

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas.

Memoria presentada por MONICA SUAREZ RODRIGUEZ
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio 1993.



FACULTAD DE VETERINARIA



* 5 3 0 9 5 5 9 6 6 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

El trabajo de investigación titulado " Degradación de los ácidos 3- y 4- hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae* : Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas" presentado por D^a MONICA SUAREZ RODRIGUEZ para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Amando Garrido-Pertierra y la Dra. D^a Margarita Martín Fernández.

Directores de la Tesis Doctoral

Dr. D. Amando Garrido-Pertierra

Dra. D^a Margarita Martín Fernández

Doctorando:

D^a Mónica Suárez Rodríguez

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Amp :	Ampicilina.
ATP :	Adenosina-5'-trifosfato.
c.p.m. :	Cuentas por minuto.
CTAB :	Hexadeciltrimetil-bromuro amónico.
Da :	Dalton.
DNA :	Acido desoxirribonucleico.
DPC :	Dietilpirocarbonato.
DTT :	Ditiotreitol.
EC :	Comisión de enzimas.
EDTA :	Acido etilen-diamino-tetracético.
F :	Constante de Faraday.
FAD :	Flavin-adenin-dinucleótido.
FPLC :	Fast Protein Liquid Chromatography.
Gly :	Glicerol.
GSH :	Glutation reducido.
h :	Coefficiente de Hill.
3-HBA :	Acido 3-hidroxibenzoico.
4-HBA :	Acido 4-hidroxibenzoico.
Hepes :	4- (2-hidroxietyl)-1-piperazin-etanosulfonato.
IPTG :	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
Kam :	Kanamicina.
Kb :	Kilo (pares) de bases.
K_I :	Constante de inhibición.
K_m :	Constante de Michaelis-Menten.
K_t :	Constante cinética de transporte.
Mr :	Masa relativa.
mUI :	Mili-unidades internacionales.
NAD (H) :	Nicotinamida-adenín-dinucleótido. Formas oxidada y reducida.
NADP (H) :	Fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido. Formas oxidada y reducida.

PI :	Punto isoeléctrico.
PM :	Peso molecular.
PMSF :	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
R_f :	Movilidad relativa.
RNAsa :	Ribonucleasa.
S_{0.5} :	(Cinéticas sigmoidales) Concentración en la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.
SDS :	Dodecilsulfato sódico.
SSC :	Tampón NaCl - Citrato sódico.
TAE :	Tampón Tris- acetato- EDTA.
TBE :	Tampón Tris-borato-EDTA.
TE :	Tampón Tris-EDTA.
TEMED :	N,N,N',N'- tetrametilenetilendiamina.
Tris :	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
V_{max} :	Velocidad máxima.
X-gal :	5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

INDICE

I. INTRODUCCION:

1. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL.	1
2. DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS.	7
2.1. RUTAS CATABOLICAS GENERALES.	8
-Rutas del catecol y ácido protocatéquico.	9
-Ruta del ácido gentísico.	14
2.2. DEGRADACION DE LOS ACIDOS 3- Y 4-HIDROXIBENZOICO.	16
2.3. SISTEMAS DE TRANSPORTE.	21
2.4. ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACION.	26
-Monooxigenasa ó hidroxilasas.	28
-Dioxigenasas.	32
2.5. REGULACION Y ASPECTOS GENETICOS.	36
-Organización genética.	37
-Regulación del metabolismo degradativo.	41
2.6. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y EVOLUTIVOS.	42

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION. 46

III. MATERIAL Y METODOS:

1. MATERIAL.	49
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	49
1.2. REACTIVOS.	49
1.3. EQUIPO UTILIZADO.	51

2. METODOS. 51

TECNICAS DE BIOLOGIA CELULAR

2.1. MANTENIMIENTO Y DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR.	51
2.2. MUTAGENESIS MEDIANTE RADIACION ULTRAVIOLETA	52
2.3. ESTUDIO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE.	52
-Ensayos de transporte	52
-Tratamiento del choque osmótico	53
-Ensayo del ATP.	53
2.4. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES.	53

ENZIMOLOGIA Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA. 54

2.5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	54
-3-hidroxibenzoato 6-hidroxilasa	54
-4-hidroxibenzoato 3-hidroxilasa	54
-2,5-DHBA dioxigenasa	54
-Maleilpiruvato isomerasa	55
-3,4-DHBA dioxigenasa	55

-Fumarilpiruvato hidrolasa.	55
2.6. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO.	55
2.7 MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA	55
2.8. METODO DE PURIFICACION ENZIMATICA.	56
-Purificación de la 4-HBA 3-hidroxilasa	56
-Purificación de la 3-HBA 6-hidroxilasa.	59
2.9. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR Y DEL PUNTO ISOELECTRICO.	59
-Electroforesis en condiciones nativas.	59
-Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.	59
-Isoelectroenfoque	60
-Tinción de geles con azul de Coomasie	60
-Tinción de geles con nitrato de plata.	60
2.10. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS	60
2.11. SECUENCIACION DEL EXTREMO N-TERMINAL.	61
2.12. DETERMINACION DE MECANISMO CATALITICO.	61
2.13. INACTIVACION ENZIMATICA POR DPC.	62

METODOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE.

2.14. EXTRACCION DE DNA.	62
-Obtencion de DNA cromosómico.	62
-Obtención de DNA plasmídico.	62
2.15. DETERMINACION ANALITICA DE DNA.	63
-Cuantitativa	63
-Cualitativa: geles de agarosa.	63
2.16. SOUTHERN BLOT.	63
2.17. ELABORACION DE UNA GENOTECA DE <i>K. pneumoniae</i> .	64
-Preparación del vector de clonaje	64
-Fragmentación del DNA cromosómico.	64
-Ligamiento.	64
-Análisis de insertos	64
2.18. TRANSFORMACION EN <i>E. coli</i> CC118 sure	65
-Obtención de células competentes.	65
-Transformación	65
-Selección de recombinantes.	65
2.19. OBTENCION DE LA SONDA.	65
2.20. HIBRIDACION	66
-Fijación del DNA a membrana.	66
-Marcaje de la sonda.	66
-Hibridación.	66
2.21 MUTAGENESIS MEDIANTE INSERCION DE TRANSPOSONES	67
-Preparación del vector de transposición.	67
-Conjugación.	67
-Selección.	67
2.22. TRANSFORMACION EN <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	67

IV. RESULTADOS:

1. CARACTERIZACION DEL MUTANTE MA04.	68
2.DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO	69
-Crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> M5a1 en 3-HBA.	69
-Crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> MA04 en 4-HBA.	71
3. DETERMINACION DE LA RUTA DEGRADATIVA DEL 3-HBA en <i>K. pneumoniae</i> M5a1.	72
-Determinación de actividades enzimáticas.	72
-Determinación de los niveles de oxidación.	76
4. DETERMINACION DE LA RUTA DEGRADATIVA DEL 4-HBA en <i>K. pneumoniae</i> MA04.	77
-Determinación de actividades enzimáticas.	77
-Determinación de los niveles de oxidación.	78
5. INDUCCION ENZIMATICA Y CRECIMIENTO EN OTROS COMPUESTOS AROMATICOS.	81
6. CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE.	84
-Inducción del sistema de transporte del 4-HBA y determinación de los parámetros cinéticos.	84
-Efecto de los inhibidores del transporte y contenido en ATP.	88
-Efecto del choque osmótico en el transporte.	89
-Efecto de ionóforos.	90
7. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA.	91
-Determinación de la pureza por métodos electroforéticos	91
-Determinación del peso molecular.	92
-Determinación del punto isoeléctrico.	92
-Análisis de la composición de aminoácidos.	92
-Secuenciación del extremo N-terminal.	98
8. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA 3-HBA 6-HIDROXILASA.	99
-Determinación de la pureza por métodos electroforéticos	99
-Determinación del peso molecular.	100
-Determinación del punto isoeléctrico.	102
-Análisis de la composición de aminoácidos.	102
9. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA Y DE LA 3-HBA 6-HIDROXILASA.	107
-Estabilidad enzimática.	108
-Estabilidad térmica.	109
-Influencia del pH.	110
-Influencia de la temperatura.	112
10. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS.	112
3-HBA 6-HIDROXILASA.	112
4-HBA 3-HIDROXILASA.	113
11. MECANISMO CATALITICO DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA.	117
12. DETERMINACION DE RESIDUOS DE TIROSINA EN LA 4-HBA 3-HIDROXILASA.	121
13. HIBRIDACION DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA.	123
14. OBTENCION DE UNA GENOTECA DE <i>K. pneumoniae</i> .	127
15. CLONACION DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA EN EL CROMOSOMA DE <i>A. calcoaceticus</i> .	133

V. DISCUSION:

1.INDUCCION DE LAS RUTAS DEGRADATIVAS DEL 3- Y 4-HBA.	134
2. SISTEMA DEL TRANSPORTE DEL 4-HBA.	137
3. HIDROXILASAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACION DEL 3- Y 4-HBA.	139
4-HBA 3-HIDROXILASA.	140
3-HBA 6-HIDROXILASA.	144
4. REGULACION DE LAS RUTAS DEGRADATIVAS DEL 3- y 4-HBA.	147
5. POSIBLE APLICACION EN BIOTECNOLOGIA.	150

VI. CONCLUSIONES.	152
-------------------	-----

VII. BIBLIOGRAFIA.	153
--------------------	-----

INTRODUCCION

1. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

El rápido e incontrolado desarrollo industrial experimentado por el mundo en los últimos años, ha generado en la actualidad numerosos problemas relacionados con el medio ambiente. Los avances tecnológicos en el ámbito industrial son principalmente motivados, no por criterios científicos, sino por las demandas de mercado y la fuerte competencia provoca la utilización exhaustiva de los recursos naturales y la aparición creciente de residuos industriales.

La progresiva preocupación por el medio ambiente surgida en la sociedad de los países industrializados, influye sobre los gobiernos que se ven en la obligación de fomentar planes de investigación encaminados a una gestión más racional de los recursos medio-ambientales. Las industrias generan productos químicos que se vierten al medio ambiente, ya sea en forma de residuo industrial en puntos concretos o de una manera dispersa por los consumidores.

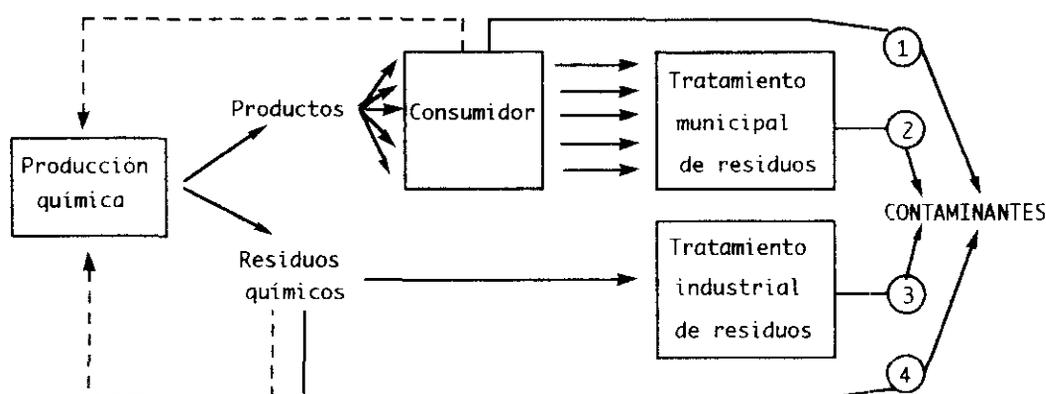


Figura 1. Transformación y destino de los compuestos químicos orgánicos al medio ambiente (Leisinger, 1983) 1. Productos que se incorporan al medio ambiente: aerosoles, fertilizantes, pesticidas. 2. Compuestos que son vertidos al medio ambiente con los disolventes de las depuradoras municipales: detergentes, solventes. 3. Compuestos químicos que resisten la degradación biológica en los sistemas de tratamiento de residuos industriales: clorobencenos, fenoles, difenilos policlorados. 4. Descargas directas de vertidos por pérdidas ó accidentes.

Una de las preocupaciones más acuciantes en este momento es el reciclaje de los residuos que genera la civilización actual con el fin de evitar el deterioro progresivo de la Biosfera. Para abordar el problema de la contaminación medio-ambiental es necesario conocer qué tipo de residuos son sintetizados químicamente e investigar que vías degradativas permiten su transformación. [En este sentido, actualmente se ha comprobado, que la degradación de tipo biológico es mucho más versátil que la de tipo exclusivamente químico utilizada en años precedentes.]

En la naturaleza, los últimos seres vivos responsables de la mineralización de los diferentes compuestos orgánicos son las bacterias, los hongos y las levaduras. Estos microorganismos tienen una enorme flexibilidad a la hora de metabolizar compuestos que ningún otro ser vivo puede utilizar como nutriente. Incluso hay bacterias que utilizan sustratos de crecimiento tan específicos como metano, ácido úrico, acetato, fenol ó catecol.

En la actualidad existen sistemas de depuración artificiales enfocados principalmente a purificar aguas residuales que contienen abundancia de sustancias contaminantes. Estos sistemas se fundamentan en la utilización de distintas poblaciones de microorganismos con una amplia capacidad degradativa de productos químicos los cuales metabolizan a través de complicadas rutas catabólicas que, en la mayoría de los casos, están relacionadas entre sí.

Debido a que los avances en el campo de la biodegradación son más lentos que la aparición de nuevas sustancias contaminantes en el medio ambiente, nos encontramos progresivamente con más compuestos orgánicos, de origen natural o sintético, que resisten la mineralización por los sistemas biológicos convencionales de tratamiento de residuos.

Estos compuestos orgánicos han sido clasificados por Leisinger y Brunner (1988) en tres grupos: persistentes, xenobióticos y contaminantes.

- Se consideran compuestos *persistentes* aquellos que no son degradados por enzimas bacterianas o lo son lentamente. Como ejemplo de este tipo de compuestos está la celulosa, la lignina u otros polímeros sintéticos, con especial énfasis a los residuos de industrias madereras o papeleras.

- Los compuestos *xenobióticos* son aquellos producidos por el hombre que presentan nuevas estructuras químicas y que, por lo tanto, no han estado nunca expuestos a la acción de microorganismos en el curso de la evolución. Son de gran interés en el estudio de mecanismos que conllevan una adquisición de nuevas funciones metabólicas. La evolución de la hidrolasa para el ácido 6-aminohexanoico, enzima implicada en la degradación del nylon-6, es un claro ejemplo de estudio de estos compuestos.

- Por último, el grupo mas amplio es el de las *sustancias contaminantes* propiamente dichas, que se acumulan en el medio ambiente de manera transitoria o permanente con efectos nocivos para el hombre. Estos efectos pueden ser debidos a una acción química directa, en el caso de los compuestos tóxicos, o a una acción indirecta debida al daño que producen en ecosistemas terrestres o acuáticos.

De las sustancias contaminantes de síntesis más conocidas cabe destacar los hidrocarburos alifáticos halogenados y el insecticida DDT. Entre los compuestos industriales los más representativos son el cloroformo, el tetracloruro de carbono y el tri- y el tetracloroetano que se encuentran en concentraciones de $\mu\text{g/l}$ en el agua de muchas regiones industrializadas. Estas concentraciones se consideran muy tóxicas para la mayoría de las diferentes formas de vida.

Tabla 1. Compuestos orgánicos de la lista de contaminantes principales de la EPA (Environmental Protection Agency, U.S.A.)

Compuestos químicos (Número de compuestos)	Compuesto representativo y frecuencia de aparición*
Pesticidas y metabolitos (17)	β -Hexaclorociclohexano(0.8%) Aldrín (0.5%)
Alifáticos halogenados (31)	Diclorometano (36%) Triclorometano (37%)
Aromáticos (8)	Benceno (26%) Tolueno (28%)
Nitroaromáticos (7)	2-Nitrofenol (2%) Nitrobenceno (2%)
Cloroaromáticos (16)	Pentaclorofenol (7%) Diclorobenceno (6%)
Bifenilos policlorados (7)	Aroclor 1254 (0.6%) Aroclor 1242 (0.8%)
Esteres del ácido ftálico (6)	Bis-(2-etilhexil)ftalato(42%) Di-n-butilftalato (19%)
Hidrocarburos policíclicos aromáticos(16)	Fenantreno/ Antraceno(11%) Pireno (8%)
Nitrosaminas y otros compuestos (6)	Difenilnitrosamina (1%)

* La frecuencia de aparición se realizó analizando 2600 muestras de aguas residuales en diferentes regiones industriales.

Se ha tratado de clasificar los compuestos de origen industrial que resultaban más nocivos para el medio ambiente evaluando su biodegradabilidad, su frecuencia de aparición y su toxicidad . Así pues, se han llegado a identificar unos 114 compuestos y 13 metales enumerados en una lista de contaminantes realizada por la EPA (Environmental Protection Agency) en Estados Unidos, cuyo resumen puede observarse en la tabla 1 (Leisinger y Brunner, 1988)

La situación es aun más compleja si se tiene en cuenta que un elevado número de compuestos, más de 50.000, se encuentran todavía pendientes de ser clasificados respecto a su toxicidad e impacto ambiental. Esta cifra se vería incrementada si tenemos en cuenta que muchos compuestos químicos, una vez depositados en el medio ambiente, se encuentran sujetos a reacciones biológicas o químicas que originan estructuras adicionales, las cuales pueden ser más tóxicas que el compuesto progenitor.

La biotecnología puede ayudar a aliviar esta situación mediante el desarrollo de técnicas biológicas para reciclar, desintoxicar o mineralizar aquellos compuestos que por su persistencia puedan alterar el equilibrio ecológico de la naturaleza. Para progresar en el desarrollo de estas técnicas primeramente es necesario identificar los compuestos que resisten los actuales sistemas biológicos de tratamiento de residuos, y posteriormente proponer nuevos mecanismos de biodegradación basados en un mejor conocimiento de su estructura química. Así mismo, se deben conocer las rutas degradativas existentes en los diferentes microorganismos conocidos y los sucesivos pasos por los que el compuesto inicial se transforma en los productos finales.

Los procesos biológicos para eliminar compuestos persistentes en el medio ambiente son más utilizados que los físico-químicos, ya que consumen menos energía, ofrecen posibilidades de reciclaje y son más específicos. Las cepas microbianas que se eligen para la investigación son aquellas que poseen altos niveles de degradación y un amplio espectro metabólico. Para su aislamiento se siguen los siguientes procedimientos alternativos. a) Enriquecimiento de los microorganismos "in situ". b) Enriquecimiento en la naturaleza con posterior mutación y selección en el laboratorio. c) Aplicación de las técnicas de DNA recombinante "in vivo". d) Aplicación de las técnicas de DNA recombinante "in vitro"

Las cepas bacterianas así transformadas podían utilizarse con fines descontaminantes, aunque al modificarse su capacidad metabólica existen riesgos de no poder controlar su metabolismo. Es por ello, que la Comisión de las Comunidades Europeas no permite, hasta ahora, su utilización. Sin embargo, sí se pueden identificar las enzimas claves de una ruta degradativa y si el producto de la reacción que catalizan es de baja toxicidad, dichas enzimas podrían usarse en depuración de aguas residuales o bien directamente sobre el suelo. En este caso es necesario un conocimiento profundo de los parámetros implicados en los procesos degradativos como son concentración de compuestos, variación en el crecimiento de las bacterias, pH, presencia de iones metálicos, etc.

Por ello, los resultados de las investigaciones a nivel microbiológico, bioquímico y genético de los microorganismos que degradan compuestos persistentes en el medio ambiente no se aplican todavía a escala industrial con la eficacia que se desearía. Esto abre un campo muy amplio de investigación y en el que en su desarrollo y aplicación se tienen fundadas esperanzas para eliminar, o al menos paliar, los graves defectos que la contaminación ambiental está produciendo en la salud de los hombres y los animales.

2. DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS.

Los compuestos aromáticos son compuestos orgánicos abundantes en la Naturaleza. La mayoría son producidos por plantas, siendo la lignina el polímero predominante y que constituye uno de los compuestos que interviene en el armazón de los tejidos vegetales. Por ello no ofrecen, a priori, ningún problema para el metabolismo microbiano, ya que muchas bacterias del suelo utilizan de forma natural compuestos aromáticos para su crecimiento. La acción de estos microorganismos es muy importante ya que permite recuperar grandes cantidades de carbonos que de otra forma quedarían fuera del ciclo del carbono (aminoácidos, vitaminas, etc.).

Actualmente existen compuestos derivados de síntesis orgánicas como pesticidas, herbicidas ó residuos industriales que tienen en común la presencia de un núcleo bencénico en su estructura. De esta manera nos encontramos con este tipo de compuestos entre los agentes tóxicos medioambientales más habituales, como los aromáticos policíclicos, o entre los contaminantes más persistentes, como los bifenilos policlorados (PCB_s). La razón por la que son resistentes a la biodegradación es la presencia de sustituyentes externos en el núcleo aromático. Estos grupos predominantemente electronegativos reducen la reactividad de la estructura resonante hacia el oxígeno e impiden, bien la activación o bien la rotura del anillo aromático, los dos pasos iniciales en el catabolismo de este tipo de compuestos.

En el estudio del catabolismo de compuestos aromáticos por bacterias es necesario conocer los distintos procesos o etapas mediante los cuales el compuesto se incorpora al metabolismo celular y se transforma en intermediarios de las rutas centrales. Ello implica un conocimiento profundo a) del sistema de transporte a través de la membrana plasmática b) del sistema de hidroxilación y escisión del anillo aromático c) de la ruta seguida en su transformación y su relación con otras rutas metabólicas y

d) de los mecanismos de control de los procesos anteriores.

Con este fin vamos a describir a continuación las rutas más importantes en la degradación de compuestos aromáticos.

2.1. RUTAS CATABOLICAS GENERALES

Entre los microorganismos capaces de crecer a expensas de compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía se encuentran muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas del suelo, algunas levaduras y ciertos hongos. Todos estos organismos asimilan dichos compuestos a través de vías catabólicas que convergen en las rutas centrales del metabolismo.

Existen dos tipos de procesos al inicio de las rutas degradativas en condiciones aerobias que son comunes a todos los compuestos aromáticos:

- Hidroxilación del anillo aromático
- Escisión del anillo bencénico

En general ambos tipos de reacciones están catalizadas por enzimas que requieren oxígeno, muestran alta especificidad por su sustrato y reciben el nombre genérico de monooxigenasas ó hidroxilasas y dioxigenasas, respectivamente. La acción conjunta de las dos enzimas origina la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la posterior utilización del carbono contenido en su estructura cíclica saturada mediante la intervención de otras enzimas. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs.

Una característica esencial para que un compuesto aromático sea escindido por las dioxigenasas es la presencia de, al menos, dos grupos hidroxilo en posición *orto* ó *para*. Los organismos procariotas pueden metabolizar una amplia variedad de compuesto aromáticos a través de

rutas degradativas relacionadas por compuestos intermediarios comunes. Si tenemos en cuenta la posición de los grupos hidroxilo de los compuestos dihidroxilados más comúnmente utilizados, podemos agrupar las rutas que convergen en el catecol y el ácido protocatéquico, y las que convergen en el ácido gentísico.

-Rutas del catecol y del ácido protocatéquico.

El catecol y el ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico) son los compuestos centrales en los que convergen la mayoría de las rutas degradativas de compuestos aromáticos que contienen un grupo OH en posición *orto*. En las fig, 2 y 3 se indican algunos compuestos aromáticos metabolizados a través de rutas que implican la formación de dichos intermediarios (Stanier y Ornston, 1973).

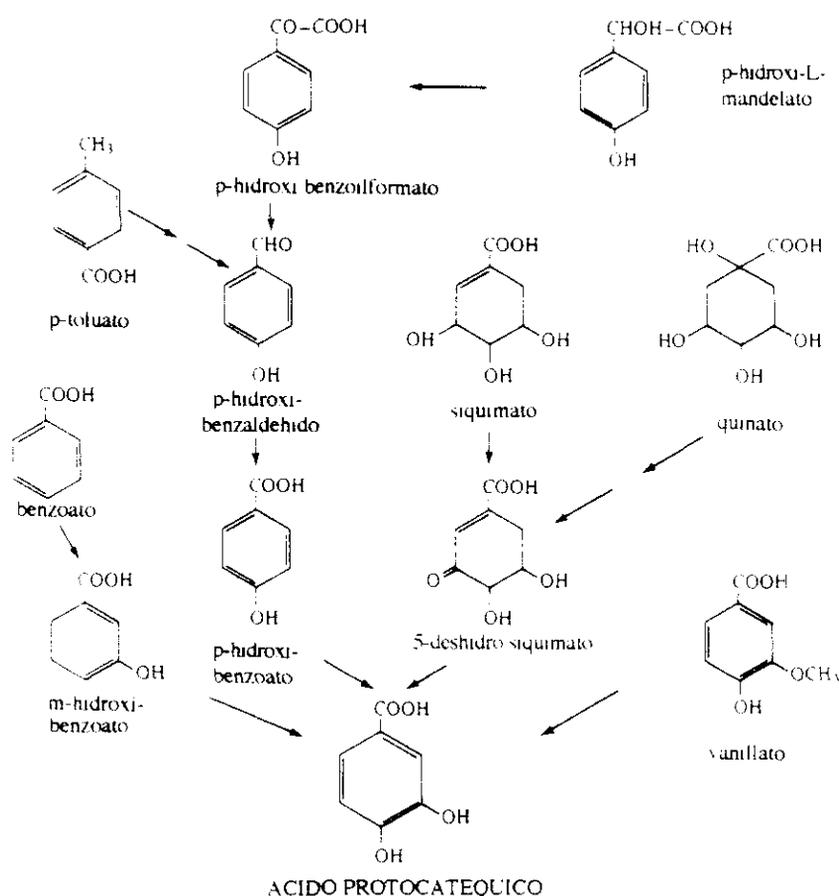


Figura 2: Algunos compuestos aromáticos metabolizados a través del ácido protocatéquico.

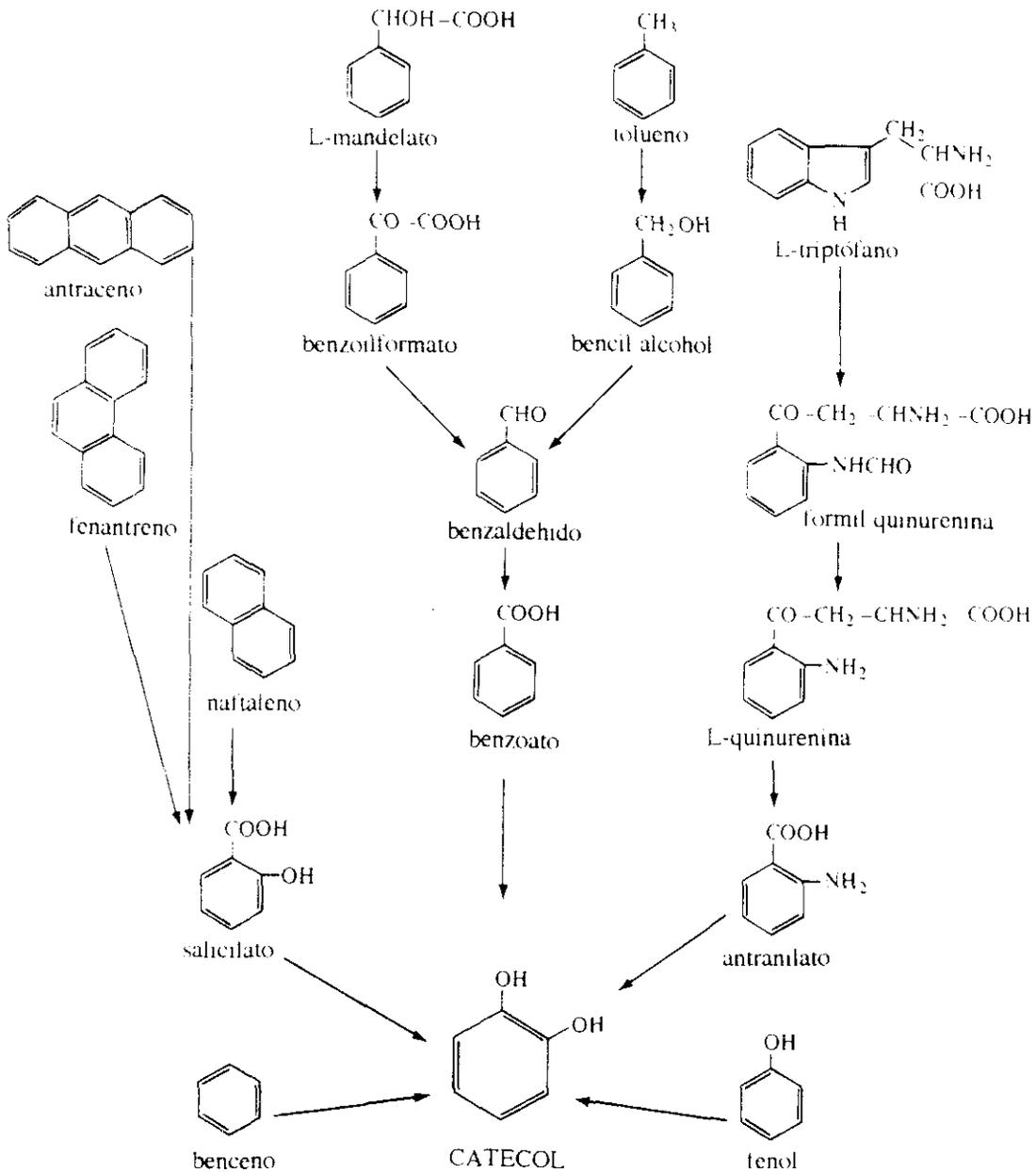


Figura 3: Algunos compuestos aromáticos metabolizados a través del catecol.

Se conocen dos tipos de escisión para que estos compuestos aromáticos transformen su estructura cerrada en abierta: la escisión *orto* ó la escisión *meta*.

-Escisión *orto* ó ruta del β -cetoadipato:

La escisión tiene lugar entre los carbonos que llevan los grupos OH (intradiol); en el caso del catecol entre los carbonos 1 y 2 y en el del protocatéquico entre el 3 y 4. Los productos de la primera reacción oxigenolítica son *cis,cis*-muconato y β -carboxi-*cis,cis*-muconato,

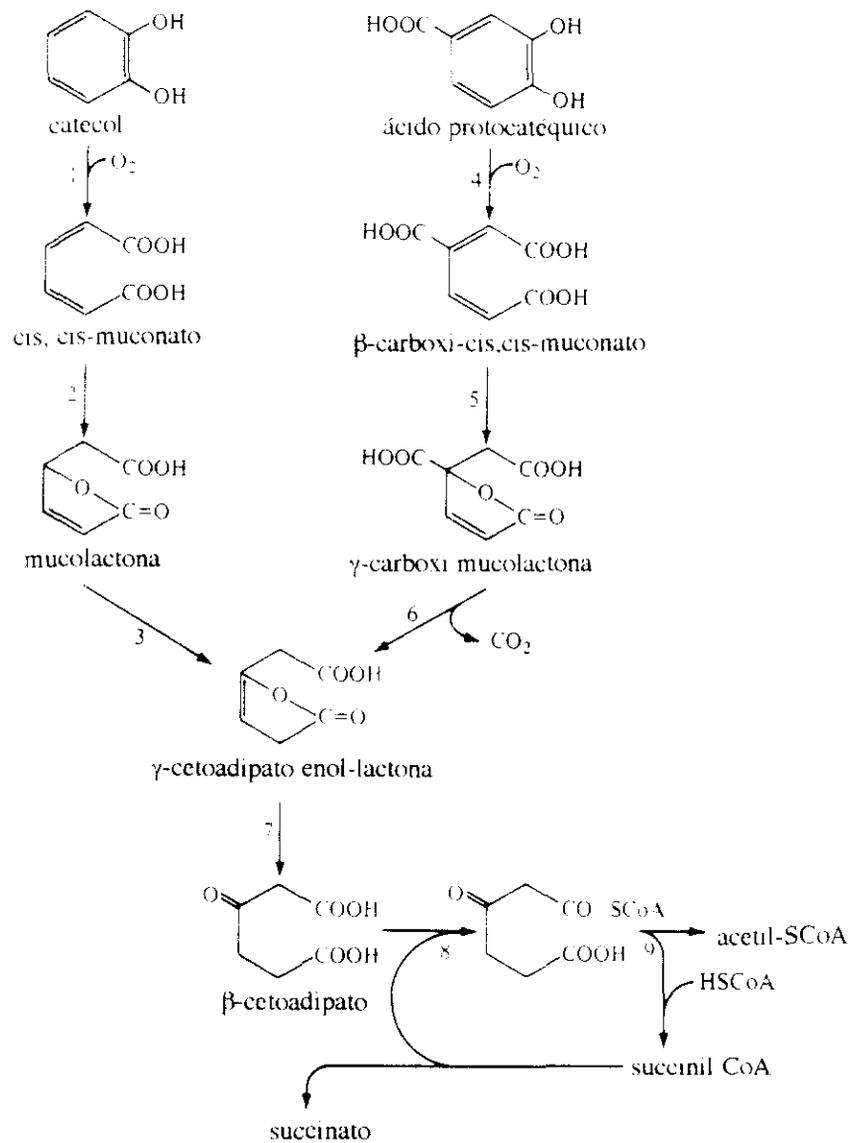


Figura 4: Escisión *orto* del ácido protocatéquico y del catecol. Ruta del β -cetoadipato. 1. catecol 1,2-dioxigenasa; 2. enzima lactonizante del muconato; 3. mucolactona isomerasa; 4. protocatecato 3,4-dioxigenasa; 5. enzima lactonizante del β -carboximuconato; 6. γ -carboximuconolactona descarboxilasa; 7. γ -cetoadipato enol-lactona hidrolasa; 8. β -cetoadipato succinil-CoA transferasa; 9. β -cetoadipato-CoA tiolasa.

respectivamente, los cuales se transforman por vías diferentes en el primer intermediario común de la ruta: el 4-cetoadipato enol-lactona (Fig. 4). A partir de este compuesto se forma el β -cetoadipato que finalmente se degrada a succinato y acetil-CoA. La convergencia del catecol y del ácido protocatéuico hacia el β -cetoadipato mediante este tipo de rotura ha sido muy estudiada en *Pseudomonas putida* por Ornston y Stanier (1966).

-Escisión meta:

En 1959 Dagley y Stopher encontraron otro tipo de escisión en varias especies de *Pseudomonas*. Este tipo de rotura se producía entre el carbono que lleva un grupo OH y el carbono adyacente (extradiol). El catecol se abre entre los carbonos 2 y 3 dando lugar al semialdehído 2-hidroximucónico. En la mayoría de bacterias que utilizan este tipo de rotura el protocatéuico rompe su anillo entre los carbonos 4 y 5 mediante la 4,5 protocatecuato dioxigenasa originando el aldehído 2-hidroxi-4-carboximucónico. En este caso no se origina ningún intermediario común y las rutas se desarrollan independientemente para formar piruvato y acetilacetaldehído como productos finales (Fig. 5).

Se ha observado en algunas especies del género *Bacillus* (Crawford, 1975) que el ácido protocatéuico también puede ser escindido entre los carbonos 2 y 3, de una manera similar al catecol, mediante una rotura oxidativa y una rápida decarboxilación del producto de rotura obteniéndose semialdehído 2- hidroximucónico.

Entre estos intermediarios principales (catecol y protocatecuato) no hay ninguna conexión a no ser la formación posterior del β -cetoadipato cuando se produce la escisión tipo *orto*. Según Patel y Grant (1969), en el estudio del catabolismo del 4- HBA en *Klebsiella aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*) se producía una decarboxilación no oxidativa que convertía el

protocatecuato en catecol. Esto constituye una excepción si consideramos que en la mayoría de los microorganismos el benzoato es convertido en catecol y el 4-HBA en protocatecuato. Esta hipótesis fue descartada por Doton y Ornston (1987), los cuales observaron que mutantes defectivos en las enzimas de la ruta degradativa del catecol crecían perfectamente en ácido protocatéquico.

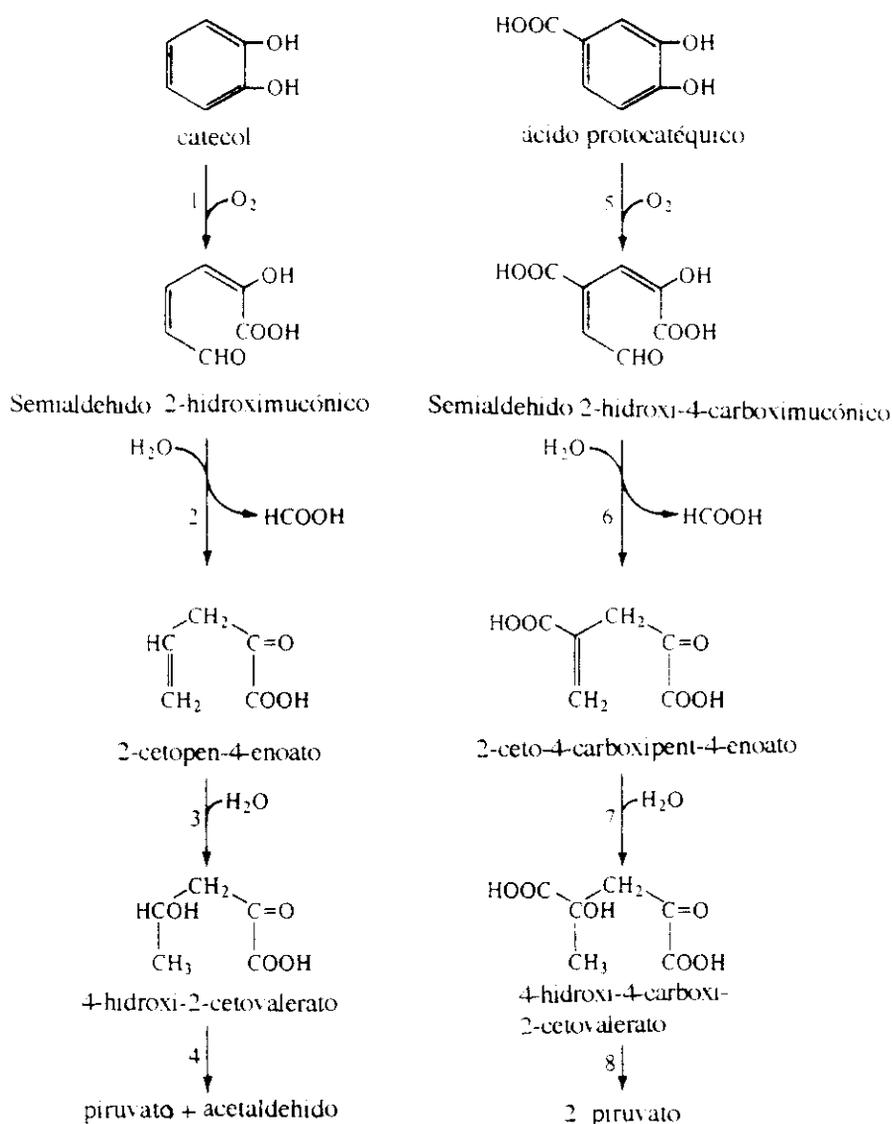


Figura 5: Escisión *meta* del ácido protocatéquico y del catecol. 1. catecol 2,3-dioxigenasa; 2. Semialdehído 2- hidroxi-4-carboximucónico hidrolasa; 3. ácido 2-cetopent-4-enoico hidrolasa; 4. 4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa; 5. protocatecuato 4,5-dioxigenasa; 6. Semialdehído 2-hidroxi-4-carboximucónico hidrolasa; 7. ácido 2-ceto-4-carboxipent-4-enoico hidrolasa; 8. 4-hidroxi-4-carboxi-2-cetovalerato aldolasa.

El modo de escisión del 3,4 DHBA depende de la especie bacteriana y se puede considerar un carácter taxonómico (Ornston y Stanier, 1966). En los tres tipos de rotura existentes para el 3,4 DHBA demuestra que el punto de rotura no solo está determinado por la naturaleza de química de los sustituyentes, sino por una elección evolutiva entre varias posibilidades. Así, se puede considerar que la distribución de las rutas degradativas entre las bacterias es muy variable y complicada. *P. acidovorans* y *P. testosteroni* metabolizan el ácido protocatéquico mediante rotura *meta* y el catecol mediante rotura *orto*. La rotura *orto* parece ser la predominante entre las pseudomonas fluorescentes, y la rotura *meta* parece adscrita a las no fluorescentes: *P. testosteroni* y *P. acidovorans* (Ornston y Stanier, 1966; Wheelis y col., 1967). Aunque no es fácil que en una misma estirpe bacteriana convergan ambos tipos de escisiones para un mismo compuesto. En *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt- 2 se observan simultáneamente las roturas *orto* y *meta* para el catecol en el metabolismo del benzoato (Nakazawa y Yokota, 1973).

-Ruta del ácido gentísico

El ácido gentísico ó ácido 2,5 dihidroxibenzoico tiene los dos grupos hidroxilo en posición *para* (Fig. 6) y la rotura se produce entre el carbono que lleva el grupo carboxilo y el que lleva el hidroxilo (C1 y C2), obteniéndose como productos finales piruvato y fumarato.

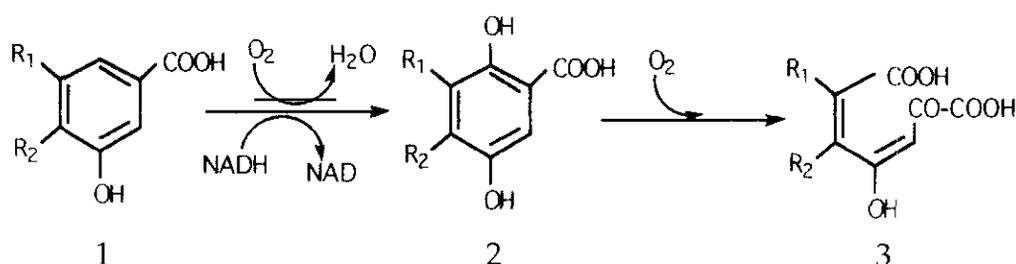


Figura 6: Reacciones de hidroxilación y escisión del anillo aromático en compuestos metabolizados a través de intermediarios con grupos hidroxilo en *para*. Si consideramos $R_1 = R_2 = H$, el *m*-hidroxibenzoato (1) sería un ejemplo que se metabolizaría a través del gentisato (2), con posterior escisión del anillo aromático (3).

La ruta del ácido gentísico fue establecida por primera vez en *Pseudomonas ovalis* (Lack, 1959) y confirmada para otras especies y compuestos (Wheelis y col., 1967; Jones y col., 1990; Harpel y col., 1991). El gentisato no es un metabolito secundario común tan frecuente como el catecol ó el ácido protocatéquico, por lo que la información acerca de las rutas metabólicas en las que participa es menor. Sin embargo, se forma a partir de varios compuestos como el antranilato, β -naptol, 3- y 4-hidroxibenzoato, salicilato, flavonones y disulfunato de naftaleno. (Harayama y col., 1992).

Un compuesto similar es el ácido homogentísico ó ácido 2,5 dihidroxifenilacético, en cuya ruta degradativa se obtienen fumarato y acetoacetato como productos finales. Esta ruta es de especial interés por degradarse a través de ella la fenilalanina y la tirosina en distintas especies de *Streptomyces* (Pometto y col., 1985), *Nocardia* (Boer y col., 1988) ó *K. pneumoniae* (Gibello, 1992). En este tipo de rutas los precursores del ácido homogentísico son el 4-hidroxifenilacético en la degradación de la tirosina y el fenilacetato en la degradación de la fenilalanina.

Como hemos indicado con anterioridad, la adición de sustituyentes en el anillo bencénico disminuye su degradabilidad. Las sustituyentes cloro y otros halogenados presentan grandes problemas a la hora de ser degradados por bacterias. Sin embargo, la producción de aromáticos halógenos es cada vez mayor (lubricantes, pesticidas, plásticos, intermediarios de síntesis orgánicas...), y por ello cobran especial importancia, las enzimas que eliminan los compuestos halogenados como las deshalogenasas. Además de estas enzimas algunas hidroxilasas con especificidad de sustrato relajada pueden reconocer como pseudosustratos ciertos compuestos halogenados, como en el caso de la degradación del 3-clorobenzoato en *Pseudomonas* sp. B 13, donde es transformado a 3-clorocatecol y la eliminación del cloro ocurre de manera espontánea. (Dorn y col., 1974). Otro tipo de reacción que no implique la formación de

un halocatecol es aquella donde la eliminación del halógeno ocurre antes de la rotura del anillo aromático (Leisinger y col., 1988).

