

## A FONDO

### Bioplásticos de origen bacteriano: los poli-hidroxi-alcanoatos

José María Luengo<sup>1</sup>

1. Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular, Área de Bioquímica y Biología Molecular. Facultades de Veterinaria y de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

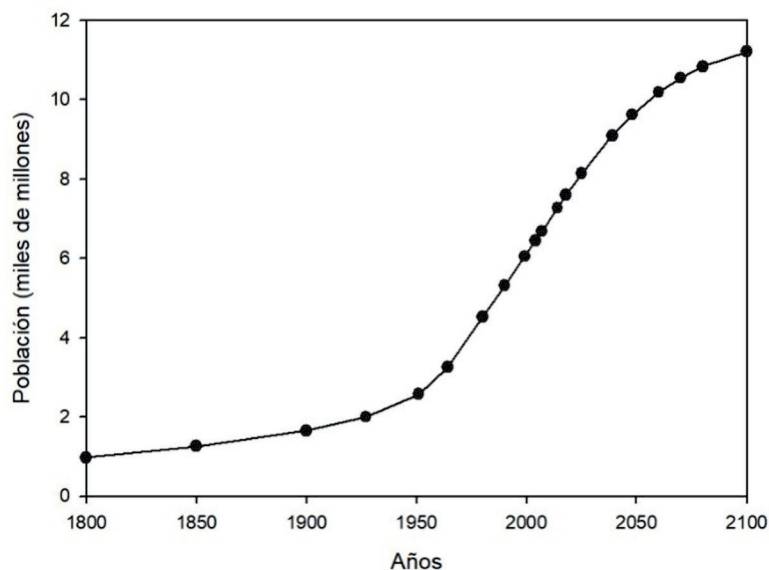
En esta revisión se analizan diferentes aspectos relacionados con unos biomateriales muy interesantes, denominados genéricamente poli-hidroxi-alcanoatos o, de forma abreviada, PHAs. Estos compuestos son poliésteres de origen bacteriano que poseen propiedades y características muy similares a los plásticos de origen petroquímico, razón por la que nos referiremos a ellos como bioplásticos. A lo largo del artículo, se describe su estructura química, sus propiedades, las rutas responsables de su biosíntesis y de su degradación, así como sus múltiples aplicaciones clínicas, farmacológicas, medioambientales y, en suma, biotecnológicas.

**Palabras clave:** Polihidroxi-alcanoatos, PHAs, bioplásticos, biomateriales, poliésteres, *Pseudomonas putida*.

#### Introducción

Los estudios más recientes acerca de la evolución de la especie humana en nuestro planeta han revelado que en los últimos cien años (periodo comprendido entre 1918-2018) la población mundial se ha cuadruplicado (**Fig. 1**). De continuar a este ritmo, en el año 2040 se alcanzarán los 9200 millones y en el 2100 la Tierra estará habitada por 11200 millones de seres humanos. Como consecuencia, los recursos naturales destinados a asegurar la supervivencia comenzarán a escasear, por lo que nuestra especie entrará, tal y como predice la **Fig. 1**, en fase estacionaria de crecimiento. La búsqueda de nuevos recursos provocará una industrialización creciente de nuestra sociedad lo que, de no ponerse límites, conducirá, sin ninguna duda, a una explotación feroz de diferentes ecosistemas, a la contaminación masiva de grandes extensiones de nuestro planeta (quizás potenciando el efecto invernadero) y, en conjunto, a una modificación irreversible de la Biosfera.

Forma de mencionar este artículo: Luengo, J.M. 2018, Bioplásticos de origen bacteriano: los poli-hidroxi-alcanoatos. AmbioCiencias, 16, 5-24. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.



**Figura 1.** Evolución de la población humana durante los tres últimos siglos (World Population Prospects: The 2017 Revision, United Nations).

Una de las manifestaciones más evidentes del efecto negativo que está causando la superpoblación es la acumulación, en determinados hábitats, de compuestos no naturales a los que denominamos xenobióticos. A pesar de que muchos de esos productos pueden ser degradados en tiempos relativamente cortos, otros, denominados recalcitrantes, que poseen unas estructuras moleculares muy estables, suelen requerir decenas de años para ser completamente eliminados. Entre estos últimos cabe destacar, por su abundancia, los plásticos derivados del petróleo, también denominados plásticos convencionales o plásticos de origen petroquímico.

Desafortunadamente, el uso de plásticos es tan común, que muchas actividades humanas, incluso las más rutinarias, no podrían realizarse sin estos materiales. Debido a ello, tenemos una dependencia absoluta de materiales que derivan de un recurso finito (el petróleo) y, además, su uso masivo provoca la acumulación de residuos que no sólo ha afectado grandes áreas del planeta (más de 1.400.000 km<sup>2</sup> en la zona del océano Índico) (Olivera *et al.*, 2010; Villarrubia-Gómez *et al.*, 2018), sino que también han alcanzado el espacio exterior, dando origen a lo que se denomina "basura cósmica" (Fig. 2).

