) que asegura la conversión del metabolito común (fenilacetil-CoA) en intermediarios generales (acetil-CoA y succinil-CoA) (**Fig. 2**).



**Figura 1.** Estructura del catabolón del fenilacetil-CoA. Representación esquemática de todas las rutas catabólicas que componen esta unidad funcional.

### Ruta central del catabolón

Los primeros estudios que abordaron la degradación bacteriana del ácido fenilacético proponían que la degradación de este compuesto requería la hidroxilación del anillo aromático generando 2-hidroxi-, 3-hidroxi-, 4-hidroxi-, 2,5-dihidroxi- o 3,4-dihidroxi-fenilacético) (Olivera et al., 1994). Sin embargo, nuestro grupo de investigación puso de manifiesto que en *Pseudomonas putida* U (CECT 4848), una bacteria con una enorme versatilidad metabólica, la degradación del ácido fenilacético requería, en primera instancia, su conversión en fenilacetil-CoA (PhAc-CoA). Esta reacción se catalizaba por la enzima fenilacetil-CoA ligasa (en adelante denominada PCL) en presencia de  $Mg^{2+}$ , ATP, CoA y de ácido fenilacético (Martínez-Blanco et al., 1990).

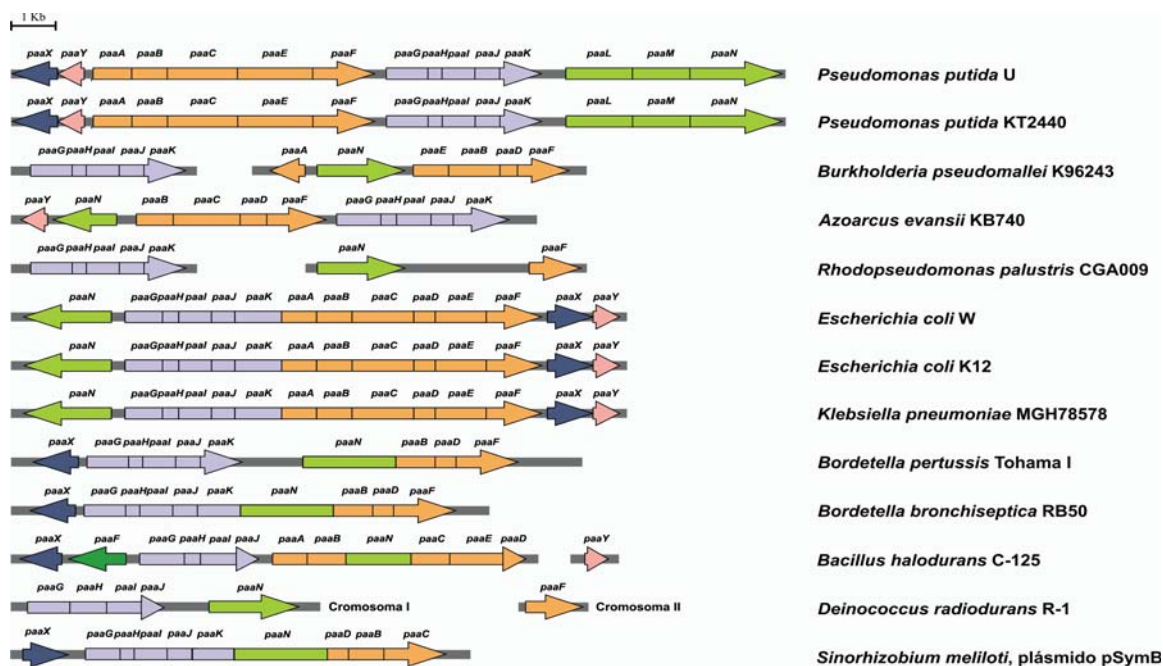


**Figura 2.** Organización de los genes que codifican la ruta central del catabolón del fenilacetil-CoA y descripción de las diferentes etapas requeridas para su transformación en metabolitos generales.

Estudios realizados con diferentes mutantes (obtenidos tras mutagénesis con el transposón Tn5) incapaces de degradar el ácido fenilacético (PhAc) revelaron que todos ellos eran capaces de crecer en medios de cultivo en los que las únicas fuentes de carbono eran derivados hidroxilados del ácido fenilacético lo que sugería que, al menos en esa bacteria, la ruta de degradación del PhAc era diferente a las propuestas en otros microorganismos. Adicionalmente, se comprobó que la enzima PCl se inducía sólo cuando *P. putida* U crecía en medios que contenían como fuentes de carbono PhAc o moléculas a partir de las cuales se obtuviera PhAc o PhAc-CoA (Olivera et al., 1998).

Los estudios genéticos realizados con mutantes incapaces de degradar PhAc (PhAc-) permitieron identificar el punto de inserción del transposón en

cada uno de ellos, lo que condujo a la localización de todos los genes requeridos para la degradación del PhAc en un fragmento continuo de DNA de 18 Kb. Su análisis en *P. putida* U reveló que esta agrupación genética (*cluster paa*) estaba integrada por 15 genes diferentes organizados en cinco operones contiguos denominados *paaABCEF*, *paaGHIJK*, *paaLMN*, *paaY* y *paaX* (**Fig. 3**). Estos genes codifican 15 proteínas diferentes que se agrupan en las seis unidades funcionales siguientes: (i) un sistema de transporte (PaaL y PaaM); (ii) una ligasa que sintetiza PhAc-CoA (PaaF); (iii) un sistema que hidroxila el anillo bencénico del fenilacético en posición orto (PaaGHIJK); (iv) una proteína que cataliza la apertura del anillo (PaaN); (v) una ruta de  $\beta$ -oxidación (PaaABCE) que degrada el producto generado tras la apertura del anillo (**Fig. 2**) y dos proteínas reguladoras, un represor transcripcional (PaaX) y una acetiltransferasa (PaaY) que podría modular la actividad de la ligasa (PaaF) mediante acetilación de residuos de lisina.