2.2. DEGRADACION DE LOS ACIDOS 3- y 4- HIDROXIBENZOICO

La lignina, el polímero más abundante en la Naturaleza despues de la celulosa, es una fuente importante de compuestos aromáticos que se encuentran en el medio ambiente. El ataque de este polímero para su degradación es producido principalmente por hongos llamados lignolíticos. Algunas especies de *Polyporus*, *Poria*, *Fomes* y *Trametes* son particularmente efectivos en la despolimerización de la lignina. Después de la acción de estos organismos quedan libres los constituyentes monoméricos de la lignina que son anillos aromáticos con diversos sustituyentes los cuales pueden posteriormente ser metabolizados por bacterias. Entre los productos obtenidos de la degradación de la lignina de hayas, pinos y abetos, en particular, se han identificado el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el 4-cumarato, el vanillato, el ferulato, el 4-hidroxi 3-metoxifenilpiruvato y una serie de aldehidos entre los que destaca el coniferaldehido (Cain y col., 1968). Los hidroxibenzoatos y sus análogos metilados ó reducidos han sido encontrados en la mayoría de los tejidos vegetales, y los más frecuentes son concretamente el 4-HBA, el 3,4-dHBA y el vanillato.

Los productos de degradación de la lignina no sólo se encuentran en bosques y terrenos con presencia de árboles y vegetación sino en aguas residuales de industrias papeleras o de fabricación de muebles de madera. Cuando el vertido de residuos es frecuente y numeroso se produce un acúmulo de materia orgánica que los microorganismos no pueden degradar y los ciclos naturales se desequilibran. Las industrias papeleras son especialmente contaminantes y sus aguas residuales reciben el nombre de lejías negras. Son aguas altamente concentradas que provienen de la

etapa de digestión alcalina del proceso de producción de pulpa de papel y presentan un alto contenido en compuestos orgánicos como la lignina, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y distintos minerales (Vidal y col., 1992).

Al igual que existe una decoloración del efluente de las industrias donde se produce papel, los efluentes resultantes de la depuración de vinazas de azucarera , en procesos de producción de alcoholes, ó las aguas residuales de las almazaras (alpechines) también presentan una coloración típica debido a la presencia de derivados aromáticos en las aguas de vertido (González Benito y col., Madrid y col., 1992). En el caso de los alpechines la presencia en ácidos fenólicos en las aguas es enorme y se ha logrado in vitro la eliminación de los ácidos 4-hidroxifenilacético, vanílico, cafeico y siríngico por una cepa de *Phanerochaete flavidobrunnea*, perteneciente a los hongos de la podredumbre blanca de la madera.

Si bien los estudios de la degradación de la lignina se han dirigido principalmente al estudio de hongos con un mayor potencial lignolítico, se hace necesario estudiar también las bacterias con capacidad degradativa para aquellos compuestos derivados de la lisis fúngica. De esta manera, se podría combinar la acción de hongos y bacterias en los tratamientos de depuración de las aguas anteriormente citadas con el fin de aumentar notablemente su biodegradabilidad.

El 4-HBA , al ser un producto de síntesis natural es utilizado por varias estirpes bacterianas del suelo como fuente de carbono y energía. Sin embargo, los compuestos aromáticos con grupos hidroxilo en posición C 3, como es el caso del 3-HBA, son utilizados menos frecuentemente por los microorganismos del suelo.

Existen pocos datos acerca de la degradación del 3-HBA en bacterias. Se ha encontrado como uno de los productos de la degradación de la

lignina, y se cree que participa como intermediario en varias rutas metabólicas degradativas. Una de ellas es la transformación del 3-metoxibenzoato por *Pseudomonas aeruginosa* en 3-HBA que aparece por una hidroxilación dependiente de NADPH con la eliminación del grupo metilo (Ribbons y col., 1970). Este tipo de reacciones son interesantes porque muchos contaminantes contienen radicales metoxilos (CH₃-O-) en su estructura química.

En condiciones aerobias, el 4-HBA se transforma en ácido protocatéquico en prácticamente todas las bacterias estudiadas, aunque existen algunas especies que lo transforman en 2,4-DHBA. Sin embargo para la degradación del 3-HBA existen dos rutas descritas que se manifiestan con similar frecuencia: la del ácido gentísico y la del ácido protocatéquico, y existe una transformación menos frecuente en 2,3 DHBA.

En el metabolismo del benzoato y de benzoatos monohidroxilados en *Amycolatopsis* y *Streptomyces* spp. se observa que el benzoato se degrada vía catecol, el 3-HBA puede transformarse en 3,4-DHBA ó 2,5-DHBA , el 4-HBA en 3,4-DHBA y el 2-HBA en 2,5-DHBA ó catecol (Grund y col.,1990).

En *Pseudomonas testosteroni* 3 y 4-HBA se degradan a través del mismo intermediario, el ácido protocatéquico, que se rompe entre los carbonos 4 y 5 por acción de la protocatecuato 4,5 dioxigenasa (rotura *meta*). *Pseudomonas acidovorans* degrada el 4-HBA por la misma vía y con el mismo tipo de escisión que *Ps. testosteroni*, pero metaboliza el 3-HBA a través del ácido gentísico por acción de la gentisato oxigenasa (Wheelis y col., 1967; Harpel y col. 1990) .

El 4-HBA es también un intermediario de numerosas rutas bioquímicas en la degradación de diversos compuestos aromáticos. En

Pseudomonas, el benzoato se transforma en catecol mediante una descarboxilación, pero en *Trichosporeum cutaneum* se produce la conversión del benzoato en 4-HBA y la transformación en 3,4-DHBA (Anderson y col., 1980).

Es interesante la formación de hidroxiquinol a partir de 4 HBA que se produce por descarboxilación oxidativa del 3,4-DHBA en *Rhodotorula rubra*. El hidroxiquinol se transforma en 3-hidroximuconato y posteriormente en β -cetoadipato. El 3,4-DHBA en este mismo organismo, además de transformarse en hidroxiquinol por acción de la 3,4-DHBA hidroxilasa, puede ser sustrato de la 3,4-DHBA,3,4-dioxigenasa y convertirse en 3-carboximuconato. Ambos intermediarios: 3-hidroximuconato y 3-carboximuconato son degradados hasta succinato y acetilCoA vía β -cetoadipato (Wright y col., 1991).

Este compuesto con tres grupos hidroxilo, también se detecta en la degradación del benzoato en *T. cutaneum* y se forma por descarboxilación oxidativa tanto del 3,4-DHBA como del 2,5-DHBA (Anderson y col., 1980). Esto recuerda a la idea de Grant y Patel (1969) que proponían la existencia de descarboxilasas constitutivas para el gentisato, protocatecuato y ácido gallico (3,4,5-trihidroxibenzoato) en cultivos de *K. aerogenes* con 4-HBA como única fuente de carbono.

El estudio de la degradación de compuestos halogenados por su carácter contaminante y tóxico tiene una importancia especial. El 4-clorobenzoato (4-CBA) se transforma en 4-HBA por un proceso de deshalogenación/hidroxilación en especies como *Alcaligenes denitrificans* (van den Tweel y col., 1986), *Artrobacter sp.* (Marks y col., 1984; Muller y col., 1988) ó *Coryneform bacterium* NTB-1 (Groenewegen y col., 1990). En *Pseudomonas sp.* cepa CBS-3 se ha caracterizado y clonado una deshalogenasa capaz de transformar el 4-clorobenzoato en 4-HBA y se ha

comprobado que se trata de un complejo enzimático formado por tres proteínas con tres funciones distintas : la 4-CBA-CoA ligasa, la 4-CBA-CoA deshalogenasa y la 4-HBA-CoA tioesterasa (Thiele y col, 1987; Chang y col., 1992; Babbit y col., 1992). Un dato interesante es que el oxígeno utilizado en el proceso de hidroxilación/deshalogenación es obtenido del agua y no del O_2 , por ello esta reacción puede tener lugar a concentraciones bajas de O_2 . En todos los casos el 4-HBA es posteriormente convertido en 3,4 dHBA y metabolizado mediante escisión orto a través del β -ceto adipato.

Los microorganismos pueden también utilizar aceptores de electrones inorgánicos (NO_3^- , SO_4^{2-} , ó CO_2) y por ello tienen la capacidad de metabolizar ciertos sustratos en ausencia de O_2 . Esto ocurre en bacterias con un metabolismo dependiente de la luz (fotometabolismo), como las que tienen respiración con nitrato y las metanogénicas (Evans, 1977). Existe una amplia gama de compuestos aromáticos que pueden degradarse en anaerobiosis, formando también un importante eslabón en el ciclo del carbono. *Rhodospseudomonas palustris* y *R. gelatinosa* son bacterias fotosintéticas capaces de metabolizar benzoato, 3- y 4- hidroxibenzoato. Entre las bacterias desnitrificantes *Pseudomonas* PN-1 y *Moraxella* spp. son capaces de crecer a expensas de benzoato, hidroxibenzoatos y ácido protocatéquico. También hay entre las bacterias reductoras de nitrato dos especies que pueden utilizar benzoato e hidroxibenzoatos como *Desulfovibrio* y *Desulfococcus* spp. El grupo de bacterias que transforman una mayor variedad de compuestos aromáticos son las metanogénicas, que pueden crecer en benzoatos, tirosina, tolueno, clorobencenos, fenoles, catecol, etc. (Evans y Fuchs, 1988).

Los fenoles se metabolizan en anaerobiosis por un número elevado de bacterias desnitrificantes, sulfato-reductoras y metanogénicas, y es curioso observar que los ácidos benzoicos se encuentran como intermediarios en estas transformaciones (Londry y col., 1992). El 4- HBA aparece como intermediario en la degradación anaerobia del fenol a

benzoato por un conjunto ó consorcio de bacterias metanogénicas, lo que constituye un proceso de *para*-carboxilación (Sharak Genthner y col., 1991). Este mismo tipo de reacción se observa en *Delsulfobacterium phenolicum*, bacteria sulfatoreductora que metaboliza fenol, 4-HBA y otros compuestos aromáticos como la anilina (Bak y Widdel, 1986) y en bacterias reductoras de nitrato, como *Pseudomonas* PN-1 (Tschech y Fuchs, 1989) En la degradación anaerobia del p-cresol por una cepa identificada como *Achromobacter* sp. se detectaron como intermediarios 4-hidroxi benzilalcohol, 4-hidroxi benzilaldehido y 4-HBA, lo que indica una oxidación progresiva del grupo metilo a grupo ácido por acción de un flavocitocromo (Hopper y col., 1991).

También *Rhodopseudomonas palustris* que presenta un metabolismo fotosintético es capaz de degradar el 4-HBA en condiciones anaerobias mediante activación y rotura del anillo aromático por un mecanismo distinto al que se produce en condiciones aerobias y distinto al de *para*-carboxilación. En este caso, el anillo se activa por acción de la 4-hidroxibenzoato-CoA ligasa formándose el derivado CoA tioester (Merkel y col., 1989).

2.3. SISTEMAS DE TRANSPORTE.

Para que un compuesto pueda ser utilizado como nutriente y degradado a través de una ruta catabólica es necesario que exista un mecanismo de introducción en el interior de la célula bacteriana. El transporte de moléculas a través de membranas biológicas puede ocurrir mediante tres procesos diferentes: difusión simple, difusión facilitada por una proteína transportadora y transporte activo. Hay un cuarto sistema que está reservado casi exclusivamente a los carbohidratos y que se denomina sistema PTS (sitema fosfotransferásico) (Fig. 7).

El transporte activo se realiza en contra del gradiente de concentración con intervención de una proteína transportadora (permeasa) integrada en membrana, que presenta especificidad de sustrato y es capaz de introducir en la célula compuestos que se encuentran en el entorno natural a baja concentración. Por esta razón este tipo de transporte no ocurre de manera espontánea, sino que se encuentra acoplado al estado energético de la célula.

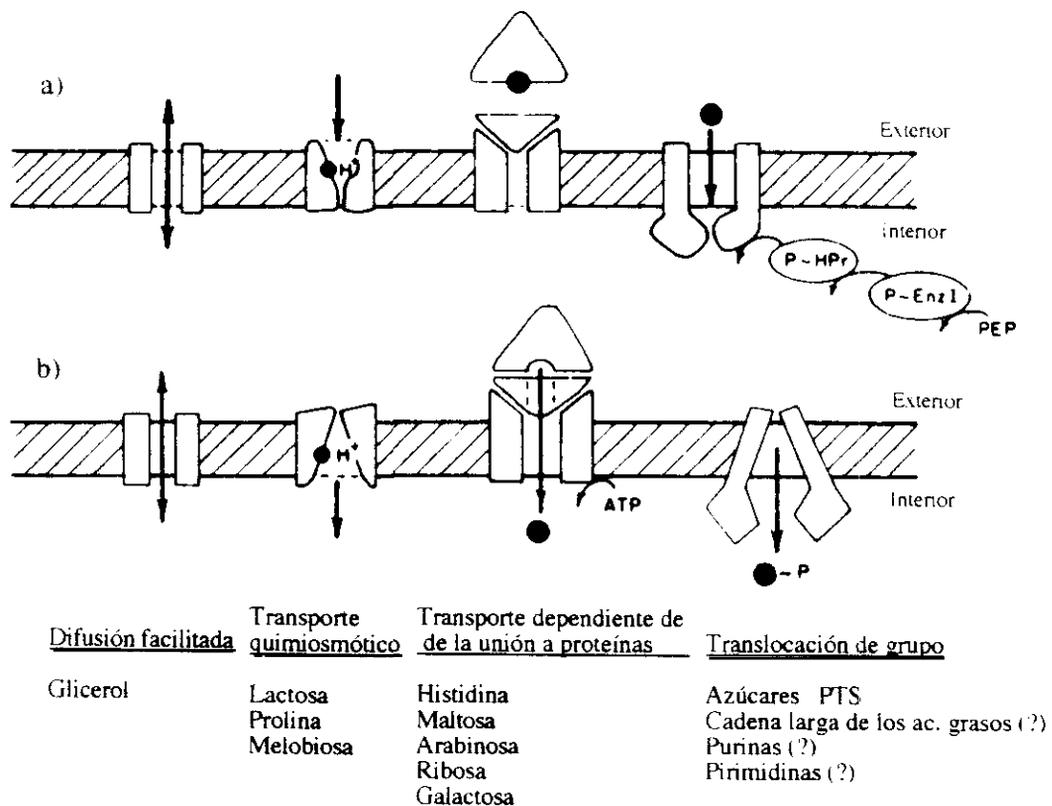


Figura 7: Posibles modelos de los sistemas de transporte a través de la membrana citoplasmática. La difusión facilitada y los sistemas de transporte dirigidos por iones requieren la expresión sólo de un gen, mientras que el transporte dependiente de la unión de proteínas y los sistemas PTS ó de translocación de grupo requieren varios productos génicos. En la difusión facilitada el sustrato entra y sale de la célula a través de un poro específico. Los sistemas de transporte activos requieren una unión entre el sustrato y proteínas de membrana estando acoplados a la fuente de energía apropiada. (a) Cambio conformacional en las proteínas transportadoras y entrada del sustrato en el interior de la célula (b).

El mecanismo de transporte en los sistemas activos puede o no implicar una transformación del sustrato. Así, en el sistema PTS existe una translocación del grupo fosfotransferasa y el sustrato transportado se modifica. En el transporte de azúcares en *E. coli*, el proceso está acoplado a la transformación del fosfoenolpiruvato en piruvato. En el resto de los sistemas de transporte bacterianos generalmente no se llevan a cabo procesos que modifiquen el sustrato. Existe un estado de alta afinidad por el sustrato en el que la permeasa se orienta hacia el exterior de la célula formándose el complejo permeasa-sustrato. A expensas de energía metabólica de origen diverso el complejo es modificado, con lo que la permeasa se orienta hacia el interior, pierde afinidad por el sustrato y se disocia el complejo, liberándose el sustrato que ha sido transportado (Fig 7)

Los gradientes iónicos y las diferencias de potencial a través de la membrana plásmática proporcionan a la célula una fuente de energía para que puedan realizarse los procesos de transporte activo. En bacterias, esta energía se obtiene por hidrólisis de ATP ó por la fuerza protomotriz generada en la cadena de transporte electrónico. La fuerza protomotriz (Δp) está compuesta por dos componentes: el potencial de membrana ($\Delta \Psi$) y el gradiente de pH (ΔpH), los cuales están relacionados por la siguiente expresión:

$\Delta p = \Delta \Psi - Z \cdot \Delta \text{pH}$, donde Z es igual a $2,303 RT/F$ (59 a 25°C), y convierte el término logarítmico de concentración en mV.

Los ácidos y bases débiles con características polares bajas pueden atravesar la membrana con relativa facilidad distribuyéndose de tal manera que el conjunto de moléculas no polares sea igual a ambos lados de la membrana, y siendo la concentración de las distintas especies moleculares (cargadas y no cargadas) a cada lado función del gradiente de pH (Kihara y col., 1981). En este aspecto es necesario indicar que los sistemas de transporte de compuestos cargados han sido ampliamente

estudiados en varias especies procariotas y eucariotas.

Sin embargo, existe poca información acerca del sistema de transporte de compuestos aromáticos en bacterias y en ocasiones, cuando se desconoce el mecanismo, se considera que tiene lugar por difusión pasiva ó facilitada. Los sistemas mejor estudiados son los del transporte de aminoácidos aromáticos en *E. coli* K 12 (Brown,1971; Whipp , 1980) y de ácidos carboxílicos aromáticos en *Rhodopseudomonas* y *Pseudomonas* spp. (Meagher y col., 1972; Thayer y col., 1976; Merkel y col., 1989).

Los mecanismos de transporte específicos del benzoato y su posible precursor, el mandelato fueron estudiados en *Pseudomonas putida* por Higgins y col. (1972) y Thayer y col. (1982) y en *Bacterium* NCIB 8250 por Cook y col. (1972). Estos investigadores propusieron un sistema de transporte inducible para el mandelato en ambos tipos de bacterias, a bajas concentraciones de mandelato extracelular y con la implicación de la síntesis de un factor para el transporte activo de este compuesto. Esta hipótesis se contrasta con la propuesta por Hegeman (1966) en la que el mandelato entraría en *P. putida* por difusión pasiva. Hegeman, detectó transporte en células inducidas y no inducidas y no se observó ninguna acumulación celular interna del mandelato.

El transporte del benzoato en *Bacterium* NCIB 8250 parece ocurrir por una difusión facilitada, sin evidencias claras de un transporte dependiente de energía. Un sistema de transporte similar sería el que seguiría este compuesto en *Rhodopseudomonas palustris*, que en condiciones anaerobias se transformaría rápidamente en benzoil CoA tras haber atravesado la membrana por difusión simple o facilitada, con un sistema de transporte que no se vería afectado por variaciones de pH en la membrana externa (Harwood y col., 1986). Sin embargo, estudios realizados en *Pseudomonas putida* ponen de manifiesto un sistema de transporte activo para el benzoato, cuya energía se obtendría del potencial

de membrana y no por acoplamiento a la hidrólisis de ATP. Este sistema estaría controlado por el gen *benP*, cuya mutación reduce la capacidad de transportar benzoato, pero no mandelato (Thayer y col, 1982)

La primera referencia de un sistema de transporte altamente específico y acoplado a la fuerza protomotriz la encontramos en el estudio del transporte de un ácido haloaromático, el 4-clorobenzoato, en *Coryneform bacterium* NTB-1. Experimentos realizados con distintos inhibidores de la cadena respiratoria e ionóforos que anulan los gradientes de pH ponen de manifiesto un mecanismo "simport" de protones que permitiría el transporte del 4-clorobenzoato en contra de su gradiente de concentración (Groenewegen y col., 1990). El 4- hidroxibenzoato formado a partir del 4-clorobenzoato no es un sustrato para la permeasa responsable de transportar el halobenzoato. Este dato y el hecho de que *C. bacterium* sea capaz de utilizar 4-HBA como única fuente de carbono y energía sugieren la existencia de un sistema de transporte diferente para este compuesto en células NTB-1.

Un estudio muy interesan para conocer el mecanismo de transporte del β -cetoadipato en *Pseudomonas putida* es el realizado por Ornston y col. (1976) . Estos investigadores comprobaron la existencia de un sistema de transporte inducible bajo condiciones fisiológicas normales y dependiente de energía. El β -cetoadipato es intermediario de numerosas rutas degradativas, y la existencia de un sistema de transporte inducible indica su papel como nutriente selectivo y como sustrato de crecimiento potencial en el entorno natural. Por ello parece jugar un papel determinante en la evolución de mecanismos de inducción característicos de las pseudomonas fluorescentes, y por extensión podría ser determinante en otras especies, como por ejemplo en los géneros *Acinetobacter*. ó *Klebsiella*.

Entre las características nutritivas de las bacterias móviles, nos encontramos con la posibilidad de producir respuestas quimiotácticas ante las variaciones de concentración de compuestos químicos en el medio en el que se encuentran. Este tipo de respuestas está estudiado intensamente en bacterias entéricas, como *E. coli* y *Salmonella* spp. que responden positivamente hacia distintos azúcares (Adler y col., 1973) y aminoácidos (Mesibov y col., 1972;). En contraste, *Pseudomonas* spp. se encuentran atraídas hacia ácidos orgánicos que posteriormente utilizan como sustratos de crecimiento (Moulton y col., 1979; Harwood y col., 1984). Ácidos aromáticos como benzoato, 4- HBA, mandelato, salicilato, m- o- y p-toluato son quimioatrayentes para *Pseudomonas putida* y quimiorepelentes para *E. coli* y *Salmonella* spp.

2.4. ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACION: HIDROXILASAS Y DIOXIGENASAS

Una vez que los compuestos aromáticos han entrado en la célula pueden ser utilizados como sustratos por las enzimas específicas, cuya acción depende de la estructura química del compuesto y de las propiedades de las enzimas. Con ello se inicia una ruta catabólica que permite obtener la energía y los intermediarios necesarios para sintetizar los componentes celulares y llevar a cabo las funciones fisiológicas necesarias.

Los microorganismos, las plantas y los animales tienen el mismo mecanismo de ataque para los compuestos orgánicos derivados del benceno: la utilización del oxígeno molecular como activador biológico. La inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato necesita energía que es suministrada por el poder reductor de, principalmente dos cofactores enzimáticos: el NADH ó el NADPH. Con este tipo de reacciones redox las estructuras estables e inertes como las del benceno y sus derivados pueden

ser utilizadas por las células como fuentes de carbono y energía.

Además de su papel predominante en el metabolismo celular de organismos aerobios como aceptor de electrones en la cadena respiratoria, en las reacciones de oxigenación anteriormente indicadas se encuentra una nueva y fundamental función fisiológica del oxígeno. Este tipo de reacciones se definen por la oxidación de un compuesto orgánico ó inorgánico a través de la inserción directa de uno o dos átomos de oxígeno procedentes del O₂ molecular.

Las enzimas encargadas de introducir el oxígeno molecular en sustratos orgánicos recibieron el nombre genérico de oxigenasas, diferenciándose las que incorporan al sustrato los dos átomos de la molécula de oxígeno, dioxigenasas, de las que incorporan sólo un átomo al sustrato con la conversión simultánea del segundo átomo en agua, monooxigenasas. Este último grupo de enzimas anteriormente se denominaron hidroxilasas puesto que hidroxilaban compuestos y, también oxigenasas de función mixta aludiendo a la incorporación de un átomo de la molécula de O₂ al sustrato.

Ambos tipos de oxigenasas requieren cofactores que les permitan reaccionar con el oxígeno, y por ello poseen en su estructura un metal de transición ó una molécula de flavina ó pteridina que interacciona con el O₂. En estos procesos se generan formas altamente reactivas, como los radicales hidroxilo.

Las oxigenasas juegan un papel fundamental en las rutas catabólicas de los microorganismos iniciando la degradación de compuestos aromáticos y también de hidrocarburos saturados. Por ello, han sido extensivamente estudiadas, y se han determinado sus mecanismos de acción, especificidad y regulación. Estos estudios cobran notable importancia en la aplicación de enzimas microbianas en biotecnología

ambiental e industrial. Las oxigenasas en organismos superiores son menos abundantes, pero no por ello menos importantes. En los mamíferos se encuentran oxigenasas que están implicadas en la hidroxilación de esteroides, en la síntesis de neurotransmisores y en la desintoxicación de sustancias nocivas.

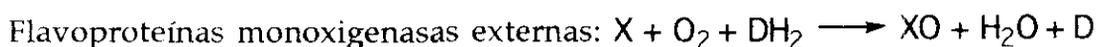
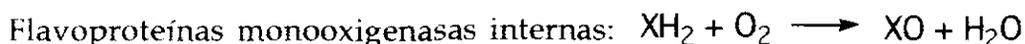
A medida que se desarrollan nuevas técnicas de investigación, se profundiza en el conocimiento de estas enzimas. Los estudios bioquímicos y los físicos se combinan con técnicas de genética molecular para llegar a establecer las posibles relaciones que existen entre las distintas oxigenasas (Harayama y col., 1992). Así, mediante la determinación de las secuencias primarias de muchas oxigenasas se han podido establecer homologías y clasificarlas en una serie de familias de proteínas. Entre las proteínas de la misma familia, las secuencias de las regiones donde se localiza el sitio de unión al cofactor se encuentran fuertemente conservadas. En aquellas proteínas de distinta familia se han encontrado homologías locales en las secuencias de las regiones donde se une el cofactor.

En los compuestos aromáticos las monooxigenasas y las dioxigenasas son las enzimas de mayor importancia por ser las enzimas clave que inician el proceso de degradación para la utilización de los carbonos contenidos en las estructuras cíclicas insaturadas de los derivados del benceno.

- Monooxigenasas o hidroxilasas

Las monooxigenasas son flavoproteínas por presentar un grupo prostético FAD en su estructura y se subclasifican basándose en el donador de electrones implicado en la reacción catalítica. Si ellas mismas sirven de donadores de electrones se denominan monooxigenasas internas, y si requieren un reductor externo como NADH o NADPH para su actividad catalítica se denominan monooxigenasas externas. Se puede representar

las reacciones que catalizan de la siguiente forma esquemática:



La mayoría de las flavoproteínas monooxigenasas externas son de origen bacteriano y pueden inducirse por el crecimiento de un microorganismo en cultivos que contengan el sustrato como única fuente de carbono. En muchos casos el sustrato es un compuesto aromático y la activación del núcleo bencénico mediante hidroxilación se lleva a cabo por este tipo de enzimas. La mayoría de las hidroxilasas introducen un grupo OH en posición *orto* respecto del preexistente en la estructura, como en el caso de la salicilato hidroxilasa (White-Stevens y Kamin, 1972) o la 4-hidroxibenzoato hidroxilasa (Howell y col., 1972). También existen enzimas que insertan el grupo OH en posición *para* como la 3-hidroxibenzoato-6 hidroxilasa (Groseclose y col., 1973). La 4-hidroxifenilacetato 1-hidroxilasa de *Pseudomonas acidovorans* transforma el ácido 4-hidroxifenilacético en homogentisato, desarrollando un mecanismo peculiar en el que moviliza el OH insertado de la posición C-1 a la C-2 (Hareland y col., 1975). Si el compuesto no está hidroxilado pueden actuar dos hidroxilasas secuencialmente.

La mayoría de las monooxigenasas catalizan reacciones de monohidroxilación de fenoles sustituido y constituyen un componente enzimático sencillo. Sin embargo, también se encuentran entre las monooxigenasas componentes multienzimáticos, como la fenol y la 4-tolueno monooxigenasa (Nordlund y col., 1990; Whited y col., 1991).

Entre las flavoproteínas hidroxilasas, existen subgrupos atendiendo al tamaño de sus subunidades. Las 4-HBA, 4-hidroxifenilacetato y salicilato hidroxilasas tienen alrededor de 45 kDa (Schreuder y col., 1988; Raju y col., 1988; You y col., 1990), mientras que otras hidroxilasas tienen un peso

molecular entre 60 y 80 kDa, como la fenol hidroxilasa (Nurk y col.,1991), la 2,4 diclorofenol hidroxilasa (Perkins y col., 1990) ó la nitrofenol hidroxilasa (Zeyer y col., 1988) . Las 4-HBA, 4-hidroxifenilacetato 3-, salicilato y fenol hidroxilasas están incuídas dentro de un mismo subgrupo también por sus mecanismos de reaccion similares.

La estructura de la p-hidroxibenzoato hidroxilasa está estudiada ampliamente en *Pseudomonas* spp. En *P. fluorescens* han sido determinadas sus estructuras primaria y terciaria (Hofsteenge y col, 1980; Wierenga y col., 1982 ; Hofsteenge y col., 1983; Weijer y col, 1983). A temperatura ambiente la enzima es un dímero con subunidades idénticas, aunque pueden existir formaciones de oligómeros más elevadas. El monómero está formado por una cadena polipeptídica con 394 aminoácidos y existe una molécula de FAD unida al monómero. En cuanto a su estructura tridimensional, cinco de las cisteínas no están implicados en puentes disulfuro y el centro activo está formado por tres tirosinas, una arginina, una serina y una treonina (Wierenga y col, 1982).

El mecanismo de acción de la p-hidroxibenzoato hidroxilasa ha sido caracterizado (Visser, 1983; Schereuder y col.,1988; Entsch y Ballou, 1989) y se ha denominado de " sustitución concertada". El ciclo catalítico ha sido determinado con precisión y está esquematizado en la fig. 8: En primer lugar se forma un complejo formado por la 4-hidroxibenzoato hidroxilasa y sustrato (2), que se hace ternario al incorporarse el NADPH (3). A continuación, el NADP es liberado y el FAD de la enzima es reducido por NADPH a FADH₂ (4), el cual reacciona rápidamente con el oxígeno (5) para formar el intermediario flavín 4a-hidroxiperóxido. Esta especie oxigenada es muy reactiva y reacciona rapidamente con el 4-HBA para formar ácido protocatéquico y flavín 4a-hidróxido (6). El flavin 4a-hidróxido es inestable y espontáneamente se descompone en agua y flavin oxidado (Schereuder y col., 1988). Finalmente el producto de la reacción, el 3,4-DHBA, se separa quedando la flavoproteína oxidada y preparada para

iniciar un nuevo ciclo catalítico (1).

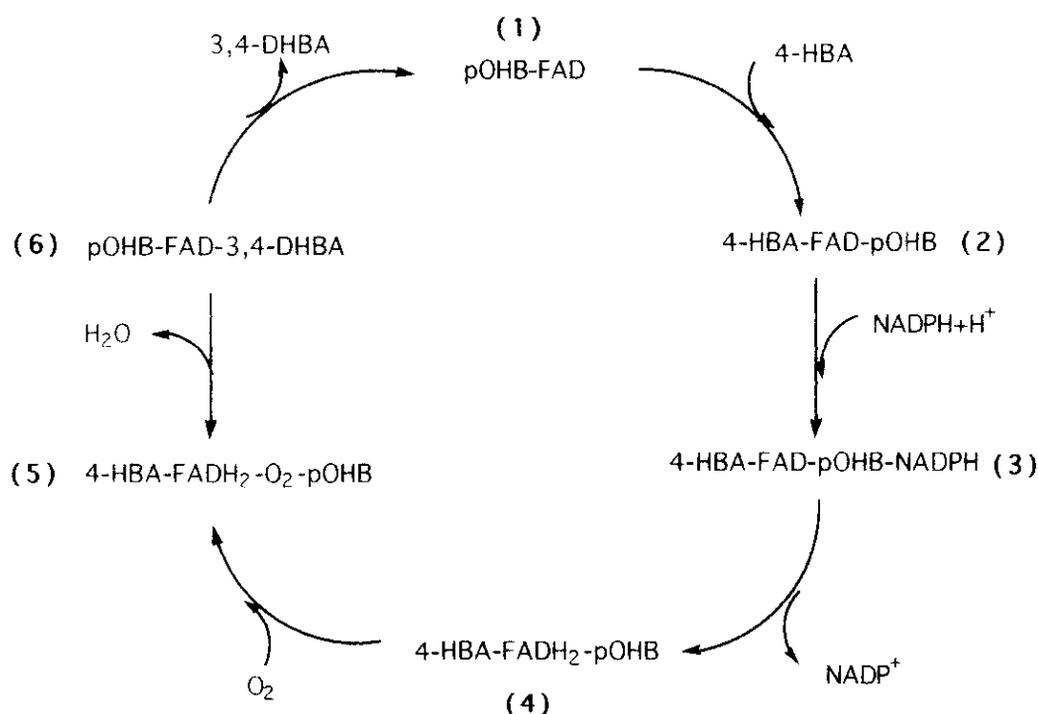


Figura 8: Esquema del mecanismo de acción de la 4-HBA hidroxilasa (pOHB-FAD)

La salicilato hidroxilasa que cataliza la descarboxilación oxidativa del 2-hidroxibenzoato es codificada por el gen *nahG* del plásmido NAH7 de *Pseudomonas putida* y presenta un 25% de homología con la 4-HBA hidroxilasa de *Ps. fluorescens* (You y col., 1991), siendo la zona más conservada la región de unión al cofactor. Esto parece sugerir que ambos tipos de enzimas tienen un origen común. Otras enzimas como la 2,4-diclorofenol hidroxilasa, que presenta un tamaño tan diferente a la salicilato y 4-HBA hidroxilasa parece que han tenido una evolución divergente, hecho que ratifica la ausencia de similitud entre esta enzima y la 4-HBA hidroxilasa (Perkins y col., 1990)

La mayoría de las hidroxilasas catalizan inserciones en *orto* respecto del grupo hidroxilo preexistente, sin embargo la 3-HBA 6-hidroxilasa

cataliza una *para* hidroxilación. Esta enzima ha sido aislada de *Pseudomonas aeruginosa* (Groseclose y col., 1973), *Pseudomonas cepacia* (Wang y col., 1987) y *Micrococcus sp.* (Rajasekharan y col, 1990) estando formada en todos los casos por monómeros de 85 kDa, 44kDa, y 70 kDa respectivamente.

- Dioxigenasas

Como hemos mencionado anteriormente, las dioxigenasas catalizan la inserción de dos átomos de O₂ en el sustrato con posterior escisión del anillo aromático. Estas enzimas generalmente llevan un metal en su estructura que suele ser Fe (II) ó Fe (III). Se pueden distinguir dos clases de dioxigenasas en cuanto su modo de escindir el anillo aromático: a) Dioxigenasas que requieren NADH ó NADPH como donantes de electrones y b) dioxigenasas que no necesitan reductor externo (Fig. 9)

Aunque las dioxigenasas generalmente actúan sobre compuestos hidroxilados existen dioxigenasas que hidroxilan doblemente el sustrato como ocurre en el metabolismo de productos tan persistentes como el benceno, tolueno, etilbenceno y naftaleno (Dagley, 1975). A partir de estos compuestos se forman cis-dioles, como el catecol.

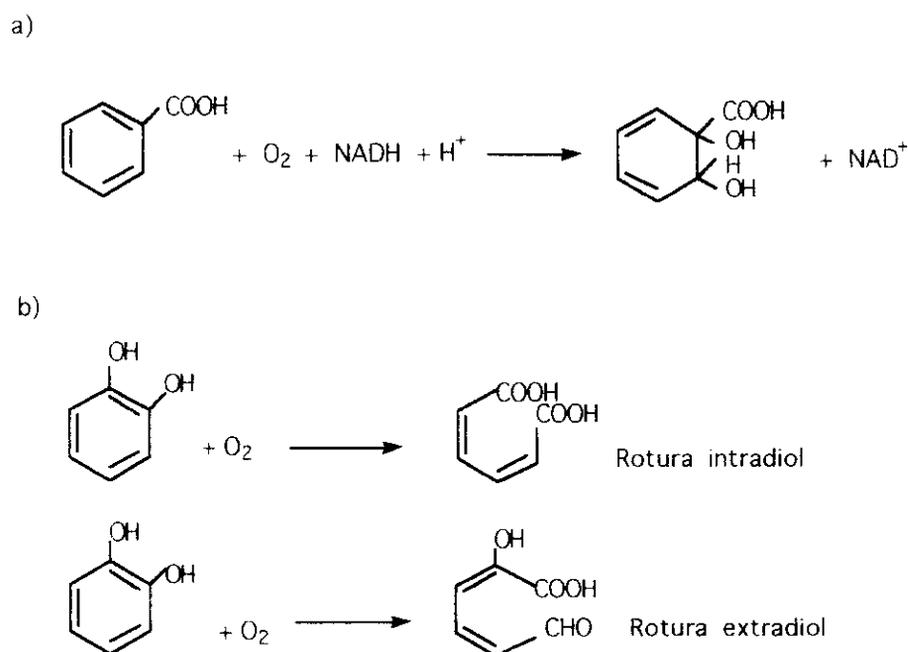


Figura 9: Mecanismos de escisión catalizados por dioxigenasas. a) Dioxigenasas que requieren NADH ó NADPH. b) Dioxigenasas que no requieren reductor externo.

Todas las dioxigenasas que hidroxilan anillos aromáticos pero sin escisión están compuestas por una o dos subunidades asociadas formando una configuración α_n o $(\alpha\beta)_n$ y poseen cofactores comunes, un centro con hierro y sulfuro [2Fe-2S], llamado Rieske y un hierro no hemo mononuclear Fe (II), ambos asociados con la subunidad α en las enzimas tipo $(\alpha\beta)_n$. La 4-cloro fenilacetato de *Pseudomonas* CBS tiene configuración α_3 , con subunidades de 50 kDa y el cofactor no tiene hierro sólo está formado por el centro tipo Rieske (Markus y col., 1986). La benceno 1,2 dioxigenasa de *Pseudomonas putida* (Irie y col., 1987) está formada por dos subunidades, de 50 y 20 kDa, y presenta los dos cofactores en su estructura. Las subunidades α son similares en todas las enzimas estudiadas, incluso en el peso molecular, al igual que las subunidades β . De hecho, una comparación de secuencias de aminoácidos sugieren que las subunidades α de las benzoato, toluato, benceno, tolueno y naftaleno oxigenasas

derivan de un antecesor común, y las β de otro distinto pero común a todas (Neidle y col, 1991).

Los sustratos de reacción de las dioxigenasas que escinden el anillo aromático son compuestos con al menos dos grupos OH. Si los dos grupos hidroxilo están en posición *orto*, la rotura puede ser intradiol o extradiol. Si los grupos están en posición *para*, como es el caso del gentisato y el homogentisato, la rotura aparece entre el grupo carboxilo ó acetilo y el grupo OH adyacente.

La primera dioxigenasa de la que se obtuvo su estructura primaria fue de la catecol 2,3 dioxigenasa de *Pseudomonas putida* mt-2 que está codificada por el gen *xyIE* del plásmido TOL (Nakai y col., 1983). Esta enzima pertenece al grupo de las que escinden extradioles y está formada por cuatro subunidades idénticas de 32 kDa y contiene un ión Fe (II) esencial catalíticamente en cada subunidad. El producto de reacción es el semialdehído 2- hidroximucónico que es de color amarillo; debido a esta característica el gen estructural *xyIE* puede utilizarse para conocer su expresión en experimentos de biología molecular.

En cuanto a las relaciones entre las dioxigenasas de este grupo, se han comparado las secuencias de aminoácidos de cuatro catecol 2,3-dioxigenasas, una 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa y tres 2,3-dihidroxibifenil dioxigenasa, de *Pseudomonas*, y se ha observado que pertenecen a la misma superfamilia (Harayama y col., 1989). Sin embargo, la catecol 2,3 dioxigenasa de *Alcaligenes eutrophus* no presenta ninguna similitud con esta familia (Kabisch y col., 1990), por lo que se piensa que las catecol 2,3 dioxigenasas tienen dos orígenes diferentes. Así mismo, entre esta enzima y la subunidad β de la 4,5 protocatecato dioxigenasa de *Pseudomonas paucimobilis* existe una cierta similitud (Noda y col., 1990).

A diferencia de las enzimas que realizan escisión extradiol y que tienen Fe (II), las que rompen intradiol, como la catecol 1,2 dioxigenasa y la protocatecuato 3,4 dioxigenasa contienen como grupo próstético un no hemo, de hierro Fe(III). Las estructuras de estas enzimas son variables, pueden presentar dos subunidades diferentes, $[\alpha\beta\text{-Fe}^{3+}]_n$, ó ser un polipéptido sencillo, $[\alpha\text{-Fe}^{3+}]_n$. La 3,4 protocatecuato dioxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* está compuesta por subunidades diferentes de 23 y 27 kDa, mientras que la catecol 1,2 dioxigenasa de *Pseudomonas arvilla* aparece frecuentemente compuesta por un tipo de subunidad de 30 kDa, ó 32 kDa que se pueden asociar entre sí. Existen homologías entre las subunidades α y β de estas dos enzimas en cuanto a su estructura primaria, por lo que se ha pensado que proceden de un antecesor común (Harayama y col., 1992).

La gentisato 1,2 dioxigenasa, que escinde el anillo aromático entre el carbono que lleva el grupo carboxilo y el que lleva el grupo hidroxilo, de *Pseudomonas acidovorans* y *Comamonas testosteroni* está formada por 4 subunidades de un polipéptido sencillo de 40 kDa: $(\alpha\text{Fe})_4$ y contiene Fe (II) como cofactor (Harpel y col., 1990).

2.5. REGULACION Y ASPECTOS GENETICOS

En el estudio de la degradación de compuestos aromáticos se ha mencionado las diferentes rutas catabólicas que pueden seguir los distintos nutrientes, entre ellos el 3- y 4-hidroxibenzoato. También se ha hecho referencia a los sistemas de transporte e hidroxilación del anillo aromático como requisitos previos a la escisión del núcleo bencénico. En este apartado se abordará el estudio de los mecanismos reguladores de la expresión de las distintas enzimas que intervienen en una ruta catabólica, y la organización de los genes que las codifican.

En el metabolismo microbiano existen enzimas catalíticas que sólo se requieren bajo determinadas condiciones de crecimiento. Si un microorganismo dispone de los sustratos empleados en condiciones fisiológicas normales, es razonable que no se sintetizen otras enzimas que son innecesarias para metabolizar estos compuestos. Sin embargo, cuando el nutriente que dispone el microorganismo no es un fuente de carbono habitual se induce la síntesis de enzima ó enzimas necesarias para su catabolismo. Este hecho está de acuerdo con el principio de economía que rige todo mecanismo vital y la existencia de un proceso de regulación de la síntesis de enzimas.

En el caso de las rutas degradativas, esta regulación ocurre mediante procesos de inducción. La inducción de las enzimas catabólicas puede ser coordinada, donde todas las enzimas se encuentran bajo el control de un inductor, ó secuencial, donde existen varios inductores. En la degradación de compuestos aromáticos el tipo de inducción suele ser secuencial, de esta manera los microorganismos economizan y sintetizan sus enzimas de forma gradual.

Los genes de las enzimas inducibles que están coordinadas se

encuentran adyacentes en el genoma bacteriano y forman parte de una unidad reguladora u operón con un promotor y un operador. En la regulación de tipo secuencial hay varios operones cada uno regulado por su inductor correspondiente.

La inducción de los operones puede presentar dos tipos de control: positivo y negativo. En el primer caso, el inicio de la transcripción en el promotor necesita de la presencia de una proteína reguladora activada por el inductor. En el segundo caso, la proteína reguladora activada por el inductor, se une a un represor impidiendo a éste bloquear el operador, lo cual permite el inicio de la transcripción a nivel del promotor.

- Organización genética

Los genes que codifican las enzimas de las ruta catabólicas de compuestos aromáticos se encuentran unas veces en plásmidos naturales y otras formando parte del cromosoma. La ruta del β -cetoadipato utilizada en la degradación del catecol y protocatecuato, así como rutas superiores asociadas con ella, están codificadas en el cromosoma. Sin embargo, las enzimas de las rutas con escisiones tipo *meta* suelen estar codificadas en plásmidos (Harayama y Timmis, 1992). También se encuentran codificadas en plásmidos rutas de compuestos haloaromáticos como el 3-clorocatecol o el 2,4- diclorofenoxiacetato .