Para poner remedio a este acuciante problema medioambiental, los gobiernos de diferentes países se han visto impelidos a potenciar el desarrollo de proyectos de investigación enfocados a la búsqueda de nuevos materiales que, manteniendo las características de los plásticos de origen petroquímicos, puedan ser eliminados o reciclados con relativa facilidad.



**Figura 2.** Acumulación de residuos en el océano Índico (parte izquierda de la imagen) y en el espacio exterior (derecha). Imágenes tomadas de Internet (Walia, A. 2014. New Study Finds 88 Percent of Earth's Ocean Surface Now Polluted With Plastic Trash; Moreno-Álvarez, H., Poliakova, M y Gómez-Roa, A. 2016. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 19 No. 81).

### Plásticos convencionales

La palabra plástico deriva del griego *πλαστικός* y se utiliza para referirse a aquellos materiales o compuestos que, a diferencia de los cuerpos elásticos, al ser comprimidos pueden cambiar de forma, conservándola luego de modo permanente (Gilbert, 2017).

Aunque parezca paradójico, los materiales plásticos surgieron en 1860 como consecuencia de las limitaciones impuestas a una actividad lúdica. Debido a la escasez de marfil, un material fundamental para la elaboración de bolas de billar, la empresa más importante de ese sector (Phelan & Collander, Nueva York, EEUU) convocó un concurso con el fin de conseguir un sustituto aceptable del mismo. John Wesley Hyatt (**Fig. 3**) presentó un proyecto en el que se detallaba la síntesis de un compuesto (denominado celuloide) constituido por nitrato de celulosa y que fue utilizado para la fabricación de diferentes objetos.

Sin embargo, a fuer de ser escrupulosamente rigurosos, el primer plástico sintético moderno fue la *parkesina*, ideada y patentada por el británico Alexander Parkes a mediados del siglo XIX (Parkes, 1866). Aunque este polímero parecía a priori muy prometedor, no tuvo éxito y la empresa creada por Parkes cerró al cabo de dos años.

Unos años más tarde (1909) Leo Hendrik Baekeland, sintetizó la *baquelita* a partir de fenol y formaldehído. Este producto constituyó el primer plástico totalmente sintético de la historia (Baekeland, 1910).

En la década de los años 30, Eric William Fawcett y Reginald Oswald Gibson describieron que el etileno polimerizaba bajo la acción del calor y la presión formando un termoplástico al que llamaron *polietileno* (PE). Al

reemplazar en el etileno un átomo de hidrógeno por uno de cloro, Lonsbury Semon (**Fig. 3**) produjo el *cloruro de polivinilo* (PVC), un plástico duro y muy resistente al fuego. De forma análoga se obtuvo el poli-tetra-fluoro-etileno (PTFE), conocido popularmente como *teflón*; el *poliestireno*; su derivado el *poliestireno expandido* (o EPS), y el *nailon*, la primera fibra artificial sintetizada (Wallace Hume Carothers, Dupont Co. Delaware, EEUU) (Gilbert, 2017).

En la década de los 50 Karl Ziegler, en el instituto Max Planck, y el químico italiano Giulio Natta, del Instituto Politécnico de Milán, describieron unos catalizadores (*catalizadores de Ziegler-Natta*) que permitían conseguir un exhaustivo control tanto de las estructuras como de la longitud y de las propiedades de ciertos polímeros (Gilbert, 2017). Desde esa fecha el número de polímeros plásticos convencionales creció exponencialmente, de forma que prácticamente todo lo que nos rodea está constituido parcial o íntegramente por plásticos de diferente naturaleza.

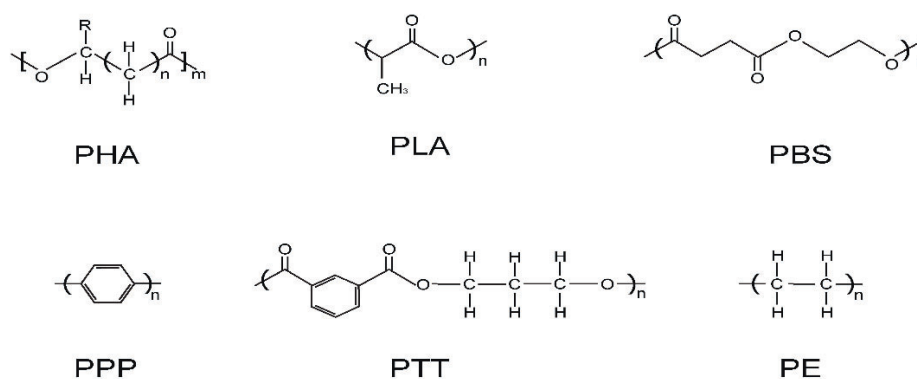


**Figura 3.** Científicos que han realizado aportaciones relevantes relacionadas con el descubrimiento y/o con la síntesis de polímeros plásticos.