**Figura 3.** Organización de los genes que codifican las enzimas requeridas para la asimilación del ácido fenilacético en diferentes microorganismos. Los genes responsables de una misma función aparecen con el mismo color.

El análisis genético de diferentes genomas bacterianos reveló que estos genes aparecen en otros muchos microorganismos (**Fig. 3**), siendo su organización similar en unos casos y muy diferentes en otros (Ferrández et al., 1998).

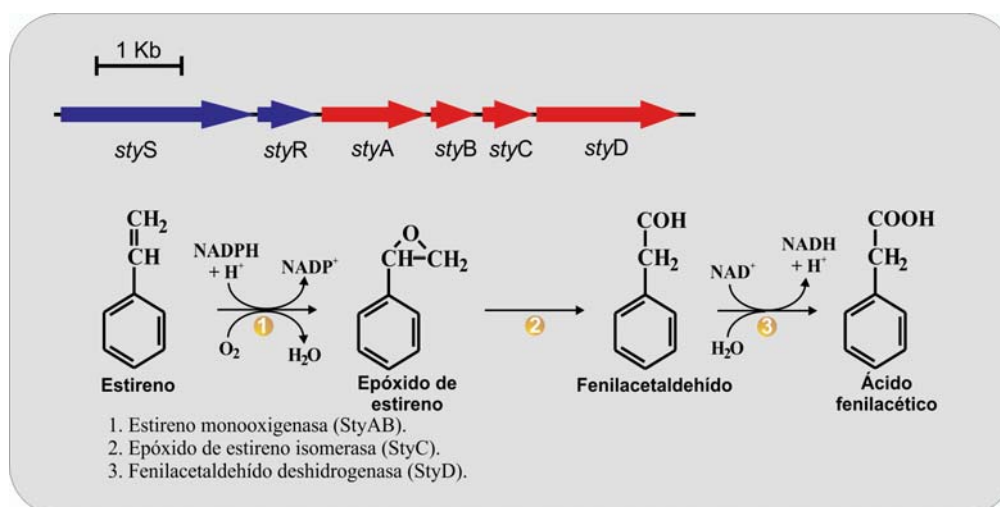
Estos resultados sugieren que la capacidad para degradar PhAc no es una característica específica de una estirpe bacteriana concreta, sino que se trata de un proceso mucho más general, que ha sido conservado evolutivamente debido, probablemente, a que su existencia confiere a las bacterias que lo poseen una mayor versatilidad catabólica y, por lo tanto, una mayor capacidad para sobrevivir y para colonizar nuevos hábitats.

### Rutas catabólicas periféricas

En este apartado describiremos someramente la información que se posee sobre aquellas rutas, denominadas periféricas, responsables de la transformación de diferentes compuestos aromáticos en PhAc o en PhAc-CoA.

#### Ruta catabólica del estireno

La región cromosómica implicada en la transformación de estireno en PhAc ha sido caracterizada en diferentes especies de *Pseudomonas* (Beltrametti et al., 1997; Velasco et al., 1998). Esta región contiene dos operones, uno catabólico constituido por los genes *styABCD* y otro regulador integrado por los genes *stySR* (**Fig. 4**). Los genes *styAB* codifican las dos subunidades de una monooxigenasa que transforma el estireno en epóxido de estireno. Este compuesto, muy tóxico, es sustrato de una isomerasa (StyC) que lo transforma en fenilacetaldehído, que posteriormente es oxidado a PhAc por una fenilacetaldehído deshidrogenasa (StyD). Esta ruta es inducida por estireno y en ese proceso participa un sistema de transducción de señales de dos componentes (*stySR*). StyS es un sensor que responde a estireno y StyR es un activador transcripcional que potencia la expresión de los genes *styABCD* (Velasco et al., 1998).



**Figura 4.** Representación esquemática de los genes y de la ruta requerida para la transformación de estireno en ácido fenilacético.