Las rutas que primero se analizaron genéticamente fueron aquellas cuyos genes se encontraban en plásmidos por la facilidad de manejo de estos elementos frente al DNA cromosómico. Así, la ruta para la degradación de tolueno/xileno ha sido exhaustivamente estudiada. Esta ruta está codificada en *Pseudomonas putida* por el plásmido TOL pWWO y los genes estructurales se encuentran organizados en dos operones. Un operón *xyl* CMABN codifica las enzimas responsables de la oxidación del tolueno/xileno a benzoato/toluato, mientras que el otro operón

*xyl*XYZLTEGFJQKIH codifica las enzimas responsables de la transformación del benzoato/toluato en intermediarios del ciclo de Krebs. Estos operones catabólicos están regulados por los productos de los genes *xyiS* y *xyiR*. (Fig. 10)

Se ha estudiado también la organización de los genes *nah* en el plásmido NAH7 que codifica las enzimas necesarias para la completa degradación del naftaleno vía escisión *meta* del catecol (Kurkela y col.,1988) y la organización del operón *tod* responsable de la oxidación del tolueno vía escisión *meta* del 3- metilcatecol con localización cromosómica (Zylstra y col.,1989). (Fig. 10)

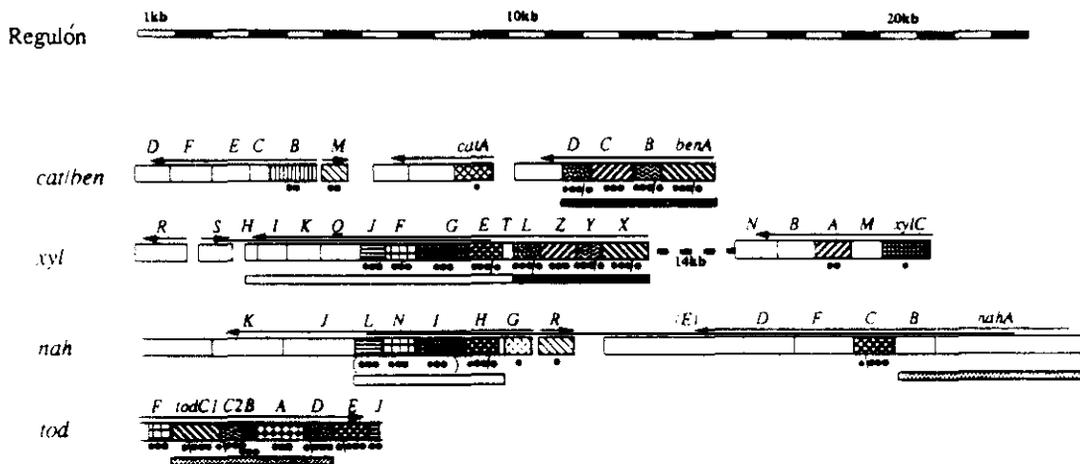


Figura 10: Comparación de diferentes regulones que codifican rutas de compuestos aromáticos en diferentes microorganismos. El tamaño de los genes viene indicado en la parte superior, y la dirección de la transcripción está indicada con flechas. Los genes *cat/ben* codifican el metabolismo del benzoato en *Acinetobacter calcoaceticus*. Los genes *xyl* del plásmido TOL tienen 4 unidades transcripcionales. Los genes *nah* del plásmido NAH7 codifican para la degradación del naftaleno y salicilato, se agrupan en dos grandes clusters con un gen regulador *nahR*. Los genes *tod* son cromosomales y codifican para la degradación del tolueno en *Pseudomonas putida* F1. (van der Meer y col., 1992)

- pobA*: p-hidroxibenzoico hidroxilasa
- pcaA* ó *pcaHG* : protocatecato 3,4-dioxigenasa (subunidades α y β)
- pcaB*: γ -carboximuconato cicloisomerasa
- pcaC*: γ -carboximuconolactona descarboxilasa
- pcaD* y *catD*: β -ceto adipato enol-lactona hidrolasa
- pcaII* y *cat II*: β -ceto adipato succinil-CoA transferasa (subunidades α y β)
- pca F* y *cat F*: β -ceto adipil-CoA tiolasa.
- benABC*: benzoato 1,2-dioxigenasa
- benD*: 1,2-dihidroxi-ciclohexa-3,5-dien-1-carboxilato deshidrogenasa
- catA*: catecol 1,2-dioxigenasa
- cat B*: cis,cis-muconato cicloisomerasa
- cat C*: mucolactona isomerasa

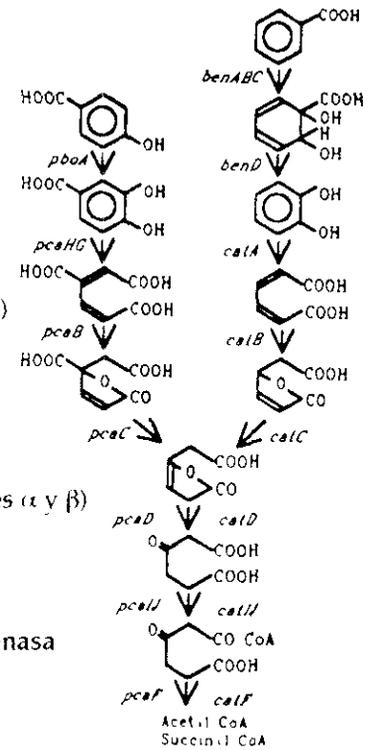
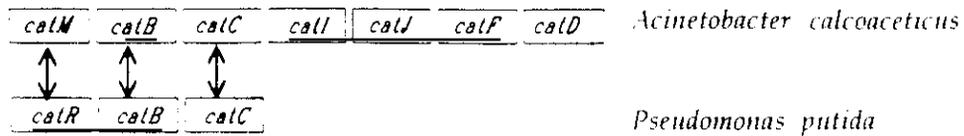
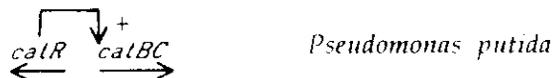


Figura 11: Nomenclatura de los genes estructurales de las enzimas implicadas en la ruta del β -ceto adipato

En *Acinetobacter calcoaceticus* los genes para la degradación del benzoato a través de la escisión *orto* están localizados en el cromosoma en un fragmento de 15 Kb y organizados en tres operones (Fig. 10). El primer operón consta de los genes estructurales *benABCD* que transforman el benzoato en catecol (Fig.11) y existe una ORF con función desconocida. El siguiente operón es el *cat A*, que codifica para la catecol 1,2 dioxigenasa que transforma el catecol en cis,cis-muconato y dos ORF funcionalmente desconocidas. El tercer operón, *cat BCEFD* codifica las enzimas que transforman el cis,cis-muconato en los intermediarios del ciclo de Krebs vía β -ceto adipato (Doten y col, 1987). El gen regulador *cat M* se localiza entre los operones *cat A* y *cat BCEFD* (fig. 10) y ejerce un control negativo cuyo efector es cis,cis muconato.



En *Pseudomonas putida* la organización es parecida y el gen regulador *catR* se encuentra entre *catA* y *catB*, sin embargo en *P. aeruginosa* existe también un regulador positivo pero no se encuentra entre estos dos operones. El gen *cat R* es activado por *cis,cis* muconato.



En la degradación del 4-HBA vía protocatecuato, los genes también se encuentran en el cromosoma. En *Acinetobacter calcoaceticus* están asociados formando dos operones, uno formado por el gen *pobA*, que codifica la 4-HBA hidroxilasa, y otro el *pcaEFDBCGH* separado unas 5 kb del anterior, que codifica el resto de las enzimas de la ruta (Hughes y col., 1988; Hartnett y col., 1990).



La organización de los genes *pca* en *Pseudomonas putida* es diferente, el *pcaA* constituye un operón inducido por ácido protocatéquico, mientras que el operón *pcaBDC* está inducido por β -ceto adipato.



La comparación de la estructura de genes *pca* y *cat* se puede observar en la fig. 12. Los productos de estos genes catalizan reacciones similares y las enzimas que catalizan la zona común de la degradación del β -ceto adipato es idéntica, mientras que los otros genes están ordenados en orden inverso.

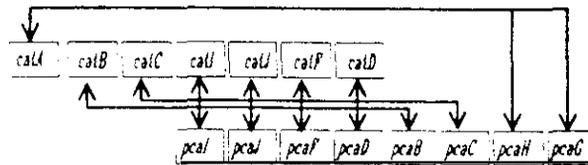


Figura 12: Comparación de los genes *cat* y *pca* en *Acinetobacter calcoaceticus*. Cuando el orden de estos genes fue comparado se observó que estaban conectados de una manera similar.

- Regulación del metabolismo degradativo

La regulación de las secuencias catabólicas se ejerce principalmente a través de un control transcripcional. En la mayoría de los casos el control es positivo pero no todos los metabolitos de la ruta ó sus análogos estructurales son inductores.

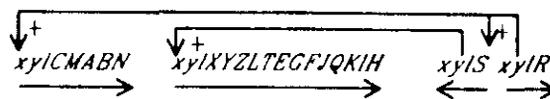
Las enzimas de la ruta del β -cetoacido están controladas de manera diferente en diferentes especies, si bien todos los mecanismos implican una inducción coordinada de las enzimas cuando el sustrato está disponible en el medio. En *Acinetobacter calcoaceticus* el ácido protocatéquico induce las enzimas expresadas por los genes *pcaHG*, *pcaB*, *pcaC*, *pcaD* y *pcaIJ* y el *cis,cis* muconato induce las enzimas codificadas por *catA*, *catB*, *catC*, *catD* y *catIJ*, es decir existen dos inductores independientes para cada rama de la ruta (Harayama y Timmis, 1992)

En *P. putida* la regulación es diferente, el ácido protocatéquico sólo puede inducir la enzima codificada por *pcaHG* y el *cis,cis*-muconato induce sólo las enzimas expresadas por *catA* y *catB*. Sin embargo, en este caso es el β -cetoacido el inductor general de todas las demás enzimas. Esto tiene la ventaja de ser una regulación más económica que la de *A. calcoaceticus*, aunque ello implique la expresión de las enzimas codificadas por *pcaB* y *pcaC* cuando se oxida el catecol.

En otras especies como *Nocardia opaca*, el β -cetoadipato es el único inductor de todas las enzimas de la degradación del ácido protocatéquico y catecol con excepción de las codificadas por los genes *catA* y *catB*, cuyo inductor es el *cis,cis*-muconato. En *Alcaligenes* spp. la regulación es similar a la de *A. calcoaceticus* (Stanier y Ornston, 1973).

El operon *benABCD* de *A. calcoaceticus* es inducido por benzoato aunque el regulador aun no ha sido caracterizado. El benzoato tambien puede inducir operón *cat A* pero no el *cat BCIFD*. El *cis,cis*-muconato puede inducir los dos operones (Harayama y Timmis, 1992)

En el plásmido TOL (pWWO) las proteínas reguladoras *xyl R* y *xyl S* son las responsables de la regulación de las oxidaciones del xileno y tolueno. *Xyl S* interacciona con el benzoato ó sus análogos y activan la transcripción del operón *xyl XYZLTEGFJQKIH*. *Xyl R* interacciona con el tolueno ó bencilalcohol ó sus análogos activando la transcripción del operon *xyl CMABN*. El *xylR* en presencia de su efector tambien puede estimular indirectamente la expresión del operon que regula el *xylS* mediante la activación de la transcripción de *xylS*. (Ramos y col., 1987; Harayama y Timmis, 1992)



2.6. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y EVOLUTIVOS

Las bacterias y los hongos tienen un papel muy importante y exclusivo en el medio ambiente como agentes que mineralizan materia orgánica a través de complejas y especializadas rutas degradativas.

La diversidad de las rutas bioquímicas que un microorganismo puede seguir al cultivarse en diversos compuestos aromáticos da una idea de la versatilidad de estos seres vivos. Sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que un microorganismo elige una u otra manera de escindir el núcleo bencénico. La variedad de rutas bioquímicas que existe en bacterias para un mismo compuesto aromático, es indicativo de que la selección natural ha explorado a través de muchas posibilidades químicas. Como ejemplo tenemos al benzoato que puede seguir cuatro rutas diferentes de degradación, entre las cuales la del catecol es con mucho la más utilizada entre las bacterias aerobias. La selección natural no tiene soluciones ilimitadas sino que siempre opera sujeto a rigurosas necesidades químicas.

La introducción de un compuesto orgánico nuevo en el medio ambiente que potencialmente pueda ser usado como fuente de carbono y energía motiva una presión selectiva que provoca el origen de una nueva ruta degradativa. Es decir, la selección natural provoca la producción de una enzima ó una secuencia de enzimas con nuevas actividades catalíticas que permiten la conversión del compuesto nuevo en un intermediario metabólico celular. Existen principalmente dos formas de expansión catabólica de las rutas degradativas: expansión horizontal y expansión vertical.

La expansión horizontal consiste en un aumento del número de sustratos metabolizados por una ruta, que contenga diversos análogos estructurales de un compuesto. Esto puede obtenerse bien mediante mutaciones que contribuyan a aumentar el número de efectores ó de sustratos reconocidos por la proteína reguladora ó por alguna de las enzimas de la ruta, ó bien gracias a la incorporación de enzimas isofuncionales, que permitan una ampliación del rango de compuestos metabolizados a través de la ruta estudiada.

La expansión vertical se caracteriza por la aparición de nuevas reacciones enzimáticas en una ruta ya existente, que confiera al microorganismo la capacidad de degradar nuevos sustratos. Cuando no se puede conseguir la degradación de un compuesto aromático por alguno de los mecanismos citados anteriormente, el microorganismo puede "crear" una ruta degradativa nueva, mediante el ensamblaje de reacciones enzimáticas pertenecientes a rutas distintas.

En el plano genético todo esto implica el desarrollo de nuevos genes estructurales por medio de modificaciones de los preexistentes, así como el desarrollo de genes reguladores que ejerzan un control adecuado sobre la expresión de los genes estructurales. Los mecanismos de adaptación genética pueden ser de transferencia de DNA, mutación, recombinación ó transposición y estos procesos provocan una elevada diversidad de DNA en las bacterias del suelo (Torsvik y col., 1990). La transferencia genética entre los diferentes microorganismos no es un proceso difícil si tenemos en cuenta que en el medio ambiente están sometidos a interacciones que pueden provocar una conjugación, una transformación ó una transducción, con la consiguiente variación de su material genético. Entre los plásmidos NAH y TOL existen homologías en el DNA que pueden ser debidos a cualquiera estos procesos.

Las mutaciones puntuales pueden afectar a la especificidad de sustrato de una enzima. Por ejemplo, el reconocimiento de una mayor cantidad de sustratos de la catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el plásmido TOL se extiende hasta el 4-etil catecol por sustituciones simples de aminoácidos. Las posibles recombinaciones que pueden ocurrir en el DNA originan nuevos reagrupamientos ó reasociaciones de los genes, como ocurre entre *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter calcoaceticus* al analizar varias rutas como la del β -cetoacido (Harayama y Timmis, 1992). La duplicación también ha sido considerada como un mecanismo importante para la evolución de microorganismos, y como ejemplo está la

existencia de tres isoenzimas diferentes $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ y $\beta\beta$ de la 1,2-dioxigenasa en *Pseudomonas arvilla* C-1 (Nakai y col.,1990). En cuanto a las transposiciones encontramos elementos transponibles en el plásmido TOL, como el Tn 4653, del grupo del Tn 3.

El esquema generalizado de escisiones *orto*, *meta* y la convergencia de las rutas catabólicas hacia unos pocos metabolitos intermediarios que se produce en un amplia variedad de especies microbianas y de compuestos aromáticos, sugiere que los microorganismos han extendido su rango de sustratos como consecuencia de:

-Una evolución divergente, en la que ha ocurrido un fenómeno de selección de un número limitado de rutas degradativas entre las diferentes especies microbianas. Las comparaciones de secuencias de aminoácidos entre enzimas isofuncionales de la ruta del β -cetoacido en diferentes microorganismos, pone de manifiesto la evolución divergente de esta ruta (Ornston y Yeh, 1982).

-Una evolución convergente, en la se han desarrollado rutas catabólicas similares en distintos microorganismo de una forma independiente, debido a la utilización de un número limitado de reacciones químicas disponibles.

Por último, hay que tener en cuenta que la manipulación genética de microorganismos para la obtención de rutas catabólicas que ayuden a descontaminar el medio ambiente, no representa cambios en las características fundamentales de estas especies, sólo supone una aceleración de los procesos evolutivos. En algunos casos, por ejemplo, la expansión del espectro de sustratos requiere únicamente la sustitución de un aminoácido en una enzima. Por lo tanto, estas mutaciones pueden ocurrir de forma natural, en unas condiciones ambientales que ejerzan una presión selectiva sobre el microorganismo (Ramos y Rojo, 1990).

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

Los compuestos aromáticos pueden ser degradados por determinadas bacterias del suelo impidiendo que resulten altamente persistentes y alteren el equilibrio ecológico de la Naturaleza. Por ello, se ha centrado la atención en algunas especies bacterianas y algunos hongos como posibles agentes descontaminantes. La mayoría de los estudios sobre degradación de compuestos aromáticos ha sido realizada en bacterias del género *Pseudomonas*, por su extraordinaria capacidad de adaptación a las condiciones fisiológicas más diversas, tanto en cuanto a la utilización de fuentes de carbono como a la tolerancia de condiciones ambientales. Más recientemente se ha estudiado la degradación de compuestos aromáticos estudiado en otros microorganismos: *E. coli* (Cooper y Skinner, 1980), *K. pneumoniae* (Fawcett y col., 1989; Martín y col., 1991) ó *Bacillus* spp.(Crawford, 1975).

K. pneumoniae es un bacteria gram negativa de la familia Enterobacteriaceae, capsulada y anaerobia facultativa que se encuentra en el tracto gastrointestinal y en el suelo con cierta profusión, por lo que es posible utilizarla como descontaminante ambiental. (Knitte y col., 1977). Su principal interés reside en la capacidad para fijar nitrógeno, por lo que ha sido muy estudiada a nivel genético (genes nif) con posibles aplicaciones para la agricultura. También, se han encontrado diferentes cepas de *K. pneumoniae* relacionadas con la degradación de la corteza de los árboles y la madera (Deschamps y col., 1983). Por otra parte, se ha observado que *K. pneumoniae* muestra cierta semejanza metabólica con *Pseudomonas* y *E. coli*, pudiendo metabolizar, al igual que estos géneros, diversos compuestos aromáticos.

La capacidad degradativa de esta bacteria no ha sido suficiente investigada y por esta razón hemos tratado de conocer las características bioquímicas y genéticas y los mecanismos reguladores del metabolismo de

varias sustancias entre ellas el 3- y 4-HPA (Fernández, 1989; Gibello, 1991) y el 3- y 4-HBA (Suárez y col., 1991).

En este trabajo de investigación se ha abordado el estudio de la degradación de los ácidos 3- y 4-HBA por dos razones:

-Existe muy poca información acerca de la degradación del 3-HBA en bacterias.

-Aunque el metabolismo del 4-HBA está más estudiado, la cepa salvaje de *K. pneumoniae* no es capaz de crecer en 4-HBA, por lo que es muy interesante el estudio de un mutante con fenotipo positivo de crecimiento en este compuesto.

Los objetivos del presente trabajo de investigación se han dirigido hacia el estudio de los siguientes aspectos:

1-Estudio de la ruta degradativa del 3- HBA en la cepa salvaje de *K. pneumoniae*

2-Obtención de un mutante que fuera capaz de crecer en 4-HBA.

3-Determinación de la actividad enzimática de las enzimas implicadas en la degradación del 3-HBA.

4-Determinación del origen de la mutación mediante estudios de inducción

5-Estudio de los sistemas de transporte del 4-HBA en el mutante positivo de *K. pneumoniae*.

6-Purificación de la 4 HBA hidroxilasa del mutante de *K. pneumoniae*

7-Purificación de la 3-HBA hidroxilasa de la cepa salvaje de *K. pneumoniae*.

8-Secuenciación de los extremos aminoterminales y composición de aminoácidos de estas hidroxilasas para analizar su similitud.

9-Hibridación con una sonda de la 4-HBA hidroxilasa con la cepa

salvaje y con el mutante.

10-Obtención de una genoteca de *K. pneumoniae* con tamaños de inserto adecuados y clonación de la 4-HBA hidroxilasa.

Mediante la consecución de estos objetivos se pretende contribuir a un mejor conocimiento de las capacidades bioquímicas y genéticas de *K. pneumoniae* y su posible aplicación en el estudio de la regulación de otros microorganismos y descontaminación ambiental.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado las siguientes estirpes bacterianas:

-*Klebsiella pneumoniae* M5a1, cepa salvaje cedida por el Dr. M. J. Merrick, Agriculture Research Council, University of Sussex , Brighton, UK.

-*Klebsiella pneumoniae* MA04, mutante con fenotipo 4 HBA positivo obtenido en nuestro laboratorio.

- *Escherichia coli* CC 118 f⁺ sure, del stock del laboratorio del Dr. de Lorenzo, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.

-*Acinetobacter calcoaceticus* ADP-1, del laboratorio del Dr. Harayama, Department of medical Biochemistry, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

- *Escherichia coli* S17-1, del laboratorio del Dr. Harayama.

1.2. REACTIVOS

Los productos utilizados en la elaboración de medios de cultivo: bactotripton, extracto de levadura y agar fueron suministrados por la casa comercial Difco, y las distintas sales por la casa Merck. Los compuestos aromáticos: 4HBA, 3HBA, 3,4 dHBA, 2,5 dHBA y los antibióticos: ampicilina y tetraciclina se obtuvieron de la casa comercial Sigma.

Tanto las columnas utilizadas en las cromatografías por FPLC y Smart: Mono Q, Superose 12, Superose 6 PC, como otras resinas: Blue Sepharose, Sephadex G-50 pertenecían a la firma Pharmacia.

Los productos necesarios para las electroforesis de proteínas: acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED y persulfato amónico son de Bio-Rad. Los geles comerciales para el Phast System y los diferentes kits de calibración para la determinación de los peso moleculares y de puntos isoeléctricos de las proteínas fueron suministrados por Pharmacia.

Los reactivos para electroforesis de DNA: agarosa y bromuro de etidio se obtuvieron de Sigma. Las endonucleasas de restricción, los plásmidos y los diferentes compuestos utilizados en Biología Molecular son principalmente de Boehringer Mannheim y Promega. El kit de elución de DNA a partir de geles de agarosa (GeneClean) es de la casa comercial Bio 101.

Las membranas de nylon (N-Hybond) empleadas en hibridación proceden de la casa Amersham. Otros compuestos utilizados en esta técnica y en la de Southern Blot: polivinilpirrolidona, ficoll, DNA de salmón y seroalbúmina bovina fueron suministrados por Sigma.

Como productos radiactivos, el ^{14}C -4-HBA utilizado en experimentos de transporte se obtuvo de Sigma y el ^{32}P - ATP necesario para el marcaje de las sondas utilizadas en las hibridaciones, se consiguió a través de NEN Research.

Los disolventes orgánicos y demás reactivos utilizados para este trabajo proceden de las casas Merck, Aldrich, Panreac y Boehringer Mannheim. Las distintas disoluciones y tampones se realizaron con agua destilada ó Milli Q . Todos los compuestos y sustancias utilizadas presentan una alta pureza.

1.3. EQUIPO UTILIZADO

Los aparatos más relevantes de nuestro laboratorio utilizados en este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- Agitadores orbitales Científica S.A.
- Baño termostático con agitación Unitronic 320 OR
- Centrifuga Beckman J2-21
- Ultracentrifuga Kontron T-1055
- Espectrofotómetro PYE-Unicam UV/VIS PU 8800
- Cubetas y fuentes de electroforesis, de Pharmacia
- Transiluminador 2011 Macrovue, LKB
- Contador de centelleo Beckman LS 3801
- Sistemas de cromatografía FPLC y Smart, de Pharmacia
- Phast System, de Pharmacia

2. METODOS

TECNICAS DE BIOLOGIA CELULAR.

2.1. MANTENIMIENTO Y DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

Para el crecimiento de las distintas estirpes bacterianas se utilizaron medios líquidos de cultivo ricos: LB, SOC, TB (Maniatis y col., 1989) y en medios líquidos mínimos: PJC (Hareland y col., 1975) que fueron incubados en matraces con aireación y agitación adecuada. Las fuentes de carbono: 4HBA, 3HBA, 2,5-DHBA, 3,4-DHBA fueron esterilizadas por separado y añadidas al medio de cultivo a una concentración 6 mM.

El crecimiento en medio solido se realizó en placas de petri conteniendo medio rico ó mínimo, solidificado con 1,5% de bacto- agar. La

temperatura de crecimiento fue de 37°C para los medios de cultivo ricos y 30°C para los medios mínimos.

Las estirpes se conservaron a 4°C en medio sólido. Para su conservación a largo plazo se mantuvieron en glicerol al 25% y a -20°C.

El crecimiento en masa de los cultivos se midió por turbidimetría determinando la densidad óptica a 550 ó 680 nm. en un espectrofotómetro.

2.2. MUTAGENESIS MEDIANTE RADIACION ULTRAVIOLETA

El mutante de *K. pneumoniae* MA04 se obtuvo por tratamiento de radiación ultravioleta, siguiendo el protocolo de Miller (1972) . El mayor rendimiento se obtuvo con un tiempo de exposición de 2 min. Los mutantes se seleccionaron en placas que contenían 4HBA como única fuente de carbono y energía. El mantenimiento de la mutación se realizó haciendo siembras sucesivas en placas de 4 HBA durante 2 meses de aquellas colonias que presentaban un mayor crecimiento.

2.3. ESTUDIO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE.

- **Ensayos de transporte:** Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento ($A_{680} = 0.7$) fueron centrifugados y lavados tres veces con tampón $H_2 K PO_4 / HK_2 PO_4$ 50mM pH 7.0. El precipitado se resuspendió en este tampón para dar una concentración de 20 mg cels./ml. Las células fueron preincubadas 20 min. a 30°C y seguidamente se realizó una mezcla de reacción que contenía 0,3-0,5 mg. cels. , 62 nmoles de ^{14}C -4 HBA(6,82x10 cpm) y tampón fosfato hasta 5 ml. Las muestras de 200 μ l fueron tomadas a intervalos de 30 seg. y aplicadas a una membrana de filtración (0.45 μ m), siendo entonces lavadas con 10 ml de tampón fosfato, por succión con una

bomba de vacío. Finalmente se introdujeron en 5 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad de las muestras en un contador de centelleo.

En algunos experimentos, las células fueron incubadas con compuestos inhibidores de la cadena respiratoria y síntesis de ATP: arseniato, azida sódica, dicitclohexilcarbodiimida; con desacoplantes del transporte: 2,4-dinitrofenol ó carbonilciamida-m-clorofenilhidrazona; ó con ionóforos : valinomicina, nigericina y gramicidina. 10 min antes de la adición de ^{14}C -4HBA. Las células fueron tratadas con EDTA para hacerlas permeables a varios inhibidores.

- **Tratamiento de choque osmótico:** El choque osmótico fue realizado según el método descrito por Heppel y col. en 1971, utilizando una concentración de sacarosa 0.5 M.

- **Ensayo del ATP:** Fueron tomadas alícuotas de 100 μl en paralelo durante los ensayos de transporte y el ATP presente fue determinado por el método de Gagnara y Finch, modificado por Joshi y col. (1989). La concentración del ATP intracelular fue calculada usando un volumen citoplásmico de 1.65 $\mu\text{l}/\text{mg}$ cels.

2.4. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES

De la misma manera que para los ensayos de transporte se tomaron cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento, se centrifugaron 10 min a 7.000 rpm y se lavaron dos veces con tampón $\text{HK}_2\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{KPO}_4$ 50 mM pH 8.0 ó con tampón Tris 20 mM pH 8.0, según su posterior utilización. Las células fueron resuspendidas en un volumen final que variaba en función del volumen del medio de cultivo. Para ensayos cinéticos se utilizaron 200 ml de medio mínimo que se resuspendieron en

4 ml del tampón correspondiente. Estas células fueron sometidas a un tratamiento con ultrasonidos con un sonicador Labsonic : 4 ml de células lavadas se sonicaron tres veces 30 seg , con un intervalo de 1 min entre cada vez y con una potencia de 3.000 watios.

Posteriormente al tratamiento de sonicación, las células fragmentadas fueron ultracentrifugadas a 40.000 rpm durante una hora y se recogió el sobrenadante que constituiría el extracto celular.

ENZIMOLOGIA Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA

2.5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

-3-hidroxibenzoato, 6-hidroxisasa (EC 1. 14. 13.): Fue medida por disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NAD(P)H, cofactores de la reacción que transforma el 3-HBA en 2,5-dHBA. Los ensayos fueron realizados con 275 μ M de 3-HBA y 250 μ M de NAD(P)H. El coeficiente de extinción molar utilizado para calcular la actividad específica fue $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wheelis y col., 1967).

- 4-hidroxibenzoato, 3-hidroxisasa (EC 1. 14. 13. 2.): Ha sido determinada por el mismo método que la anterior, excepto que el 4 HBA fue utilizado como sustrato y el NADPH como único cofactor. el coeficiente de extinción molar utilizado fue el mismo que para la 3-HBA hidroxisasa (Wright y col., 1991).

-2,5-DHBA (gentisato) dioxigenasa (EC 1. 13. 11. 4.): Fue medido el incremento de la absorbancia a 330 nm debido a la transformación del 2,5 DHBA en maleil piruvato. El ensayo se realizó con 300 μ M de 2,5-DHBA y el coeficiente de extinción molar fue $2,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wheelis y col., 1967).

- **Maleilpiruvato isomerasa (EC.5. 2. 1.4.):** Se determinó su actividad por aumento de la absorbancia a 330 nm como consecuencia de la adición de glutatión reducido a la reacción de la 2,5-DHBA dioxigenasa. El ensayo se realizó añadiendo a la reacción de la 2,5-DHBA 30 μM de GSH. El coeficiente de extinción molar fue $13 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lack, 1961).

- **3,4-DHBA (protocatecato) dioxigenasa (EC 1. 13. 11. 3.):** Fue medida por disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la desaparición del 3,4-dHBA y a su transformación en β -carboxi-cis,cis-muconato. Se realizó el ensayo añadiendo 200 μM de 4-HBA, el coeficiente de extinción molar fue $2,28 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wright y col., 1991).

- **Fumaril piruvato hidrolasa (EC 3. 7. 1.):** Se midió por aumento de la absorbancia a 315 nm por aparición de piruvato (Lack, 1961).

2.6. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO

Los experimentos para determinar los niveles de oxidación de los extractos enzimáticos se realizaron en un oxígrafo Gilson modelo 5/6. Se añadió a las cubetas el extracto enzimático que se ensayaba, 10 μl de NAD(P)H 20 mM y 100 μM del sustrato (3-HBA, 4-HBA....).

2.7. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA

La determinación de la concentración de proteína (mg/ml) se realizó siguiendo el método de Bradford (1976) con la modificación de Marshall y Willians, 1986. Como patrón se utilizó BSA 1 mg/ml realizando una recta de calibración en el momento de hacer una medida

de proteína. También se utilizó alternativamente el método espectrofotométrico aplicando la fórmula siguiente : $1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$ (Segel,1968).

Las concentraciones más bajas de proteína ($\mu\text{g/ml}$) se midieron calculando el siguiente valor de absorbancia: $144(A_{225} - A_{215})$ (Segel, 1968).

2.8. METODO DE PURIFICACION ENZIMATICA

Se utilizaron dos métodos diferentes para la purificación a homogeneidad de la 4-HBA, 3-hidroxilasa (Fig. x) y la 3-HBA, 6-hidroxilasa (Fig.x). En estos procesos se emplearon diferentes tipos de cromatografías utilizando el sistema FPLC y Smart. Las columnas empleadas fueron:

- Cromatografía de afinidad: Blue Sepharose
- Cromatografía de filtración en gel: Superose 12 , Sephadex G-25 y Superose 6 PC.
- Cromatografía de intercambio iónico: Mono Q

- Purificación de la 4-HBA, 3-hidroxilasa.

Mediante estudios preliminares se comprobó que la utilización de Blue Sepharose daba un buen resultado como cromatografía inicial del proceso de purificación. La siguiente cromatografía utilizada tenía la función de eliminar el contenido en sales de la muestra eluída de Blue Sepharose y de separar otras proteínas en función del peso molecular. La cromatografía de intercambio iónico fue la más resolutive y por ello se hicieron dos pases a diferentes pH, dializando la muestra entre ambos. Los tampones utilizados para equilibrar las columnas, así como los tampones de elución vienen reflejados en la Fig. 13.

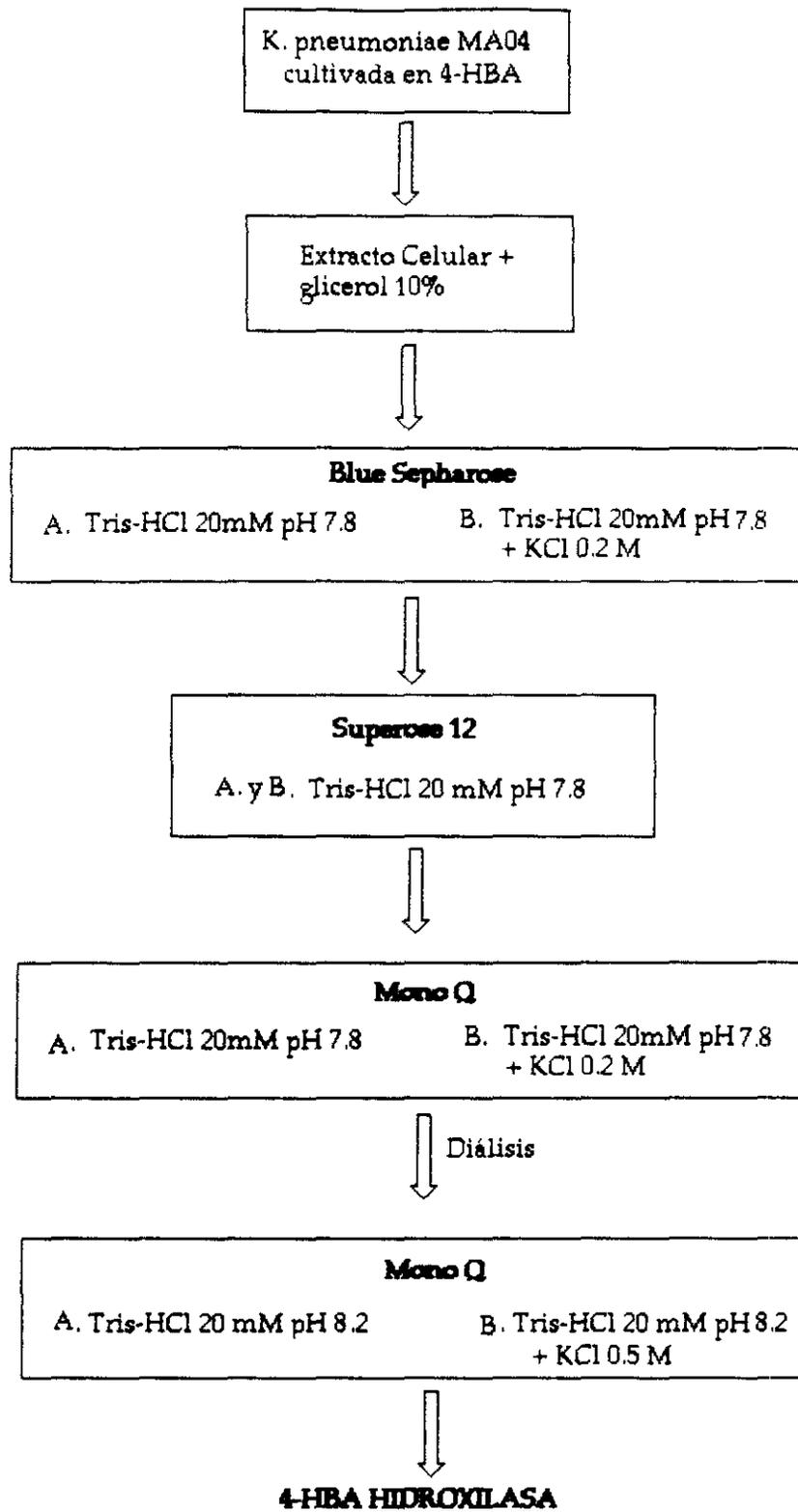


Figura 13: Proceso de purificación de la 4-HBA, 3-hidroxilasa de *K. pneumoniae* MA04.

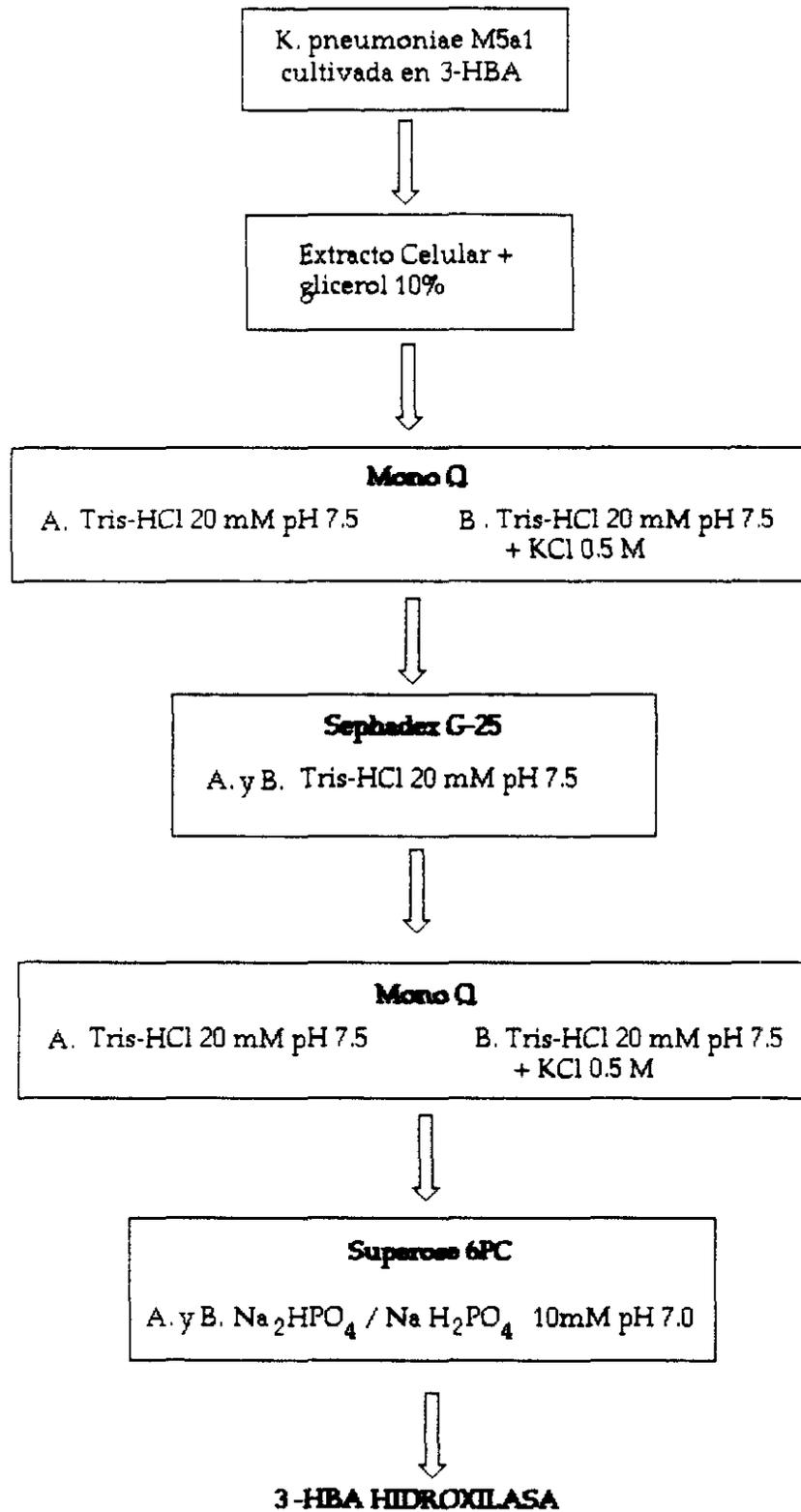


Figura 14: Proceso de purificación de la 3-HBA, 6-hidroxilasa de *K.pneumoniae* M5a1.

- Purificación de la 3-HBA, 6-hidroxilasa

Para la purificación de esta enzima no se utilizó la columna Blue Sepharose porque no se obtenían buenos resultados en los estudios preliminares. Empleamos la columna Mono Q que fue altamente resolutive y nos permitió un proceso de purificación más rápido que el anterior. La muestra se inyectó dos veces consecutivas en esta columna con desalación de la muestra por cromatografía en Sephadex G-25. Estas columnas se empaquetaban de manera sencilla en una jeringuilla, y nos permitieron realizar la eliminación del KCl de una forma menos aparatosa que las diálisis.

Un último paso en este proceso, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de proteína pura, fue utilizar la columna de gel filtración Superore 6 PC en el Smart . Esta etapa nos permitió concentrar la muestra y cambiar el tampón Tris-HCl por Fosfato potásico de una manera simultánea, ya que este último fue el tampón requerido para analizar los aminoácidos de la proteína. Los tampones utilizados durante el proceso de purificación para equilibrar y eluir están descritos en la Fig. 14.

2.9. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR Y DEL PUNTO ISOELECTRICO

- **Electroforesis en condiciones nativas:** Como técnica analítica para comprobar la validez de la purificación se utilizó la electroforesis en condiciones nativas siguiendo el protocolo de Bryan (1977) para preparar el gel de poliacrilamida al 8 %. Los patrones utilizados fueron los de bajo peso molecular comercializados por Pharmacia.

- **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes:** Se realizaron utilizando el sistema de electroforesis automático Phast System con geles entre el 8-25% de poliacrilamida. La concentración de SDS fue al

0.55%. Los marcadores fueron los mismos que los utilizados en condiciones nativas.

- **Isoelectroenfoque:** Para determinar el punto isoeléctrico se utilizaron geles comerciales IEF 5-8 aplicables al Phast System. Los marcadores fueron de Pharmacia.

- **Tinción de geles con azul de Coomassie R-250:** Se realizó este tipo de tinción cuando la cantidad de proteína analizada se estimó superior a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- **Tinción de geles con nitrato de plata:** Se utilizó este método de tinción (Nielsen y col., 1984) para una mejor estimación de la pureza de las muestras o cuando la cantidad de proteína era muy baja para ser detectada por el método anterior (ng prot).

La conservación de los geles se hizo sumergiéndolos en una solución que contenía 10% de glicerol, 30% de etanol y 10% de acético y manteniéndolos a 4°C.

2.10. DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS

Para determinar la composición de aminoácidos de la 4-HBA y 3-HBA hidroxilasa se utilizaron las muestras resultantes del último paso del proceso de purificación con una cantidad de enzima pura de aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para reducir el volumen existente de 1 ml la muestra se aplicó sobre una unidad de microconcentración Amicón y se centrifugó a 4.500 rpm durante 30 minutos. Se recogió la muestra a 1000 rpm en un volumen de 200 μl , lavando el filtro con 30 μl de agua.

El proceso de hidrólisis en el caso de la 4-HBA hidroxilasa fue realizado por Pharmacia durante 20 horas a 110°C, aplicándose 100 μ l de muestra en el analizador. En el caso de la 3-HBA, 6-hidroxilasa la composición de aminoácidos se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.C.M.

2.11. SECUENCIACION DEL EXTREMO N-TERMINAL

Las muestras fueron tomadas en el último paso de purificación y se dializaron frente a tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7.0 utilizando las unidades de microconcentración Amicón. La muestra, con un volúmen final de 200 μ l, fue aplicada a un secuenciador de proteínas (Applied Biosystems 477A, de Pharmacia). Este proceso fue realizado por el Departamento de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.) de Madrid.

2.12. DETERMINACION DEL MECANISMO CATALITICO

Se utilizó la 4-HBA hidroxilasa parcialmente purificada y se determinaron los valores de velocidad inicial obtenidos utilizando 4-HBA como sustrato variable a cuatro concentraciones fijas de NADPH y a una constante de oxígeno a 4°C.

También se determinó la velocidad inicial de la reacción catalizada por la 4-HBA hidroxilasa utilizando 4-HBA como sustrato variable a cuatro concentraciones de oxígeno y una constante de NADPH.

Mediante representaciones gráficas se pudieron calcular las constantes de disociación y las constantes de Michaelis (Dalziel, 1969).

2. 13. INACTIVACION POR DIETIPIROCARBONATO

La determinación de residuos que forman parte del centro catalítico de la 4-HBA hidroxilasa fue determinada mediante la incubación de la enzima con varias concentraciones de dietilpirocarbonato (Blanke y col., 1990).

Las soluciones stock de dietilpirocarbonato se realizaron en etanol absoluto. La concentración se determinó mediante la adición de una pequeña alícuota (5 μ l) de DPC en 3 ml de imidazol 10 mM pH 7,5 y la medida de la absorbancia a 230 nm, usando el coeficiente de extinción molar $3,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Melchior y Fahrney, 1970). El estudio de la dependencia del pH en la inactivación se realizó a pH 7,5-10 utilizando tampón glicina-NaOH.

METODOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE

2.14. EXTRACCION DE DNA

- **Obtención de DNA cromosómico:** Se realizó siguiendo el método descrito por Chow y col. (1977), basado en la utilización del CTAB para la eliminación de los polisacáridos. La concentración de DNA obtenido mediante este método fue entre 0,7 - 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

- **Obtención de DNA plásmidico (minipreps) :** Se realizó creciendo los cultivos bacterianos en medio rico Terrific Broth y siguiendo el método de Birnboim y Doly, 1979. Se trató con 1 μl de RNAsa (10 mg/ml) media hora a 37 °C.

2.15. DETERMINACION ANALITICA DE DNA

- **Cuantitativa** : La concentración de DNA se valoró experimentalmente midiendo la absorbancia a 260 nm de una pequeña alícuota de DNA (3 ó 6 μ l) en 600 μ l de agua. 1 Unidad de Absorbancia de DNA a esa longitud de onda equivale a una concentración de 50 μ g/ml.

- **Cualitativa : Geles de agarosa** : Para visualizar el DNA se realizaron geles de agarosa a una concentración variable entre 0.8 y 1.5 % en tampón TAE óTBE. Si los geles eran analíticos se empleó TBE, si posteriormente se procedía a la extracción de DNA con el kit GeneClean se utilizaba TAE. Siempre se empleó el mismo tampón como electrolito que el utilizado para hacer el gel. La electroforesis se mantuvo a un voltaje constante de 80 voltios.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 μ g/ ml) durante 5 min para su visualización con luz ultravioleta y se bañaron en agua destilada 15 min para eliminar el fondo. Los geles fueron fotografiados con una cámara instantánea Polaroid DS 34. El marcador utilizado fue λ HindIII.

2.16. SOUTHERN BLOT

DNAs de *E.coli* CC118 sure , *K. pneumoniae* M5a1 y MA04 fueron digeridos totalmente con BamHI, EcoRI y Pst I y aplicados a un gel de agarosa al 0,8%. La transferencia de estos DNAs a membranas de nylon se realizó siguiendo el método descrito por Southern (1975).

2.17. ELABORACION DE UNA GENOTECA DE *K. pneumoniae*

- **Preparación del vector de clonaje:** El vector utilizado fue el plásmido pUC 18 (0.25 μ g/ μ l). 1 μ g de vector fue digerido con 1 unidad de la enzima de restricción Eco RI, en un volumen final de 25 μ l con agua Milli Q. La digestión tuvo lugar toda la noche a 37 °C. El tratamiento con fosfatasa alcalina se hizo añadiendo 5 μ l de enzima y llevando el volumen a 50 μ l. Se mantuvo 1 hora a 37°C y se calentó a 65°C durante 10 minutos. Se realizó una extracción fenólica y se pasó el vector por una columnita de Sephadex G-50 equilibrada con TE para eliminar los posibles restos de fenol.

- **Fragmentación del DNA cromosómico:** El DNA de *K. pneumoniae* MA04 se digirió parcialmente a distintos tiempos con Eco RI hasta que se obtuvieron los tamaños de inserto deseados. La temperatura de digestión fue siempre 37°C. Antes de realizar la mezcla de ligamiento se trató el DNA con 1 μ l de RNasa (10 mg/ml) con el fin de evitar interferencias.

- **Ligamiento:** Se usó la ligasa T4 para la reacción de ligamiento. Se probaron distintas proporciones de plásmido y de DNA cromosómico digeridos ambos con la misma enzima de restricción. La reacción tuvo lugar durante una noche a 4°C.

- **Análisis de insertos:** Las mezclas de ligamiento se analizaron por transformación de *E.coli* CC118 sure. Se analizó el DNA plasmídico de 6 colonias recombinantes por placa. Los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción correspondiente y se comprobó la existencia de insertos valorándose su tamaño mediante un gel de agarosa al 0.8 %.

2.18. TRANSFORMACION EN *E. coli* CC118 *sure*

- **Obtención de células competentes:** Cultivos de *E. coli* CC118 *sure* en medio rico SOB / Tet fueron tratados modificando el método de Hanahan, 1983. Las células fueron alicuoteadas en 200 μ l y guardadas a -70°C hasta su utilización.

- **Transformación:** Alícuotas de células competentes fueron descongeladas, y transformadas con 3 μ l de la mezcla de ligamiento. El método seguido fue el de Hanahan pero se añadieron 200 μ l de medio SOC para el crecimiento de los posibles transformantes. La eficiencia de transformación obtenida con este método fue de $1,2 \times 10^7$ cels/ μ l .

- **Selección de los recombinantes:** Al utilizar pUC 18 y la bacteria *E. coli* *sure* CC118 que complementa el operón de la β - gactosidasa, la selección se hizo por visualización del color blanco de las colonias recombinantes y el azul de las colonias portadoras de plásmido sin inserto en placas de LB/ Amp/X-Gal/IPTG. Este tipo de placas se realizaron según Sambrook y col., 1989, añadiendo X-Gal y el IPTG en el momento de utilizar las placas.

2.19. OBTENCION DE LA SONDA.

La sonda empleada para detectar la presencia de 4-HBA hidroxilasa fue el oligonucleótido diseñado a partir del estudio del extremo N-terminal de la proteína purificada, utilizando los codones que aparecen con mayor probabilidad en *K. pneumoniae* (Wada y col.,1992). Este oligonucleótido fue sintetizado por el Servicio Automático de la U.C.M.

2.20. HIBRIDACION

- **Fijación del DNA a membrana:** La transferencia del DNA a una membrana de nylon se realizó mediante la técnica del Southern Blot si partíamos de geles de agarosa, y directamente de placas en el caso de la búsqueda del clon a partir de la genoteca de DNA de *K. pneumoniae* MA04. La transferencia de colonias a membranas tuvo lugar según el método de Grunstein y Hogness, 1975.

- **Marcaje de la sonda:** El oligo de 18 nucleótidos se marcó con γ -³²P-ATP en el momento de la prehibridación con la polinucleótido quinasa, siguiendo el protocolo de Promega. La sonda una vez marcada se aplicó a una columna de Sephadex-50 equilibrada y lavada con TE. Se comprobó la eficacia del marcaje con un contador Geiger.

- **Hibridación:** Se dejaron las membranas en 6 X SSC durante 5 min. En la prehibridación se colocaron dos membranas por cada bolsa de hibridación, conteniendo 20 ml de: 6 x SSC, 5 X Solución Denhardt, 0,5 % SDS y 500 μ l de ss DNA de salmón (5 mg/ml) y se mantuvieron 1 hora y media en un baño con agitación a 65°C. Una vez desnaturalizada la sonda se retiró el líquido de la bolsa menos unos 5 ml y se añadió 250 μ l de la sonda marcada diluída en agua dejando hibridando toda la noche.

Se hicieron 2 lavados de 15 minutos cada uno con 2 x SSC y 0.5 % SDS a 65°C con agitación. Se expuso a una película de Rayos X a -80°C y se observaron los resultados a las 24 horas .

2.21. MUTAGENESIS MEDIANTE INSERCIÓN DE TRANSPOSONES

- **Preparación del vector de transposición:** se utilizó como vector el plásmido pEMR 1, un derivado del pBR322 que presenta resistencia a K_m y A_p y lleva el transposón Tn 903. Este plásmido se digirió con Sal I y se insertó el gen de la 4-HBA hidroxilasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. (Averhoff y col., 1992). Se transformó la cepa *E.coli* S 17-1 con este plásmido recombinante.

- **Conjugación:** Se utilizaron como cultivos *E. coli* S 17-1 y *Acinetobacter calcoaceticus* ADP-1 realizándose la conjugación siguiendo el método de Miller (1972).

- **Selección:** Los mutantes 4-HBA⁻ se seleccionaron en placas de quinato/ K_m y en placas de 4-HBA/ K_m .

2. 22. TRANSFORMACION EN *Acinetobacter calcoaceticus* ADP-1

Acinetobacter spp. tienen la propiedad de recibir DNA exógeno de forma natural sin necesidad de hacer competentes a sus células. Un cultivo de 5 ml de medio líquido con succinato de *A. calcoaceticus* 4-HBA⁻ se mantuvo 24 horas a 30°C. Posteriormente se añadió 100µl de succinato 1 M incubándose el cultivo durante 30 min. En este punto las células de *A. calcoaceticus* 4-HBA⁻ ya están preparadas para la transformación y se sembró 100 µl en placas de 4-HBA/ A_p / K_m .

La fuente de DNA exógeno fueron las mezclas de ligamiento obtenidas en la elaboración de la genoteca de *K. pneumoniae* MA04 utilizándose varias diluciones que se sembraron en las mismas placas de 4-HBA/ A_p / K_m en forma de gota (Neidle y Ornston, 1986). Las colonias que crecieron llevaban en su genoma el gen de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae*.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DEL MUTANTE MA04

La cepa salvaje de *K. pneumoniae*, M5a1, tiene la capacidad de crecer en 3-HBA como fuente de carbono en medios mínimos líquidos ó sólidos (apartado II. 2.1.). Sin embargo, esta cepa no es capaz de utilizar el 4-HBA como única fuente de carbono y energía en las mismas condiciones. Mediante la acción de luz ultravioleta(apartado II. 2.2.) se obtuvo un mutante de esta cepa que se denominó MA04. Este mutante es estable y es capaz de metabolizar con igual eficacia tanto el 3-HBA como el 4-HBA.

Cuando se cultiva el mutante de *K. pneumoniae*, MA04, en medios mínimos con 4-HBA como fuente de carbono, se ha observado un color azulado al alcanzar el crecimiento una densidad óptica a 680 nm. de 0.4, es decir, cuando se encontraba aproximadamente en la mitad de la fase logarítmica (Fig. 15).



Figura 15: Cultivo de *K. pneumoniae* MA04 en fase logarítmica de crecimiento.

2. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO

- Crecimiento de *K. pneumoniae* M5a1 en 3-HBA.

Para determinar la concentración óptima de la fuente de carbono (3-HBA) en el medio de cultivo se ensayaron varias concentraciones (Fig. 16), valorándose el crecimiento bacteriano por medida de la densidad óptica. Estas medidas fueron tomadas después de 12 horas de crecimiento a 30°C, con una aireación y agitación adecuadas.

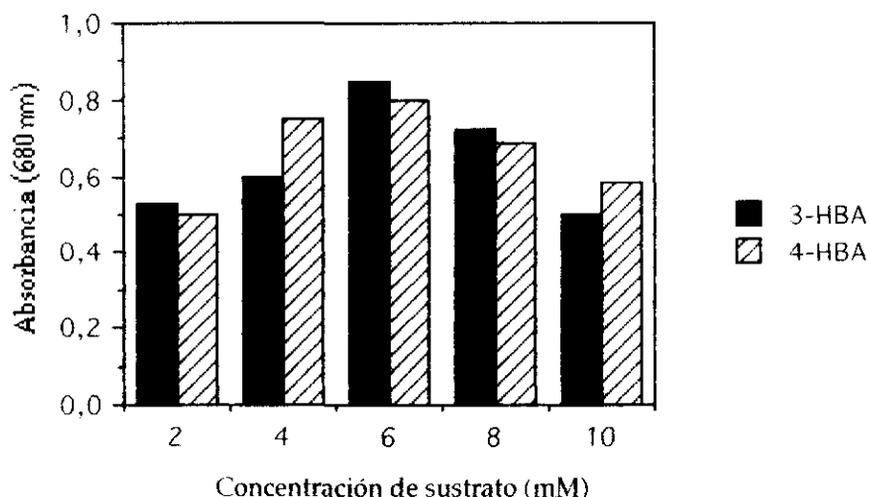


Figura 16 : Determinación de las concentraciones óptimas de crecimiento de *K. pneumoniae* M5A1 en 3-HBA y *K. pneumoniae* MA04 en 4-HBA.

Para que en los diferentes sustratos la adición de la fuente de carbono sea equivalente cuantitativamente, se utilizó una cantidad en milimoles/litro de medio de cultivo que multiplicada por el número de átomos de la estructura del compuesto sea igual a 60. Así, en el caso de la glucosa sería 10 mM, en el del glicerol 20 mM y en el del acetato 30 mM. En

este cálculo hay que tener en cuenta que los compuestos aromáticos presentan una mayor toxicidad que otros compuestos orgánicos y, por tanto, concentraciones demasiado elevadas pueden provocar una inhibición del crecimiento. Los resultados obtenidos aparecen en la Fig. 16. Una concentración de 6 mM fue la concentración óptima en cultivos de *K. pneumoniae* M5a1 cultivada en 3-HBA.

Antes de iniciar el estudio de la ruta metabólica de un compuesto aromático es necesario determinar la velocidad con que éste es capaz de crecer en medio líquido. Para ello, se realizó la correspondiente curva de crecimiento de la cepa salvaje de *K. pneumoniae* en 3-HBA (Fig. 17). El tiempo de generación obtenido fue de 80 min. y la fase estacionaria se alcanzó cuando la absorbancia a 680 nm. era 0.85 .

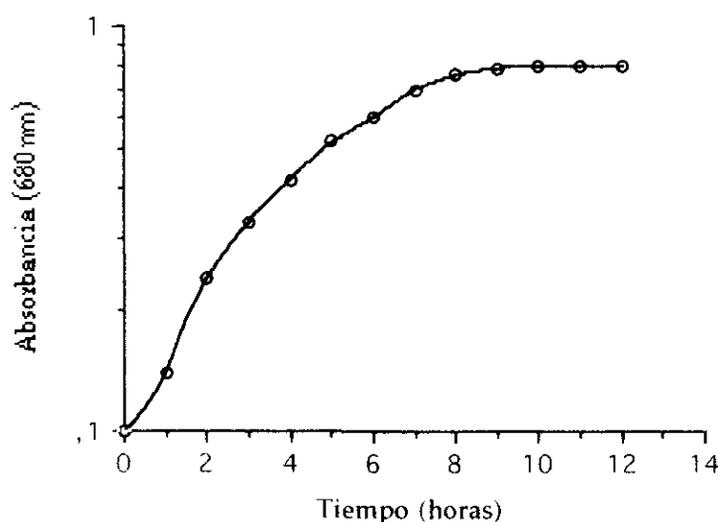


Figura 17: Curva de crecimiento de *K. pneumoniae* M5a1 en 3- HBA (6 mM).

-Crecimiento de *K. pneumoniae* MA04 en 4-HBA

La determinación de la concentración óptima de 4-HBA en cultivos de *K.pneumoniae* MA04 se realizó de manera semejante a la determinación de la concentración óptima de 3-HBA para la cepa salvaje de esta cepa. Los resultados obtenidos ensayando diferentes concentraciones se muestran en la Fig. 16. De manera similar a los resultados obtenidos para *K. pneumoniae* M5a1 cultivada en 3-HBA, una concentración de 6 mM resultó ser la óptima, lo cual resulta lógico hasta cierto punto debido a que el 4-HBA contiene idéntico número de carbonos y una estructura similar que el 3-HBA.

En la Fig. 18 se muestra la curva correspondiente de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 4-HBA. El tiempo de generación obtenido fue de 102 min., y la absorbancia medida a 680nm de la fase estacionaria fue de 0.8.

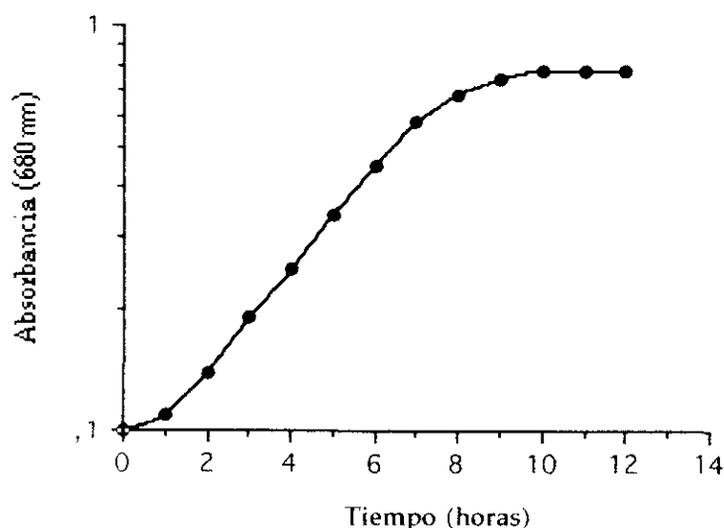


Figura 18: Curva de crecimiento de *K. pneumoniae* MA04 en 4-HBA.

3. DETERMINACION DE LA RUTA DEGRADATIVA DEL 3-HBA EN *K. pneumoniae* M5a1

Para determinar la ruta por la que el 3-HBA se metaboliza utilizamos dos métodos:

-Directamente. Mediante aislamiento de los metabolitos, utilizando sistemas de cromatografía de alta resolución (HPLC, FPLC, Smart).

-Indirectamente. Midiendo las actividades enzimáticas que corresponden a uno u otro tipo de transformación, ó midiendo los niveles de oxidación.

- **Determinación de actividades enzimáticas.**

Las actividades enzimáticas fueron determinadas siguiendo los ensayos descritos en el punto II. 2.5. Se midieron todas las actividades enzimáticas implicadas en la ruta degradativa del 3-HBA: 3-HBA, 6-hidroxisalicyato hidroxilasa, 1,2- gentisato dioxigenasa, maleil-piruvato isomerasa y fumaril-piruvato hidrolasa. La presencia de las actividades 3-HBA hidroxilasa y 2,5-DHBA dioxigenasa en extractos de *K. pneumoniae* M5a1 nos hizo deducir la vía degradativa del 3-HBA a través de la ruta del gentisato (Fig. 19).

De la ruta degradativa del 4-HBA sólo se midieron las dos enzimas claves: 4-HBA, 3-hidroxisalicyato hidroxilasa y 3,4 protocatecato dioxigenasa, con resultados negativos. Cuando las células fueron cultivadas en medios nutritivos no se encontró actividad en ninguna de las enzimas de las dos rutas, lo cual sugiere que sean inducibles.

De todas las enzimas, nuestro interés se centró en el estudio de las hidroxilasas por ser las primeras de las rutas de la ruta y por constituir sistemas enzimáticos complejos tanto en lo que se refiere a su inducción como a la utilización de cofactores (Tabla III). En la degradación del 3-HBA,

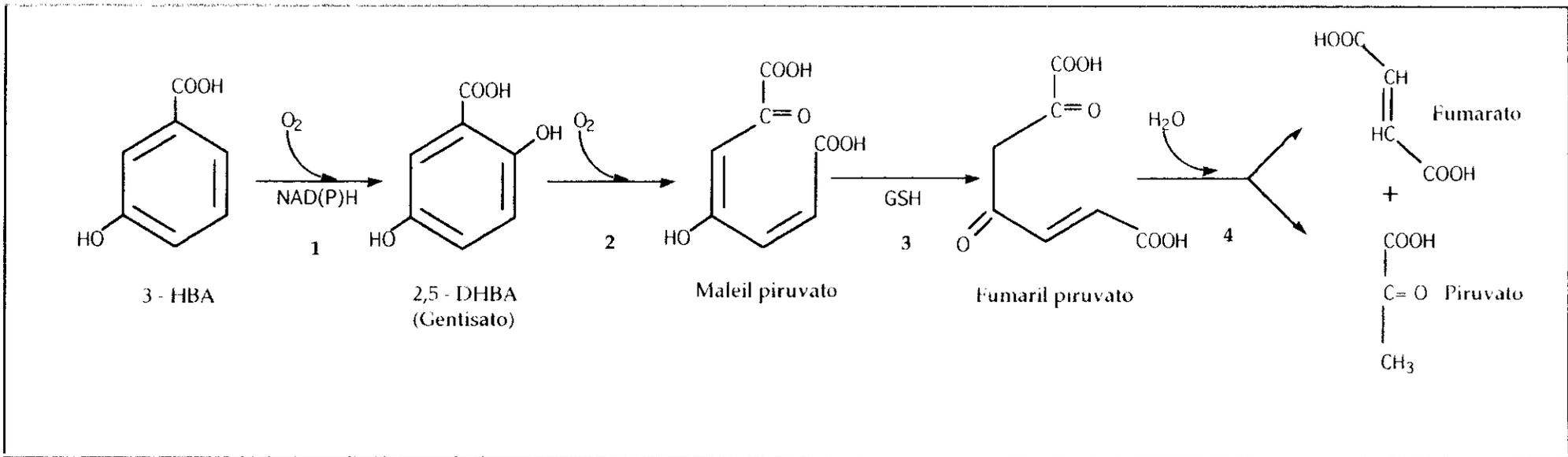


Figura 19: Ruta degradativa del 3-HBA en *K. pneumoniae* M5a1 y MA04. 1. 3-HBA 6-hidroxilasa. 2. 1,2 gentisato dioxigenasa. 3. Maleilpiruvato isomerasa. 4. Fumarilpiruvato hidrolasa. GSH: Glutation.

Tabla II : Actividades específicas* de algunas enzimas implicadas en la degradación del 3- y 4- HBA en *K. pneumoniae* M5a1.

Sustrato de crecimiento	Enzimas ruta Gentisato				Enzimas ruta Protocatecato	
	3 HBA hidroxilasa	Gentisato dioxigenasa	Maleil piruvato isomerasa	Fumaril piruvato hidrolasa	4 HBA hidroxilasa	3,4 diHBA dioxigenasa
Gly	<1	<1	<1	<1	<1	<1
3- HBA	115 ±13	552±28	260±28	303±19	<1	<1
Gly + 2,5 diHBA	78±5	585±52	ND	ND	<1	<1
Gly + 3,4 diHBA	<1	<1	ND	ND	<1	832± 75

* Las actividades específicas vienen expresadas en mU/mg proteína y son el resultado de la media aritmética de 4 medidas.

En la degradación del 3-HBA, tanto por *K. pneumoniae* M5a1 como por el mutante MA04, se detecta una actividad hidroxilasa, que parece ser la responsable de la transformación del 3-HBA en 2,5-DHBA (Tablas II y V). Por tanto, el mutante MA04 conserva la capacidad de degradar 3-HBA. Esta enzima denominada 3-HBA, 6-hidroxilasa inserta el grupo hidroxilo en posición *para*. En *K. pneumoniae* esta enzima utiliza como cofactores NADH y NADPH con la misma eficacia (Tabla III) y su actividad aumenta considerablemente en presencia de FAD.

Tabla III: Actividad específica * de la 3-HBA hidroxilasa de *K.pneumoniae* M5a1 y de la 4-HBA hidroxilasa de *K.pneumoniae* MA04 utilizando diferentes cofactores.

Enzima	Cofactores			
	NADH	NADPH	NADH/FAD	NADPH/FAD
3-HBA hidroxilasa	115± 8	110±14	235±21	222±11
4-HBA hidroxilasa	<1	112±23	<1	225±10

* Expresada en mUI/mg de proteína

- Determinación de los niveles de oxidación.

Los datos obtenidos en los experimentos de oxidación ratifican los resultados encontrados mediante la determinación de actividades enzimáticas. No se observa ninguna oxidación representativa en extractos de células cultivadas en medios nutritivos. Utilizando extractos frescos de *K. pneumoniae* M5a1 cultivadas en 3-HBA se observa que esta cepa es capaz de oxidar el 3-HBA (Tabla IV).

Tabla IV: Niveles de oxidación * en extractos crudos de *k. pneumoniae*.

Cepa	Sustrato de crecimiento	Compuesto oxidado			
		3-HBA	4-HBA	2,5-DHBA	3,4-DHBA
M5a1	Gly	<1	<1	<1	<1
MA04	Gly	<1	<1	<1	<1
M5a1	3-HBA	22±4	<1	16±3	<1
MA04	3-HBA	26±5	<1	14±4	<1
MA04	4-HBA	<1	20±3	8±3	5±2

* Los niveles de oxidación están expresados en nmol O₂ consumido . min⁻¹ . mg prot⁻¹.

El mismo extracto puede oxidar el 2,5-DHBA, pero no se ha observado ninguna actividad utilizando 4-HBA y 3,4-DHBA como sustratos. Estas observaciones sugieren que la cepa salvaje de *K. pneumoniae* cataboliza el 3-HBA vía gentisato y no puede metabolizar el 4-HBA por esta vía. Utilizando extractos de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 3-HBA se observan valores semejantes a los obtenidos para la cepa salvaje de *Klebsiella pneumoniae*.

4. DETERMINACION DE LA RUTA DEGRADATIVA DEL 4-HBA en *K. pneumoniae* MA04

-Determinación de actividades enzimáticas.

Se determinaron todas las actividades enzimáticas correspondientes a la ruta degradativa del 3-HBA vía gentisato y también la 4-HBA, 3-hidroxilasa y 3,4 protocatecato dioxigenasa de la ruta degradativa del 4-HBA. Los resultados obtenidos demuestran que la degradación del 4-HBA tiene lugar vía ácido protocatéquico, ya que los valores de actividad de la 3,4-protocatecuato dioxigenasa fueron altos (Tabla V). Se puede deducir, en principio, que la degradación del 3-HBA y del 4-HBA en *K. pneumoniae* son diferentes.

Las enzimas de la ruta del 4-HBA también parecen inducibles, pero se observa alguna excepción. Cuando se cultiva el mutante MA04 en medios ricos ó en glicerol hay una expresión significativa de la 4-HBA, 3-hidroxilasa que no alcanza los niveles que se obtienen cuando se crece esta misma cepa en 4-HBA. Esto sugiere la posibilidad de que la mutación afecte a un elemento regulador de la hidroxilasa que la haría expresarse constitutivamente.

La actividad de la 4-HBA hidroxilasa detectada durante la degradación del 4-HBA en *K. pneumoniae* MA04 parece ser la responsable

de la transformación del 4-HBA en 3,4-DHBA, y que sólo es capaz de utilizar NADPH como cofactor. Esta hidroxilasa, al igual que la 3-HBA hidroxilasa aumenta su actividad en presencia de FAD (Tabla IV), lo que sugiere que sea una flavoproteína.

Aunque en los extractos de *K. pneumoniae* MA04 se detecta actividad 2,5-DHBA dioxigenasa, los valores de la actividad de la 3,4 protocatecuato dioxigenasa son notablemente superiores. Este hecho lleva a considerar al 3,4-DHBA como intermedario de la ruta degradativa del 4-HBA. Hay que destacar que en esta ruta el 3,4 DHBA sufre la escisión del anillo aromático entre los carbonos 3 y 4 mediante una rotura *orto* ó intradiol por acción de la 3,4-DHBA dioxigenasa, formando el β -carboxi-cis,cis muconato (Fig. 20).

Curiosamente, cuando se cultiva *K. pneumoniae* MA04 en 4-HBA aparece la inducción de todas las enzimas de la ruta del gentisato, aunque se detecten unos valores muy superiores de la 4-HBA hidroxilasa y 3,4- dioxigenasa. Este fenómeno de doble inducción ya ha sido descrito en *P. acidovorans* y *P. testosteroni* (Wheelis y col., 1967; Harpel y col., 1990) para el metabolismo de estos mismos compuestos (3- y 4-HBA) y parece tratarse de simples inducciones gratuitas cuyo significado fisiológico se desconoce.

-Determinación de los niveles de oxidación.

Cuando *K. pneumoniae* MA04 se cultiva en 4-HBA se detectan ciertos valores de oxidación para el 3,4 y 2,5-DHBA (Tabla IV). Estos resultados , aunque bajos, sugieren la posibilidad de oxidación de que los dos sustratos dihidroxilados sean oxidados por *Klebsiella pneumoniae.*, y, de hecho, las dos cepas de *K. pneumoniae* pueden crecer tanto en 2,5-DHBA como en 3,4-DHBA.

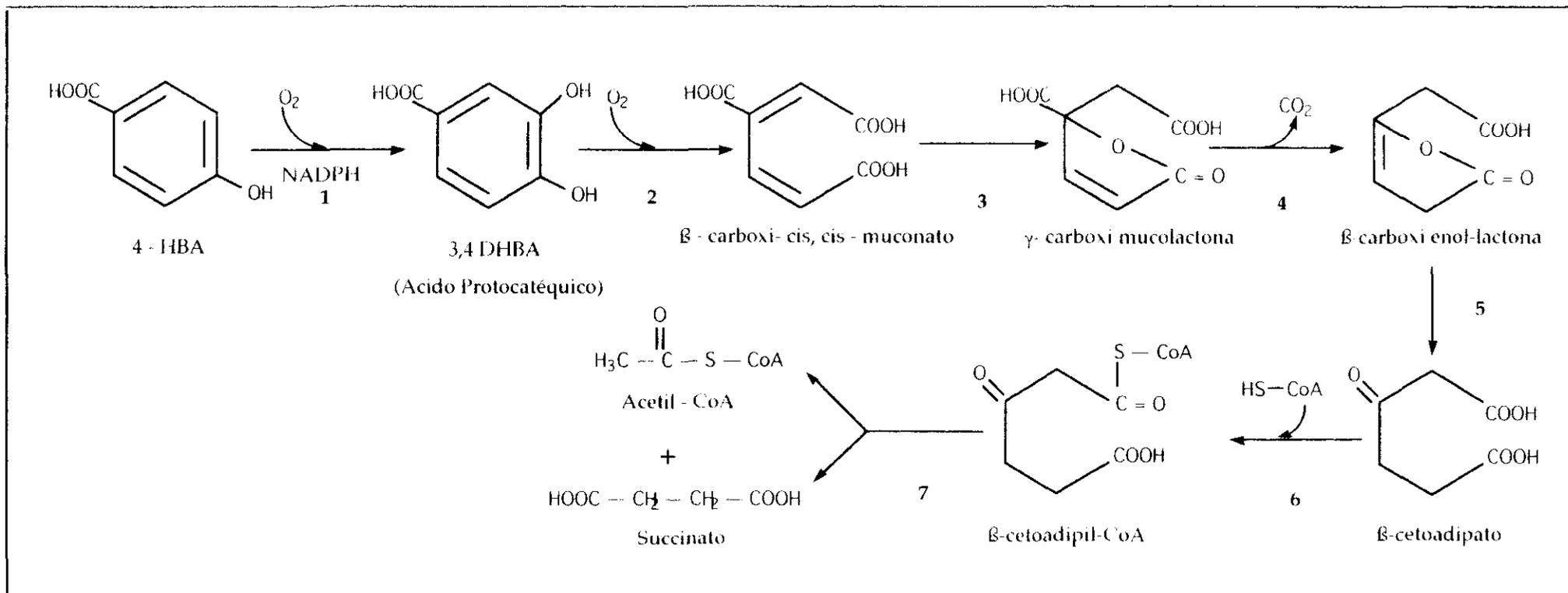


Figura 20: Ruta degradativa del 4-HBA en *K. pneumoniae* MA04. 1. 4-HBA 3-hidroxisilasa. 2. 3,4- protocatecato dioxigenasa. 3. γ - carboxi muconato cicloisomerasa. 4. γ - carboxi mucolactona descarboxilasa. 5. β -cetoadipato enol-lactona hidrolasa. 6. β -cetoadipato succinil-CoA transferasa. 7. β -cetoadipil-CoA tiolasa.

Tabla V : Actividades específicas* de algunas enzimas implicadas en la degradación del 3- y 4- HBA en *K. pneumoniae* MA04.

Sustrato de crecimiento	Enzimas ruta Gentisato				Enzimas ruta Protocateato	
	3 HBA hidroxilasa	Gentisato dioxigenasa	Maleil piruvato isomerasa	Fumaril piruvato hidrolasa	4 HBA hidroxilasa	3,4 dHBA dioxigenasa
Gly	<1	<1	<1	<1	15±4	<1
LB	<1	<1	ND	ND	24 ± 2	<1
3- HBA	108 ±12	585±39	257±27	352±12	13± 2	<1
4- HBA	38±4	113±17	85± 5	107± 8	145±230	883±53
Gly + 2,5 dHBA	102±13	563±271	ND	ND	9± 2	<1
Gly + 3,4 dHBA	<1	<1	ND	ND	15±11	852±28

* Las actividades específicas vienen expresadas en mU/mg proteína y son el resultado de la media aritmética de cuatro medidas.

5. INDUCCION ENZIMATICA Y CRECIMIENTO EN OTROS COMPUESTOS AROMATICOS.

La cepa salvaje de *Klebsiella pneumoniae* es capaz de crecer en 2,5 dHBA, 3,4 DHBA, 3 y 4- hidroxifenilacetato, ácido benzoico, ácido p-hidroximandélico y p-aminobenzoico. La cepa mutante es capaz de crecer en todos estos compuestos y además en 4- HBA.

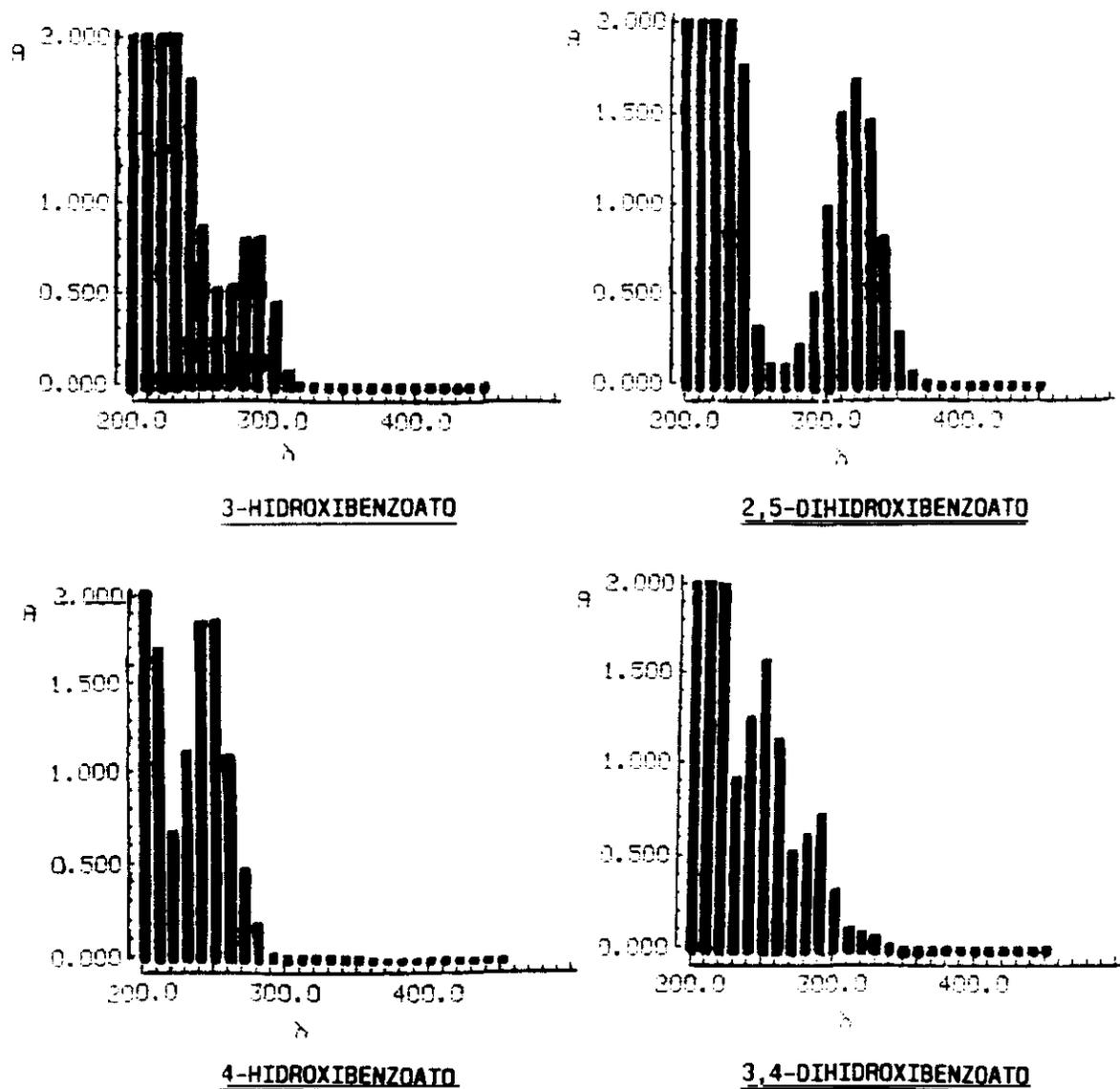


Figura 21: Medida de la absorbancia entre $\lambda = 200-450$ nm del 4-HBA, 3-HBA, 3,4-DHBA y 2,5-DHBA.

Con el fin de comprobar que no se perdían las propiedades de absorción de las fuentes de carbono al ser esterilizadas mediante vapor, se realizaron análisis espectrales en la región visible UV ($\lambda = 200-450$ nm) de los compuestos monohidroxilados: 3-HBA y 4-HBA y dihidroxilados: 3,4-DHBA y 2,5-DHBA (Fig. 22). Los máximos de absorbancia fueron 300 nm para el 3-HBA, 250 nm para el 4-HBA, 250 y 290 nm para el 3,4-DHBA y 330 nm para el 2,5-DHBA.

La cepa salvaje y el mutante MA04 de *K. pneumoniae* se cultivaron en 3,4-DHBA y en 2,5-DHBA. En los extractos se determinaron las actividades de las hidroxilasas y dioxigenasas reflejados en la tablas II y V. Es necesario indicar que el color de los cultivos de ambas cepas al crecer en estos compuestos fue característico (Fig. 21). El medio de cultivo de *K. pneumoniae* MA04 en gly/ 3,4-HBA tenía el mismo color que el obtenido cuando cultivamos esta cepa en 4-HBA (Fig. 15). Este hecho sugiere que el color se debe a la presencia del 3,4-DHBA cuando se acumula en el medio.

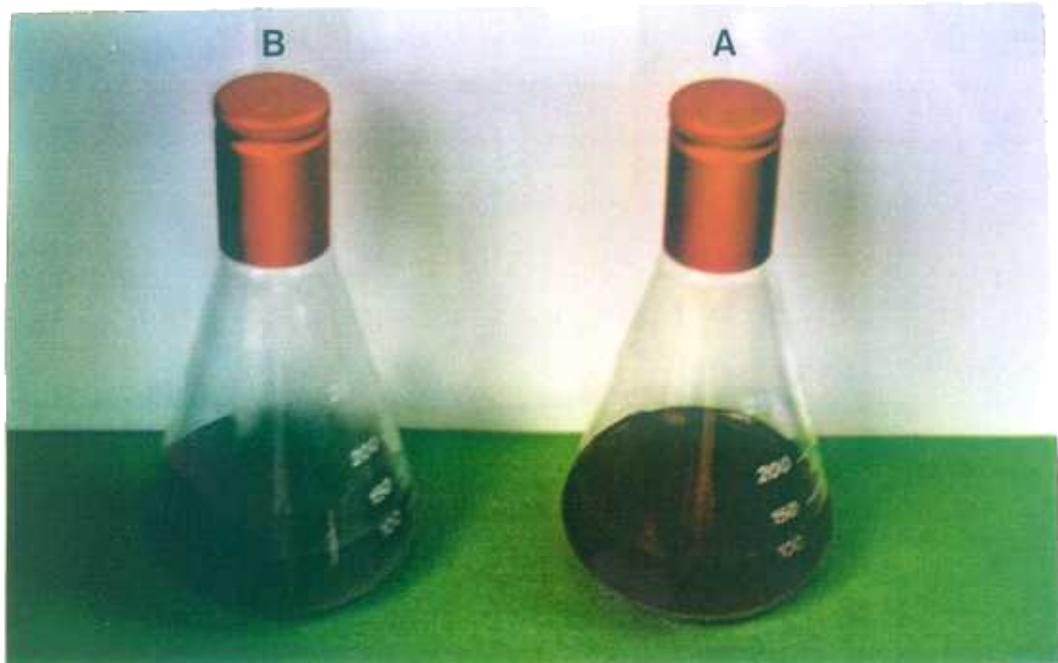


Fig. 22: Cultivos en fase logarítmica de crecimiento. A: Color rojizo del cultivo de *K. pneumoniae* M5a1 en gly / 2,5-DHBA. B: Color azulado del cultivo de *K. pneumoniae* MA04 en gly / 3,4-DHBA.

Cuando se cultiva la cepa salvaje de *K. pneumoniae* en Gly/3,4-DHBA no se obtiene actividad de ninguna de las enzimas implicadas en la ruta del 3-HBA y sólo se detecta la dioxigenasa correspondiente a la ruta del 4-HBA, con un valor semejante al obtenido por la cepa mutante MA04 en este mismo medio de cultivo (Tabla II).

Si se utiliza como inductor el 2,5-DHBA en la cepa salvaje de *K. pneumoniae* se puede observar un valor similar al de la 2,5-DHBA dioxigenasa cuando esta misma cepa se cultiva en 3-HBA. Pero el valor de la 3-HBA hidroxilasa es diferente cuando se cultiva *K. pneumoniae* M5a1 en Gly/3,4-DHBA. En este caso se encuentra un valor más bajo, aproximadamente un 50% del que se obtiene cuando se metaboliza el 3-HBA directamente (Tabla II). Este dato sugiere la posibilidad de que ambas enzimas 2,5-DHBA dioxigenasa y 3-HBA hidroxilasa se encuentren situadas en un mismo operón. En cultivos de *K. pneumoniae* M5a1 en Gly/ 2,5-DHBA no se detectó ninguna actividad enzimática relacionada con la ruta del 4-HBA.

Cuando se cultiva el mutante MA04 de *K. pneumoniae* en Gly/2,5-DHBA se observa un comportamiento similar al que presenta la cepa salvaje. Este mutante en Gly/3,4-DHBA no expresa ninguna enzima de la ruta del 3-HBA pero sí la 4-HBA hidroxilasa con una actividad bastante menor que la obtenida cuando se metaboliza directamente el 4-HBA. La dioxigenasa, sin embargo se expresa con una actividad similar a la que se obtiene en 4-HBA (Tabla V). Estos datos demuestran que la 4-HBA hidroxilasa se expresa constitutivamente, y que esta enzima y la 3,4-DHBA dioxigenasa se encuentran localizados en operones distintos.

6. CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DEL 4-HBA.

Con el fin de obtener información acerca de la naturaleza de la mutación que permite a la cepa MA04 degradar el 4- HBA, se estudió el transporte de este compuesto a través de la membrana bacteriana.

- Inducción del sistema de transporte del 4-HBA y determinación de los parámetros cinéticos del transporte.

Los experimentos de transporte se realizaron siguiendo el apartado II. 2. 3. Se cultivó *K. pneumoniae* MA04 bajo condiciones aerobias en glicerol y añadiendo el 4-HBA tres generaciones antes de centrifugar las células. Para estudiar la inducción del transporte se emplearon también otros sustratos de crecimiento tal y como indica la Tabla VI.

Tabla VI: Transporte de 4-HBA de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en distintos sustratos.

Sustrato de crecimiento	Transporte de 4-HBA (nmol/ min mg prot)	Inducción relativa (%)
Glicerol	0,1	1,0
Glicerol + 4-HBA	17,0	100,0
Glicerol + 3-HBA	1,3	7,7
Glicerol + 3,4-DHBA	4,8	28,2
Glicerol + 2,5-DHBA	1,0	5,8
Glicerol + 4-HPA	1,5	8,8
Glicerol + 3-HPA	0,4	2,4

Se observa que el 4-HBA induce el nivel más alto de transporte, mientras que el análogo estructural, el 3,4 DHBA induce únicamente 28%. Es hasta cierto punto sorprendente que el 3-HBA sólo induzca un 7% al igual que otros compuestos como el 3 y 4- HPA y glicerol que presentan unos niveles bajos de inducción.

El transporte del 4-HBA es un proceso saturable cuyos parámetros cinéticos determinados a pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 están reflejados en la tabla VII. Se puede observar que no existen diferencias considerables, aunque sí un ligero incremento de la K_T y V_{max} a pH 8.0.

Tabla VII: Parámetros cinéticos del transporte del 4-HBA en *K.pneumoniae* MA04 a diferentes pH.

pH	K_T (μM)	V_{max} . (nmol/min. mg prot.)
6,0	24 \pm 7	25,8 \pm 6
6,5	16 \pm 5	26,7 \pm 5
7,0	13 \pm 4	27,6 \pm 4
7,5	18 \pm 8	29,8 \pm 5
8,0	37 \pm 8	36,3 \pm 8

La especificidad del sistema de transporte para el 4-HBA se realizó determinando la proporción de ^{14}C [4-HBA] transportado, en presencia de varios análogos estructurales del sustrato (Tabla VIII). Según los datos obtenidos el inhibidor más potente del transporte del 4-HBA fue el 3,4-DHBA, con un efecto inhibitor superior al 60%, seguido del 4-HPA con un 34%, del 3-HBA con un 33% y del 3,4-DHPA con un 31%. Con los demás sustratos la actividad de transporte se reducía entre el 8 y el 24%.

Tabla VIII: Efecto de algunos análogos estructurales en el transporte de 4-HBA en *K.pneumoniae* MA04.