### Los bioplásticos

Los bioplásticos son materiales poliméricos con propiedades semejantes a las de los plásticos petroquímicos, pero que, a diferencia de ellos, se obtienen, total o parcialmente, a partir de precursores sintetizados por los seres vivos. Unos derivan de macromoléculas biológicas (almidón, aceite de soja, celulosa, etc.) y, por lo tanto, son biodegradables. Otros, están formados por mezclas de

éstos y de plásticos convencionales, lo que implica que son sólo parcialmente biodegradables y un tercer grupo, los denominados bioplásticos de origen microbiano, son polímeros biodegradables constituidos por unidades sintetizadas íntegramente por bacterias. Dentro de este último grupo se incluyen los poli-hidroxicanoatos (PHAs), el poli-lactato (PLA), el poli-butilén-succinato (PBS), el poli-*para*-fenileno (PPP), el poli-trimetilén-tereftalato (PTT) y el polietileno (PE) (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Estructura química de las diferentes familias de bioplásticos.

En esta revisión nos referiremos exclusivamente a los PHAs, ya que éstos son los únicos bioplásticos polimerizados *in vivo*, biodegradables, y que poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo.

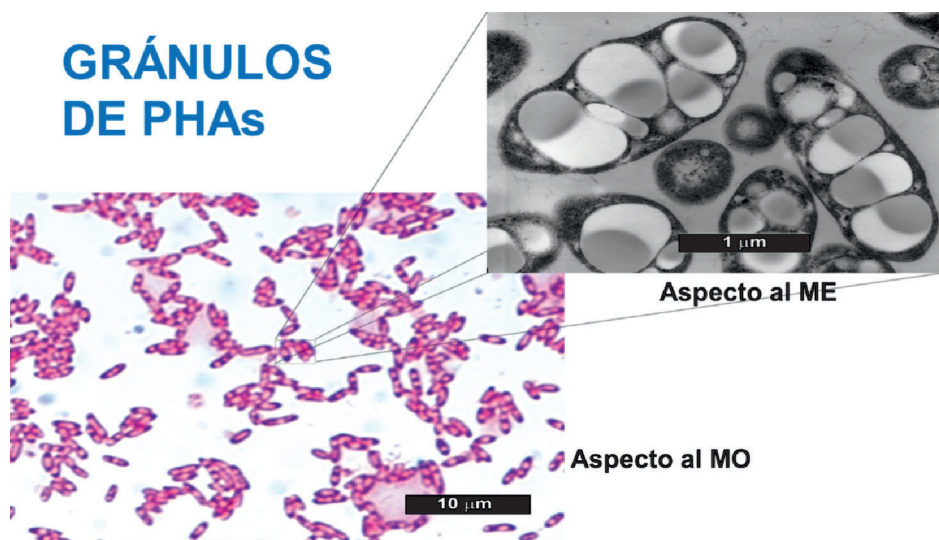
### Descubrimiento de los PHAs

En 1923, el microbiólogo francés Maurice Lemoigne (**Fig. 3**), Director del Laboratorio de Fermentaciones del Instituto Pasteur en Lille (Francia), descubrió el poli-3-hidroxi-butarato (PHB) en cultivos de *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1923). Este compuesto, que poseía actividad óptica, fue considerado, erróneamente, como un material lipídico, motivo por el cual este autor y sus aportaciones científicas permanecieron ignorados hasta que Wilkinson en Edimburgo y el grupo de Doudoroff y Stanier en Berkely redescubrieron los PHBs (Williamson y Wilkinson, 1958; Doudoroff y Stanier, 1959).

El análisis de esos polímeros, a los que la comunidad científica denominó *poli-hidroxicanoatos* (abreviadamente PHAs), reveló que en realidad se trataba de una familia de compuestos constituidos por, al menos, 125 monómeros diferentes (Olivera *et al.*, 2010).

En resumen, los PHAs son poliésteres producidos por un gran número de

bacterias que se acumulan como inclusiones supramoleculares (*carbonosomas*), observables como gránulos refringentes al microscopio óptico y como cuerpos electrolúcidos cuando se utiliza el microscopio electrónico (**Fig. 5**). Estos compuestos constituyen una valiosa reserva energética; protegen al microorganismo ante diferentes situaciones de estrés; participan en la formación de *biofilms*; sirven para mantener el estado redox intracelular y, en algunas bacterias (como *Azospirillum brasilense*) modulan la *quimiotaxis*, esto es, la capacidad para modificar su movilidad en función del gradiente de concentración de ciertos nutrientes (Chen, 2010).



**Figura 5.** Fotografía óptica (izquierda) y electrónica (derecha superior) de *Pseudomonas putida* U cuando esta bacteria se cultiva en medios que contienen precursores de PHAs (Olivera *et al.*, 2010).

### Clasificación de los PHAs

Dada la gran diversidad estructural de los PHAs (se han descrito más de 150 tipos diferentes) la clasificación de estos polímeros no ha sido una tarea sencilla. Nosotros (Luengo *et al.*, 2003) los hemos agrupado atendiendo a los siguientes criterios:

- frecuencia de aparición: *PHAs comunes* y *PHAs inusuales*
- naturaleza química de los monómeros: *alifáticos*, *aromáticos* y *mixtos*
- tamaño de la unidad monomérica:
  - aquellos cuyos monómeros contienen entre 3 y 5 carbonos (denominados *scl-PHAs* o *PHAs de cadena corta*)
  - los que contienen monómeros cuya longitud oscila entre 6 y 12 carbonos (a los que nos referiremos como *mcl-PHAs* o *PHAs de cadena media*), y
  - aquellos otros en los que la longitud de sus monómeros es superior a 12 átomos de carbono (llamados *lcl-PHAs* o *PHAs de cadena larga*).