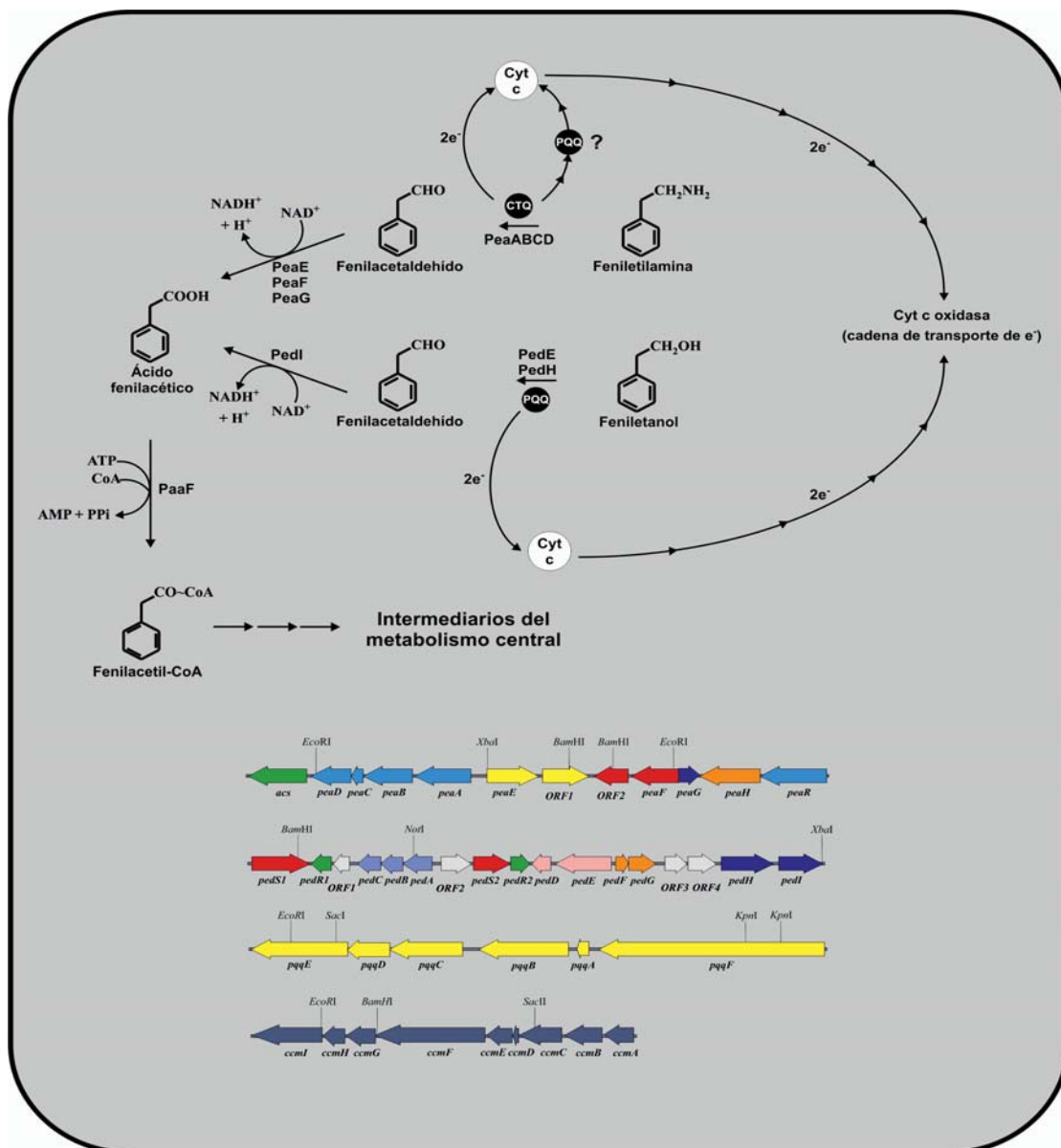
### Ruta responsable de la degradación de 2-feniletilamina

La degradación de 2-feniletilamina en *P. putida* U es un proceso mucho más complicado de lo que se creía y del que había sido descrito en *E. coli* (Ferrández et al., 1997). En *Pseudomonas* la degradación de esta amina requiere una ruta constituida por nueve proteínas diferentes (PeaABCDEFGHR) que catalizan el transporte (PeaHR), su desaminación a fenilacetaldehído (por acción de una quinohemoproteína amino deshidrogenasa, PeaABCD) y la oxidación de este compuesto a PhAc por una fenilacetaldehído deshidrogenasa (PeaE). Otras dos proteínas (PeaF y PaaG) se requieren también para la degradación de 2-feniletilamina. Aunque su función aún no ha sido esclarecida, los genes que las codifican aparecen, en todos los microorganismos en que han sido descritos, ligados siempre a los *peaABCD* (**Fig. 5**), lo que sugiere que deben participar, probablemente como proteínas colaboradoras, en las reacciones de desaminación de aminas primarias (Arias et al., 2008).

### Degradación de 2-feniletanol

El catabolismo del feniletanol en *P. putida* U requiere el transporte de este compuesto desde el medio de cultivo, su oxidación a fenilacetaldehído y su oxidación ulterior a PhAc. La ruta completa (Ped) requiere la participación de trece genes diferentes (*pedS<sub>1</sub>R<sub>1</sub>ABCS<sub>2</sub>R<sub>2</sub>DEFGHI*, **Fig. 5**) que codifican dos sistemas de transducción de señales de dos componentes (PedS<sub>1</sub>R<sub>1</sub> y PedS<sub>2</sub>R<sub>2</sub>); una proteína periplásmica de unión (PedG) que participa en el transporte de ese alcohol; una quinoproteína alcohol deshidrogenasa (PedEH); un citocromo c (PedF); una aldehído deshidrogenasa (PedI) responsable de la transformación de fenilacetaldehído en PhAc (y que es diferente a la que participa en la ruta de degradación de 2-feniletilamina) y un sistema de eflujo (PedABC) perteneciente a la familia ABC y que asegura la eliminación intracelular de feniletanol cuando se alcanzan concentraciones inusualmente altas o potencialmente tóxicas en el interior de la bacteria. Otra proteína, PedD, parece jugar un papel estructural importante, ya que es esencial para la organización del complejo responsable de la oxidación de diferentes alcoholes. Adicionalmente, la degradación de 2-feniletanol requiere la participación de dos rutas adicionales. Una de ellas (PqqABCDEF) es la responsable de la síntesis del grupo prostético requerido por algunas alcohol-deshidrogenasas, mientras que la otra (CcmABCDEFGHI) se precisa para las modificaciones post-traduccionales implicadas en la maduración y correcta localización de los citocromos. En resumen, la oxidación de 2-feniletanol a ácido fenilacético es un proceso complejo en el que participan tres rutas metabólicas y 28 proteínas diferentes (Arias et al., 2008).





**Figura 5.** Representación esquemática de los genes y de las rutas requeridas para la transformación de 2-feniletilamina y 2-feniletanol en ácido fenilacético.

Ruta catabólica requerida para la degradación de n-fenilalcanoatos

La degradación de los ácidos n-fenilalcanoicos (n-PhAs) en *P. putida* U requiere las mismas enzimas que participan en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (García et al., 1999). Una vez que los PhAs son tomados por la bacteria, se activan con CoA mediante una reacción catalizada por una acil-CoA ligasa (FadD). Posteriormente, una acil-CoA deshidrogenasa (FadF) cataliza la introducción de un doble enlace en la posición 2 de la cadena alifática.