Compuesto	Actividad de transporte (%)
Ninguno	100
3-hidroxibenzoato	67
3,4-dihidroxibenzoato	37
2,5-dihidroxibenzoato	80
2,3-dihidroxibenzoato	83
4-hidroxifenilacetato	66
3,4-dihidroxifenilacetato	69
3-hidroxifenilacetato	86
4-iodobenzoato	77
4-clorobenzoato	76
4-aminobenzoato	85
Tirosina	92

Con el objeto de obtener información acerca de la inhibición del 3,4-DHBA sobre el transporte del 4-HBA, se realizó un estudio más detallado del mismo, calculándose los parámetros cinéticos de inhibición.

Cuando se representaron los datos obtenidos según la representación Lineweaver-Burk de $1/[4\text{-HBA}]$ frente a $1/v$ a cuatro concentraciones de 3,4-DHBA (4, 8, 12 y 16 μM) se obtuvieron una serie de líneas que convergían en un punto en el eje de las Y (Fig. 23)

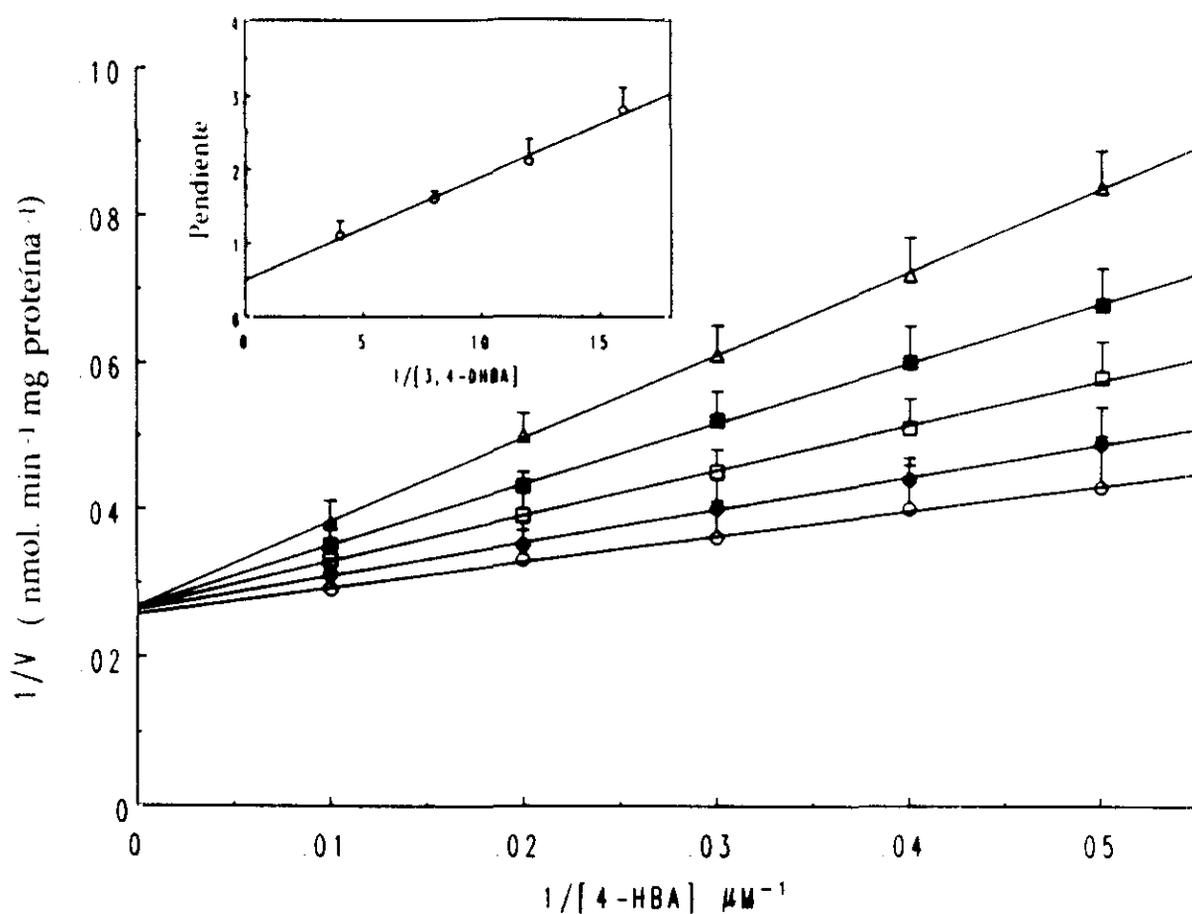


Figura 23: Representación de dobles recíprocas en la inhibición del transporte del 4-HBA por 3,4-DHBA. ¹⁴C- 4-HBA fue el sustrato variable frente a las concentraciones de 3,4-DHBA. (●) 4 μM ; (□) 8 μM ; (■) 12 μM ; (△) 16 μM y (○) sin 3,4-DHBA. La pendiente de cada recta es función de la concentración de 3,4-DHBA.

Cuando se representaron las pendientes de estas rectas frente a $1/[3,4\text{-DHBA}]$ se obtuvo una línea recta con una K_i aparente de $26,3 \pm 4 \mu\text{M}$. Este valor es del mismo orden que K_i 4-HBA y refleja una alta sensibilidad del sistema de transporte del 4-HBA a la inhibición por 3,4- DHBA.

-Efecto de los inhibidores del transporte y contenido de ATP

Se analizaron los efectos de varios inhibidores de la energía necesaria para que se lleve a cabo el transporte y se midió el nivel de ATP intracelular.

Tabla IX: Efecto de varios compuestos sobre el transporte del 4-HBA y el nivel de ATP.

Compuesto (concentración)	Actividad de transporte (%)	Nivel de ATP (%)
Ninguno	100	100
K CN (1mM)	72	68
Na F (1mM)	80	74
N ₃ Na (5 mM)	65	38
Arseniato (10mM)	76	31
2,4-dinitrofenol (2 mM)	6	57
Gramicidina (100 mM)	0	85
Carbonil cianido-m-cloro- fenil hidrazona (10 μM)	9	61
Diciclohexil carbodiimida (5 μM)	95	68

Como indica la tabla IX, el fluoruro sódico y el cianuro potásico reducen ligeramente la actividad del transporte y el contenido en ATP, mientras que la azida sódica (N_3Na) y el arseniato afectan mayormente al nivel de ATP reduciéndolo en un 60%.

También se ensayaron desacoplantes del transporte como 2,4 dinitrofenol, gramicidina y carbonilcianido clorofenilhidrazona (CCCP), los cuales disipan la fuerza protomotriz, y se comprobó que reducían la actividad transportadora significativamente, mientras que el valor de ATP se reducía menos de un 50%. Estos resultados sugieren que el proceso de transporte puede producirse en ausencia de la hidrólisis de ATP. Este hecho se puede confirmar por la acción del diclohexil carbodiimida (DCCD), un inhibidor de la hidrólisis de ATP que no afecta en absoluto al transporte aunque disminuye la síntesis de ATP. Por tanto, se puede deducir que el transporte es activo y que es la fuerza protomotriz la que genera la energía necesaria para que se realice.

-Efecto del choque ósmótico en el transporte

Las células de *K. pneumoniae* MA04 se trataron como se indicó en el apartado II.2.3. Las células sometidas a choque ósmótico se compararon con las no tratadas. Los datos obtenidos indican que la pérdida de actividad del transporte en células tratadas sólo fue de un 5% después de 5 min. de tratamiento. Este hecho sugiere que el tipo de transporte es resistente al choque osmótico y que, por tanto, la acción de incorporación del 4-HBA al interior de la célula debe tener lugar a través de una permeasa.

-Efecto de ionóforos

Los resultados del tratamiento con valinomicina y nigericina vienen reflejados en la fig. 24. Se ensayó el efecto de la valinomicina que anula el potencial de membrana en presencia de iones K^+ , observándose que el transporte era inhibido entre los pH 5 y 8. Sin embargo, cuando se utilizó nigericina, que bloquea el gradiente de pH, el transporte no se vió afectado. Estos resultados confirman que el transporte del 4-HBA está acoplado al potencial de membrana.

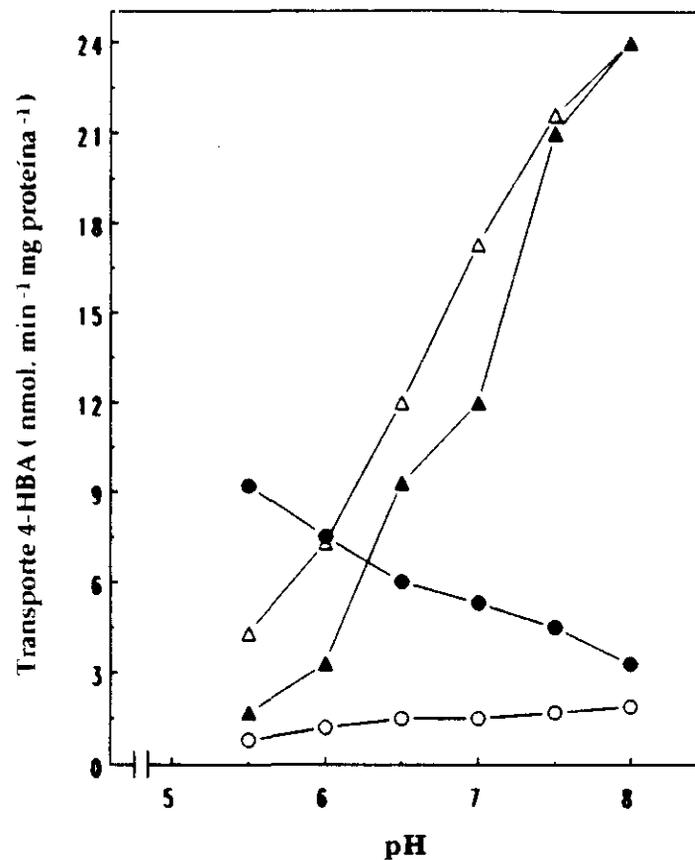


Figura 24: Efecto de la nigericina y valinomicina en el transporte del 4-HBA por *Klebsiella pneumoniae* MA04 a diferentes pH. (Δ) En ausencia de ionóforo; (▲) en presencia de 1 μ M de nigericina; (●) en presencia de 10 μ M de valinomicina; (○) en presencia de ambos.

7. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA 4-HBA 3- HIDROXILASA

La 4-HBA 3-hidroxilasa se purificó a partir de extractos celulares de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 4-HBA. El método de purificación utilizado se esquematiza en la Fig. 13 del punto II. 2.8 y los resultados obtenidos se resumen en la tabla X. El extracto celular se pasó por una columna de Blue Sepharose y la actividad 4-HBA hidroxilasa se obtuvo en las fracciones 8, 9 y 10 eluyendo a un 50% de concentración 0.2 M de KCl. Estas fracciones, de 1 ml cada una, se inyectaron nuevamente en una columna de Superose 12, donde la enzima eluyó en las fracciones 13, 14 y 15.

Las fracciones 13 y 15 se inyectaron nuevamente en una columna de Mono Q y la actividad 4 HBA hidroxilasa se detectó en las fracciones 21 y 22, obtenidas cuando la concentración de KCl era de 0.13 M. Se mezclaron estas fracciones y se dializaron durante 12 horas frente a tampón Tris 20 mM pH 8.2 . Posteriormente, la solución enzimática se volvió a inyectar a una columna de Mono Q, obteniéndose la enzima pura eluyendo en las fracciones 25 y 26 a una concentración 0.23 M de KCl. El perfil de elución de esta última columna aparece en la figura 25.

-Determinación de la pureza por métodos electroforéticos.

Se realizaron electroforesis en geles nativos y de SDS como se mencionó en el punto II. 2.9. Mediante tinción con nitrato de plata ó con azul de Coomassie se determinó la pureza por visualización de una única banda en el gel de poliacrilamida (Figura 26).

-Determinación del peso molecular

El peso molecular de la proteína pura determinado por cromatografía en gel de filtración, resultó 80.000 ± 10.000 . El peso molecular de las subunidades se determinó por electroforesis en geles de SDS comerciales utilizando un aparato Phast System de Pharmacia. Se observó que la proteína está formada por dos subunidades idénticas de 40.000 ± 2.000 (Fig. 27)

-Determinación del punto isoelectrico.

El punto isoelectrico de la proteína pura determinado en geles comerciales usando el Phast System, resultó de $4,6 \pm 0,1$ (Fig. 28)

-Análisis de la composición de aminoácidos.

La composición de aminoácidos analizada como se citó en el punto II.2.10., proporcionó el resultado que se indica en la tabla XI. Se han comparado la composición aminoacídica de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* con la de las enzimas homólogas de *Pseudomonas fluorescens* (Hofgsteen y col., 1983) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Fernández y col., 1993).

Tabla X: Proceso de purificación a homogeneidad de la 4-HBA 3-hidroxilasa.

Etapas de Purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (mUI)	Actividad Específica (mUI/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Extracto Crudo	5	26.5	4000	154	100	—
Blue Sepharose	3	3.9	3900	869	97	5.6
Superose 12	3	0.48	1560	3250	39	21.1
Mono Q	2	0.06	640	10600	10	68.8
Mono Q	2	0.02	300	15000	7.5	97.4

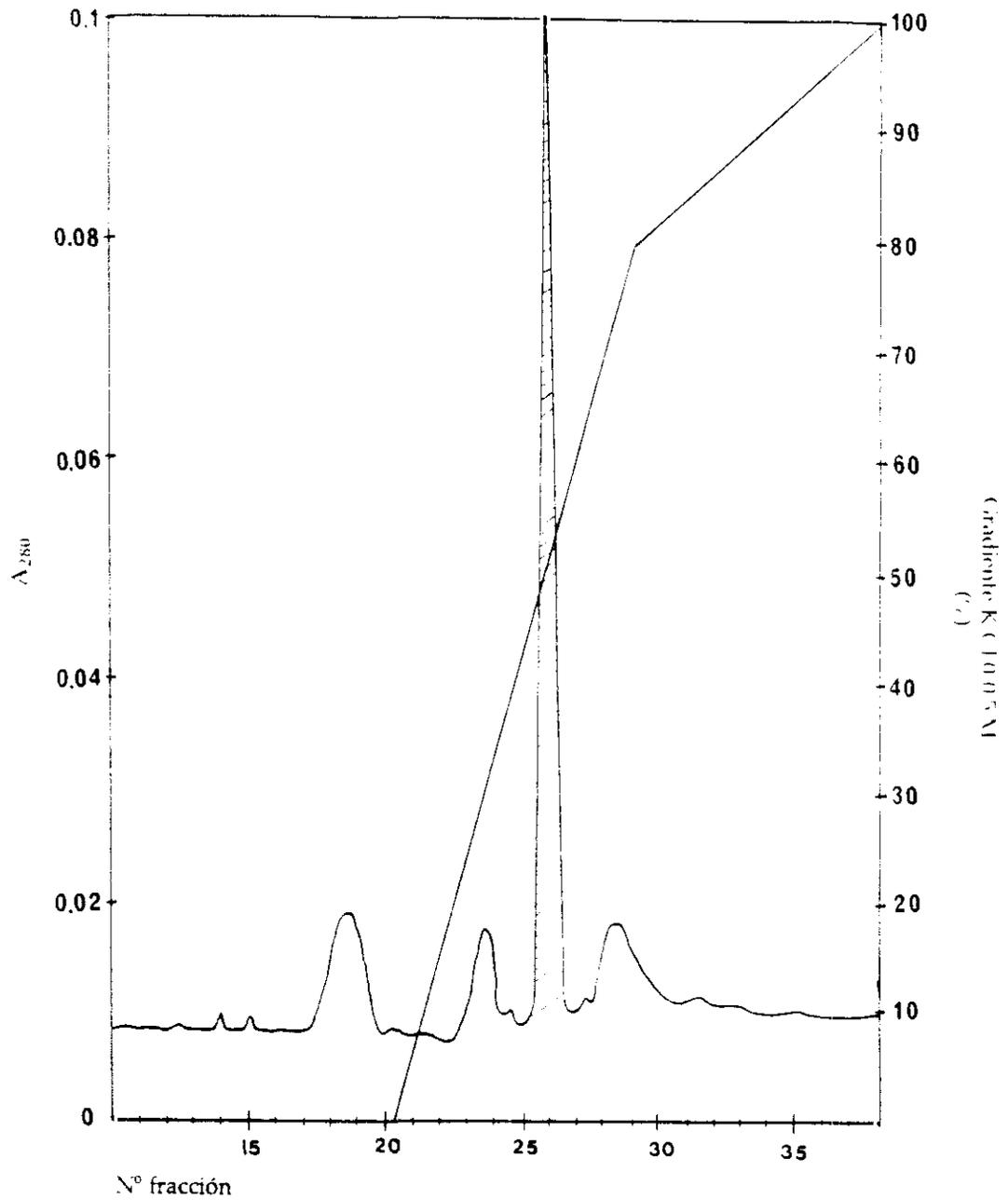


Figura 25: Perfil de elución de la 4-HBA 3-hidroxilasa (E) obtenido por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna Mono Q del sistema FPLC. La enzima eluyó a una concentración 0,23 M de K Cl.

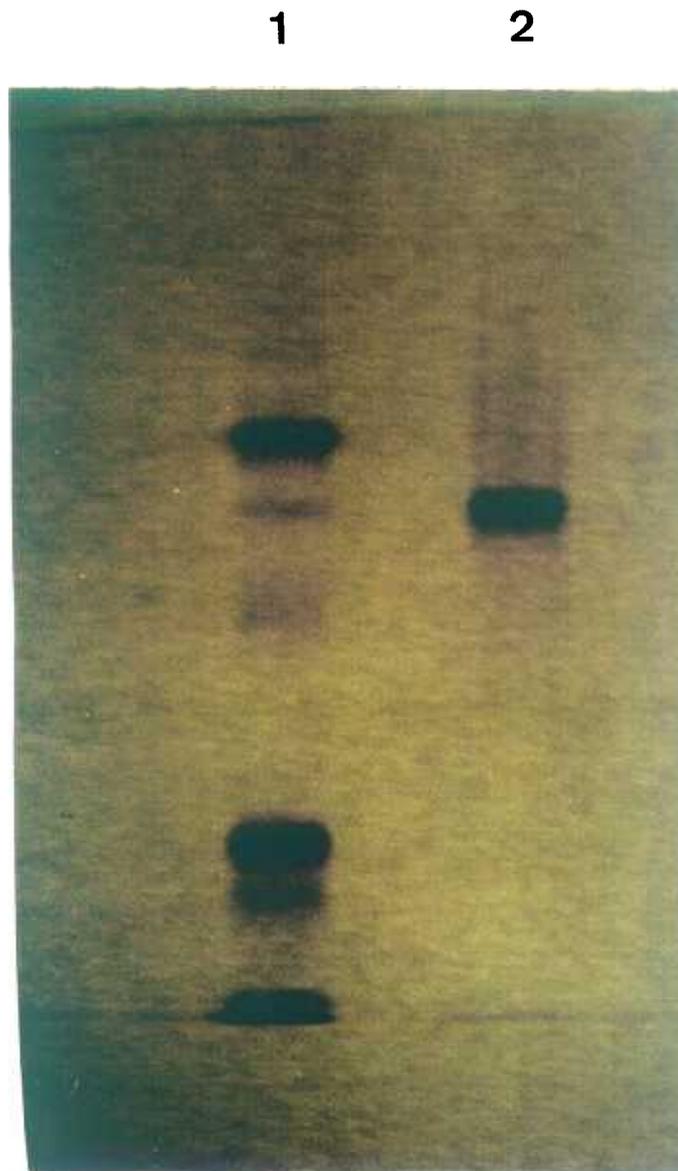


Figura 26: Electroforesis en condiciones nativas en un gel de poliacrilamida al 8 % teñido con azul de Coomasie.

1. Proteínas patrón: Fosforilasa b (94.000 Da); Albúmina (67.000 Da); Ovoalbúmina (43.000 Da); Anhidrasa carbónica (30.000 Da); Inhibidor de tripsina (20.100 Da); α -Lactoalbúmina (14.400 Da). 2. Extracto eluído de la columna Mono Q : 4-HBA 3-hidroxilasa.

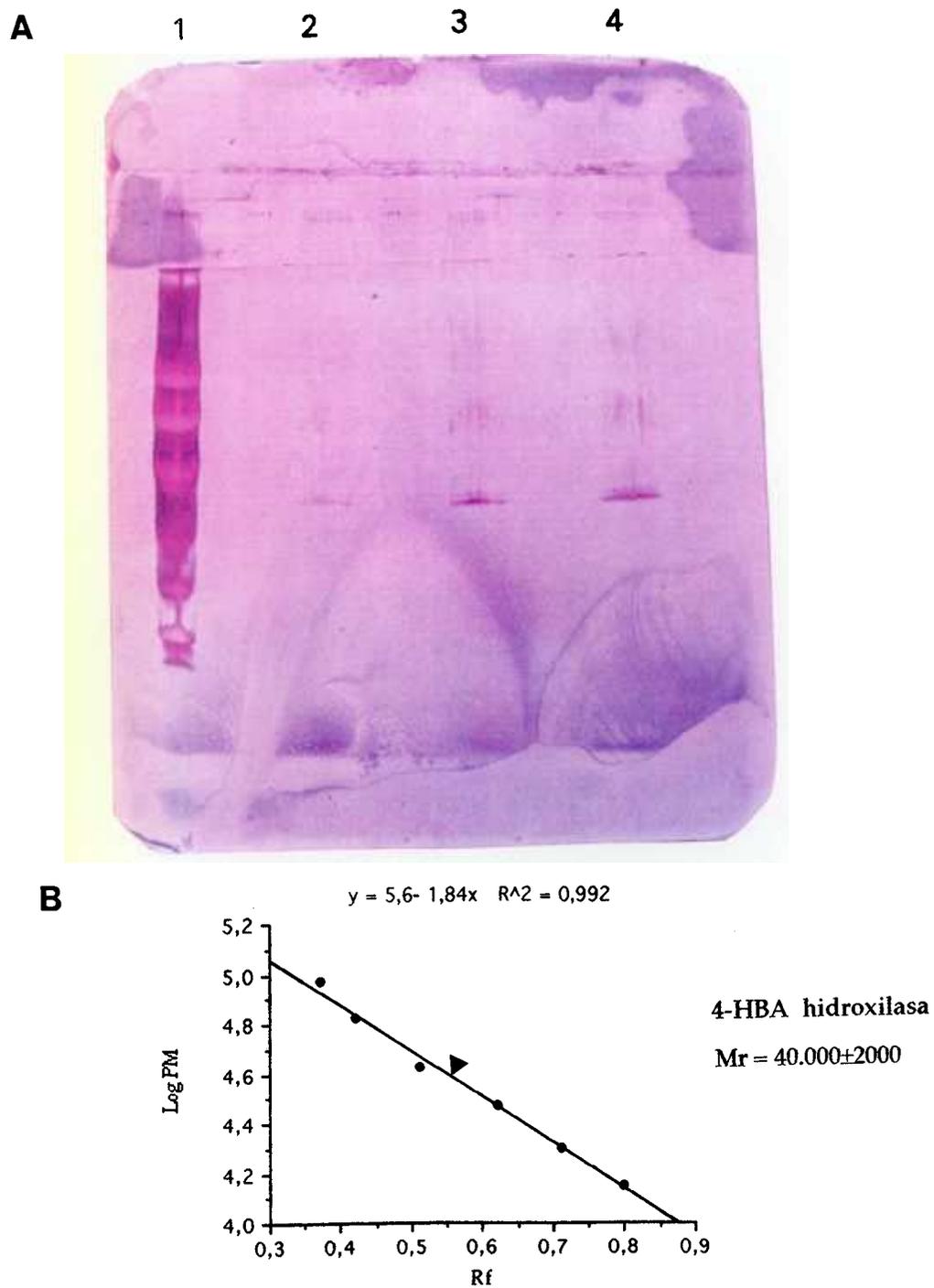


Figura 27: Determinación del peso molecular de las subunidades que componen la 4-HBA, 3-hidroxilasa (B) en función de la movilidad relativa R_f de las bandas de proteína en geles de poliacrilamida (8-25 %)-SDS 0.1% del teñidos con nitrato de plata (A).

1. Proteínas patrón: Fosforilasa b (94.000 Da); Albúmina (67.000 Da); Ovoalbúmina (43.000 Da); Anhidrasa carbónica (30.000 Da); Inhibidor de tripsina (20.100 Da); α -Lactoalbúmina (14.400 Da). 2., 3. y 4. Extracto eluido de la columna Mono Q : 4-HBA, 3-hidroxilasa.

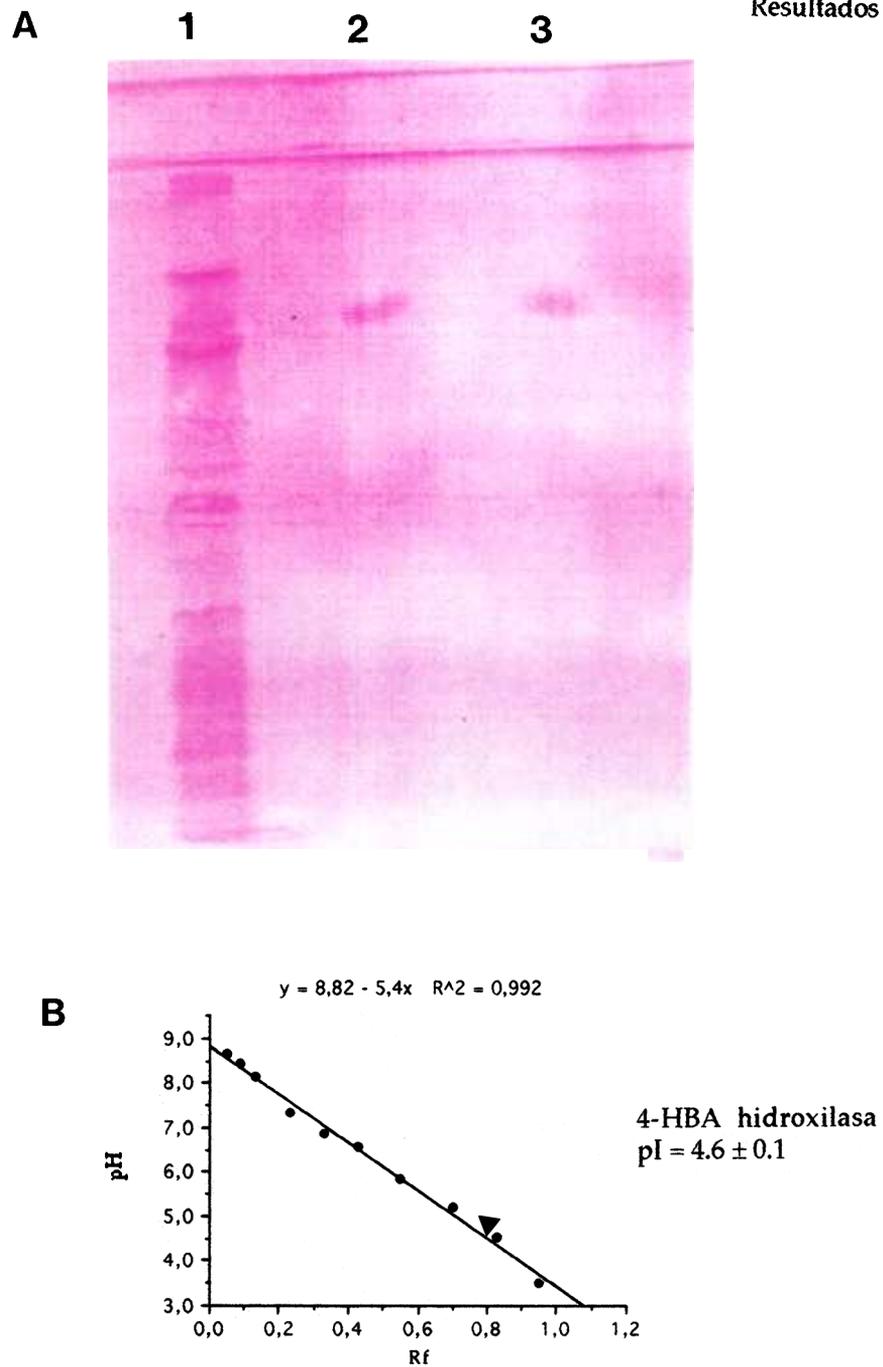


Figura 28: Determinación del punto isoelectrico de la 4-HBA, 3-hidroxilasa (B) en función de la movilidad relativa R_f de las bandas de proteína en geles IEF (3-9) teñido con nitrato de plata (A).

1. Proteínas patrón: Amiloglucosidasa, 3.5; Rojo de metilo, 3.75; Inhibidor de la tripsina, 4.55; β-lactoglobulina A, 5.20; Anhidrasa carbónica bovina B, 5.85; Anhidrasa carbónica humana B, 6.55; Mioglobina (banda ácida), 6.85; Mioglobina (banda básica), 7.35; Lentil lectina (ácido), 8.15; Lentil lectina (medio), 8.45; Lentil lectina (básico), 8.65; Tripsinógeno, 9.30 . 2. y 3. 4-HBA, 3-hidroxilasa.

Tabla XI: Composición de aminoácidos de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* comparativa con las de otras 4-HBA hidroxilasas purificadas

Aminoácidos	<i>A.calcoaceticus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>K. pneumoniae</i> .	
	Nºresiduos	%	Nºresiduos	%	Nºresiduos	%
Alanina	30	7,4	36	9,1	38	10,5
Arginina	16	3,9	38	9,6	12	3,3
Asparragina	9	2,2	4	1,0	—	—
Acido aspártico	21	5,1	19	4,8	42	11,6
Cisteína	7	1,7	5	1,2	6	1,6
Glutamina	24	5,9	15	3,8	—	—
Acido glutámico	32	7,9	34	8,6	24	6,6
Glicina	30	7,4	34	8,6	32	8,8
Histidina	11	2,7	9	2,2	9	2,5
Isoleucina	23	5,6	18	4,5	17	4,7
Leucina	39	9,6	46	11,6	23	6,3
Lisina	23	5,6	12	3,0	27	7,4
Metionina	6	1,4	6	1,5	8	2,2
Fenilalanina	16	3,9	12	3,0	12	3,3
Prolina	15	3,7	17	4,3	18	4,9
Serina	30	7,4	19	4,8	16	4,4
Treonina	21	5,1	20	5,0	35	9,6
Triptófano	6	1,4	5	1,2	—	—
Tirosina	18	4,4	17	4,3	7	1,9
Valina	27	6,6	28	7,1	36	9,9

-Secuenciación del extremo aminoterminal

Se secuenciaron los 21 aminoácidos del extremo amino terminal de la forma que se menciona en el punto II. 2.10. La secuencia es la que aparece en la fig. 29:

Acinetobacter calcoaceticus M **K** T K V A I I **G** S **G** P A **C** L L L G N L L

Pseudomonas fluorescens M K T G V A I I **G** A **G** P S **C** L L L G E L L

Klebsiella pneumoniae M **K** A P V G I N **G** F **G** R I **C** R I V F R A A

Figura 29: Secuencia del extremo amino-terminal de la 4-HBA hidroxilasa en tres especies bacterianas. Los aminoácidos que se resaltan son los conservados en *K. pneumoniae*

8. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA 3-HBA 6-HIDROXILASA

La 3-HBA 6-hidroxisasa se purificó a partir de extractos celulares de *K. pneumoniae* cultivada en 3 HBA, según el método descrito en el punto II. 2.8 (Fig. 14). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla XII.

El extracto celular se inyectó en un columna de Mono Q, detectándose una actividad 1,2 dioxigenasa en la fracción 10 eluída a una concentración 0.30 M de KCl. Esta actividad dioxigenasa, que enmascaraba la actividad de la 3-HBA hidroxisasa, fue inhibida por la adición de EDTA 50 mM.

Para eliminar el contenido en KCl se pasó la fracción 10 por un pequeña columna de Sephadex G-25. Posteriormente, la solución de proteínas se cargó en la misma columna de Mono Q pero con un gradiente mucho más lento, obteniéndose 5 picos de proteína mayoritarios de los cuales uno correspondía con la actividad 3-HBA hidroxisasa. En el tubo 22 se obtuvo la proteína pura y en el 21 se detectó un elevado grado de pureza. El contenido de este último tubo se pasó por una columna de gel-filtración para eliminar las pequeñas contaminaciones. El perfil de elución de esta columna se muestra en la figura 30.

-Determinación de la pureza por métodos electroforéticos.

La obtención de la proteína pura se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida nativos y de SDS teñidos con nitrato de plata. Se puede observar que en la fig. 31 aparece una sola banda que resultó ser de menor tamaño que la 4-HBA, 3-hidroxisasa.

-Determinación del peso molecular

El peso molecular se determinó por cromatografía de filtración en gel, y electroforesis en geles de SDS utilizando el Phast System. según se deduce por interpolación de la recta de calibración, esta enzima parece estar formada por un monómero de 42.000 ± 1.000 (Fig. 32).

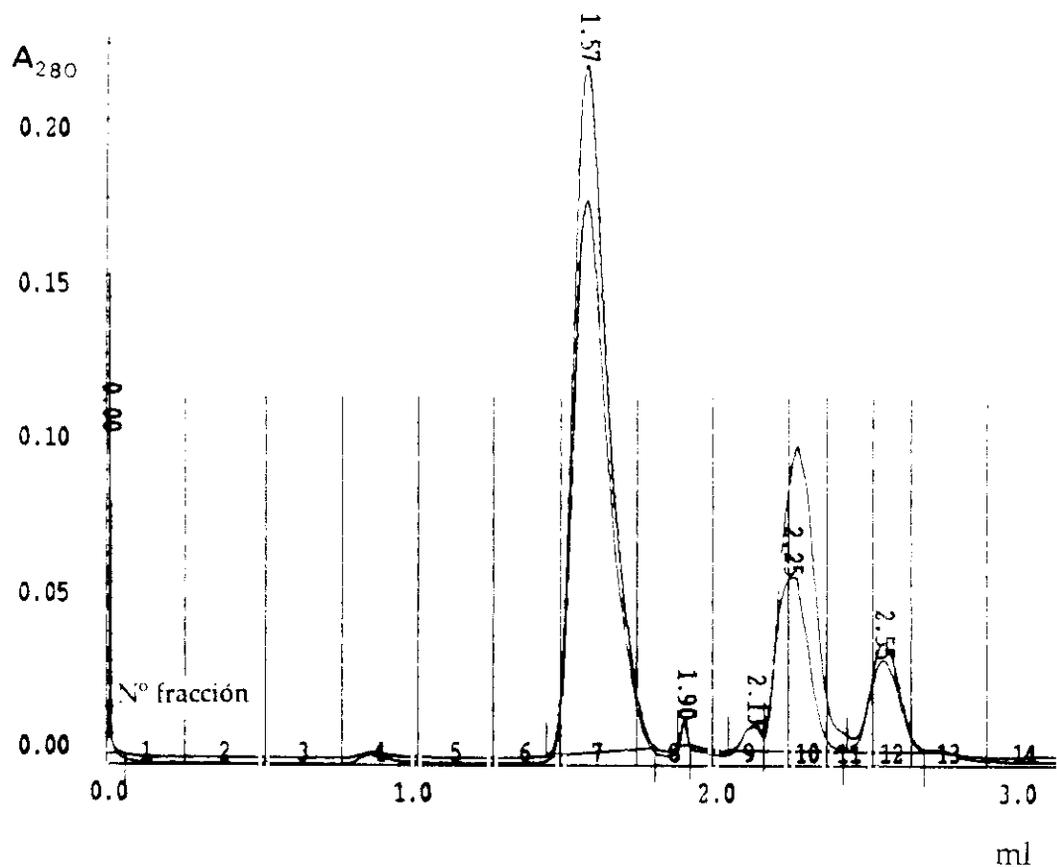


Figura 30: Perfil de elución de la 3-HBA, 6-hidroxilasa obtenido por cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna Superose 6 PC del sistema Smart.

Tabla XII: Proceso de purificación a homogeneidad de la 3-HBA 6-hidroxilasa.

Etapas de Purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (mUI)	Actividad Especifica (mUI/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Extracto Crudo	4	23.2	2640	106	100	—
Mono Q	1.5	1.8	1060	590	40	5.5
Sephadex G-25	1.5	1.5	930	620	35	5.8
Mono Q	1	0.11	310	2818	12	26.5
Superose 6PC	1	0.04	180	4180	7	39.4

-Determinación del punto isoelectrico.

El punto isoelectrico de la 3-HBA, 6-hidroxilasa se obtuvo mediante la técnica de isoelectroenfoque utilizando el Phast System. El valor obtenido fue de $5,06 \pm 0,004$ (Fig. 33).

-Análisis de la composición de aminoácidos

Los aminoácidos de la 3-HBA hidroxilasa fueron analizados en un analizador automático Beekman modelo 1203 equipado con una columna rellena de resina M 70 (Beekman). El resultado obtenido se indica en la tabla XIII.

Tabla XIII: Composición de aminoácidos de la 3-HBA 6 hidroxilasa en *K. pneumoniae*

Aminoácidos	<i>K. pneumoniae.</i>	
	Nºresiduos	%
Alanina	38	11,7
Arginina	24	7,4
Asparragina	-	-
Acido aspártico	32	9,8
Cisteína	-	-
Glutamina	-	-
Acido glutámico	35	10,7
Glicina	34	10,4
Histidina	12	3,7
Isoleucina	13	4
Leucina	24	7,4
Lisina	18	5,5
Metionina	2	0,6
Fenilalanina	8	2,5
Prolina	17	5,2
Serina	14	4,3
Treonina	17	5,2
Triptófano	-	-
Tirosina	10	3,1
Valina	27	8,3

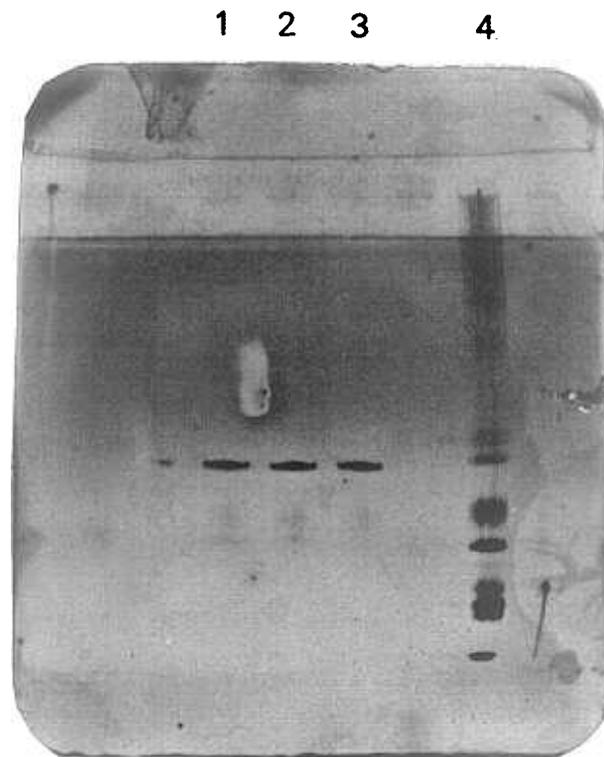


Figura 31: Electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida (8-25 %)-SDS 0.1 % teñido con nitrato de plata.

1., 2. y 3. Extracto eluído de la columna Superose 6 PC : 3-HBA, 6-hidroxilasa. 4. Proteínas patrón: Fosforilasa b (94.000 Da); Albúmina (67.000 Da); Ovoalbúmina (43.000 Da); Anhidrasa carbónica (30.000 Da); Inhibidor de tripsina (20.100 Da); α -Lactoalbúmina (14.400 Da).

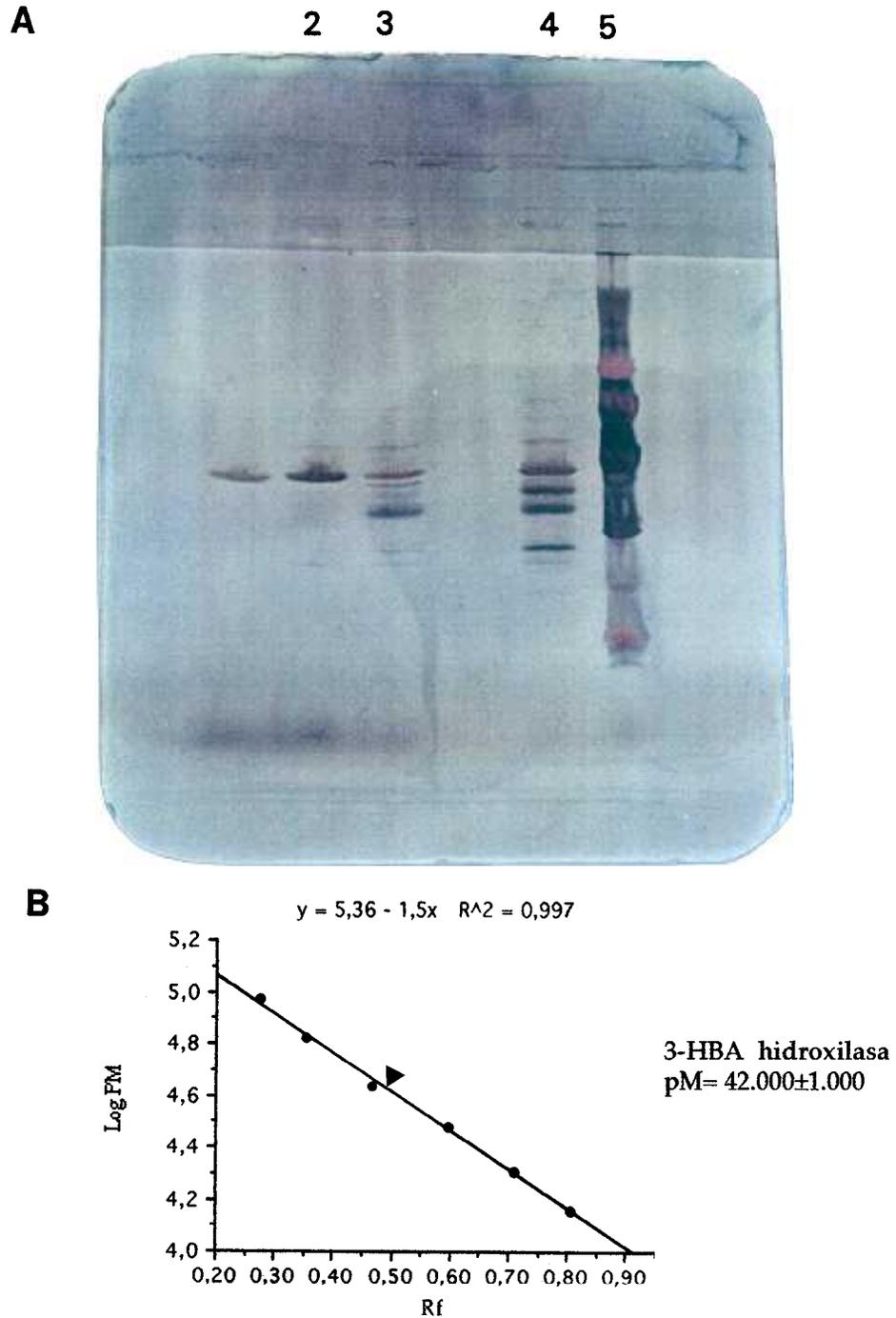


Figura 32: Determinación del peso molecular del monómero que constituye la 3-HBA, 6-hidroxilasa (B) en función de la movilidad relativa R_f de las bandas de proteína en geles de poliacrilamida (8-25 %)-SDS 0.1% teñido con nitrato de plata (A).

1., 2. y 3. Extracto eluído de la columna Mono Q: fracciones 22, 21 y 20 (4-HBA, 3-hidroxilasa).4. Extracto eluído de la columna Mono Q 5. Proteínas patrón: Fosforilasa b (94.000 Da); Albúmina (67.000 Da); Ovoalbúmina (43.000 Da); Anhidrasa carbónica (30.000 Da); Inhibidor de tripsina (20.100 Da); α -Lactoalbúmina (14.400 Da).