- origen biosintético: *naturales*, *semisintéticos* y *sintéticos*

Y, finalmente, en función de:

- tipos de monómeros presentes en los PHAs: *homopolímeros* y *heteropolímeros*.

### Propiedades de los PHAs

Todos los PHAs comparten dos características esenciales: (i) son biodegradables, lo que implica que pueden ser eliminados tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, sin dejar ningún tipo de residuo y (ii) son biocompatibles, esto es, esos materiales pueden aplicarse en un ser vivo (hombre u otras especies) sin causar efectos nocivos (Luengo *et al.*, 2003).

Además, los PHAs poseen otra serie de características que les hacen muy interesantes. Son termoplásticos, piezoeléctricos y con elasticidad variable; pueden contener grupos funcionales; su peso molecular oscila entre 20000 y 30 millones de Da; poseen monómeros quirales; son hidrofóbicos e impermeables a los gases y, lo que es muy importante, sus estructuras moleculares pueden ser diseñadas y modificadas, casi a voluntad, mediante ingeniería genética.

### Biosíntesis de PHAs de cadena corta (scl-PHAs)

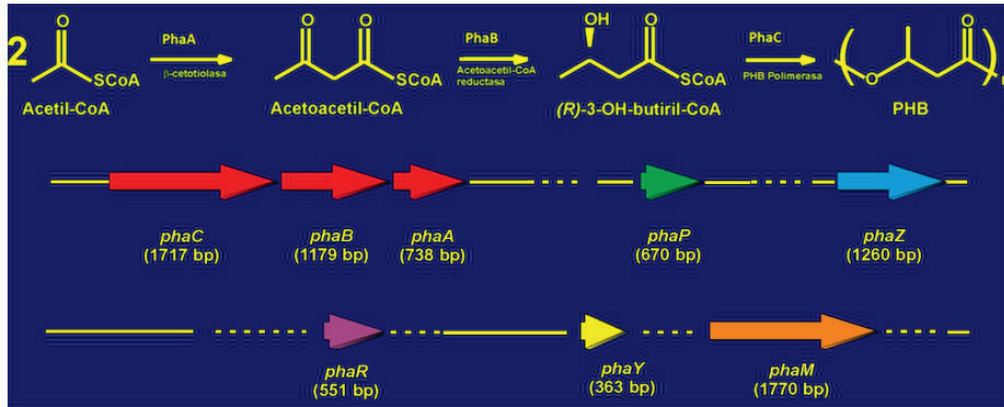
A finales de la década de los 80, se consiguió la clonación de los genes involucrados en la síntesis y movilización de polihidroxibutirato en el microorganismo *Cupriavidus necator*, así como la expresión heteróloga de estos genes en *Escherichia coli* (Slater *et al.*, 1988).

Esos estudios demostraron que para sintetizar el polímero se requerían tres genes (*phaC*, *phaB* y *phaA*), localizados en el *cluster pha* (acrónimo de polihidroxialcanoato). Las tres proteínas codificadas por esos genes catalizaban la síntesis de acetoacetil-CoA desde acetil-CoA (reacción llevada a cabo por PhA); la reducción esteroespecífica de este compuesto a (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA (etapa catalizada por PhB) y, finalmente, la polimerización de este monómero para generar PHB (reacción catalizada por la polimerasa PhaC) (**Fig. 6**).

Además de los genes anteriormente citados, se precisan otros, localizados en regiones genómicas separadas, que codifican proteínas requeridas para la organización y estabilidad del gránulo (PhaP); para la movilización de los monómeros desde el polímero (PhaZ, que es una despolimerasa), y para regular tanto su biosíntesis (PhaR) como la distribución de los gránulos durante la división celular (PhaM).

Recientemente, se han identificado otros genes que codifican otras polimerasas,  $\beta$ -cetotilasas, NADPH-oxidorreductasas y despolimerasas alterna-

tivas, variantes de PhaP (*phaP1-phaP7*), así como otros que codifican hidrolasas de oligómeros (*phaY1, phaY2*) (Kobayashi *et al.*, 2005; Jendrossek y Pfeiffer, 2014).



**Figura 6.** Ruta responsable de la síntesis de PHB y organización de los diferentes genes que codifican las enzimas requeridas para ese proceso y para la movilización de sus monómeros.