Finalmente, el complejo FadBA, formado por dos proteínas (FadB y FadA) cataliza la liberación de unidades de acetyl-CoA. Las proteínas FadBA poseen cinco actividades enzimáticas, cuatro de ellas (enoyl-CoA hidratasa, 3-OH-acetyl-CoA-deshidrogenasa, *cis*-D3-*trans*-D2-enoyl-CoA isomerasa y, 3-OH-acetyl-CoA epimerasa) corresponden a FadB, mientras que la actividad 3-cetoacetyl-CoA tiolasa (que conduce a la liberación de un resto de acetyl-CoA tras el ataque nucleofílico del SH del CoA sobre el carbonilo del 3-cetoacetyl-CoA) es inherente a la proteína FadA. La degradación de n-PhAs en los que n es un número par, conducen a PhAc-CoA, mientras que aquellos otros en los que n es un número impar generan *trans*-cinamoil-CoA (un derivado catabólico del 3-fenilpropionil-CoA) que al no poder ser catabolizado es hidrolizado por tioesterasas liberándose al medio de cultivo como ácido cinámico (Olivera et al., 2001a y 2001b).

#### Degradación del ácido *trans*-estirilacético

Este compuesto es degradado hasta PhAc-CoA mediante la ruta de  $\beta$ -oxidación. En primer lugar, el ácido *trans*-estirilacético es activado a *trans*-estiril-CoA, que sufre una isomerización del doble enlace (pasa de la posición 2 a la 3) generando 4-fenilbutanoil-CoA (**Fig. 1**). Este tioéster se degrada tal y como se indicó en el apartado anterior.

#### Ruta catabólica del ácido trópico

El ácido trópico es un derivado de la atropina, un alcaloide topánico sintetizado por la planta solanácea *Atropa belladonna*. Cuando se añade atropina a cultivos de algunas *Pseudomonas sp.* AT3 o de *Flavobacterium sp.*, estas bacterias son capaces de transformar ese compuesto en tropina y en ácido trópico (van den Twell et al., 1988; Long et al., 1997). El ácido trópico es oxidado a semialdehído fenilmalónico, que tras sufrir una descarboxilación para dar fenilacetaldehído, es oxidado a PhAc (**Fig. 1**).

#### Catabolismo de amidas y ésteres derivados del fenilacético

Los ésteres y amidas derivadas del PhAc son hidrolizadas por diferentes enzimas entre las que cabe destacar la penicilina G acilasa (Pac), un miembro de las enzimas conocidas como  $\beta$ -lactama-acilasas, por ser frecuentemente utilizadas en la semisíntesis de diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Luengo et al., 1998). Aunque Pac cataliza la hidrólisis de la bencilpenicilina (penicilina G) a ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y PhAc, puede hidrolizar también diferentes ésteres tanto del PhAc como los de otros ácidos aromáticos o alifáticos (tienilacético, hexanoico, etc.).

### Ruta catabólica responsable de la degradación de etilbenceno

El etilbenceno suele ser usado como disolvente y es un precursor del estireno. Este compuesto se obtiene como residuo durante la producción de gasolinas de elevado octanaje. El estudio de la degradación de este compuesto por diferentes *Pseudomonas* (*P. fluorescens* CA-4 y *Pseudomonas sp.*Y2) reveló que en primera instancia el etilbenceno era oxidado a 2-feniletanol, compuesto que posteriormente era transformado en PhAc, vía fenilacetaldehído (Corkey et al., 1994).

### **Aplicaciones biotecnológicas**

Como hemos indicado anteriormente, el catabolón del PhAc-CoA lo integran numerosas rutas metabólicas en las que participan enzimas que catalizan reacciones particulares, intermediarios catabólicos poco frecuentes y reguladores inusuales. Esto hace que algunos de esos elementos puedan tener interesantes aplicaciones biotecnológicas. A continuación se describen alguna de las más importantes.

### Síntesis enzimática de penicilinas

La etapa final en la biosíntesis de bencilpenicilina (penicilina G) en el hongo *P. chrysogenum* está catalizada por tres enzimas diferentes. En primer lugar el PhAc, cadena lateral de la bencilpenicilina, es incorporada por el hongo, desde el medio de cultivo, mediante un sistema de transporte (PhAcTS). Posteriormente, el PhAc es activado a PhAc-CoA por una fenilacetil-CoA ligasa (PCL) y, finalmente, una aciltransferasa (AT) es capaz de acilar el grupo amino del 6-APA (o intercambiar el residuo de  $\alpha$ -aminoadípico de la isopenicilina N, -IPN-) para generar penicilina G (**Fig. 6**). Dado que la PCL de *Pseudomonas putida* (PCLps) es una enzima que cataliza la misma reacción que la de *Penicillium*, su acoplamiento con la AT de *Penicillium* (ATpen) permitió, por primera vez, reproducir *in vitro* la etapa la etapa final de biosíntesis de penicilina. Adicionalmente, dado que ambas PCLps y ATpen poseen una amplia especificidad de sustrato, el sistema enzimático PCLps/ATpen condujo a la síntesis de más de 60 penicilinas diferentes entre las que se incluían todas las naturales, muchas semi-sintéticas y otras, que como la ticarcilina, hasta ese momento sólo se obtenían mediante síntesis química (Luengo, 1998).

### Manipulación genética de *P. chrysogenum*: Mejora de su capacidad biosintética

El hecho de que el sistema enzimático PCLps/ATpen funcionase eficazmente *in vitro* sugería que la expresión del gen que codifica PCLps en

*Penicillium*, podría incrementar la capacidad de producción de bencilpenicilina en este hongo. El análisis de los recombinantes que expresaban el gen de *Pseudomonas* reveló que todos ellos producían entre un 150 y un 300 % más penicilina que la cepa parental (Miñambres et al., 1996). Estos resultados demostraron por primera vez que podía incrementarse la biosíntesis de penicilina G en *Penicillium chrysogenum* mediante la expresión de genes procedentes de otro microorganismos.