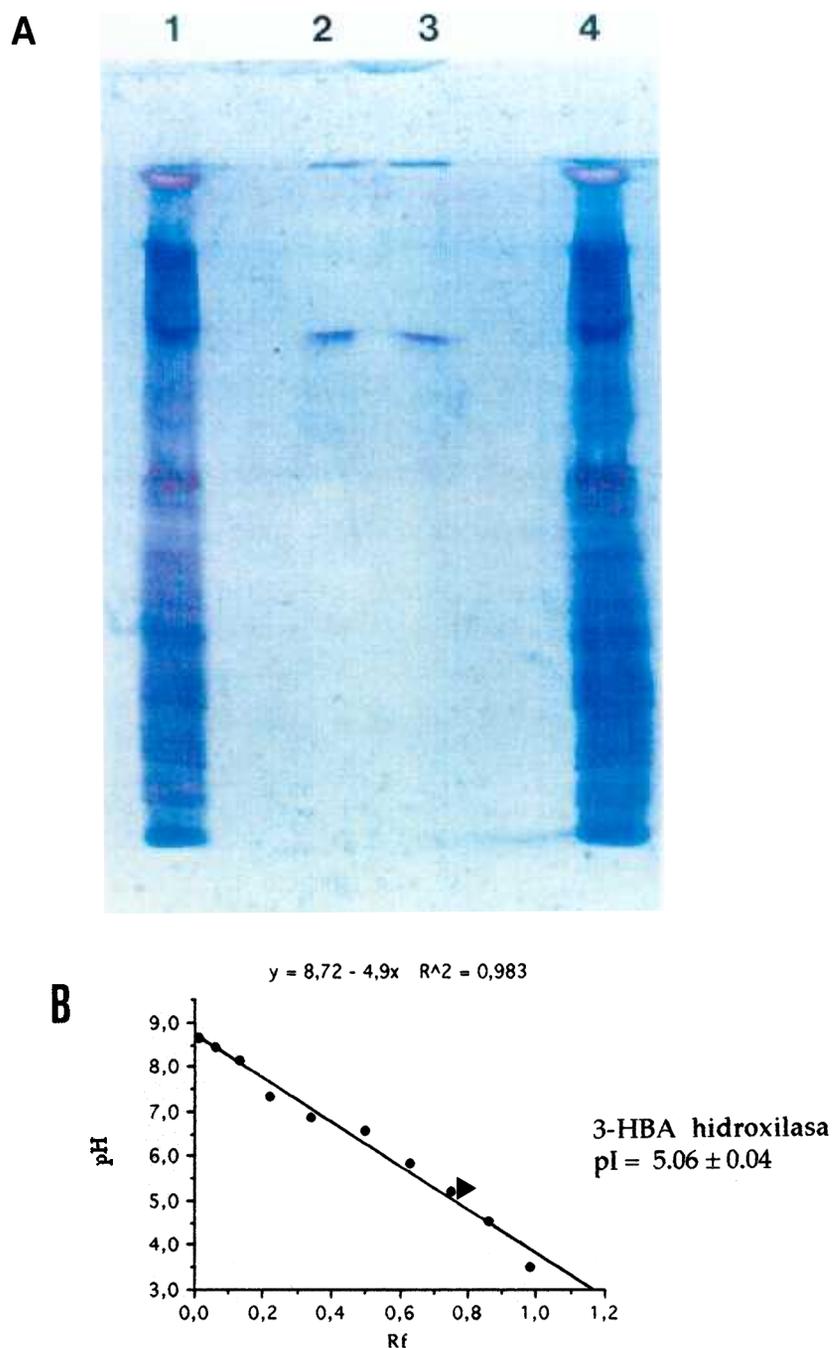


Figura 33: Determinación del punto isoeléctrico de la 3-HBA, 6-hidroxilasa (B) en función de la movilidad relativa R_f de las bandas de proteína en geles IEF (3-9) teñido con nitrato de plata (A).

1. y 4. Proteínas patrón: Amiloglucosidasa, 3.5; Rojo de metilo, 3.75; Inhibidor de la tripsina, 4.55; β -lactoglobulina A, 5.20; Anhidrasa carbónica bovina B, 5.85; Anhidrasa carbónica humana B, 6.55; Mioglobina (banda ácida), 6.85; Mioglobina (banda básica), 7.35; Lentil lectina (ácido), 8.15; Lentil lectina (medio), 8.45; Lentil lectina (básico), 8.65; Tripsinógeno, 9.30 . 2. y 3. 3-HBA, 6-hidroxilasa.

Como resumen de las investigaciones realizadas en torno a las propiedades físicas de las hidroxilasas implicadas en la degradación de los ácidos 3- y 4- hidroxibenzoico, se han comparado los resultados obtenidos con los existentes en la bibliografía consultada.

La 4-HBA 3-hidroxilasa de *K. pneumoniae* se ha comparado con las aisladas de *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter calcoaceticus* (Tabla XIV). Las 4-HBA hidroxilasa de *P. putida* (Hosokawa y col. 1966) y *P. desmolytica* (Yano y col., 1969) no se han incluido por tener sólo constancia de su peso molecular que es 83.600 y 68.000 da respectivamente. En estas dos especies bacterianas, como en todas las 4-HBA hidroxilasa descritas, el cofactor utilizado es NADPH.

En cuanto a la 3-HBA 6-hidroxilasa, está muy poco estudiada y hasta el momento solamente se ha determinado el peso molecular y la estructura de esta enzima en *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia* y *Micrococcus sp.* (Tabla XV).

Tabla XIV: Propiedades físicas de la 4-HBA 3-hidroxilasa

	<i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>P. cepacia</i> (2)	<i>Micrococcus sp.</i> (3)	<i>K. pneumoniae</i>
Holoenzima (M_r)	85.000	44.000	70.000	42.000
Estructura	α	α	α	α
Residuos de aminoácidos	-	-	-	325
Cofactor	NAD(P)H	NAD(P)H	NAD(P)H	NAD(P)H
Punto isoeléctrico	-	-	-	5

(1) Howell y col., 1972; Wierenga y col., 1982; Hofsteen y col., 1983

(2) Entsch y col., 1989

(3) Fernández y col., 1993

Tabla XV: Propiedades físicas de la 3-HBA 6-hidroxilasa

	<i>P. fluorescens</i> (1)	<i>P. aeruginosa</i> (2)	<i>A. calcoaceticus</i> (3)	<i>K. pneumoniae</i>
Holoenzima	88.000- 90.000	90. 000	90.000	80.000
Subunidad (M _r)	44. 299	45.000	45.000	40. 000
Estructura	α ₂	α ₂	α ₂	α ₂
Residuos de aminoácidos	394	394	404	362
Cofactor	NADPH/FAD	NADPH/FAD	NADPH/FAD	NADPH/FAD
Punto isoelectrico	5,8	—	-	4,6

(1) Groseclose y col., 1973

(2) Yu y col., 1987; Wang y col., 1987

(3) Rajasekharan y col., 1990

9. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA 4- HBA 3-HIDROXILASA Y DE LA 3-HBA 6-HIDROXILASA.

Caracterizar enzimas del tipo de las hidroxilasas resulta muy complicado debido a que pierden su actividad al cabo de 24 horas, y los procesos de purificación deben realizarse en este tiempo. A pesar de ello hemos conseguido purificar estas dos enzimas a homogeneidad, aunque los ensayos cinéticos tuvieron que realizarse con extractos parcialmente purificados. De esta forma se estudiaron las propiedades térmicas, influencia del pH y la estabilidad de las dos hidroxilasas.

-Estabilidad enzimática.

Se probaron diferentes estabilizantes segun indican las figuras 34 y 35.

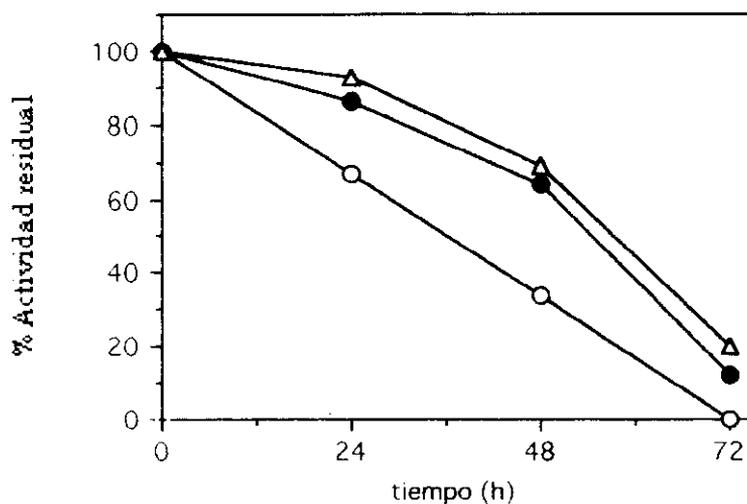


Figura 34: Efecto de algunos agentes estabilizantes sobre la actividad 3-HBA, 6-hidroxilasa. (○) EDTA 1mM, DTT 0,1 mM, FAD 0,1 mM. (●) EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 2 mM (Δ) Glicerol 10 %, PMSF 1 mM.

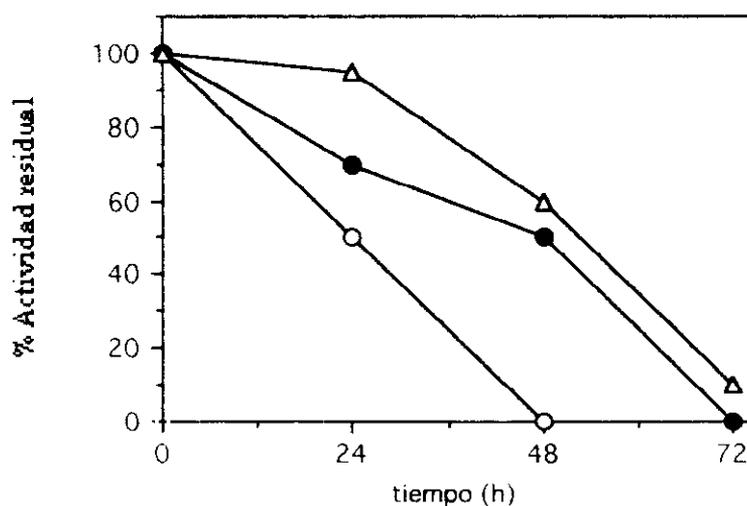


Figura 35: Efecto de algunos agentes estabilizantes sobre la actividad 4-HBA, 3-hidroxilasa. (○) EDTA 1mM, DTT 0,1 mM, FAD 0,1 mM. (●) EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 2 mM. (Δ) Glicerol 10 %, PMSF 1 mM.

Ambas hidroxilasas fueron más estables en una solución de glicerol al 10% y PMSF 1 mM. Con estas sustancias estabilizantes se pudo mantener la actividad de la 3-HBA hidroxilasa 72 horas con una pérdida del 75% de actividad mientras que en las mismas condiciones la 4-HBA hidroxilasa perdía un 90% de actividad. En el estudio de estas enzimas con estas enzimas los experimentos se realizaron en el mismo día ó a las 24 horas de haber preparado el extracto.

-Estabilidad térmica

La estabilidad de las enzimas se determinó dependiendo del tiempo y de la temperatura. Los resultados obtenidos para ambas aparecen en las fig. 36 y 37.

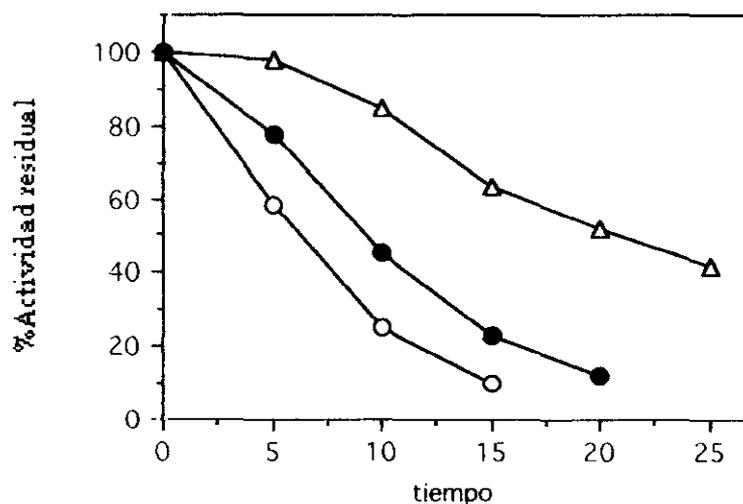


Figura 36: Efecto de la temperatura sobre la actividad de la 3-HBA, 6-hidroxilasa.

(Δ) 40°C (●) 45°C (○) 50°C

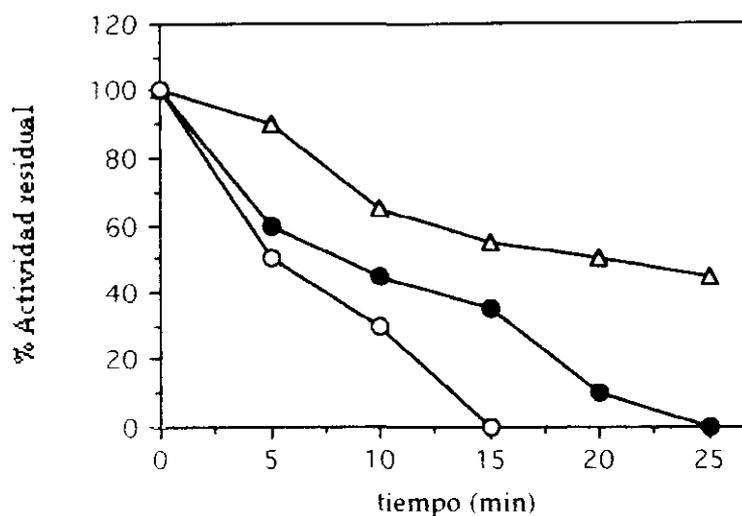


Figura 37: Efecto de la temperatura sobre la actividad de la 4-HBA, 3-hidroxisilasa.

(Δ) 35°C (\bullet) 40°C (\circ) 45°C

Tanto la 3-HBA hidroxilasa como la 4-HBA hidroxilasa resultaron ser inestables térmicamente. Dentro de esta característica la 3-HBA 6-hidroxilasa resultó un poco más estable que la 4-HBA 3-hidroxilasa y a 40°C, la primera mantiene el 40% de actividad durante al menos 25 minutos, mientras que la segunda en el mismo tiempo ya no presenta ningún tipo de actividad.

-Influencia del pH

Los estudios sobre la actividad de las enzimas se realizaron en los tampones indicados en la figura 38 y 39. El tampón Tris-HCl 1 M inhibía completamente las actividades de ambas enzimas.

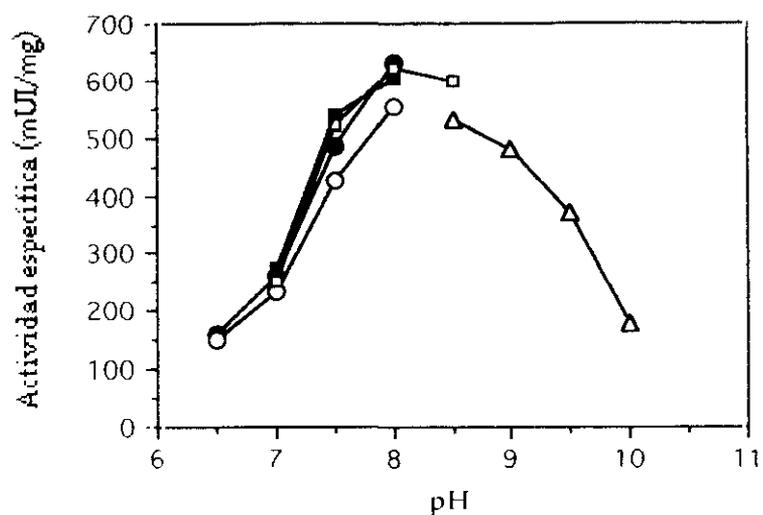


Figura 38: Efecto del pH sobre la actividad de la 3-HBA, 6-hidroxilasa .

(○) Tris-maleato 50 mM ; (●) Fosfato potásico 50 mM ; (□) Tris-HCl 50 mM ; (■) Hepes 50 mm
(Δ) Glicina-NaOH 50 mM

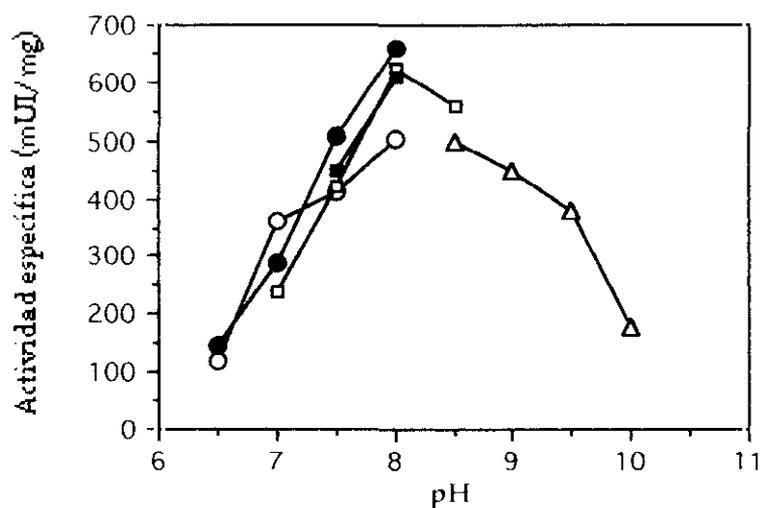


Figura 39: Efecto del pH sobre la actividad de la 4-HBA, 3-hidroxilasa

(○) Tris-maleato 50 mM ; (●) Fosfato potásico 50 mM ; (□) Tris-HCl 50 mM ; (■) Hepes 50 mm
(Δ) Glicina-NaOH 50 mM

-Influencia de la temperatura

La temperatura óptima de reacción fue determinada según indica la fig. 40. Ambas enzimas presentaban la máxima actividad alrededor de los 25°C.

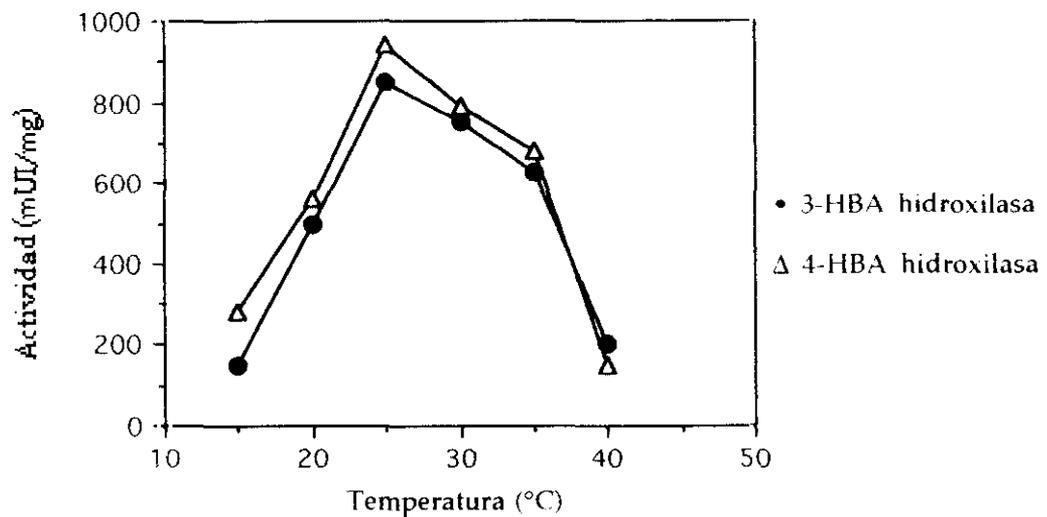


Figura 40: Estabilidad térmica de la 4-HBA, 3-hidroxilasa y 3-HBA, 6-hidroxilasa

10. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS

- 3-HIDROXIBENZOATO, 6-HIDROXILASA

La cepa salvaje de *K. pneumoniae* y el mutante MA04 se cultivaron en 3-HBA. Los estudios cinéticos sobre la 3-HBA 6-hidroxilasa se llevaron a cabo con la enzima parcialmente purificada en tampón fosfato potásico pH 8. La enzima presentó una cinética hiperbólica cuando NADH ó NADPH eran los sustratos variables en presencia de una concentración saturante de 2mM de 3-HBA. De las representaciones de ordenadas en el origen frente a $1/[NADH]$ y $1/[NADPH]$ (Fig 41 A) se obtuvieron los valores para la K_m aparente de ambos cofactores que resultó ser 70 μM para los dos.

Cuando el 3-HBA fue el sustrato variable en presencia de una concentración fija de $160 \mu\text{M}$ de NADH ó NADPH, la enzima presentó cinéticas sigmoidales. Representando los valores de $1/V$ frente a $1/[3\text{-HBA}]$, se obtuvieron líneas curvas, cóncavas con respecto al eje de ordenadas, que indicaban la existencia de efectos homotrópicos positivos en la unión del 3-HBA a la enzima (Fig 41 B), con valores de $S_{0.5}$ de $400 \mu\text{M}$ en presencia de NADPH y de $500 \mu\text{M}$ con NADH. La representación de Hill para las concentraciones intermedias de 3-HBA (Fig, 41 C) proporcionaron una línea recta, con un valor del coeficiente de Hill de 2.7 para el NADPH y 2.4 para el NADH. Estos valores indican la presencia de, al menos, dos sitios de unión de la enzima para el 3-HBA y para el NAD(P)H, y una cooperatividad positiva.

Los parámetros cinéticos de la 3-HBA, 6-hidroxilasa vienen resumidos en la tabla XVI.

4 HBA 3-HIDROXILASA

Con extractos parcialmente purificados de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 4 HBA se detectó una actividad 4 HBA hidroxilasa que transformaba el 4 HBA en 3,4 hidroxibenzoico. Esta hidroxilasa se denominó 4 HBA, 3-hidroxilasa y sólo emplea NADPH como cofactor.

Los datos cinéticos se obtuvieron manteniendo la enzima en tampón fosfato potásico pH 8. Cuando NADPH era el sustrato variable en presencia de 2 y 100 mM de 4 HBA la enzima mostró un comportamiento hiperbólico cuya representación de Lineaweaver-Burk viene reflejado por una línea recta (Fig. 42 A) De esta representación de dobles inversas obtuvimos un valor de la K_m aparente de $30 \mu\text{M}$ para el NADPH.

Cuando el sustrato variable era el 4-HBA, la enzima también mostraba un comportamiento que se ajustaba a la cinética de Michaelis-

Menten, a valores fijos de NADPH de 160 μM . A partir de los valores de las ordenadas en el origen (Fig. 42 B) y de las pendientes, obtenidos en las representaciones de dobles inversas frente a $1/4\text{-HBA}$, se determinó el valor de K_m que resultó ser de 80 μM . Otros parámetros cinéticos como la velocidad máxima y los coeficientes de Hill también se muestran en la tabla XVI.

Tabla XVI: Parámetros cinéticos de la 3- y 4-HBA hidroxilasa.

Sustrato de crecimiento	Enzima	Sustrato variable (μM)	Sustrato constante (μM)	K_m (μM)	V_{max} .	$S_{0.5}$ (μM)	h
3-HBA	3-HBA hidroxilasa	3-HBA (20-120)	NADH 160	-	165	500	2,70
		3-HBA (20-120)	NADPH 160	-	110	400	2,40
		NADH (5-300)	3-HBA 2000	70	95	-	0,95
		NADPH (5-243)	3-HBA 2000	70	145	-	0,90
4-HBA	4-HBA hidroxilasa	4-HBA (13-120)	NADPH 160	30	210	-	0,90
		NADPH (4-200)	4-HBA 2000	80	225	-	0,95

* Los valores de la velocidad están expresados en nmoles de sustrato transformado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$

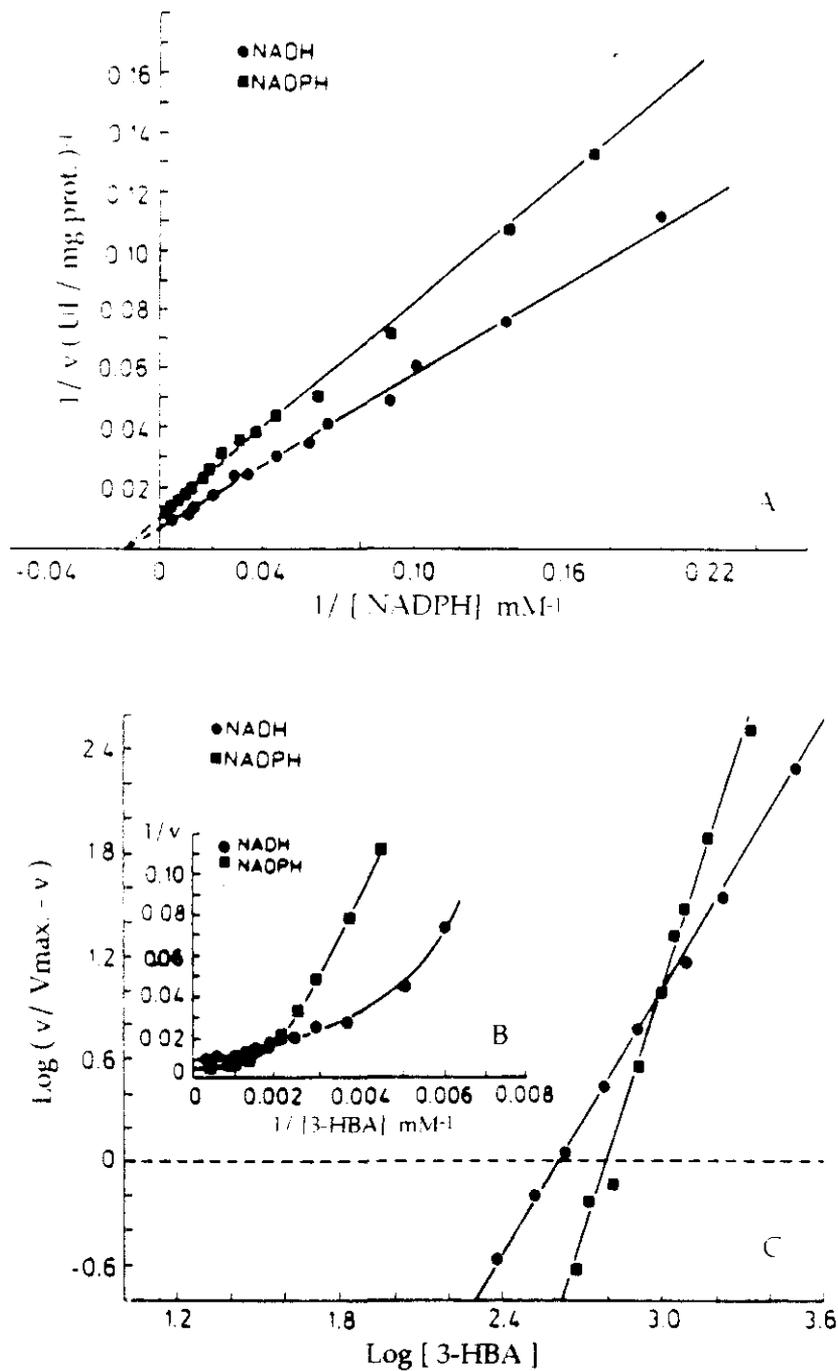


Figura 41: Cinética de la reacción catalizada por la 3-HBA, 6-hidroxilasa.

A. Representación de dobles inversas, a concentración fija de 3-HBA 2 mM

B. Representación de dobles inversas, a concentraciones fija de NADH ó NADPH de 160 μ M

C. Representación de Hill a concentraciones intermedias de 3-HBA (20-120 μ M)

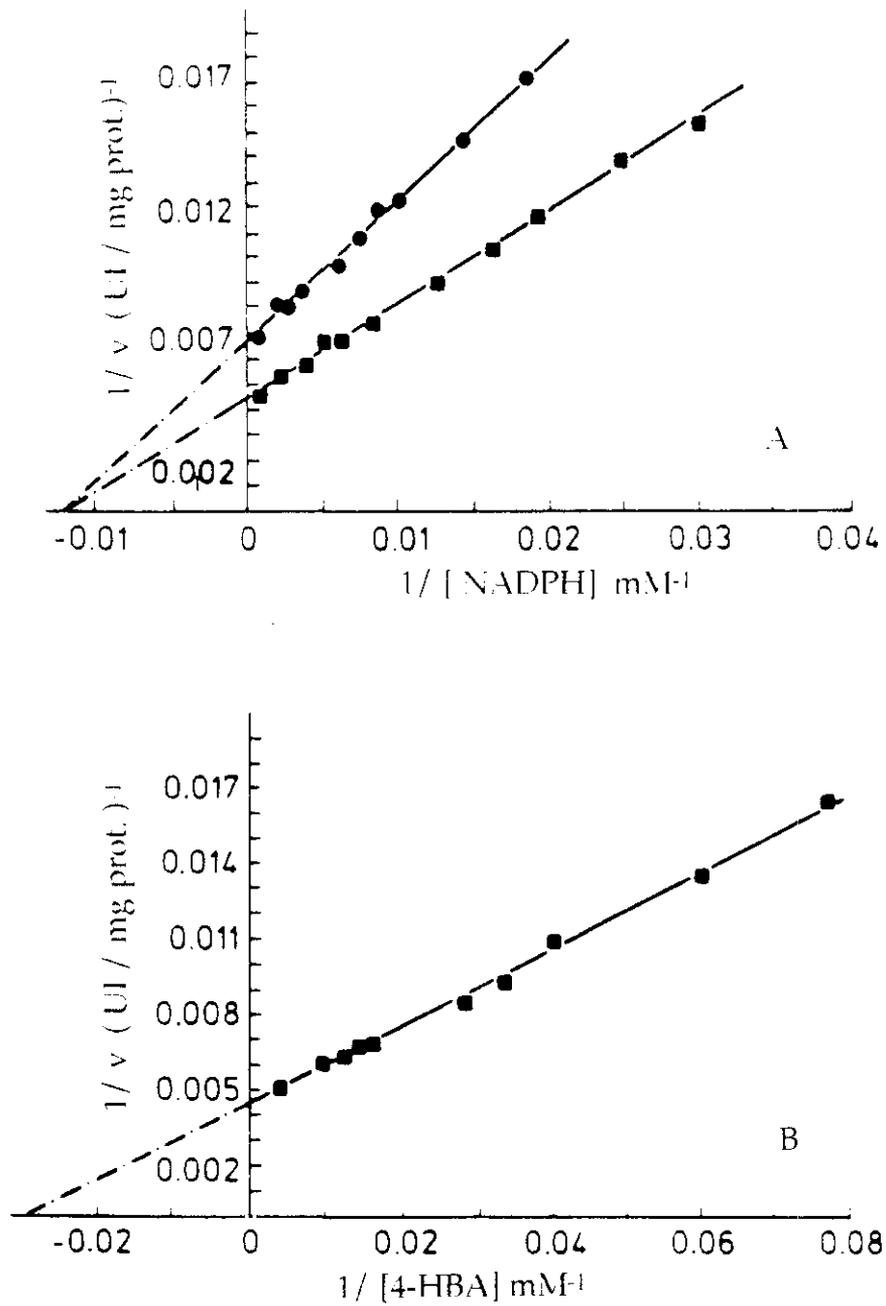


Figura 42: Cinética de la reacción catalizada por la 4-HBA, 3-hidroxisilasa.

A. Representación de Lineaweaver-Burk, dobles inversas, a concentraciones fijas de 4-HBA: (■) 2 mM; (●) 100 mM.

B. Representación de Lineaweaver-Burk, dobles inversas a una concentración fija de NADPH, de 160 μM.

11. MECANISMO CATALITICO DE LA 4-HBA 3-HIDROXILASA

Para conocer el mecanismo de la reacción catalizada por la 4-HBA hidroxilasa se representaron los valores inversos de la velocidad inicial ($1/V$) frente a concentraciones variables de 4-HBA expresadas como $1/[4\text{-HBA}]$. Manteniendo fija la concentración de O_2 a 0.4 mM se obtuvieron cuatro líneas rectas para las concentraciones de NADPH utilizadas (20, 40, 60 y 120 μM) que convergían en un punto (Fig. 43 A). Expresando las pendientes de estas rectas en función de los inversos de su concentración, los puntos obtenidos se alinean formando una recta (Fig. 43 B). Este mismo hecho ocurre al representar los puntos de corte con el eje de las Y de las rectas obtenidas en la representación de dobles recíprocas frente a $1/[NADPH]$ (Fig. 43 C).

Por otro lado, se realizó la representación de Lineaweaver-Burk de $1/V$ frente a $1/[4\text{-HBA}]$ manteniendo fija la concentración de NADPH a 100 μM y variando la concentración de O_2 . En este caso se obtuvieron cuatro líneas rectas paralelas para las cuatro concentraciones de O_2 utilizadas (0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 mM) (Fig. 44 A). Los puntos de intersección con el eje de las Y de estas rectas al expresarse en función de $1/[O_2]$ forman una recta (Fig. 44 B).

De las pendientes de las rectas mencionadas y de las ordenadas en el origen de las gráficas representadas es posible calcular los coeficientes cinéticos de la ecuación de los tres sustratos. Los parámetros sobre la velocidad inicial resultan pertenecientes a un mecanismo llamado de "sustitución concertada tipo II b". este mecanismo es similar al encontrado en las enzimas homólogas de *P. fluorescens* (Husain y Massey, 1979) y *P. aeruginosa* (Entsch y Ballou, 1989).

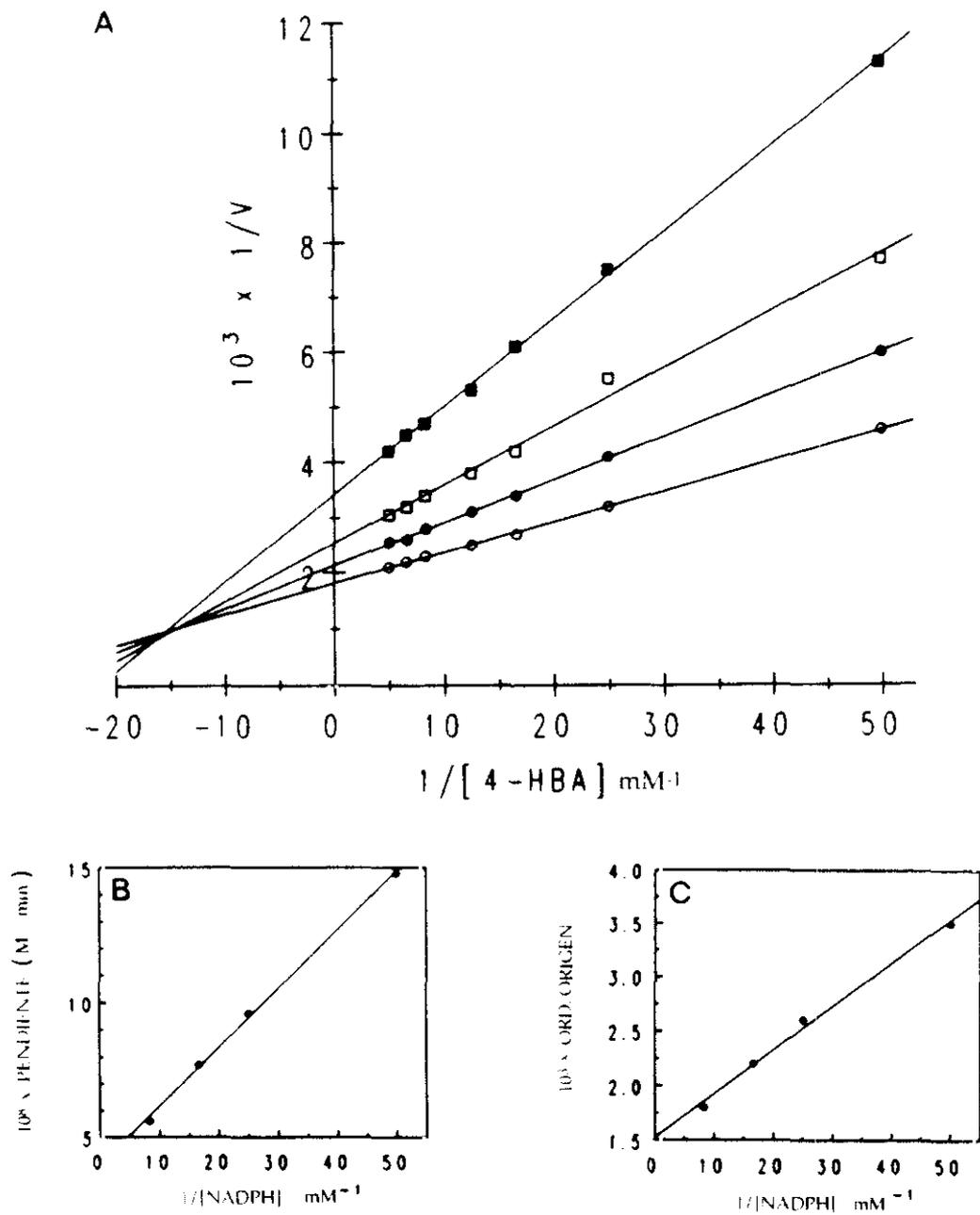


Figura 43: Representación del mecanismo cinético de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* a 4°C en tampón fosfato potásico y a pH 8.

- A. Dobles recíprocas de $1/V$ frente a $1/[4-HBA]$ a 0,4 mM de O_2 y a concentraciones variables de NADPH: (■) 20 μM ; (□) 40 μM ; (●) 60 μM y (○) 120 μM .
- B. Representación de las pendientes en función del inverso de la concentración de NADPH
- C. Representación de las ordenadas en el origen en función del inverso de la concentración de NADPH.

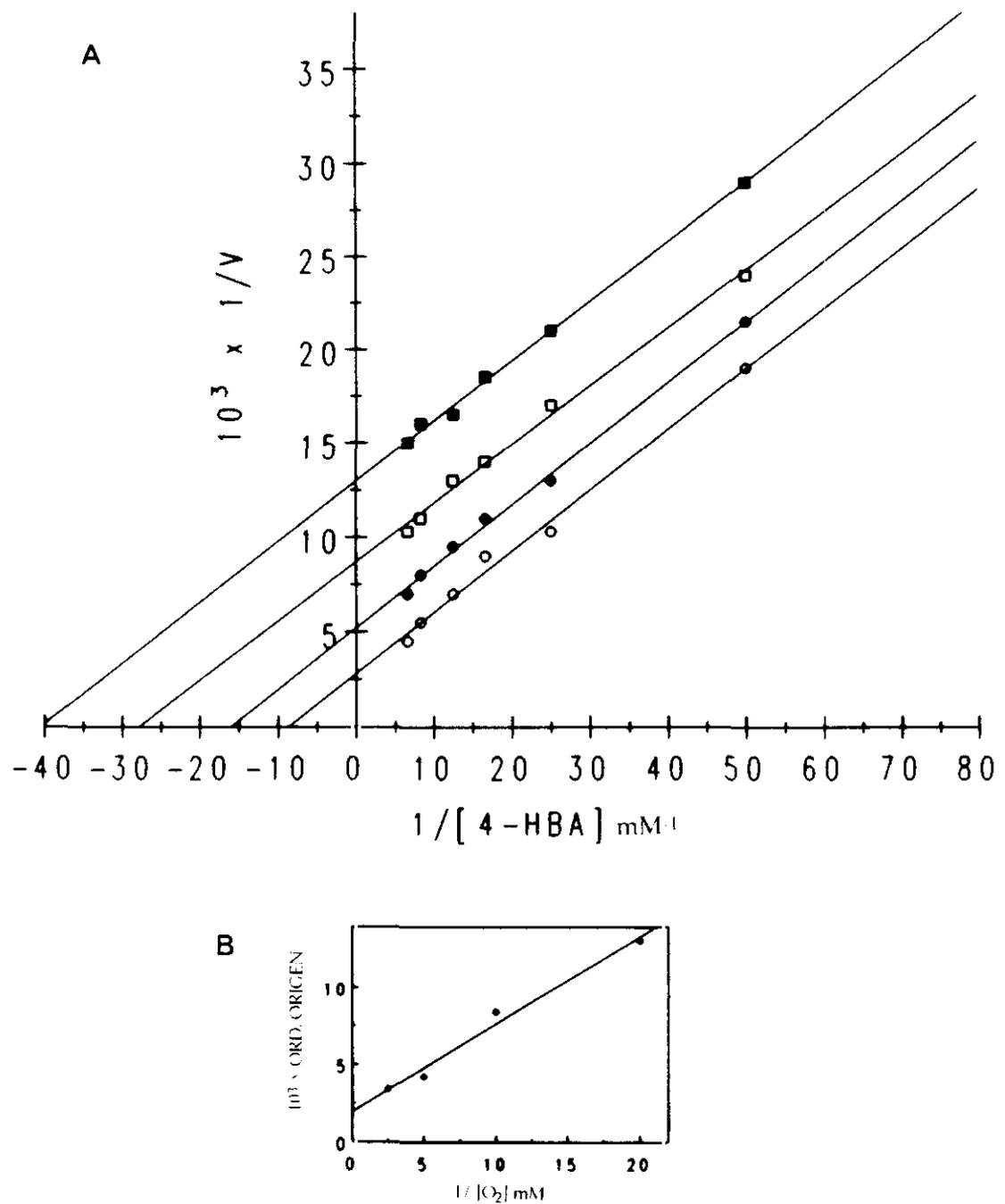


Figura 44: Representación del mecanismo cinético de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* a 4°C en tampón fosfato potásico y a pH 8.

A. Dobles recíprocas de $1/V$ frente a $1/[4\text{-HBA}]$ a $100 \mu\text{M}$ de NADPH y a concentraciones variables de O_2 : (■) 0,05 mM; (□) 0,1 mM; (●) 0,2 mM y (○) 0,4 mM.

B. Representación de las ordenadas en el origen en función del inverso de la concentración de NADPH

Tabla XVII: Valores experimentales de los coeficientes cinéticos de la reacción catalizada por la 4-HBA hidroxilasa en tampón fosfato potásico 50 mM pH 8.0 a 4°C.

Coeficiente en la ecuación	Valor determinado	Sustrato	Constante de Michaelis	Constante de disociación
ϕ_0^a	$1.55 \cdot 10^{-3} \text{ min}$	—		
$\phi_{4\text{-HBA}}$	$4.0 \cdot 10^{-8} \text{ M min}$	4-HBA	$2.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$7.1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
ϕ_{NADPH}	$3.9 \cdot 10^{-8} \text{ M min}$	NADPH	$2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$5.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
ϕ_{O_2}	$5.8 \cdot 10^{-8} \text{ M min}$	O ₂	$3.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	
$\phi_{4\text{-HBA} \cdot \text{NADPH}}$	$1.42 \cdot 10^{-12} \text{ M}^2 \text{ min}$	—		

$$^a V_{\max} = 1 / \phi_0 = 645 \text{ min}^{-1}$$

Los parámetros de la ecuación han sido calculados de las pendientes y de las ordenadas en el origen de las gráficas de dobles recíprocas de las velocidad inicial descrita por Dalziel (1969) para reacciones con tres sustratos.

$$\frac{[E]}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_{4\text{-HBA}}}{[4\text{-HBA}]} + \frac{\phi_{\text{NADPH}}}{[\text{NADPH}]} + \frac{\phi_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{\phi_{4\text{-HBA} \cdot \text{NADPH}}}{[4\text{-HBA} \cdot \text{NADPH}]}$$

12. DETERMINACION DE TIROSINA EN LA 4-HBA 3-HIDROXILASA

La determinación de los posibles restos aminoácidos que forman parte del centro activo de la 4-HBA hidroxilasa se realizó mediante estudios de modificación química de esta enzima por dietilpirocarbonato (apartado II. 2. 13.). El DPC es un reactivo muy usado para la modificación selectiva de residuos de aminoácidos protonados. Está demostrado que el DPC puede reaccionar con residuos de histidina, cisteína, lisina y tirosina en las proteínas (Wilson y col., 1975).

Se observó que la incubación de la 4-HBA hidroxilasa parcialmente purificada con DPC reducía la actividad enzimática en función de la concentración del inhibidor y del tiempo de incubación.