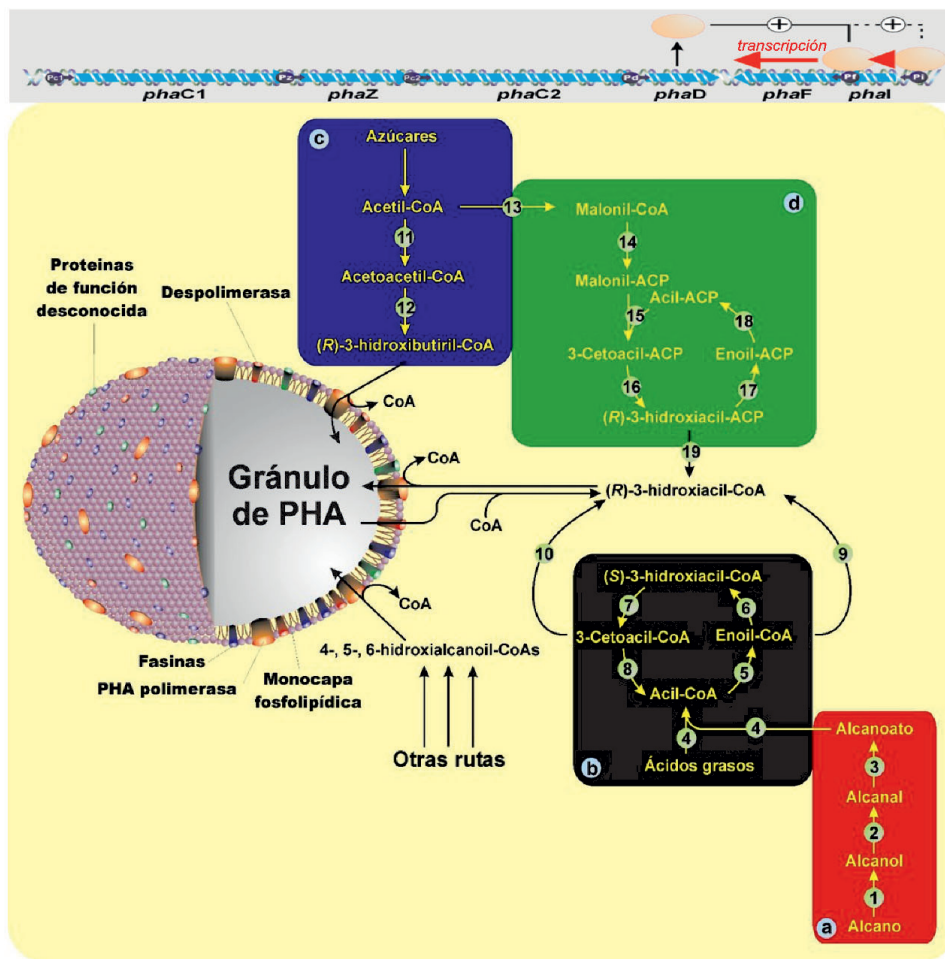
La regulación de la ruta de síntesis de PHB es muy compleja ya que está sometida a señales metabólicas, ambientales y otras puramente genéticas. Así, un exceso de acetyl-CoA reduce la síntesis de estos polímeros, mientras que todas las condiciones metabólicas o ambientales que causan una reducción del contenido de acetyl-CoA desencadenan o restauran la síntesis de PHB. Por otra parte, PhaC y PhaZ se sintetizan como proteínas inactivas, por lo que requieren polipéptidos distintos (PhaM en el caso de PhaC y uno desconocido en el caso de PhaZ) para ser convertidas en enzimas plenamente funcionales. Adicionalmente, se ha comprobado que la síntesis de PhaP es un proceso dependiente de PHB que requiere la participación del represor PhaR. En suma, la síntesis y organización de los gránulos de PHB es un proceso complejo que requiere la participación de numerosas proteínas, algunas de las cuales, o son desconocidas, o han sido caracterizadas sólo parcialmente.

### Biosíntesis de PHAs de cadena media (mcl-PHAs)

A diferencia de los anteriores, los PHAs de cadena media, o mcl-PHAs, están constituidos por monómeros alifáticos (usualmente ácidos 3-OH-alcanoicos) en los que la longitud de la cadena carbonada está comprendida entre 6 y 12 átomos de carbono.

Su biosíntesis requiere la participación de cinco proteínas diferentes (PhaC1, PhaC2, PhaD, PhaF y PhaI), codificadas por otros tantos genes que pertenecen al *locus pha* (Fig.7).





**Figura 7.** Organización de los genes que codifican las enzimas requeridas para la biosíntesis, acumulación intracelular de mcl-PHAs y movilización de los monómeros. En la parte inferior se representa la estructura de un gránulo de PHA indicando la localización de algunas de las proteínas más importantes y las diferentes rutas (a, b, c y d) implicadas en la síntesis y en la degradación de las unidades monoméricas. 1, Alcano 1-monooxigenasa; 2, alcohol deshidrogenasa; 3, aldehído deshidrogenasa; 4, acil-CoA ligasa; 5, acil-CoA deshidrogenasa; 6, enoil-CoA hidratasa; 7, 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa; 8, 3-cetotiolasa; 9, (R)-enoil-CoA hidratasa; 10, 3-cetoacil-CoA reductasa; 11, b-cetotiolasa; 12, acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH. 13, acetil-CoA carboxilasa; 14, ACP-maloniltransferasa; 15, 3-cetoacil-ACP-sintetasa; 16, 3-cetoacil-ACP-reductasa; 17, 3-OH-acil-ACP reductasa y 18, enoil-ACP reductasa (Luengo *et al.*, 2003).