#### Biotransformación de PhAc en 2'-OH-PhAc

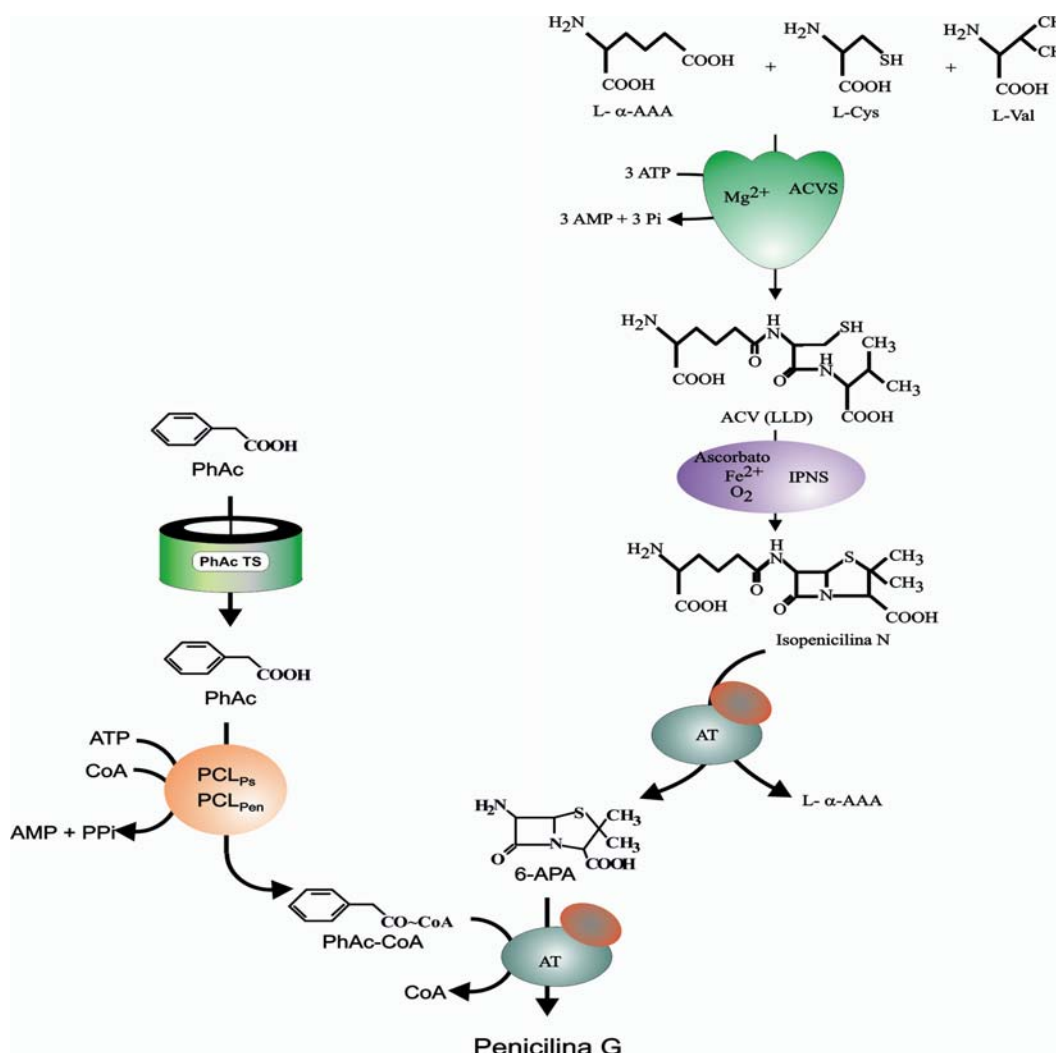
El ácido 2'-OH-PhAc es un compuesto químico que suele utilizarse para la síntesis de muchas otras moléculas, y que, además, tiene importantes aplicaciones. El 2'-OH-PhAc se obtiene mediante síntesis química y aunque en algún caso se ha conseguido por fermentación (Staudenmaier et al., 1998), el uso de microorganismos para producir esta molécula es poco frecuente. En *P. putida* U la mutación del gen *paaN* impide que el 2'-OH-PhAc-CoA sea transformado en un tioéster alifático (Fig. 2) y, por lo tanto, al acumularse, sería hidrolizado, excretándose 2'-OH-PhAc. La delección del gen *paaN* nos permitió obtener un mutante que en presencia de PhAc y de otra fuente de carbono que asegurase el crecimiento acumulaba en el caldo de cultivo 2'-OH-PhAc. Adicionalmente, cuando una cepa de *E. coli* en la que se expresaba un plásmido en el que habíamos clonado los genes *paaFGHIJK*, se cultivaba en medios que contenían PhAc, más del 85% de ese compuesto era transformado en 2'-OH-PhAc y acumulado en el caldo de cultivo (Luengo et al., 2001). El interés biotecnológico de esta biotransformación no sólo radica en el hecho de obtener 2'-OH-PhAc por fermentación, sino en que también podían obtenerse otras moléculas. Así, la expresión del gen que codifica la benzoil-CoA sintetasa de *Rhodopseudomonas palustris* junto a los *paaGHIJK* de *Pseudomonas*, podría conducir a la síntesis de 2-OH-benzoico (ácido salicílico), un precursor de la aspirina.