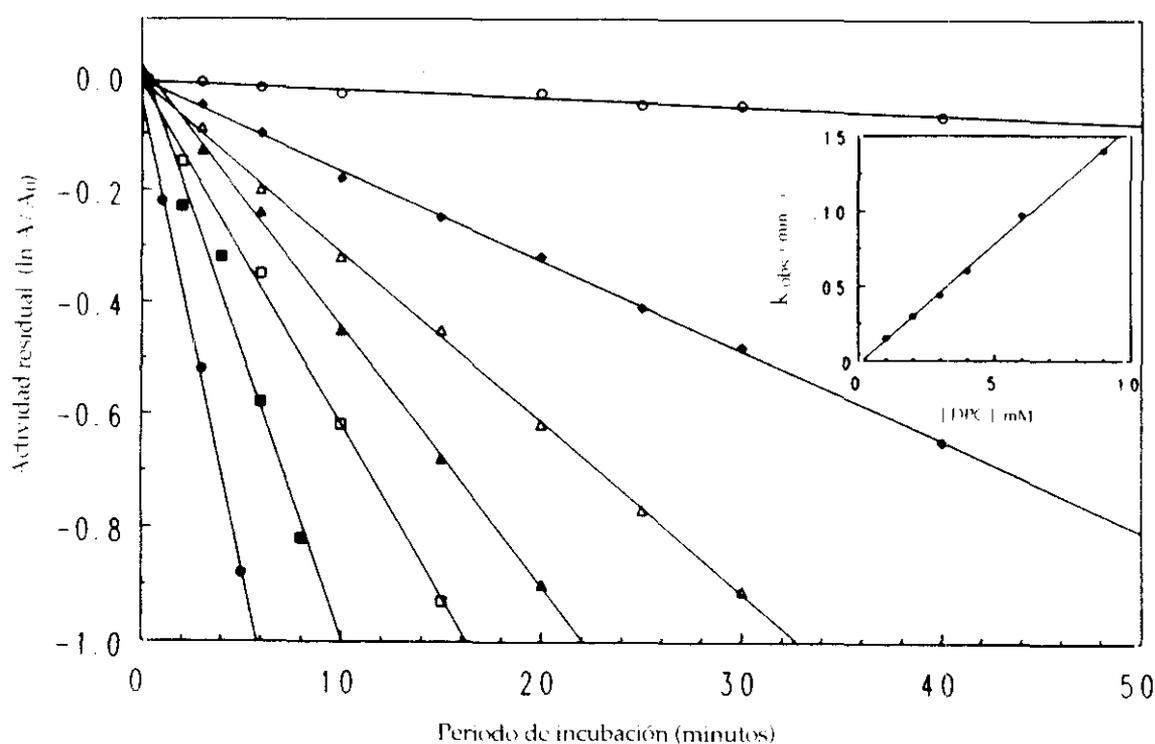


Figura 45: Cinética de la inhibición de la 4-HBA hidroxilasa por dietilpirocarbonato.

A. Determinación de las constantes de inactivación de la reacción de pseudo-primer orden. Las mezclas de inactivación contenían 4-HBA hidroxilasa ($50\mu\text{M}$) con varias concentraciones de DPC a pH 8: (○) 0 mM; (◇) 15 mM; (△) 30 mM; (▲) 60 mM; (□) 90 mM; (■) 120 mM y (●) 150 mM.

B. Representación de las pendientes de las rectas de la figura A. (k_{obs}) en función de la concentración de DPC.

La actividad residual expresada en $\ln(A/A_0)$ se representó frente al tiempo, donde A_0 es la actividad sin inhibidor y A es la actividad en presencia de DPC (Fig. 45 A). Las pendientes de las rectas obtenidas en la representación de dobles recíprocas se expresaron en función de la concentración de DPC resultando una línea recta (Fig. 45 B). La pendiente de esta última recta es $17,2 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y este valor es la constante de inactivación de la reacción de segundo orden a pH 8 y 25°C .

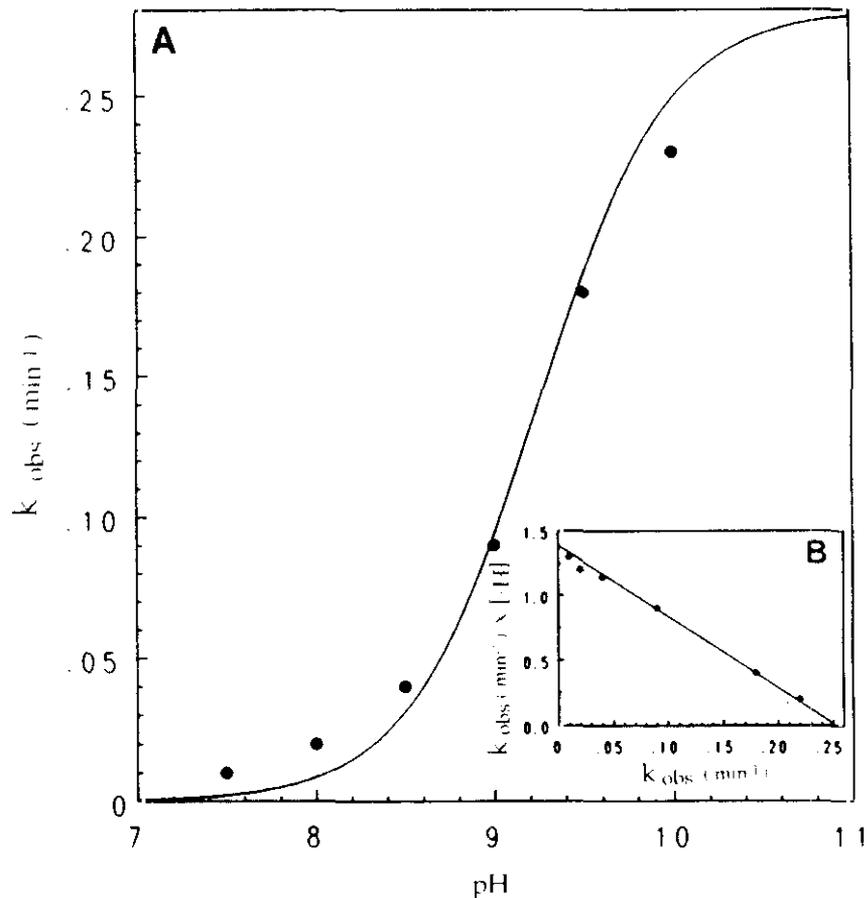


Figura 46: Dependencia del pH en la inactivación por dietilpirocarbonato. La 4-HBA hidroxilasa ($15 \mu\text{M}$) fue incubada con 30 mM de DPC a pH entre 7,5 y 10.

A. Las constantes de pseudo primer orden se representaron en función del pH. La línea curva representa la curva teórica de la ecuación $k_{\text{obs}} \cdot [\text{H}^+] = k_a \cdot k_{\text{obs}}$.

B. Las constantes de pseudo primer orden se representan en la figura empleando dicha ecuación.

También estudiamos la dependencia del pH en la inhibición por DPC. Para ello, se añadió una concentración fija de DPC a la enzima variando el pH del tampón de reacción utilizado. Las medidas de las actividades se realizaron en tampón Glicina-NaOH a pH 7,5, 8, 8.5, 9, 9.5 y 10 representándose la actividad residual ($\ln A/A_0$) frente al tiempo de incubación.

En este caso, la representación de las pendientes de las rectas obtenidas se representaron en función del pH, obteniéndose una curva (Fig. 46 A). Si despreciamos los puntos más bajos de la curva que menos se ajustan al modelo teórico y representamos las pendientes de las rectas frente al valor de la pendiente por la concentración de protones, obtenemos una línea recta (Fig. 46 B). El logaritmo de la pendiente de esta última recta es 9,25 que resulta ser un valor próximo al del pK_a del aminoácido que se localice en el centro catalítico de la proteína.

La tirosina tiene un pK_a de 10,1, no obstante se puede sugerir que éste es el residuo catalíticamente esencial en la 4-HBA hidroxilasa, ya que el valor aparente del pK_a determinado experimentalmente está próximo a este valor.

13. HIBRIDACION DE LA 4-HBA HIDROXILASA

Los experimentos de hibridación se realizaron con un doble objetivo: comprobar si la cepa salvaje de *K. pneumoniae* posee el gen estructural de la 4-HBA hidroxilasa y estudiar si existe una homología entre los genes (*pobA*) que codifican esta enzima en *K.pneumoniae* MA04 y *Acinetobacter calcoaceticus*. Para ambos casos el método de fijación del DNA a membranas de nylon empleado fue el descrito en el apartado II.

En el estudio de la existencia del gen estructural de la 4-HBA hidroxilasa en *K. pneumoniae* M5a1, se diseñó un oligonucleótido de acuerdo con el uso de codones más frecuente de *K.pneumoniae* (Wada y col., 1992) a partir de la secuencia del extremo NH₂-terminal de la proteína (Fig. 47).

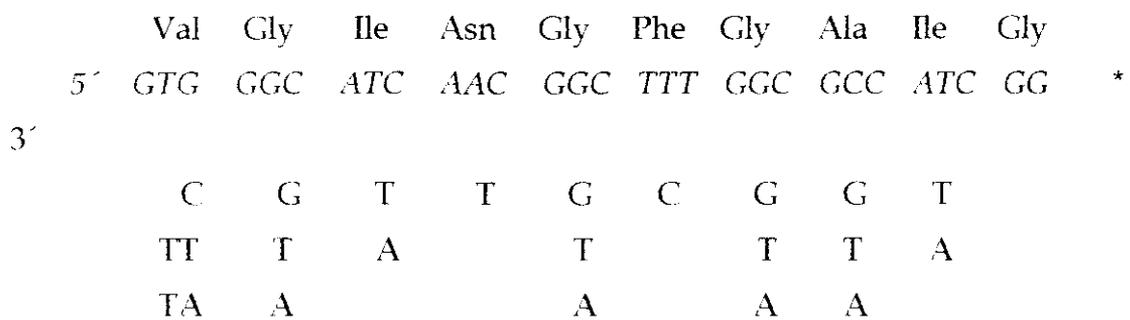


Figura 47: Oligonucleótido utilizado * en los procesos de hidridación siguiendo el uso de codones más probables que utiliza *K. pneumoniae* a partir de una región conservada del extremo NH-terminal de la 4-HBA hidroxilasa.

Este oligonucleótido de 29 bases se marcó radiactivamente con ³²P-γ-ATP en el momento de hacer la hibridación. Los filtros de nylon con el DNA fijado de *K. pneumoniae* M5a1 y MA04 y *E.coli* sure CC 118 se pusieron en contacto con la sonda radiactiva durante 30'a 65°C.

Los resultados de las exposiciones durante 24 horas de dos ensayos efectuados se muestra en la figura 48, observándose que mientras se observa una clara hibridación en las dos cepas de *K. pneumoniae* y se detecta una señal muy débil en *E. coli* sure CC118.

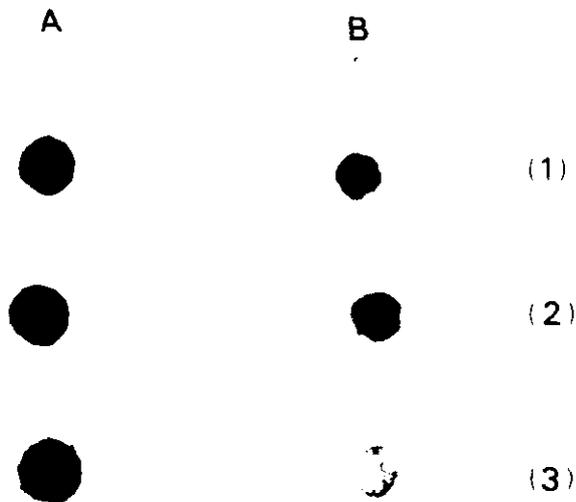


Figura 48: Hibridación de las colonias de *K. pneumoniae* M5a1 (1), *K. pneumoniae* MA04 (2) y *E. coli* sure CC118 (3). **A:** Lavado 2 x 5' a RT en 2 x SSC y 1' x 65°C en 2 x SSC. El tiempo de exposición fue de 24 horas. **B:** Lavado 5' x 65°C en 2 x SSC y 1' x 65°C en 0,1 x SSC. El tiempo de exposición fue de 24 horas.

Para estudiar la posible homología de las 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* y *Acinetobacter calcoaceticus*, se utilizó como sonda el gen estructural (*pobA*) de la 4-HBA hidroxilasa de *A. calcoaceticus* obtenido a partir del plásmido recombinante donde se encuentra clonada (Averhorf, 1992). Para ello se cortó el plásmido pZR 4053 de 4,9 Kb con las enzimas EcoRI y Xho I obteniéndose dos fragmentos de 1,6 y 3,3 Kb (Fig. 49). El fragmento de 1,6 Kb era el que contenía el gen estructural de la 4-HBA hidroxilasa, por lo tanto se extrajo de un gel de agarosa con un "gene-clean" y se marcó radiactivamente con ^{32}P - α -ATP.

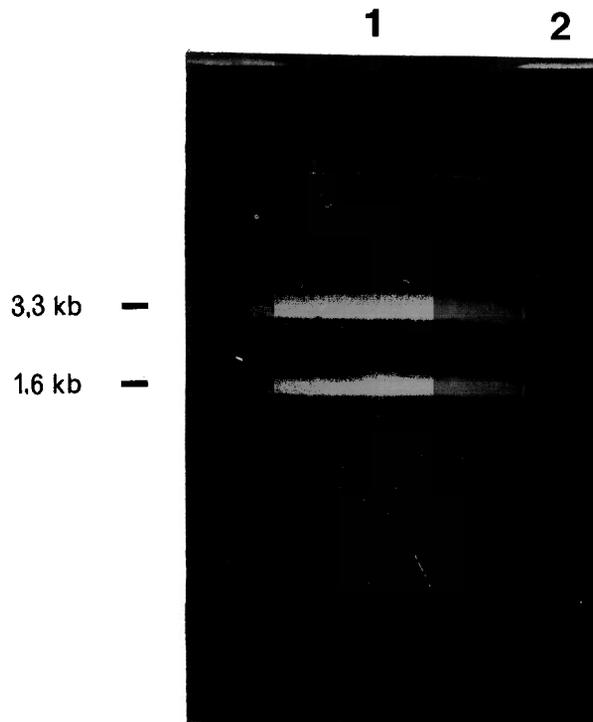


Figura 49: Obtención del fragmento de DNA que contiene la 4-HBA hidroxilasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. El plásmido pZR 4053 fue digerido durante 24 horas a 37°C con las enzimas Eco RI / Xho I. Después de comprobar la eficiencia del corte mediante un gel analítico de agarosa, se cargó toda la muestra en este gel preparativo de agarosa al 1,5%. 1: De los dos fragmentos obtenidos el de 1,6 Kb fue el de tamaño esperado y se extrajo del gel con GeneClean. 2: λ Hind III (23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,3 Kb; 2,3 Kb; 2,0 Kb; y 0,5 Kb)

Se siguió el mismo procedimiento anterior, con la diferencia de que la sonda radiactiva estuvo en contacto con los filtros de nylon durante 24 horas. El control positivo se realizó con *E. coli* sure CC118 transformado con el plásmido pZR 4053. En nuestras condiciones de lavado las dos cepas de *K. pneumoniae* no presentaron hibridación con esta sonda (Fig. 50).

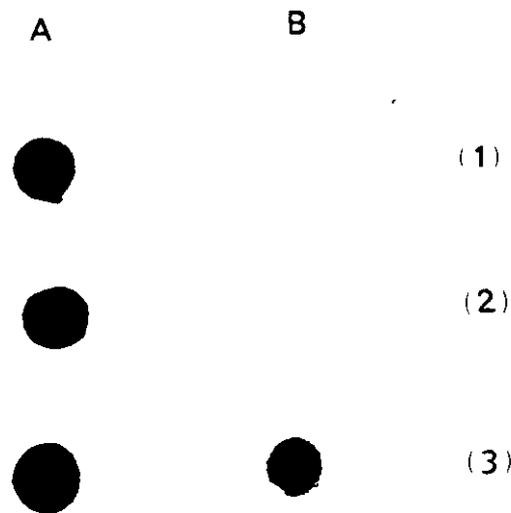


Figura 50: Hibridación de las colonias de *K. pneumoniae* M5a1 (1), *K. pneumoniae* MA04 (2) y *E. coli* sure CC118 transformada con pZR 4053(3). **A:** Lavado 2 x 5' a RT en 2 x SSC y 4' a 65°C en 2 x SSC. El tiempo de exposición fue de 24 horas. **B:** Lavado 2 x 15' a 65°C en 2 x SSC y 3' x 65°C en 0,1 x SSC. El tiempo de exposición fue de 2 horas.

14. OBTENCIÓN DE UNA GENOTECA DE *K. pneumoniae*.

Con el fin de analizar qué enzima de restricción era más idónea para su utilización en la digestión del DNA de *K. pneumoniae* empleado para realizar la genoteca, realizamos un Southern (apartado II. 2. 16) con DNA aislados de *K. pneumoniae* M5a1, *K. pneumoniae* MA04 y *E. coli* sure CC118 (Fig. 51) y digeridos con diferentes enzimas de restricción. El Southern se realizó a partir de un gel de agarosa (Fig. 52) donde *E. coli* sure CC118 se utilizó como control negativo de la hibridación. La sonda utilizada fue la diseñada a partir del extremo NH-terminal de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* MA04. Los resultados de la hibridación del gel de agarosa transferido a nylon muestran una señal nítida en el DNA cortado con EcoRI, tanto el *K. pneumoniae* MA04 como *K. pneumoniae* M5a1. En el DNA de *E. coli* sure CC118 no se observó ningún tipo de señal.

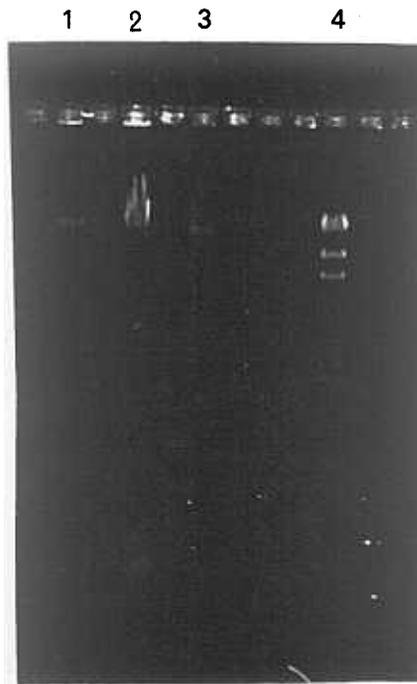


Figura 51: DNAs aislados por el método del CTAB. 1. DNA de *K. pneumoniae* MA04; 2. DNA de *E. coli* CC118 sure; 3. DNA de *K. pneumoniae* M5a1; 4. λ Hind III (23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,3 Kb; 2,3 Kb; 2,0 Kb; y 0,5 Kb).

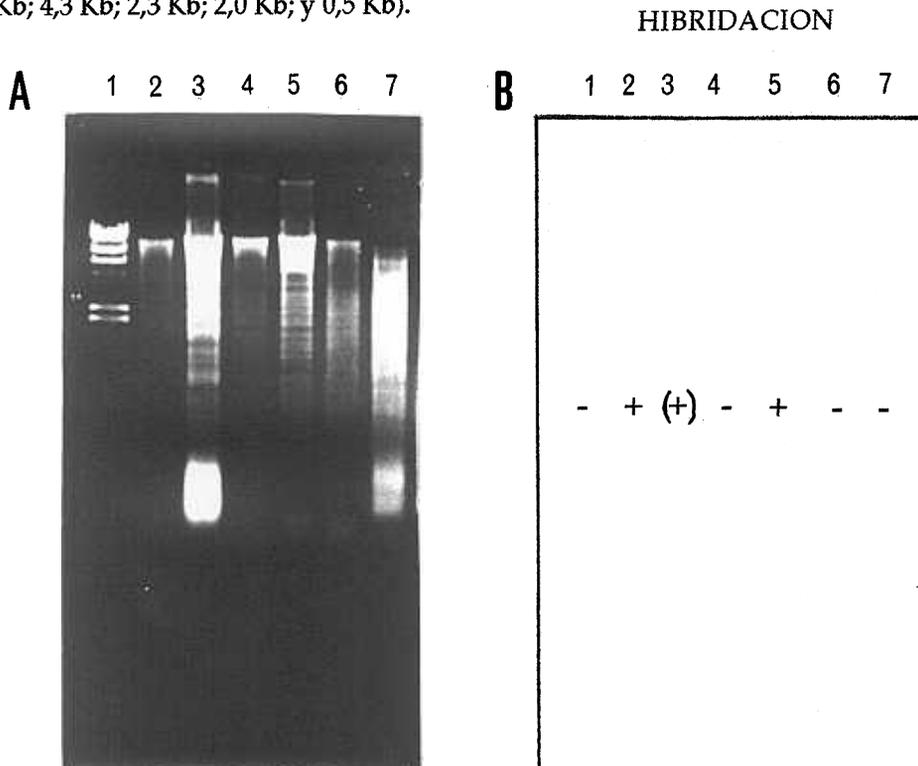


Figura 52: A: Gel a partir del cual se realizó el Southern 1. λ Hind III (23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,3 Kb; 2,3 Kb; 2,0 Kb; y 0,5 Kb). 2., 3. y 4. DNA de *K. pneumoniae* MA04 digerido con Eco RI, Bam HI, y Pst I. 5. y 6. DNA de *K. pneumoniae* M5a1 digerido con Eco RI y Pst I. 7. DNA de *E. coli* sure CC118 digerido con Eco RI. B: Resultado de la hibridación del Southern.

Para digerir el DNA de *K. pneumoniae* MA04 que iba a ser utilizado para clonar en pUC 18 se eligió la enzima Eco RI, por los resultados obtenidos en la hibridación del Southern anteriormente mencionado.

El vector de clonación fue digerido totalmente con Eco RI durante 24 horas y se preparó según se indica en el apartado II.2.17. El DNA de *K. pneumoniae* fue digerido con la misma enzima durante 15 min, 30 min, 1 hora, dos horas y 24 horas. Para un DNA de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ la digestión se realizó de la siguiente manera: Se mezclaron 7 μl de DNA, 10 μl del buffer H (x10) y 70 μl de agua y de esta mezcla se tomaron 27 μl a los que se añadió 3 μl de Eco RI. El tamaño de DNA adecuado (2-23Kb) para una posible clonación de la 4-HBA hidroxilasa fue el obtenido con 30 min de digestión del cromosoma (Fig. 54)

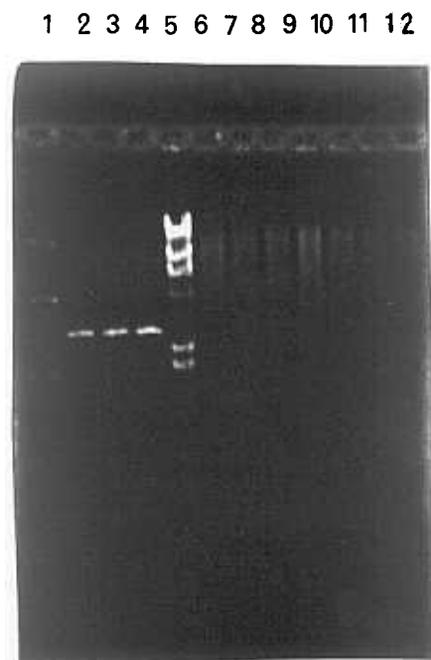


Figura 54: 1. Miniprep de pUC 18. 2, 3. y 4. pUC 18 digerido con Eco RI 24 horas. 5. λ Hind III (23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,3 Kb; 2,3 Kb; 2,0 Kb; y 0,5 Kb).6. al 12. DNA de *K. pneumoniae* digerido con Eco RI durante 30 min.

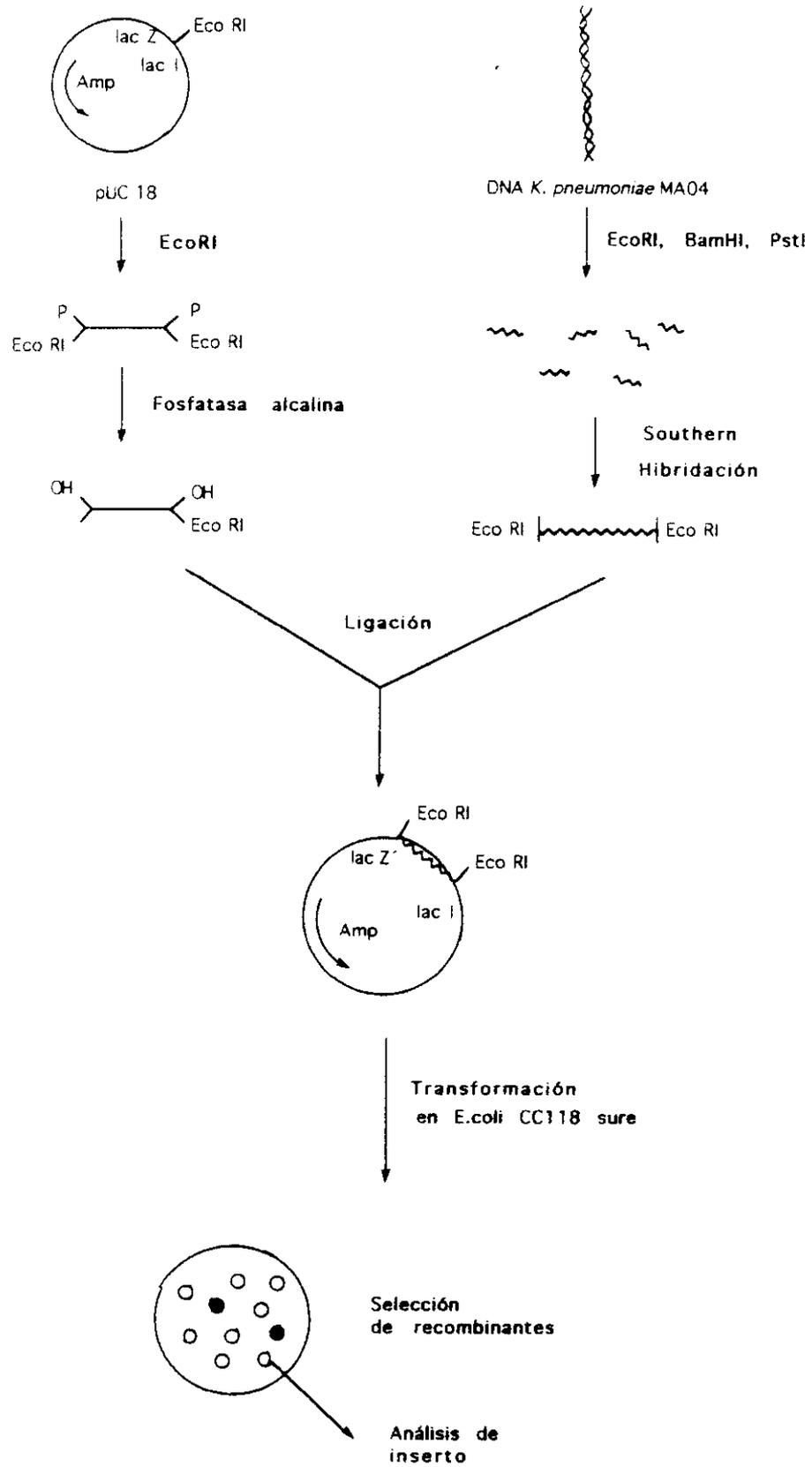


Figura 55: Estrategia de clonación de fragmentos del DNA de *K. pneumoniae* MA04.



Figura 56: Análisis de plásmidos recombinantes de pUC 18. se transformo 50 μ l de células competentes de *E. coli* CC 118 sure con 2 μ l de la mezcla de ligamiento. la frecuencia de recombinantes fue de 12 colonias recombinantes/ 1 colonia blanca

La mezcla de reacción de ligación óptima fue 1 μ l de pUC 18 (40 ng/ μ l), 2 μ l de DNA digerido 30 min y 5 μ l de una premezcla de 10% de agua, 80% del buffer H (x10) y 10% de ligasa T4. Despues de 24 horas a 4°C se transformó con 2 μ l de esta mezcla de ligamiento a *E. coli* CC118 con una eficiencia de transformación de $1,3 \times 10^7$ cels/ml.

La selección de recombinantes se realizó sembrando *E. coli* CC118 sure transformada en placas de LB/Amp/X-Gal/IPTG. Se obtuvo una proporción de 12 colonias blancas/ 1 colonias azul, por lo que la frecuencia de recombinación fue 90% de recombinantes, 8% de no recombinantes. El tamaño de inserto medio obtenido fue de 3Kb.

15. CLONACION DE LA 4-HBA HIDROXILASA EN EL CROMOSOMA DE *Acinetobacter calcoaceticus*

Para clonar la 4-HBA hidroxilasa y así obtener información acerca de su secuencia de DNA se utilizó un mutante 4-HBA- de *Acinetobacter calcoaceticus* obtenido mediante inserción del Tn 903 del plásmido pEMR 1 (apartado II. 2. 21.). Este mutante se transformó con las mezclas de ligamiento obtenidas en el apartado anterior mediante el simple contacto directo de *Acinetobacter calcoaceticus* 4-HBA- y el DNA exógeno constituido por plásmidos recombinantes de pUC 18 (ap. II. 2. 22.).

Como resultado de esta transformación se obtuvieron 7 colonias que crecieron en las placas de selección utilizadas: 4-HBA/Ap/Km. El análisis de plásmidos en estas colonias resultó negativo, por lo que se ha pensado que el gen de la 4-HBA hidroxilasa se ha insertado en el cromosoma de *Acinetobacter calcoaceticus* de una manera inespecífica, y ello le ha conferido la posibilidad de metabolizar el 4-HBA y ser resistente a Ap.

DISCUSSION

1. INDUCCION DE LAS RUTAS DEGRADATIVAS DEL 3- Y 4-HBA.

La versatilidad que presentan los microorganismos para degradar diferentes sustratos tiene una importante función en el ciclo del carbono y depende en gran medida de la acción de las oxigenasas y/ó deshalogenasas que actúan en el inicio de las rutas catabólicas. La capacidad degradativa de *K. pneumoniae* por compuestos aromáticos ha sido escasamente investigada (Martín y col., 1991; Jones y col., 1991) y ello nos ha llevado a estudiar en este trabajo, por primera vez, la degradación del 3- y 4-HBA en esta bacteria.

Cuando se cultiva *K. pneumoniae* M5a1 en 3-HBA se inducen todas las enzimas necesarias para su degradación, al igual que ocurre cuando se cultiva esta misma cepa en Gly/2,5-DHBA. Es decir, parece existir dos inductores de la ruta del gentisato, el 3-HBA y el mismo 2,5-DHBA. En *Pseudomonas cepacia* el 3-HBA induce su ruta degradativa a través del gentisato y, sin embargo, no se detecta crecimiento en 2,5-DHBA, lo que ha llevado a pensar que el 3-HBA es el único inductor de la ruta (Wang y col., 1987). En *K. pneumoniae*, el hecho de que el gentisato induzca la 3-HBA hidroxilasa podría hacernos considerar al gentisato como único inductor, pero el valor de actividad superior de esta enzima en presencia de 3-HBA hace sugerir que son dos los inductores de la ruta degradativa completa del 3-HBA ó bien que el 3-HBA es sólo inductor de la 3-HBA hidroxilasa y el 2,5-DHBA lo sería del resto de la ruta. En *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 3-HBA, no hay ninguna variación sobre este modelo de inducción.

Por otro lado, *K. pneumoniae* M5a1 cultivada en Gly/3,4-DHBA induce la ruta completa del β -ceto adipato, al igual que ocurre en *Acinetobacter calcoaceticus* ó *Alcaligenes eutrophos* (Stanier y Ornston, 1973). Sin embargo, en este caso no podemos analizar el papel inductor del 4-HBA, por la imposibilidad de esta bacteria de transportarlo y/ó

metabolizarlo. En *K. pneumoniae* MA04 se induce la ruta del β -cetoacido cuando se cultiva este mutante en 4-HBA ó en Gly/ 3,4-DHBA. Por lo tanto, dos son también los inductores de esta ruta, el 4-HBA y el 3,4-DHBA.

En *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 4-HBA se inducen, además de las enzimas correspondientes para su degradación, las enzimas de la ruta del 3-HBA. Este es un hecho característico de inducción gratuita que también aparece en otras enterobacterias como es el caso de *Pseudomonas testosteroni* (Harpel y col., 1990). En esta bacteria donde el 3-HBA se degrada a través del 3,4-DHBA, se inducen las tres enzimas de la ruta del gentisato (gentisato dioxigenasa, maleilpiruvato isomerasa y fumarilpiruvato hidrolasa) en unos niveles apreciables. El sentido fisiológico de esta inducción no es conocido. Quizás el origen de estas enzimas sean las que metabolizan el análogo estructural homogentisato, a través del cual se degradan la tirosina ó la fenilalanina. Pero hoy en día estas dos rutas están muy diferenciadas con sus enzimas específicas cada una.

En este trabajo se demuestra la existencia de dos hidroxilasas distintas inducidas diferencialmente por crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en 3-HBA ó 4-HBA. En *Pseudomonas cepacia* encontramos también esta inducción diferencial para tres sustratos en una misma cepa. El crecimiento de esta bacteria en 2-HBA induce una salicilato hidroxilasa, el crecimiento en 3-HBA induce una 3-HBA 6-hidroxilasa y el crecimiento en 4-HBA induce una 4-HBA 3-hidroxilasa (Wang y col., 1987).

Este hecho también ha sido descrito para otros compuestos con grupos hidroxilo en posición C-3 y C-4, como es el caso del 3 y 4-HPA. Se ha sugerido la existencia de dos hidroxilasas inducidas diferencialmente para el catabolismo del 3 y 4-HPA vía 2,5-DHPA en *Flavobacterium* sp. (van den Tweel y col., 1988) y en *Klebsiella pneumoniae* para estos mismos

compuestos catabolizados a través del 3,4-DHPA (Martín y col., 1991). Ello contrasta con la idea sugerida por Cooper y Skinner (1980) en la que se propone la existencia de un única hidroxilasa para el catabolismo del 3- y 4-HPA en *E. coli*.

Cuando se cultivan *K. pneumoniae* M5a1 ó MA04 en 3-HBA como única fuente de carbono y energía se induce la síntesis de una hidroxilasa específica que sólo es capaz de catalizar la hidroxilación del 3-HBA. El crecimiento de MA04 en 4-HBA induce una hidroxilasa específica, claramente diferente de la anterior, que sólo reconoce al 4-HBA como sustrato. Estos datos contrastan con la inducción de hidroxilasas para el 3 y 4-HPA en *K. pneumoniae*. En este caso el crecimiento de *K. pneumoniae* en 3-HPA induce la formación de la 3 y 4-hidroxilasas, mientras que el crecimiento en 4-HPA induce solamente la 4-HPA hidroxilasa (Gibello, 1992).

En el caso del mutante MA04 de *K.pneumoniae* cultivado en 4-HBA se induce una permeasa responsable de su introducción en el interior de la célula, que no se expresa en la cepa salvaje. Las diferencias entre la cepa M5a1 y MA04 se encuentran en los procesos de transporte del 4-HBA y su posterior hidroxilación. Por ello, fue importante estudiar el mecanismo de transporte del 4-HBA en *K. pneumoniae* MA04, su especificidad, su inducción y sobre todo, la fuerza conductora del mismo.

Otro hecho a tener en cuenta en la inducción de las rutas degradativas no es sólo la especificidad de los sistemas de transporte, sino también la especificidad de las hidroxilasas iniciales de ruta. En *Pseudomonas* spp. la especificidad relajada de un sustrato es la que permite la oxigenación de diferentes sustratos para formar los catecoles correspondientes (Spain y Gibson, 1988). En *Klebsiella pneumoniae*, la 4-HPA hidroxilasa muestra una baja especificidad de sustrato que le permite reconocer al 3- y 4-HPA, y quizás a otros compuestos monohidroxilados,

como sustratos (Gibello, 1992). Esta característica es muy importante desde el punto de vista evolutivo, ya que los microorganismos que posean hidroxilasas con especificidad relajada podrían ampliar su capacidad degradativa de "nuevos" compuestos que aparezcan en el entorno y transformarlos en compuestos más fácilmente metabolizables.

2. SISTEMA DE TRANSPORTE DEL 4-HBA

El análisis del sistema de transporte puede ayudarnos a conocer los mecanismos que se producen en el paso de un compuesto aromático a través de la membrana plasmática y su relación con los procesos de inducción de las rutas degradativas.

En el estudio del transporte del 4-HBA se observa que éste es fundamentalmente inducible por 4-HBA puesto que no se observa actividad de transporte utilizando otras fuentes de carbono diferentes a este compuesto. Los resultados obtenidos demuestran que el sistema de transporte tiene una alta afinidad por el 4-HBA con una $K_T = 13 \pm 2 \mu\text{M}$ y una $V_{\text{max}} = 27,6 \pm 3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ a pH 7,0.

El sistema de transporte de *K. pneumoniae* MA04 cultivada en 4-HBA es altamente específico para el 4-HBA, con una clara inhibición de la actividad transportadora por varios análogos estructurales, destacando entre ellos el 3,4-DHBA como un potente inhibidor. Se puede sugerir que el grupo hidroxilo en la posición C-4 y el carboxilo en la posición C-1 del núcleo bencénico son esenciales para el reconocimiento de este sistema de transporte.

La especificidad de sustrato para el sistema de transporte del 4-HBA junto con la especificidad de su inducción podría estar relacionada con la síntesis de una hidroxilasa implicada en la transformación del 4-HBA en

3,4-DHBA. Cuando *K. pneumoniae* MA04 se cultiva en 4-HBA se induce la síntesis de una hidroxilasa: la 4-HBA 3-hidroxilasa que sólo reconoce el 4-HBA como sustrato. La coordinación de la producción de ambos procesos, transporte e hidroxilación demuestra que la bacteria desarrolla unos mecanismos altamente específicos para utilizar los compuestos aromáticos del medio externo.

Varios compuestos aromáticos pueden entrar en la célula por difusión pasiva y el transporte depende tan solo del gradiente de concentración y del pH. El hecho de que el sistema de transporte sea sensible a varios inhibidores del metabolismo energético indican que el 4-HBA es introducido en la célula por un mecanismo de transporte activo (Booth, 1988) similar al de otros compuestos aromáticos en diferentes bacterias como ácidos aromáticos en *E. coli* (Brown, 1971; Whipp y col., 1980; Pittard, 1987), mandelato en *P. putida* (Higgins y col., 1972) y en *Acinetobacter / Moraxella* (Cook y Fewson, 1972) y 4-hidroxifenilacético en *K. pneumoniae*. (Allende y col., 1992)

La reducción insignificante del transporte después del choque osmótico sugiere que el sistema de transporte del 4-HBA está ligado a iones y que la energía es producida por una fuerza protomotriz transmembrana.

Para determinar el papel de los dos componentes de la fuerza protomotriz en el transporte del 4-HBA, se investigaron los efectos de la nigericina y valinomicina entre los pH 5,5 y 8,0. La nigericina no ejerció efecto sobre el transporte, por lo que se concluye que el Δ pH no tiene capacidad suficiente para conducir el proceso. Por el contrario, la valinomicina inhibe el transporte del 4-HBA completamente a pH alcalinos, lo que indica que este transporte es un proceso electrogénico. Esto sugiere que el mecanismo de transporte ocurre de manera similar al transporte del 4-clorobenzoato en *Corynebacterium* (Groenegen y

col., 1990) y de el transporte del benzoato en *P. putida* lo cuales se llevan a cabo gracias al estado energético producido por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) (Thayer y col., 1982).

Los experimentos de transporte realizados ponen de manifiesto que la mutación que permite a *K. pneumoniae* catabolizar el 4-HBA implica el transporte del 4-HBA dentro de la célula y que la cepa salvaje no lo metaboliza porque no es capaz de transportarlo.

De los resultados se deduce la existencia de una permeasa de especificidad relajada en células. Desde un punto de vista evolutivo, la coordinación de los sistemas de transporte e inducción reportarían una enorme ventaja a los microorganismos para degradar un amplio rango de compuestos aromáticos y adaptarse a las condiciones ambientales. El estudio del transporte y su relación con los mecanismos de inducción enzimática es un tema de gran interés, cuya investigación nos puede reportar, sin duda, unos datos muy útiles a la hora de proponer un modelo de regulación de las rutas degradativas de compuestos aromáticos.

3. HIDROXILASAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACION DEL 3- Y 4-HBA.

La dihidroxilación del anillo aromático es un requisito esencial para la posterior escisión del mismo y la conversión de los compuestos resultantes en intermediarios de las rutas centrales del metabolismo. Por esta razón, las hidroxilasas bacterianas juegan un papel vital en la iniciación de la degradación de una amplia variedad de compuestos aromáticos (Spain y Gibson, 1988; Harayama y ,1992).

Aunque existe un gran variedad de compuestos aromáticos que pueden ser metabolizados por bacterias, sólo se han aislado y estudiado un número reducido de hidroxilasas, casi todas con un mecanismo de

hidroxilación en posición *orto*. Entre ellas se pueden destacar la salicilato hidroxilasa (White-Stevens y Kamin, 1972), la fenol hidroxilasa (Neujahr y Gaal, 1973) y la p-hidroxibenzoato hidroxilasa a la que nos referiremos más detalladamente.

Como se ha observado en este trabajo, en *K. pneumoniae* existen dos hidroxilasas implicadas en la degradación del 3- y 4- hidroxibenzoato que difieren en sus mecanismos de inducción, mecanismos de hidroxilación, características físico-químicas y comportamiento cinético.

4-HBA 3-HIDROXILASA

La p-hidroxibenzoato hidroxilasa ó 4-HBA 3-hidroxilasa ha sido purificada y aislada anteriormente en *Pseudomonas putida* (Hosokawa y col, 1966), *P. desmolytica* (Yano y col., 1969), *P. fluorescens* (Howell y col., 1972), *Corynebacterium cyclohexanicum* (Fuji y col., 1985), *P. aeruginosa* (Entsch y col., 1989) y recientemente en *Acinetobacter calcoaceticus* (Fernández y col., 1993).

Puesto que *K.pneumoniae* M5a1 no puede degradar el 4-HBA, se ha purificado la 4-HBA hidroxilasa del mutante MA04. Este hecho y el que la cepa salvaje pueda degradar el 3,4-DHBA hacen considerar, en principio, que el origen de la mutación de *K.pneumoniae* MA04 se encuentra en la enzima que convierte el 4-HBA en 3,4-HBA, la 4-HBA, 3-hidroxilasa, cuya expresión está silenciada en la cepa salvaje por una alteración en la regulación de su síntesis ó en relación con la síntesis de la permeasa que permite sus transporte a través de la membrana plasmática.

En cuanto a su estructura , la 4-HBA hidroxilasa se describe como un dímero con peso molecular aproximado entre 45.000 da en *P. aeruginosa* (Entsch y col. 1989), *P. fluorescens* (Muller y col., 1979) y *A. calcoaceticus*. (Fernández y col., 1993). En *P. desmolytica*. se describen dos

formas cristalizadas, el complejo holoenzima 4-HBA y el holoenzima libre, estimándose el peso molecular en 68.000 da (Nakamura y col., 1970), y en *P. putida* se estima entre 83.600-93.600 da (Hosokawa y col., 1966; Hesp y col., 1969). Tan sólo la 4-HBA hidroxilasa de *Corynebacterium cyclohexanicum* se describe como un monómero de 47.000 da (Fuji y col., 1985). Por lo tanto, la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae*, aunque el peso molecular estimado del dímero es ligeramente menor, 40.000 da, es próximo al de las 4-HBA hidroxilasas estudiadas.

La 4-HBA hidroxilasa se caracteriza por reconocer exclusivamente al 4-HBA como sustrato y al NADPH como cofactor. Este rasgo se encuentra también en esta misma enzima de otras especies bacterianas como *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* sp. ó *Acinetobacter calcoaceticus*. Solamente las 4-HBA hidroxilasas de levaduras parecen mostrar preferencia por el NADH, y en *Rhodotorula rubra* utiliza el NADH como único cofactor (Wright y Ratledge, 1991), mientras que *C. cyclohexanicum* puede utilizar ambos cofactores pero con una afinidad ligeramente mayor por el NADH ($K_m = 45 \mu\text{M}$) que por el NADPH ($K_m = 63-170 \mu\text{M}$) (Fuji y col., 1985). En este sentido, la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* también se diferencia de la 3-HBA hidroxilasa, ya que ésta última puede utilizar como cofactores tanto el NADH como el NADPH con igual afinidad.

Los estudios cinéticos sobre la 4-HBA 3-hidroxilasa en *K. pneumoniae* han presentado una problemática difícil de abordar debido a la gran inestabilidad de esta enzima. Esta misma enzima en *P. putida* también se ha mostrado muy lábil (Hosokawa y col., 1969), lo que no ha permitido realizar demasiados estudios acerca de ella. Sin embargo, la estabilidad encontrada para esta enzima en *P. fluorescens* (Howeel y col., 1972) ha hecho posible el desarrollo de numerosos estudios acerca de sus propiedades catalíticas y estructurales. La 4-HBA de *P. fluorescens* es estable a temperatura ambiente, mientras que la de *K. pneumoniae* mantenida 30 min a 35°C pierde el 50% de actividad. La 4-HBA hidroxilasa de *C.*

cyclohexanicum se mantiene activa 10 min. a 60°C (Fuji y col., 1985) y la de *K. pneumoniae* tan sólo 15 min a 45°C. En cuanto a la temperatura utilizada en las investigaciones, 4°C, la enzima en *K. pneumoniae* MA04 mantenía la actividad al 100% tan solo 12 horas; a las 24 horas en presencia de 10% de glicerol la actividad enzimática medida era la mitad.