El análisis funcional de esas cinco proteínas reveló que PhaC1 y PhaC2, actúan como polimerasas. Usualmente se encuentran formando complejos inactivos (dímeros) que requieren la presencia de acil-CoA derivados para convertirse en enzimas funcionales (Obeso *et al.*, 2015). Ambas reconocen monómeros alifáticos y aromáticos y, aunque estructuralmente muy similares, poseen distinta

especificidad de substrato (Arias *et al.*, 2008).

Otras dos proteínas, PhaF y PhaI, participan en la organización de los gránulos de PHA en el interior de la bacteria. Ambas poseen una gran homología con oleosinas (unas proteínas relacionadas con la acumulación de lípidos en vegetales) y, por esta razón, de la combinación de *pha* (de polihidroxicanoatos) más la terminación *sinas* de oleosinas, se las ha denominado genéricamente fasinas (García *et al.*, 1999; Sandoval *et al.*, 2007).

El análisis estructural de una de estas fasinas, la denominada PhaF, ha revelado que es una proteína en la que existen dos dominios perfectamente definidos (Maestro *et al.*, 2013). Uno, el correspondiente al extremo amino terminal (denominado péptido BioF), posee homología con oleosinas y es el responsable de la unión de esta proteína a las cadenas nacientes o al gránulo de PHAs. El otro dominio, localizado en el extremo carboxilo terminal, está relacionado con una secuencia consenso presente en las histonas del tipo H<sub>1</sub>. En suma, PhaF es una proteína bifuncional que se une a gránulos de PHA y también a DNA. Esta particularidad tiene una gran importancia biotecnológica tal y como describiremos más adelante.

Adicionalmente, entre los genes *phaC1* y *phaC2* (Fig. 7) se encuentra otro gen, *phaZ*, que codifica una despolimerasa requerida para la liberación de los monómeros desde el polímero (de Eugenio *et al.*, 2007). Finalmente, PhaD es una proteína que controla la expresión de las fasinas PhaF y PhaI (de Eugenio *et al.*, 2010).

La regulación del metabolismo de los PHA es harto compleja, puesto que tiene lugar tanto a nivel enzimático (mediada por inhibición de cofactores y disponibilidad de metabolitos) como a nivel transcripcional (lo que requiere la participación de reguladores específicos -PhaD, PhaF- y de reguladores globales -RpoN, RpoS y Crc-).

### Acumulación intracelular de PHAs

Aunque todavía no ha sido esclarecido con precisión el proceso que conduce a la acumulación intracelular de PHAs, para explicarlo se han propuesto tres modelos diferentes: el *micelar*; el de formación de brote o yema y el de andamio o *scaffold* (Jendrosseck y Pfeiffer, 2014).

La hipótesis que propone el *modelo micelar*, sugiere que los gránulos de PHAs se generan como consecuencia de un proceso de autoensamblaje de las cadenas poliméricas nacientes, originando inclusiones citoplásmicas insolubles rodeadas por una unidad de membrana.

La segunda hipótesis (la de *brote* o *yema*) preconiza que las polimerasas

se unirían a la membrana citoplasmática (donde se incorporarían también las fasinas) y allí comenzarían a sintetizarse las cadenas nacientes de PHAs. Los oligómeros, unidos a la membrana, se agregarían en el espacio intermembranal, formando, al crecer, una especie de yema que, una vez alcanzado el tamaño crítico, se liberaría al citoplasma como una entidad independiente o gránulo.

El tercer modelo, el de andamio o *scaffold*, propuesto exclusivamente para explicar la síntesis de PHBs, asume que la polimerasa (PhaC) se encuentra unida al cromosoma bacteriano por medio de la proteína PhaM, quien actuaría como esqueleto o andamio durante la síntesis del polímero.

A pesar de que todas estas hipótesis cuentan con defensores y detractores, ésta última (*modelo de andamio*) parece ser la más aceptada.

### **Movilización y degradación de los gránulos de PHAs**

Cuando la concentración de los nutrientes presentes en el medio disminuye, los PHAs acumulados intracelularmente comienzan a ser movilizados. La proteína responsable de la liberación de los monómeros es la despolimerasa PhaZ, una esterasa que hidroliza todos aquellos PHAs cuyos constituyentes están unidos mediante enlaces oxoésteres (de Eugenio *et al.*, 2007). Una vez liberados, los (R)-3-OH-acil (o aril)-CoA generados, son degradados a través de la ruta de beta-oxidación de los ácidos grasos (Olivera *et al.*, 2001). Por lo tanto, la acumulación de PHAs en las bacterias se debe, a la existencia de un notable desequilibrio entre la velocidad de síntesis y la de su movilización (**Fig. 7**).

Como ya hemos advertido, una de las ventajas de los PHAs frente a los plásticos convencionales es que son *biodegradables*, es decir, los sistemas vivos, o partes de ellos, pueden eliminar estos compuestos del medio ambiente. La degradación extracelular de PHAs se lleva a cabo por despolimerasas extracelulares, que también son esterasas; pero diferentes de PhaZ. La enzima prototipo es la despolimerasa de *Pseudomonas fluorescens*, una proteína que hidroliza PHAs de cadena media (Chen, 2010).