#### Degradación y biotransformación del estireno

El estireno (Sty) es un producto aromático obtenido por síntesis química que posee numerosas aplicaciones industriales. Este compuesto es muy tóxico incluso a concentraciones bajas, por lo que debe evitarse la exposición o inhalación de sus gases ya que puede ser mortal para el hombre y para animales. Con objeto de eliminar el estireno de aquellos ambientes en los que se genera, el aire de esos recintos se pasa a través de biofiltros que contienen atrapadas, sobre distintos soportes, bacterias que por poseer la rutas periféricas (Sty) de este

catabolón (**Fig. 4**) son capaces de metabolizar el estireno. De este modo el aire a la salida del filtro está exento de estireno o de su derivado más tóxico (epóxido de estireno).

También se han diseñado biosensores muy específicos útiles para detectar trazas de estireno en un ambiente concreto. En estos casos, el aire de esos lugares se hace pasar a través de columnas que poseen bacterias inmovilizadas en las que se ha clonado un gen testigo (por ejemplo el que codifica la luciferasa u otra enzima capaz de generar una señal luminiscente) bajo el control de proteínas sensoras que responden específicamente a estireno.



**Figura 6.** Etapa final de biosíntesis de penicilina G (bencilpenicilina) en *Penicillium chrysogenum*. ACVS, aminoadipoil-L-cisteinil-D-valina sintetasa; IPNS, Isopenicilina N sintetetasa (ciclasa); AT, acil-CoA:IPN(6-APA) aciltransferasa; PhAcTS, transportador del ácido fenilacético; PCL, fenilacetil-CoA ligasa (PCL<sub>pen</sub> de *Penicillium*; PCL<sub>ps</sub> de *Pseudomonas*).

### Producción de nuevos bioplásticos

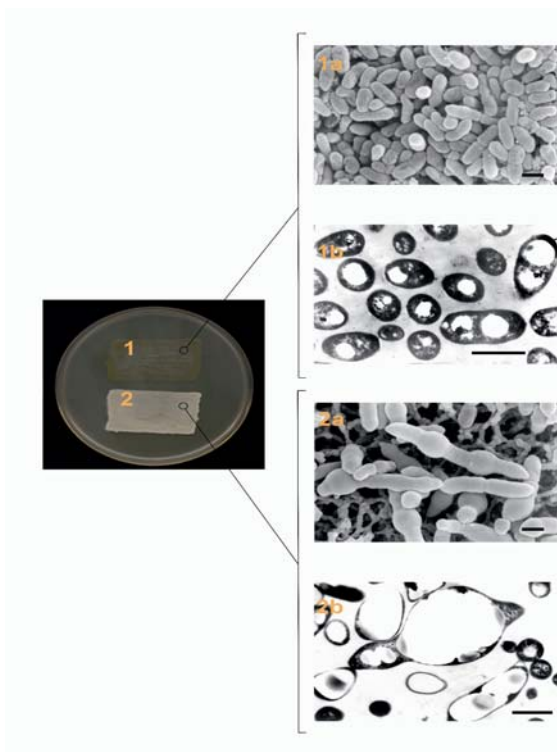
Cuando especies pertenecientes al género *Pseudomonas* se cultivan en diferentes medios que contienen ácidos alcanoicos como fuentes de carbono, esas bacterias acumulan en su interior unos polímeros constituidos por poli-3-OH-alcanoatos (PHAs) que les sirve como material de reserva y que poseen características muy semejantes a los plásticos de origen petroquímico. Sin embargo, a diferencia de ellos, estos poseen dos ventajas que les hacen particularmente interesantes: son biodegradables y biocompatibles.

Estudios acerca de la capacidad de producción de PHAs en *P. putida* U nos permitieron concluir que esta especie era capaz de sintetizar también otro tipo de poliésteres constituidos por monómeros aromáticos (poli-3-OH-fenilalcanoatos, PhHAs) lo que les dotaba de unas características físico-químicas y de una propiedades muy interesantes (García et al., 1999). Más aún, cuando a los caldos de cultivo se añadían ácidos alcanoicos y arilalcanoicos conjuntamente, *P. putida* U acumulaba PHAs en los que se alternaban monómeros alifáticos y aromáticos (Olivera et al., 2001a y 2001b).

El análisis genético de la ruta responsable de la síntesis de estos polímeros en *P. putida* U reveló la existencia en una agrupación génica que contenía cinco genes (*phaC1ZC2DFT*) que codificaban las proteínas específicas requeridas para la síntesis y organización estructural de estos polímeros. PhaC1 y PhaC2 son dos polimerasas que catalizan la condensación de acil-CoA derivados generando poli-3-OH-alcanoatos y CoA. PhaD es una proteína con función reguladora, mientras que PhaF y PhaI (dos proteínas denominadas phasinas) se requieren para la formación de los gránulos de PHAs. La otra proteína, PhaZ, es una despolimerasa que libera residuos de 3-OH-(aril)alcanoatos desde el polímero de PHA. Estos monómeros, una vez activados a tioéster de CoA sufren una  $\beta$ -oxidación en la que participan otras dos proteínas (FadBA) tal y como se explicó anteriormente.

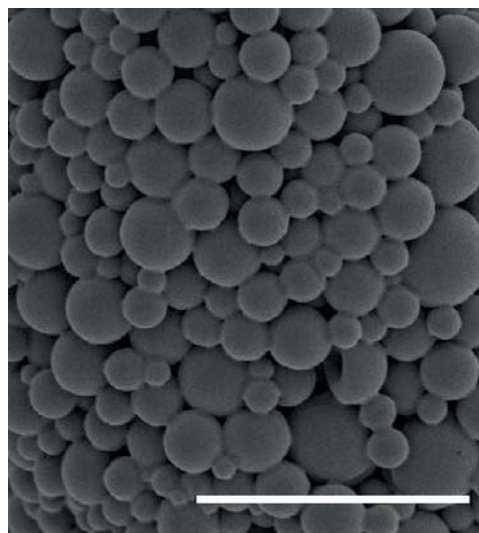
Aunque *P. putida* U es capaz de sintetizar PHAs constituidos exclusivamente por monómeros de naturaleza alifática (PHAs), aromática (PhHAs) o aquellos otros que contienen los dos (PHA/PhHAs, polímeros mixtos), la cantidad de polímero de naturaleza (PhHAs) es mucho menor que la de PHAs. Por esta razón y con el fin de superproducir estos nuevos polímeros, se procedió a aislar diferentes tipos de mutantes mediante: (i) mutación/delección del gen *phaZ*; mediante mutación/delección de los genes que codifican alguna de las enzimas responsables de la ruta del glioxílico o mediante la eliminación de los genes *fadBA* responsables de cinco de las actividades requeridas para la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Los mutantes pertenecientes a este último grupo