El pH 8 es el óptimo encontrado para la actividad de la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* y es similar al de todas las enzimas de este tipo descritas, igual que su temperatura óptima de 25°C (Husain y col., 1979).

Spector y col. (1972) sugirieron la idea de que el grupo carboxilo del 4-HBA jugaba un papel importante en la unión de la enzima con su sustrato. Shoun (1974) propuso que la carga negativa del ión carboxilato del sustrato permitiría una interacción iónica con un aminoácido básico del centro activo de la enzima. Este residuo sería el grupo amino de una lisina (pK_a 8.5) ó el grupo SH de la cisteína y ello podría ser la causa de que el pH óptimo de la 4-HBA hidroxilasa se encontrara en la región alcalina.

La 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* muestra una especificidad por su sustrato que no se observa en otras enzimas. En *P. fluorescens*, esta enzima reconoce al 4-aminobenzoato, 4-fluorobenzoato, benzoato y 2,4-dihidroxibenzoato entre otros sustratos (van Berkel y col., 1989). En *C. cyclohexanicum* la 4-HBA hidroxilasa reconoce a otros sustratos análogos entre ellos el 3-HBA, 2,5-DHBA y 3,4-DHBA, 4-aminobenzoato y 4-fluorobenzoato.

En *K. pneumoniae* el valor de K_m obtenido para el 4-HBA a concentraciones fijas de NADPH (160 μ M) fue 80 μ M, lo que indica un alta afinidad por su sustrato, y la cinética en la representación de Michaelis-Menten era hiperbólica. Esto constituye una diferencia fundamental con la cinética de la 3-HBA hidroxilasa que, para concentraciones fijas del

cofactor, era sigmoidal.

La estructura primaria completa de la 4-HBA hidroxilasa ha sido determinada en *P. fluorescens* estando compuesta por 394 aminoácidos (Hofsteenge y col., 1980 y 1983; Weijer y col., 1982) y *P. aeruginosa* (Entsch y col., 1988). La composición de aminoácidos de *K. pneumoniae* varía con respecto a *P. fluorescens* y *A. calcoaceticus*. Entre las variaciones encontradas destacan son el aumento de asp/asn, thr, y val y la disminución de glu/gln, leu y tyr. No se ha detectado thr.

La comparación de la secuencia del extremo aminoterminal entre *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *A. calcoaceticus* pone de manifiesto una conservación de secuencias tanto de aminoácidos como de DNA que es mayor entre las dos especies de pseudomonas. Sin embargo, en la secuencia aminoácidica correspondiente a los catorce primeros aminoácidos de *K. pneumoniae* existe una gran variabilidad. Llama la atención la conservación de las gly que parecen estar implicadas en la unión al NADPH. Este hecho y el que sea el aminoácido más pequeño le darían la característica de esencial en el mantenimiento de estructura tridimensional de la proteína. También merece la pena resaltar que la mayoría de las sustituciones son entre aminoácidos hidrofóbicos.

Los experimentos de hibridación de la 4-HBA hidroxilasa parecen concluir que no existe una homología entre la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae* y de *Acinetobacter calcoaceticus*. Sin embargo, mediante la clonación del gen de esta enzima en el cromosoma del mutante *A. calcoaceticus* 4-HBA⁻ y la detección de una actividad 4-HBA hidroxilasa, se observa que la maquinaria celular de *A. calcoaceticus* es capaz de reconocer y traducir este gen en una proteína con la actividad hidroxilasa requerida.

La determinación de residuos en el centro activo de la 4-HBA hidroxilasa se ha estudiado en *P. desmolytica* detectándose un residuo

esencial de arginina implicado en el sitio de unión al 4-HBA (Shoun y col., 1980), y un residuo de histidina en el sitio de unión al NADPH (Shoun y col., 1982). En *P. fluorescens* se ha determinado un residuo de tirosina con función catalítica, probablemente la Tyr-222 (Wijnands y col., 1986) y dos residuos de arginina (Wijnands y col., 1987). Schreuder (1990) ha estudiado el mecanismo catalítico de la 4-HBA hidroxilasa indicando que los residuos Tyr-201 y Tyr-385 son los implicados en la unión del hidrógeno del sustrato 4-HBA. Mediante un estudio por mutagénesis dirigida modificando estos residuos por Phe en *P. aeruginosa* se indicó que el papel del residuo Tyr-201 era activar el sustrato, mientras que el Tyr-385 es el encargado de hidroxilarlo (Entsch y col., 1991). En *K. pneumoniae*, mediante la inactivación por DPC, se han detectado residuos de tirosina como aminoácidos implicados en el mecanismo catalítico de la enzima.

Los residuos cys también han sido muy estudiados al comprobarse su presencia en la estructura primaria y observarse que no había ninguna implicación de alguno de ellos en puentes disulfuro (Wierenga y col., 1982). Se ha puesto especial atención en las Cys-116 y Cys-222 (van Berkel y col., 1984; Eschrich y col., 1990). La Cys-116 es muy reactiva con el oxígeno y con reactivos del grupo sulfidrilo y se ha observado en geles de agarosa-SDS dos bandas que difieren en su movilidad (van der Laan y col., 1989). Estas bandas se pueden apreciar en la 4-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae*. Este es, sin duda, el efecto de la oxidación del residuo Cys-116 de uno de los monómeros de la enzima, ya que si el grupo SH se encuentra bloqueado la banda se mueve más lentamente.

3-HBA 6-HIDROXILASA

Como ya se ha indicado anteriormente las enzimas que hidroxilan en posición *para* están mucho menos estudiadas que las que lo hacen en *orto*. Entre las hidroxilasas que actúan sobre el 3-HBA se han estudiado la 3-HBA 4-hidroxilasa de *Aspergillus niger* (Premkumar y col., 1969) y la de

Pseudomonas testosteroni (Michalover y col., 1973), ambas con mecanismos de *orto* hidroxilación. Por otro lado, la 3-HBA 6-hidroxilasa ha sido purificada en *P. aeruginosa* (Groseclose y Ribbons., 1973), *P. cepacia* (Wang y col., 1987) y en una bacteria Gram +, *Micrococcus sp.* (Rajasekharan y col., 1990).

Todas estas hidroxilasas, al igual que la de *K. pneumoniae* son inducibles por crecimiento en 3-HBA y su pH óptimo de actividad es cercano a pH 8. El FAD se encuentra como grupo prostético en todas las 3-HBA 6-hidroxilasas estudiadas, y en el caso de la de *Micrococcus sp.* se requiere FAD exógeno para que se produzca la actividad enzimática óptima. Esto también ocurre en la 3-HBA 6-hidroxilasa de *K. pneumoniae* que aumenta su actividad aproximadamente un 50% en presencia de FAD.

La estructura de las 3-HBA 6-hidroxilasas estudiadas son idénticas y están constituidas por un monómero de peso molecular variable (Tabla XV de Resultados). Los pesos moleculares oscilan entre los 44.000 da de la 3-HBA 6-hidroxilasa de *P. cepacia* y los 85.000 da de *P. aeruginosa*. El peso molecular de esta misma enzima de *K. pneumoniae* (42.000 da), obtenido en este trabajo es similar al de *P. cepacia*.

En cuanto a la utilización de cofactores se observan claras diferencias entre estas enzimas. La 3-HBA 6-hidroxilasa de *P. aeruginosa* y *Micrococcus sp.* muestran una clara preferencia por el NADH frente al NADPH, al igual que ocurre con otras hidroxilasas como la salicilato hidroxilasa (White-Stevens y col., 1972), la 3-HPA hidroxilasa (Gibello, 1992) ó la melilotato hidroxilasa (Strickland y col., 1973) en las que el NADH es mejor agente reductor. En cambio, la 3-HBA 4-hidroxilasa de *P. testosteroni* prefiere como cofactor al NADPH ($K_m = 0,07$ mM) con una afinidad muy baja por el NADH ($K_m = 3$ mM) (Michalover y col., 1973). En contraste con todas estas estas hidroxilasas la 3 HBA 6-hidroxilasa de *K. pneumoniae* puede utilizar con igual eficacia NADH ó NADPH con

valores idénticos de K_m ($70\mu\text{M}$). Esta característica sólo ha sido descrita previamente en *P. cepacia*, aunque los valores de K_m para ambos cofactores difieren ligeramente ($64\mu\text{M}$ para el NADPH y $40\mu\text{M}$ para el NADH) (Wang y col., 1987).

Mientras que la 3-HBA 6-hidroxilasa de *P. aeruginosa* parece presentar una especificidad relajada de sustrato esta característica no se observa en la 3-HBA hidroxilasa de *K. pneumoniae*. La versatilidad de esta enzima en *P. aeruginosa* le permite aceptar análogos del 3-HBA sustituidos en las posiciones 2, 4, 5 y 6, aunque parece que un requisito estructural para el reconocimiento de la hidroxilasa es que el grupo carboxilo y el hidroxilo estén en posición 1 y 3 (Groseclose y Ribbons, 1973). La 3-HBA 4-hidroxilasa de *P. testosteroni* también reconoce compuestos análogos del 3-HBA, como el 2,5-DHBA, 3,5-DHBA ó 4-fluor-3-hidroxibenzoato.

En *K. pneumoniae* la 3-HBA 6-hidroxilasa sólo reconoce al 3-HBA como sustrato, y este hecho también ocurre en *Micrococcus sp.*, donde esta enzima es altamente específica y no reconoce ni al 2-HBA, ni al 4-HBA, ni al 3,4-DHBA como sustratos (Rajasekharan y col., 1990). De entre todas las hidroxilasas descritas hasta el momento tan sólo la 3-HPA hidroxilasa de *K. pneumoniae* muestra una especificidad de sustrato similar a la de la 3-HBA hidroxilasa (Gibello, 1992).

La 3-HBA 6-hidroxilasa de *K. pneumoniae* presenta cinéticas sigmoidales respecto al 3-HBA a concentraciones fijas tanto de NADH como de NADPH ($160\mu\text{M}$). La representación de Lineaweaver-Burk nos proporciona en ambos casos unas líneas cóncavas con respecto al eje de ordenadas, que indican fenómenos de cooperatividad en el que el 3-HBA ejercería el papel de modulador positivo. En ambos casos se obtienen unos valores del coeficiente de Hill de 2,4 y 2,7 respectivamente para el NADH y NADPH, que sugieren la existencia de dos sitios de unión en la enzima

para los dos sustratos. Este tipo de cinética sigmoideal se obtiene también en el estudio de la 3-HPA hidroxilasa (Gibello, 1992).

4. REGULACION DE LAS RUTAS DEGRADATIVAS DEL 3- y 4-HBA.

Las enzimas catabólicas que catalizan las reacciones de la ruta degradativa del 3 y 4-HBA son todas inducibles secuencialmente, lo cual supone un ahorro energético en la célula. La naturaleza del mecanismo de inducción de las enzimas degradativas no es conocida todavía.

En el caso de la ruta del 3-HBA estudiada en *K. pneumoniae* M5a1 se detecta la existencia de dos inductores de la ruta, el 3-HBA y el 2,5-DHBA. Lo mismo parece suceder con la ruta del 4-HBA estudiada en *K. pneumoniae* MA04 que es inducida por 4-HBA y 3,4-DHBA. Sin embargo, existe una diferencia fundamental a la hora de analizar la regulación de estas dos rutas. La 3-HBA hidroxilasa que transforma el 3-HBA en gentisato se induce tanto por su sustrato como por su producto, mientras que la 4-HBA hidroxilasa sólo es inducida por el 4-HBA y no por el 3,4-DHBA. Estos datos sugieren que la ruta del 3-HBA se encuentra codificada en un solo operón y la del 4-HBA al menos en dos.

La primera posibilidad se fundamenta en que en esta ruta tan sólo están implicadas cuatro enzimas y el fragmento de DNA necesario para codificar estas proteínas sería de unas 10 Kb. En cuanto a la ruta del 4-HBA, parece que la hidroxilasa está codificada en un operón aparte de las demás enzimas de la ruta, y las seis restantes estarían organizadas en uno ó dos operones como ocurre en *Pseudomonas* ó *Acinetobacter*. El mantenimiento de dos genes estructurales para las dos hidroxilasas en *K. pneumoniae* permite, por tanto, la existencia de dos inductores diferentes, uno para cada ruta.

Es muy factible que la permeasa del 4-HBA se encuentre en el mismo operón que la 4-HBA hidroxilasa y separado del operón u operones de la ruta del β -cetoadipato como ocurre en *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter calcoaceticus*. Pero también es posible que el 3,4-DHBA sea transportado por otra permeasa diferente a la que transporta al 4-HBA, y que se localice en el mismo operón que el gen estructural de la 3,4-DHBA dioxigenasa. Este hecho aparece en *K. pneumoniae* para el metabolismo del 3,4-DHPA, donde se sospecha la existencia del gen de una permeasa específica en el operon del 3,4-DHPA (Gibello, 1992). Quizás por esta razón, el 3,4-DHBA es un potente inhibidor del transporte del 4-HBA.

Mediante los estudios de hidridación de la 4-HBA hidroxilasa se pone de manifiesto la presencia de este gen en la cepa salvaje, lo cual es un resultado lógico. El hecho de que un gen no se exprese en la cepa salvaje y lo haga en un mutante está descrito en otros microorganismos. Este sería el caso de *P. putida* (arvilla) mt-2 que presenta dos vías de degradación del benzoato por expresión de una pirocatecasa con escisión *meta* y una pirocatecasa con escisión *orto*. En este caso, la cepa salvaje presenta genéticamente las dos rutas pero la pirocatecasa está reprimida y fenotípicamente sólo expresa la vía *meta* (Nakazawa y Yokota, 1973).

Un proceso similar ocurre también en el mutante de *Pseudomonas* sp. cepa HBP1 Prp. La cepa salvaje, HBP1, no es capaz de crecer en 2-propilfenol porque no induce una monooxigenasa dependiente de NADH y una metapirocatecasa, las dos primeras enzimas de la ruta degradativa. Sin embargo en el mutante HBP1 Prp existe un mecanismo celular de inducción de estas dos enzimas, lo cual permite la degradación del 2-propilfenol (Kohler y col., 1993).

En *K. pneumoniae* MA04, los resultados obtenidos en los estudios de inducción hacen pensar en una alteración en la regulación de la 4-HBA hidroxilasa y, como en el caso del mutante HBP1, se obtiene una actividad

constitutiva entre el 5 y 10% en los extractos procedentes de cultivos con succinato ó glicerol. En presencia de 4-HBA esta inducción es mucho mayor , lo que significa que la síntesis enzimática se mantiene bajo regulación. Podemos proponer que la mutación que confiere fenotipo positivo al mutante MA04 de *K. pneumoniae* puede ser debido a las siguientes circunstancias:

-Alteración de algún represor que permita un bloqueo relativo de la regulación negativa. El hecho de que todavía siga habiendo inducción por 4-HBA hace pensar en un complejo sistema regulador tipo operón lac.

-Modificación de algún gen estructural de alguna hidroxilasa que le amplie el rango de reconocimiento. La hipótesis de que fuera el propio gen de la 3-HBA hidroxilasa está descartada si tenemos en cuenta que las propiedades físicas, estructurales, cinéticas y reguladoras de ambas enzimas son totalmente distintas.

-Expresión de una permeasa reprimida en la cepa salvaje que no le permite la entrada del 4-HBA al interior de la célula impidiendo ejercer su papel como inductor. La regulación de esta permeasa parece estar estrechamente relacionada con la hidroxilasa, de manera que dechas desrepresiones estén conjuntadas. Esto nos lleva a pensar que ambos genes se encuentran en el mismo operón y se regulan mediante el mismo mecanismo.

5. POSIBLE APLICACION EN BIOTECNOLOGIA

La posible utilización de microorganismos con capacidades degradativas de amplio espectro es muy importante en procesos de descontaminación ambiental al igual que la utilización de microorganismos que metabolicen sustancias difícilmente degradables como el petróleo. Todavía no existe una legislación aplicable a la liberación de microorganismos modificados genéticamente al medio ambiente, sin embargo existe un proyecto de ley basado en las normas marcadas por la Comunidad Europea a este respecto. mientras tanto se siguen estudiando posibles estrategias para que los microorganismos que van a ser liberados al medio ambiente cumplan estrictamente su misión (de Lorenzo, 1992).

Actualmente los microorganismos con capacidades descontaminantes pueden emplearse dentro de lugares confinados como células enteras ó bien se utilizan sus enzimas inmovilizadas en un soporte. En este sentido, los productos de las hidroxilasas son en muchos casos más solubles que sus sustratos ó más fácilmente metabolizables. Por ello, estas enzimas ayudan considerablemente al proceso de detoxificación de compuestos aromáticos y constituyen un factor importante en el control de la polución y desintoxicación llevada a cabo por los microorganismos del suelo.

El estudio de enzimas inmovilizadas se considera muy interesante para su uso en descontaminación ambiental. Lamentablemente, se tiene la idea de que es una técnica de coste elevado y que su utilización quedaría restringida a casos concretos de compuestos de una elevada toxicidad. Actualmente se emplea esta técnica principalmente para obtención de grandes cantidades de proteínas con interés farmacéutico. En descontaminación ambiental hay algunos estudios como la inmovilización de la catecol 1,2-dioxigenasa de *Nocardia sp.* (Smith y col., 1990) ó de células de *Pseudomonas sp.* que deshalogenan mezclas de

compuestos halogenados aromáticos (Sahasrabudhe y col., 1991)

La inmovilización de las hidroxilasas como las estudiadas en este trabajo no parece rentable si tenemos en cuenta la necesidad del cofactor (NADPH) en la reacción y la inestabilidad térmica y enzimática que caracteriza a estas enzimas. Una alternativa sería la utilización de células enteras de *Klebsiella pneumoniae* en lodos activados ó fijadas a filtros percoladores en estaciones depuradoras de agua residuales cercanas a industrias papeleras ó madereras donde el contenido en 3- y 4-HBA parece elevado. Una idea a tener en cuenta es la posibilidad de combinar su acción con dioxigenasas ó deshalogenasas inmovilizadas. De esta manera sería posible la degradación de un gran número de sustancias tóxicas ó persistentes del medio ambiente.

CONCLUSIONES

En el estudio sobre la degradación de los ácidos 3- y 4-hidroxibenzoico, y de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir :

1. La cepa salvaje de *K. pneumoniae* puede degradar el 3-HBA vía gentisato, pero no es capaz de utilizar el 4-HBA como única fuente de carbono y energía.

2. Un mutante de *K. pneumoniae*, MA04, es capaz de metabolizar el 3- y 4-HBA con igual eficacia. El 4-HBA es degradado vía β -ceto adipato e induce un sistema de transporte activo específico y acoplado directamente a la fuerza protomotriz. El 5-10% de este transporte se induce constitutivamente.

3. Mediante el cultivo de *K. pneumoniae* en 3-HBA ó 4-HBA se inducen diferencialmente dos hidroxilasas que difieren en sus características físico-químicas, mecanismo de hidroxilación y comportamiento cinético.

4. La 3-HBA 6-hidroxilasa se induce por crecimiento en 3-HBA y 2,5-DHBA, lo que hace pensar que las 4 enzimas de esta ruta degradativa se encuentran en un mismo operón. Esta enzima utiliza con igual eficacia NADH y NADPH, es específica para su sustrato y presenta cinética sigmoideal para concentraciones variables de 3-HBA. Se ha purificado a homogeneidad, estando constituida por un monómero de 42 kDa.

5. La 4-HBA 3-hidroxilasa presenta su máxima actividad cuando es inducida por 4-HBA, sin embargo el 5-10% de actividad es inducido constitutivamente. Utiliza sólo el NADPH como cofactor y su cinética es hiperbólica para concentraciones variables de sustrato. Se ha purificado a homogeneidad, estando constituida por un dímero de 40 kDa.

6. La mutación que permite al mutante MA04 de *K. pneumoniae* metabolizar el 4-HBA podría afectar: al gen de una permeasa que reconocería el 4-HBA como sustrato ó a un gen regulador que tendría efecto pleiotrópico sobre el gen de la permeasa y/ó hidroxilasa. La existencia de un operón independiente para esta hidroxilasa se confirma con los estudios de inducción realizados.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, J., Hazelbauer, G.L., y Dahl, M.M. (1973). Chemotaxis toward sugars in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**: 780-786.
- Allende, J.L., Suárez, M., Gallego, M., y Garrido-Pertierra, A. (1993). 4-hydroxybenzoate uptake in *Klebsiella pneumoniae* is driven by electrical potential. *Arch. Biochim. Biophys.* **300**: 142-147.
- Allende, J.L., Gibello, A., Martín, M., y Garrido-Pertierra, A. (1992). Transport of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochim. Biophys.* **292**: 583-588.
- Anderson, J.J., y Dagley, S. (1980 a). Heat evolution of microbial catabolism: effects of monooxygenases. *J. Bacteriol.* **143**: 523-528.
- Anderson, J.J., y Dagley, S. (1980 b). Catabolism of aromatic acids in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.* **143**: 534-543.
- Averhoff, B., Gregg-Jolly, L., Elsemore, D. y Ornston, L. N. (1992). Genetic analysis of supraoperonic clustering by use of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **174**: 200-204.
- Babbitt, P.C., y Kenyon, G.L. (1992). Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: Analysis of amino acid sequence identities among families of acyl: adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochem.* **31**: 5594-5604.
- Bak, F. y Widdel, F. (1986). Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**: 177-180.
- van Berkel, W.J.H. y Muller, F. (1987). The elucidation of the microheterogeneity of highly purified p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens* by various biochemical techniques. *Eur. J. Biochem.* **167**: 35-47.
- van Berkel, W.J.H. y Muller, F. (1989). The temperature and pH dependence of some properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.* **179**: 307-314.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522.

- Blanke, S.R. y Hager, P. (1990). Chemical modification of chloroperoxidase with diethylpyrocarbonate. *J. Biol. Chem.* **265**: 12454-12461.
- de Boer, L., Harder, W. y Dijkhuizen, L. (1988). Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia* sp. *239 Arch. Microbiol.* **149**: 459-465.
- Booth, I.R. (1988). *Bacterial Energy Transduction* (Anthony, C., Ed.), pp. 1-82, Academic Press, New York.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bryan, J.K. (1977). *Anal. Biochem.* **78**: 513-
- Brown, K.D. (1971). *J. Bacteriol.* **145**: 1196-1208.
- Cain, R.B., Bilton, R.F. y Darrah, J.A. (1968). The metabolism of aromatic acids by microorganisms: metabolic pathways in the fungi. *Biochem. J.* **108**: 797-827.
- Chang, K.-H., Liang, P.-H., Beck, W., Scholten, J.D. y Dunawzy-Mariano, D. (1992). Isolation and characterization of the three polypeptide components of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3. *Biochem.* **31**: 5605-5610.
- Chow, L.T., Kahmann, R. y Kamp, D. (1977). Electron microscopy characterization of DNA of non-effective deletion mutants of bacteriophage Mu. *J. Mol. Biol.* **113**: 591-609.
- Collinsworth, W.L., Chapman, P. J. y Dagley, S. (1973). Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **113**: 922-931.
- Cook, A.M. y Fewson, C.A. (1972). Evidence for specific transport mechanism for aromatic compounds in Bacterium N.C.I.B. 8250. *Biochim. Biophys. Acta*, **290**: 384-388.
- Cooper, R.A. y Skinner, N.A. (1980). Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetate by the 3,4-dihydroxyphenylacetate pathway in *Escherichia coli* C. *J. Bacteriol.* **143**: 302-306.
- Crawford, R.L. (1975). Novel pathway for degradation of protocatechuic acid in *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* **121**: 531-536.

- Dagley, S. (1971). Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **6**: 1-48.
- Dagley, S. (1975). A biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Essays Biochem.* **11**: 81-138. Biochemical society. (Campbell, P.W. y Aldridge, W.N., Ed.). Academic Press. New York.
- Deschamps, A.M., Richard, C. y Lebeault, J.-M. (1983). Bacteriology and nutrition of environmental strains of *Klebsiella pneumoniae* involved in wood and bark decay. *Ann. microbiol. (Inst. Pasteur)* **134**: 189-196.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. y Knackmuss, H.-J. (1974). *Arch. Microbiol.* **99**: 61-70.
- Doten, R.C., Ngai, K.-L., Mitchell, D.J. y Ornston, L.N. (1987). Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **169**: 3168-3174.
- Doten, R.C., and Ornston, L.N. (1987). Protocatechuate is not metabolized via catechol in *Enterobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* **169**: 5827-5830.
- Entsch, B., Palfey, B.A., Ballou, D.P. y Massey, V. (1991). Catalytic function of tyrosine residues in para-hydroxybenzoate hydroxylase as determined by the study of site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* **266**: 17341-17349.
- Eschrich, K., van Berkel, W.J.H., Westphal, A., de Kok, A., Mattevi, A., Obmolova, G., Kalk, K.H. y Hol, W.G.J. (1990). Engineering of microheterogeneity-resistant p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *FEBS Lett.* **277**: 197-199.
- Evans, W.C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* **270**: 17-20.
- Evans, W. C., and Fuchs, G. (1988). Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 289-317.
- Fawcett, T., Garrido-Pertierra, A. y Cooper, R.A. (1989). 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenases of *Escherichia coli* C and *Klebsiella pneumoniae* M5a1 show very high N-terminal sequence homology. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 307-312.
- Fernández, J. (1989). Regulación de la degradación del ácido 4-hidroxifenilacético en *Klebsiella pneumoniae*. Tesis doctoral. 172 pp.

- Fuji, T. y Kaneda, T. (1985). Purification and properties of NADH/NADPH dependent p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium cyclohexanicum*. Eur. J. Biochem. **147**: 97-104.
- Gibello, A. (1992). Degradation de 3- y 4-hidroxifenilacetato por *Klebsiella pneumoniae*: aspectos bioquímicos y genéticos. Tesis doctoral. 159pp
- Gibson, D.T. (1968). Microbial degradation of aromatic compounds. Science **161**: 1093-1097.
- González Benito, G., Fernández-Polanco F., García Encina, P.A., Heras Nieto C. (1992). Decoloración del efluente resultante de la depuración de vinazas de alcoholera. IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano-Luso de Biotecnología. p.188.
- Goottschalk, G. En " Bacterial metabolism". (Ed. Donnelley, R.R. y Sons). Ed. Springer-Verlag. 359 pp.
- Grant, D.J.W. y Patel, J.C. (1969). The non-oxidative decarboxilation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*) Antoine van Leeuwenhoek **35**: 325-343.
- Groenewegen, P.E.J., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. y de Bont, J.A.M. (1990). Energy-dependent uptake of 4-chlorobenzoate in *Coryneform bacterium* NTB-1. J. Bacteriol. **172**: 419-423.
- Groseclose, E.E. y Ribbons, D.W. (1973). 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Research. Commun. **55**: 897-903.
- Grund, E., Knorr, C. y Eichenlaub, R. (1990). Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1459-1464.
- Grunstein, M. y Hogness, D. (1975). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **72**: 3961-
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. J. Mol. Biol. **166**: 557-561.
- Harayama, S., Kok, M. y Neidle, E.L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. **46**: 565-601.
- Harayama, S. y Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. J. Biol. Chem. **264**: 15328-15333.

- Hareland, W.A., Crawford, R.L., Chapman, P.J. y Dagley, S. (1975). Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. J. Bacteriol. **121**: 272-285.
- Harayama, S. y Timmis, K.N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. En "Metal ions in biological systems". pp. 99-155. (Sigel, H. y Sigel, A., Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York.
- Harpel, M.R. y Lipscomb, J.D. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. J. Biol. Chem. **265**: 6301-6311.
- Harnett, G.B., Averhoff, B. y Ornston, L.N. (1990). Selection of *Acinetobacter calcoaceticus* mutants deficient in the p-hydroxybenzoate hydroxylase gen (pobA), a member of a supraoperonic cluster. J. Bacteriol. **172**: 6160-6161.
- Harwood, C.S. y Gibson, J. (1986). Uptake of benzoate by *Rhodopseudomonas palustris* grown anaerobically in light. J. Bacteriol. **165**: 504-509.
- Harwood, C.S., Rivelli, M. y Ornston, N.L. (1984). Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **160**: 622-628.
- Hegeman, G.D. (1966). Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **91**: 1155-1160.
- Hegeman, G.D. (1967). The metabolism of p-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and its regulation. Archiv. Mikrobiol. **59**: 143-148.
- Heppel, L.A. (1969). The effect of osmotic shock on release of bacterial proteins and an active transport. J. Gen. Physiol. **54**: 95-109.
- Hesp, B., Clavin, M. y Hosokawa, K. (1969). Studies on p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem. **214**: 5644-5655.
- Higgins, S. J. y Mandelstam, J. (1972). Evidence for induced synthesis of an active transport factor for mandelate in *Pseudomonas putida*. Biochem. J. **126**: 917-922.

- Hofsteenge, J., Vereijken, J.M., Weijer, W.J., Beintema, J.J., Wierenga, R.K. y Drenth, J. (1980). Primary and tertiary structure studies of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. Eur. J. Biochem. **113**: 141-150.
- Hofsteenge, J., Weijer, W.J., Jekel, P.A. y Beintema, J.J. (1983). p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. 1. Completion of the elucidation of the primary structure. Eur. J. Biochem. **133**: 91-108.
- Hopper, D.J., Bossert, I.D., and Rhodes- Roberts, M.E. (1991). p-cresol methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anerobic degradation of p-cresol. J. Bacteriol. **173**: 1298-1301.
- Hosokawa, K. y Stanier, R.Y. (1966). Cristallization and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem. **241**: 2453-2460.
- Howell, L.G., Spector, T. y Massey, V. (1972). Purification and properties of p-hydroxybenzoate from *Pseudomonas fluorescens*. J. Biol. Chem. **247**: 4340-4350.
- Hughes, E.J., Shapiro, M.K., Houghton, J.E. y Ornston, L.N. (1988). J. Gen. Microbiol. **134**: 2877-2887.
- Husain, M. y Massey, V. (1979). Kinetic studies on the reaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase. J. Biol. Chem. **254**: 6657-6666.
- Jones, D.C.N. y Cooper, R.A. (1990). Catabolism of 3-hydroxybenzoate by the gentisate pathway in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. Arch. Microbiol. **154**: 489-495.
- Joshi, A., Ahmed, S. y Ames, G.F.-L. (1989). J. Biol. Chem. **264**: 2126-2138.
- Kabisch, M. y Fortnagel, P. (1990). Nucleotide sequence of metapyrocatechase I (catechol 2,3-oxygenase I) gene mpcl from *Alcaligenes eutrophus* JMP222. Nucleic Acids Res. **18**: 3405-3406.
- Kohler, T., Harayama, S., Ramos, J.L. y Timmis, K.N. (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN δ factor in regulation of various metabolic functions. Bacteriol. **171**: 4326-4333.
- Kohler, H.-P. E., van der Maarel, M.J.E.C. y Kohler-Staub, D. (1993). Selection of *Pseudomonas* sp. HBP1 for metabolism of 2-propylphenol and elucidation of degradative pathway. Appl. Environm. Microbiol. **59**: 860-866.

- Kihara, M., and Macnab, R.M. (1981). Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria. *J. Bacteriol.* **145**: 1209-1221.
- Knittel, M.D., Seidler, R. J., Eby, C. y Cabe, L.M. (1977). Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolated of pathogenic origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 557-563.
- Kurkela, S., Lehvaslaiho, H., Palva, E.T. y Teeri, T.H. (1988). *Gene* **73**: 355-362.
- van der Laan, J.M., Swarte, M.B.A., Groendijk, Hol, W.G.J. y Drenth, J. (1989). The influence of purification and protein heterogeneity on the crystallization of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **179**: 715-724.
- Lack, L. (1959). The enzymic oxidation of gentisic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **34**: 117-123.
- Leisenger, T. (1983). *Experientia* **39**: 1183-1191.
- Leisenger, T. y Brunner, W. (1988). Poorly degradable substances. En *Biotechnology* vol.8. pp. 477-530.
- Londry, K.L., and Fedorak, P.M. (1992). Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1-11.
- de Lorenzo, V. (1992). Genetic engineering strategies for environmental applications. *Curr. Op. Biotechnol.* **3**: 227-231.
- Madrid, F.J., Enguita, F.J., De la Rubia, T., Martínez, J. (1992). Degradación de compuestos fenólicos característicos del alpechín por *Phanerochaete flavido alba*. IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano-Luso de Biotecnología. p. 192.
- Marshall, T. y Williams, K. M. (1986). Phenol enhancement of the Coomassie Blue protein dye binding assay. *Biotechniques* **4**: 308-310.
- Marks, T.S., Wait, R., Smith, A.R.W. y Quirk, A.V. (1984). The origin of the oxygen incorporated during the dehalogenation/hydroxylation of 4-chlorobenzoate by *Arthrobacter* sp. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **124**: 669-674.
- Martín, M., Gibello, A., Fernández, J., Ferrer, E., y Garrido-Pertierra, A. (1991). Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 621-628.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1975). Flavins and pteridine monooxygenases. En "The enzymes". Vol 12. pp. 191-228.

- Meagher, R.B., McCorkie, G.M., Ornston, M.K., and Ornston, L.N. (1972). Inducible uptake system for β -carboxy-cis-cis-muconate in a permeability mutant of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **111**: 465-473.
- van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S. y Zehnder, A.J.B. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. **56**: 677-694.
- Melchior, W.B. y Fahrney, D. (1970). Biochemistry **9**: 251-258.
- Merkel, S.M., Eberhard, A.E., Gibson, J. y Harwood, C.S. (1989). Involvement of coenzyme A thioester in anaerobic metabolism of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris*. J. Bacteriol. **171**: 1-7.
- Mesibov, R. y Alder, J. (1972). Chemotaxis toward amino acids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **112**: 315-326.
- Michalover, J.L. y Ribbons, D.W. (1973). 3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase from *Pseudomonas testosteroni*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **55**: 888-896.
- Miller, J.H. (1972). Experimentes in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, N.Y. pp 121-125.
- Moulton, R.C. y Montie, T.C. (1979). Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **137**: 274-280.
- Muller, R., Oltmanns, R.H. y Lingens, F. (1988). Enzymatic dehalogenation of 4-chlorobenzoate by extracts from *Arthrobacter* sp. SU DSM 20407 Biol. Chem. Hoppe-Seyler **369**: 567-571.
- Nakai, C., Kagamiyama, H., Nozaki, M., Nakazawa, T. e Inouye, S. (1983). Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Biol. Chem. **258**: 2923-2928.
- Nakamura, S., Ogura, Y., Yano, K., Higashi, N. y Arima, K. (1970). Kinetic studies on the reaction mechanism of p-hydroxybenzoate hydroxylase. Biochemistry **9**: 3235-3242.
- Nakazawa, T. y Yokota, T. (1973). Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol. **115**: 262-267.

- Neidle, E.L. y Ornston, L.N. (1986). Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase structural gene *catA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 815-820.
- Neidle, E.L., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., y Rekik, M. (1991). Nucleotide sequences of *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *J. Bacteriol.* **173**: 5385-5395.
- Neujahr, H.Y. y Gaal, A. (1973). Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* **35**: 385-400.
- Nielsen, B.I. y Brown, L.R. (1984). The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **141**: 311-315.
- Noda, Y., Nishikawa, S., Shiozuka, K., Kadokura, H., Nakajima, H., Yoda, K., Katayama, Y., Morohoshi, N., Haraguchi, T. y Yamasaki, M. (1990). Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **172**: 2704-2709.
- Nordlund, I., Powlowski, J. y Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6826-6833.
- Nurk, A., Kasak, L., and Kivisaar, M. (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* **102**: 13-18.
- Ornston, N.L., y Parke, D. (1976 a). Properties of an inducible uptake system for β -keto adipate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **125**: 475-488.
- Ornston, N.L., y Parke, D. (1976 b). The evolution of induction mechanisms in bacteria: insights derived from the study of the β -keto adipate pathway. pp. 209-262.
- Ornston, N.L. y Stanier, R.Y. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. I. Biochemistry. *J. Biol. Chem.* **241**: 3776-3786.
- Patel, J.C. y Grant, J.W. (1969). The formation of phenol in the degradation of p-hydroxybenzoic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*). *Antonie van Leeuwenhoek* **35**: 53-65.

- Perkins, E.J., Gordon, M.P., Caceres, O. y Lurquin, P.F. (1990). Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and diclorocatechol oxydative operons of plasmid pJP4. *J. Bacterio.* **172**: 2351-2359.
- Pittard, A.J. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Neidhant, E.C., ed.), Vol. 1, pp. 369-394, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pometto III, A.L. y Crawford, D.L. (1985). L-Phenylalanine and L-tyrosine catabolism by selected *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 442-228.
- Premkumar, R., Subba Rao, P. V., Sreeleela, N. S. y Vaidyanathan, C.S. (1969). *Canad. J. Biochem.* **47**: 825-827.
- Rajasekharan, S., Rajasekharan, R. y Vaidyanthan, C.S. (1990). Substrate mediated purification and charaterization of a 3-hydroxybenzoate-6-hydroxylase from *Micrococcus* sp. *Arch. Biochim. Biophys.* **278**: 21-25.
- Raju, S.G., Kamath, A.V. y Vaidyanatha, C.S. (1988). Purification and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 3-hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 537-543.
- Segel, I.H. (1969). En "Biochemical calculations". pp. 333-334. (Ed. Wiley, J. y Sons), Inc., New York.
- Ribbons, D.W. (1970). Stoichiometry of O-demethylase activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **8**: 101-104.
- Sahasrabudhe, A., Pande, A. y Modi, V. (1991). Dehalogenation of *Pseudomonas* sp. US1 Ex. cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 830-832.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. (Ed. Nolan, C.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheuder, H.A., Hol, W.G.J. y Drenth, J. (1988). Molecular modeling reveals the possible importance of a carbonyl oxygen binding pocket for the catalytic mechanism of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **263**: 3131-3136.

- Schreuder, H.A., Hol, W.G.J., y Drenth, J. (1990). Analysis of the active site of the flavoprotein p-hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism. *Biochemistry*, **29**: 3101-3108.
- Sharak-Genthner, B.R., Towndend, G.T. y Chapman, P.J. (1991). Para-hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 265-270.
- Shoun, H., Higashi, N., Beppu, T. y Arima, K. (1974). Studies on pH dependence of p-hydroxybenzoate hydroxylase-catalyzed reactions: functional groups involved in the reactions. *FEBS Lett.* **49**: 13-17.
- Shoun, H., Higashi, N., Beppu, T., Nakamura, S., hiromi, K. y Arima, K. (1979). Studies on the interaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase with NADPH. *J. Biol. Chem.* **254**: 10944-10951.
- Shoun, H., Beppu, T., y Arima, K. (1980). An essential arginine residue at substrate-binding site of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **255**: 9319-9324.
- Shoun, H. y Beppu, T. (1982). A histidine residue in p-hydroxybenzoate hydroxylase essential for binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* **257**: 3422-3428.
- Smith, M.R., Ratledge, C. y Crook, S. (1990). Properties of cyanogen bromide activated, agarose immobilized catechol 1,2-dioxigenase from freeze-dried extracts of *Nocardia* sp. NCIB-10503. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**: 945-949.
- Southern, E.M. (1975). *J. Mol. Biol.* **90**: 503-511.
- Spain ,J.C. y Gibson, D.T. (1988). Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1399-1404 .
- Spector, T. y Massey, V. (1972). Studies on the effector specificity of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **247**: 4679- 4687.
- Stanier, R.Y. y Ornston, L.N. (1973) The β -keto adipate pathway. En : *Adv. Microbial Physiol.* pp. 89-151 (Rose, A.H. y Tempest, D.W., Eds.), Vol 9, Academic Press, London.
- Strickland, S. y Massey, V. (1973). *J. Biochem.* **248**: 2944-2952

- Suárez, M., Gibello, A., Allende, J.L., Martín, M., Ferrer, E. y Garrido-Pertierra, A. (1991). Degradation of 3- and 4-hydroxybenzoate by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 677-682.
- Thayer, J.R. y Wheelis, M.L. (1976). Characterization of a benzoate permease mutant in *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.* **110**: 37-42.
- Thayer, J.R. y Wheelis, M.L. (1982). Active transport of benzoate in *Pseudomonas putida*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1749-1753.
- Thiele, J., Muller, R. y Lingens, F. (1987). Initial characterisation of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas sp.* CBS3. *FEMS Microbiol. Letters.* **41**: 115-119.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R. y Goksoyr, J. (1990). Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**: 776-781.
- Tschech, A. y Fuchs, G. (1989). Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Arch. Microbiol.* **52**: 594-599.
- van den Tweel, W.J.J., ter Burg, N., Kok, J.B. y de Bont, J.A.M. (1986). Bioformation of 4-hydroxybenzoate from 4-chlorobenzoate by *Alcaligenes denitrificans* NTB-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 289-294.
- van den Tweel, W.J.J., Smit, J.P. y de Bont, J.A.M. (1988). Catabolism of DL-1-phenylhydracrylic, phenylacetic and 3- and 4-hydroxyphenilacetic acid via homogentisic acid in *Flavobacterium sp.* *Arch. Microbiol.* **149**: 207-213.
- Verburg, J.G., Smith, C.E., Lidek, C.A. y Khai Huynh, Q. (1992). Identification of an essential tyrosine residue in the catalytic site of chinitase isolated from *Zea mays* that is selectively modified during inactivation with 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide. *J. Biol. Chem.* **267**: 3886-3893.
- Vidal, G. , Ramos, M.B., Soto, M. y Lema, J.M. (1992). Caracterización, toxicidad y biodegradabilidad de efluentes de la industria de pasta de papel. IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano-Luso de Biotecnología. p.187.
- Visser, C.M. (1983). Reaction mechanism of flavin-dependent hydroxylation. Evolution of a non-imitable enzyme. *Eur. J. Biochem.* **135**: 543-548.

- Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T. e Ikemura, T. (1992). Codon usage tabulated from the genbank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2111-21118.
- Wang, L.H., Hamzah, R.Y., Yu, Y. y Tu, S.C. (1987). *Pseudomonas cepacia* 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase : Induction, purification and characterization. *Biochemistry*, **26**: 1099-1104.
- Weijer, W.J., Hofsteenge, J., Beintema, J.J., Wierenga, R.K., y Drenth, J. (1983). p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. 2. Fitting of the amino-acid sequence to the tertiary structure. *Eur. J. Biochem.* **133**: 109-183.
- Wheelis, M.L., Palleroni, N.J. y Stanier, R.Y. (1967). The metabolism of aromatic acids by *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. *Arch. Mikrobiol.* **59**: 302-314.
- Whipp, M.J. (1980). *J. Bacteriol.* **143**: 1-7.
- White-Stevens, R.H. y Kamin, H. (1972). Studies of a flavoprotein, salicylate hydrogenase. I. Preparation, properties and the uncoupling of oxygen reduction from hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **247**: 2358-2370.
- Wierenga, R.K., Kalk, K.H., van der Laan, J.M., Drenth, J., Hofsteenge, J., Weijer, W.J., Jekel, P.A., Beintema, J.J., Muller, F. y van Berkel, W.J.H. (1982). "Flavins and flavoproteins" (Massey, V. y Willians, C.H. Ed.), pp. 11-18. Elsevier North Holland, Inc.3.
- Wijnands, R.A., Weijer, W.J., Muller, F., Jekel, P.A., van Berkel, W.J.H., y Beintema, J.J. (1986). Chemical modification of tyrosine residues in p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*: assignment in sequence and catalytic involvement. *Biochemistry* **25**: 4211-4218.
- Wijnands, R.A., Muller, F., y Visser, A.J.W.G. (1987). Chemical modification of arginine residues in p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*: a kinetic fluorescence study. *Eur. J. Biochem.* **163**: 535-544.
- Wilson, M. (1975). Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods in enzymology*. Vol 12. pp. 431-442.
- Wright, J.D. y Ratledge, C. (1991). Isolation of two *Rhodotorula rubra* strains showing differences in the degradation of aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 94-99.

- Yano, K., Higashi, N. y Arima, K. (1969). p-hydroxybenzoate hydroxylase: conformational changes in crystals of holoenzyme VS holoenzyme-substrate complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**: 1-7
- You, I.S., Ghosal, D. y Gunsalus, I.C. (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (nahG) and its 3'-flanking region. *Biochemistry*, **30**:1635-1641.
- You, I.S., Murray, R.I., Jollie, D. y Gunsalus, I.C. (1990). Purification and characterization of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* PpG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**: 1049-1054.
- Zeyer, J. y Kocher, H.P. (1988). Purification and characterization of a bacterial nitrophenol oxygenase which converts ortho-nitrophenol to catechol and nitrite. *J. Bacteriol.* **170**: 1789-1794.
- Zylstra, G.J. y Gibson, D.T. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 14940-14946