### **Factores que afectan la producción de PHAs**

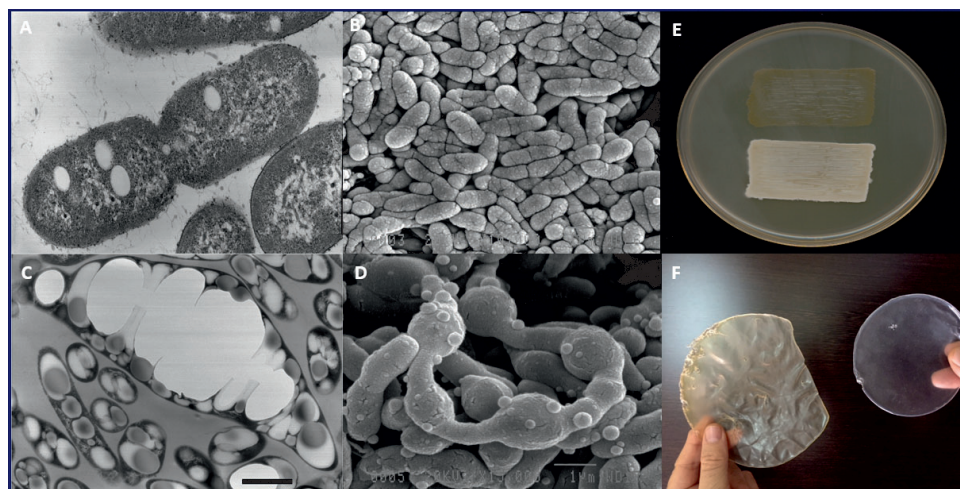
Uno de los mayores problemas que atañen a la producción de bioplásticos y, en particular a la de los PHAs, son los bajos rendimientos de producción. Unas veces, esta limitación se debe a la escasa capacidad biosintética del microorganismo productor y otras a sus estrictos requerimientos nutricionales. Por esta razón, las estrategias científicas diseñadas para mejorar la producción industrial de PHAs han pretendido conseguir cepas con mayor capacidad biosintética; pero que, a la vez, sean capaces de utilizar como nutrientes las materias primas (o los

subproductos) generados en el país o en la zona del mundo donde se van a producir esos polímeros. Por estas razones, las aproximaciones científicas diseñadas para abordar la producción industrial de PHAs, han tenido como objetivos prioritarios: (1) la selección de la mejor cepa productora; (2) aquella que sintetice el polímero o copolímero más valioso; (3) la que utilice como nutrientes las materias primas más baratas; (4) la que para cultivarse requiera condiciones poco exigentes (incluso ausencia de esterilidad); (5) aquella que requiera los procesos de fermentación, purificación y extracción menos costosos y, finalmente, (6), la que sea más fácil de manipular genéticamente.

De todas las aproximaciones experimentales, la herramienta molecular más útil para conseguir tales propósitos ha sido, sin ninguna duda, la ingeniería genética. Mediante diferentes abordajes se ha conseguido incrementar el número de copias de los genes biosintéticos; se han alterado los mecanismos responsables de su regulación; se han eliminado los cuellos de botella metabólicos y/o se han suprimido las rutas catabólicas que desviaban el flujo de monómeros, o que secuestraban precursores monoméricos (Olivera *et al.*, 2001). Adicionalmente, la ingeniería de proteínas ha permitido diseñar polimerasas que reconocen monómeros inusuales, y la ingeniería metabólica ha facilitado la biosíntesis de PHAs a partir de materias primas mucho más baratas.

Hoy día, disponemos ya de bacterias manipuladas genéticamente que acumulan grandes cantidades de PHAs (más del 75% del peso seco de las bacterias), constituidos por monómeros que poseen estructuras químicas muy diversas, y con características y aplicaciones biotecnológicas muy interesantes (**Fig. 8**).

Una alternativa al uso de bacterias recombinantes ha sido la utilización de ciertos eucariotas (levaduras y plantas) como biofactorías de PHAs. Así, se han empleado cepas de levaduras recombinantes pertenecientes a las especies *Sacharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*, que expresaban en peroxisomas algunos los genes requeridos para sintetizar polihidroxibutirato en la bacteria *Cupriavidus necator*. Desafortunadamente, la cantidad de polímero acumulado nunca superó el 7% respecto al peso seco; rendimiento que era unas 10 veces inferior al que se obtenía con bacterias manipuladas genéticamente (Bogdawa *et al.*, 2005). Por esta razón, esta línea de investigación fue abandonada y se abordó otro proyecto que tenía como finalidad expresar esos mismos genes en plantas. El mayor tamaño de las células vegetales; su contrastada capacidad para acumular inclusiones lipídicas y lo poco costoso que resultaba su cultivo en grandes extensiones, hicieron concebir grandes esperanzas en este tipo de estudios.