acumulaban en su interior una gran cantidad de polímero (más del 90% del citoplasma estaba ocupado por gránulos de PhHAs) y sufrían unas modificaciones morfológicas muy acusadas (el grosor de las bacteria incrementaba unas 5 veces y su longitud era más de 10 veces superior al de la cepa silvestre) (**Fig. 7**). Con estos mutantes ha sido posible obtener un gran número de polímeros diferentes, cuya estructura puede ser controlada a voluntad simplemente modificando la proporción de monómeros (alifáticos y/o aromáticos) añadidos al caldo de cultivo. En función de la proporción y naturaleza de los monómeros polimerizados, las características físico-químicas de los PHAs/PhHAs obtenidos eran diferentes y, por lo tanto, también sus aplicaciones. Algunos de ellos están siendo utilizados en la industria farmacéutica para la elaboración de microesferas (**Fig. 8**) que serán empleadas como vehículos de drogas.



**Figura 7.** Aspecto morfológico de *Pseudomonas putida* U (cepa parental, 1) y de un mutante super-productor (2) en el que se han deletado los genes *fadBA* que codifican el complejo enzimático responsable de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Microfotografías realizadas con microscopio de rastreo (1a y 2a) y de transmisión (1b y 2b) de esas dos cepas. En todos los casos las cepas se cultivaron en medios de composición definida que contenía 4-OH-PhAc (10 mM) como fuente de carbono y 7-fenilheptanoico (5 mM) como precursor de bioplásticos. Todas las barras equivalen a 1  $\mu$ m (tomado de Luengo et al., *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:251-260, 2003).

Otros mutantes han sido empleados para la obtención por fermentación del ácido cinámico (3-fenilpropenoico).



**Figura 8.** Fotografía de las microsferas obtenidas a partir de bioplásticos para ser utilizadas como vehículos de fármacos. La barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

#### Otras aplicaciones del catabolón del PhAc-CoA y perspectivas de futuro

El hecho de que ciertas bacterias hayan logrado constituir una unidad catabólica compleja, a partir de rutas individuales específicas, ha hecho posible que esos microorganismos sean capaces de degradar un gran número de compuestos estructuralmente semejantes y que puedan, mediante la incorporación de nuevos genes, ampliar su potencial metabólico de una manera sencilla. Así por ejemplo, al disponer de los genes que permiten la transformación del ácido trópico en fenilacético, es más sencillo degradar atropina (un compuesto que no puede ser catabolizado) ya que sólo se requerirá la incorporación del gen/genes requeridos para la conversión de atropina en ácido trópico. De modo análogo, clonando en *P. putida* U los genes requeridos para la degradación del cinámico (3-fenilpropenoico) en otras bacterias, podría asimilarse completamente los ácidos n-arilalcanoicos que contienen un número impar de átomos de carbono.

Por otra parte, la manipulación genética de los genes reguladores que controlan la expresión de la vía central o la de las periféricas puede tener importantes repercusiones ecológicas. Así por ejemplo, la delección del gen *paaX* que codifica un represor de la ruta central (Paa) y la del gen *crc* responsable de la represión catabólica, hace posible que la ruta responsable de la transformación de PhAc en succinil-CoA y en acetil-CoA se exprese constitutivamente incluso en presencia de concentraciones elevadas de azúcares y otras fuentes de carbono. Estos mutantes pueden ser utilizados para eliminar ácido fenilacético de aquellos ambientes (vertidos a depuradoras de fábricas de producción de penicilina) en los que exista una concentración elevada de esa molécula.

La localización de los diferentes genes que componen el catabolón del PhAc-CoA en diferentes microorganismos (incluso en especies alejadas



filogenéticamente) revela la ubicuidad del mismo lo que pone de manifiesto su importancia metabólica.

En la actualidad, además del aquí descrito, se han identificado varios catabolones: el del 4-OH-PhAc, el del colesterol y el del imidazolacético. El análisis molecular de estos modelos está permitiendo establecer la relación existente entre convergencia metabólica y potencial evolutivo en bacterias.

### **Bibliografía**

- Arias, S., Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G. y Luengo, J. M. 2008. Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversión of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environmental Microbiology* 10:6920-6926.
- Arcos, M., Olivera E. R., Arias, S., Naharro, G. y Luengo, J. M. 2010. The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. *Environmental Microbiology* 12:1684-1704.
- Beltrametti, F., Marconi, A. M., Bestetti, G., Colombo, C., Galli, E., Ruzzi, M. y Zennaro, E. 1997. Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Applied Environmental Microbiology* 63:2232-2239.
- Corkery, D. M., O'Connor, K. E., Buckley, C. M. y Dobson, A. D. W. 1994. Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. *FEMS Microbiology Letters* 124:23-28.
- Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E. R., Luengo, J. M., García, J. L. y Díaz, E. 1998. Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273:25974-25986.
- Ferrández, A., Prieto, M. A., García, J. L. y Díaz, E. 1997. Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 406:23-27.
- García, B., Olivera, E. R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L. M., Prieto, M. A., García, J. L., Martínez, M. y Luengo, J. M. 1999. Novel biodegradable aromatic plastic from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *Journal of Biological Chemistry* 274:29228-29241.
- Long, M. T., Bartholomew, B. A., Smith, M. J., Trudgill, P. W. y Hopper, D. J. 1997. Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in

- metabolism of atropine by *Pseudomonas* sp. strain AT3. *Journal of Bacteriology* 179:1044-1050.
- Luengo, J. M. 1998. Enzymatic synthesis of penicillins. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (eds. Barton, D., and Nakanishi, K.). Vol. 4, pp 239-274. Pergamon Press, New York.
- Luengo, J. M., Arias, S., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G. y Olivera, E. R. 2004. From aromatics to bioplastics: The phenylacetyl-CoA catabolon as a model of catabolic convergence. In *Recent Research Developments in Biophysic and Biochemistry* (ed. Gayathri A.). Vol. 4, pp. 257-292 Research Signpost, Kerala, India
- Luengo, J. M., García, J. L. y Olivera, E. R. 2001. The phenylacetyl-CoA catabolón: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Molecular Microbiology* 39:1434-1442.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo, J. M. 1990. Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *Journal of Biological Chemistry* 265:7084-7090.
- Miñambres, B., Martínez-Blanco, H., Olivera, E. R., García, B., Díez, B., Barredo, J. L., Moreno, M. A., Schleissner, C., Salto, F. y Luengo, J. M. 1996. Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry* 271:33531-33538.
- Olivera, E. R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M. A., Cañedo, L., DiRusso, C. C., Naharro, G. y Luengo, J. M. 2001a. Two different pathways are involved in the b-oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: Genetic studies and biotechnological applications. *Molecular Microbiology* 39:863-874.
- Olivera E. R., Carnicero, D., Rodrá, R., Miñambres B., García, B., Abraham, G. A., Gallardo, J., San Román, J., García J. L., Naharro, G. y Luengo, J. M. 2001b. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology* 3:612-618.
- Olivera, E. R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M. A., Ferrández, A., Díaz, E., García J. L. y Luengo, J. M. 1998. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: The phenylacetyl-CoA catabolon. *Proceedings of National Academy of*

- Sciences USA* 95:6419-6424.
- Olivera, E. R., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Medarde, A., Moreno, M. A. y Luengo, J. M. 1994. Catabolism of aromatics in *Pseudomonas putida* U. Formal demonstration that phenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid are catabolized by two unrelated pathways. *European Journal of Biochemistry* 221:375-381.
- Staudenmaier, H. R., Meyer, J., Hauer, B., Ladner, W., Mueller, U. y Pressler, U. 1998. Preparation of 2-hydroxyphenylacetic acid by fermentation. US Patent 5739017.
- Timmis, K. N. y Pieper, D. H. 1999. Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnology* 17:201-204.
- Utkin, I. B., Yakimov, M. M., Matveera, L. N., Kozlyak, E. I., Rogozihin, I. S., Solomon, Z. G. y Bezborodov, A. M. (1991) Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiology Letters* 77:237-242.
- van den Tweel, W. J. J., Smits, J. P. y de Bont, J. A. M. (1988) Catabolism of DL- $\alpha$ -phenylhydracrylic, phenylacetic and 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid via homogentisic acid in *Flavobacterium* sp. *Archives of Microbiology* 149: 207-213.
- Velasco, A., Alonso, S., García, J. L., Perera, J. y Díaz, E. (1998). Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Journal of Bacteriology* 180:1063-1071.



**José María Luengo Rodríguez** es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de León. Ha dirigido 36 Proyectos de Investigación financiados por diferentes Organismos e Instituciones públicas y privadas. Ha publicado más de 100 artículos en las revistas más prestigiosas de Bioquímica, Microbiología y Biología Molecular. Es autor de 15 capítulos de libros publicados todos ellos en obras especializadas. Ha realizado más de un centenar de ponencias y comunicaciones en diversos congresos nacionales e internacionales. Es autor de 17 patentes de invención y ha dirigido 22 Tesis Doctorales. Director de un Grupo de Excelencia de la Junta de Castilla y León. Se le han reconocido seis Complementos de Investigación (Sexenios) por el Consejo General de Universidades. Fue galardonado con el Premio XXV Aniversario de la Universidad de

León a la Investigación Científica en el Área de Ciencias Experimentales y de la Salud. Ha formado parte de diferentes Comités de Expertos Nacionales e Internacionales para la Evaluación Científica y Tecnológica. Miembro del Comité Editorial de diferentes revistas internacionales punteras en el campo de la Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Cofundador de la empresa biotecnológica BIOGES STARTERS dedicada a la producción industrial de cultivos iniciadores. Académico de Número de la Academia de Farmacia de Castilla y León.



**Eliás Rodríguez Olivera** es Profesor Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León. Tras la realización de su Tesis Doctoral en el Área de Bioquímica permaneció en la Universidad de León realizando labores de investigación. Tras una estancia de dos años en la Universidad de Massachusetts en Amherst (MA, USA) se reincorporó en la Universidad de León en 2009 como Profesor Titular de la misma. Imparte docencia en los Grados de Enfermería, Fisioterapia e Industrias Agroalimentarias en el Campus del Bierzo y participa en la docencia del Máster "Metodología de investigación en biología

fundamental y biomedicina" y en el correspondiente programa de Doctorado asociado al Departamento de Biología Molecular. Su actual línea de investigación, incluida en el Grupo de Excelencia dirigido por el Profesor José María Luengo, está centrada en aspectos metabólicos, genómicos y proteómicos de especies del género *Pseudomonas*, así como en las aplicaciones biotecnológicas derivadas de éstos. Fruto de su labor investigadora ha publicado más de 35 artículos científicos en revistas y libros de relevancia internacional en su ámbito de trabajo.