**Figura 8.** Aspecto de la cepa silvestre *Pseudomonas putida* U (paneles A y B) así como la de un mutante superproductor de mcl-PHAs (*P. putida* U  $\Delta$ fadBA) (paneles C y D) en el que se han deletado los genes responsables de la beta-oxidación de los ácidos grasos. Las microfotografías (A y C) han sido realizadas con un microscopio electrónico (ME) de transmisión, mientras que las de B y D han sido obtenidas con un ME de barrido. El panel E muestra el aspecto de la cepa silvestre (parte superior) y del mutante (parte inferior) cuando se cultivan en un medio en el que ambas cepas acumulan PHAs. En el panel F se muestran las láminas de PHAs obtenidas a partir de diferentes cultivos.

En 1992 se describió por primera vez la síntesis de PHB en un recombinante de la planta *Arabidopsis thaliana*. Desde entonces, la investigación para optimizar los procesos de producción de PHA en plantas ha continuado hasta nuestros días, lográndose expresar los genes que codifican la ruta de biosíntesis de estos polímeros en distintas especies vegetales (Porier y Brumbley, 2010). Sin embargo, a pesar de que mediante estas estrategias se ha conseguido cierto éxito, la producción de PHAs en cultivos extensivos de plantas sigue siendo muy baja, debido, fundamentalmente, a que la acumulación de PHAs en tejidos vegetativos provoca clorosis y, como consecuencia, una notable reducción del crecimiento de las plantas recombinantes.

### Producción global de PHAs

Establecer la cantidad real de PHAs que se produce a nivel mundial no es una tarea sencilla ya que existe una diferencia notable entre los datos publicados por las diferentes compañías y los valores reales. Así, si nos atenemos a los estudios de mercado más recientes, en el año 2014 se produjeron 32.000 toneladas (Nova-Institute, Alemania), cifra que según European Bioplastic se duplicará en

el próximo quinquenio (Khandal *et al.*, 2015). No obstante, la capacidad real para obtener estos biomateriales a nivel mundial es muchísimo mayor (alrededor de 6,7 millones de toneladas en el año 2018), y va a seguir creciendo exponencialmente ya que, a tenor de las previsiones más conservadoras, la demanda de materiales plásticos para el año 2100 será de 2000 millones de toneladas, lo que requeriría consumir el 50% de las reservas de petróleo disponibles a nivel mundial para sintetizarlos.

### **Aplicaciones biotecnológicas**

Si las características y propiedades de estos polímeros ya los hacían particularmente atractivos, el interés por estos biomateriales ha crecido exponencialmente al comprobar sus múltiples e interesantes aplicaciones. Algunas de ellas, las más importantes, las describimos a continuación.

#### Uso como materiales de empaquetamiento

Los primeros PHAs obtenidos se utilizaron para elaborar recipientes destinados a contener productos de uso común, así como para bolsas de almacenamiento. Hoy día su uso es mucho más amplio, y entre los materiales fabricados por diferentes empresas encontramos: bolsas de la compra, envases, materiales para tapizar, bolsas para desechables, tubos, fibras con alta resistencia a la tracción y diversos artículos con aplicaciones muy diferentes (Iwata y Tanaka, 2010; Noda *et al.*, 2010).

#### Aplicaciones en medicina y en farmacia

Los PHAs y sus derivados se han utilizado también en medicina, fundamentalmente en Quirúrgica, y han servido para fabricar prótesis, para desarrollar elementos empleados en la fijación de suturas y guías de nervios, para elaborar materiales usados en la reparación del cartílago articular (por ejemplo, menisco), para fabricar placas óseas, injertos óseos y de tendones. También han sido usados para obtener parches cardiovasculares, stents y válvulas venosas. Recientemente, los PHAs han servido para elaborar implantes oculares, protectores dérmicos, apósitos para heridas y homeostáticos (Williams y Martin, 2005; Bian *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2013).

Un aspecto interesante lo constituye el hecho de que los PHAs y sus derivados puedan actuar como transportadores de proteínas implicadas en la morfogénesis ósea y que, además, sean promotores de la proliferación celular. Este descubrimiento ha conducido a su utilización en procesos de regeneración ósea, así como en la reparación de tejidos (Williams *et al.*, 2013). Buena prueba de ello

es que algunos productos derivados de los PHAs han sido ya autorizados por la FDA, para ser utilizados como implantes.

En farmacia, los PHAs se han utilizado fundamentalmente como activadores de la coagulación; como radiopotenciadores y quimioprotectores; como inhibidores del óxido nítrico sintetasa y, en algunos casos, como antibacterianos (Sandoval *et al.*, 2005). Además, el ácido 3-hidroxi-butírico y sus derivados actúan sobre funciones cerebrales muy complejas, incrementando la capacidad y la velocidad de aprendizaje y potenciando, muy significativamente, la memoria (Zou *et al.*, 2009).

En los últimos años la manipulación de partículas cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nanómetros (base de la nanotecnología) ha sufrido un gran avance. El uso de partículas tan pequeñas, presenta ventajas interesantes respecto a materiales de mayor tamaño, ya que, debido a su mayor área superficial, poseen una mayor reactividad química. Los PHAs han sido usados como material de partida para elaborar nanopartículas que actúan como vehículos de diversos fármacos (antitumorales, antiinflamatorios, analgésicos o antihelmínticos) y que han sido diseñadas para dirigirse a receptores celulares específicos (Yamamoto *et al.*, 2005).

#### Aplicaciones en agricultura

##### - Empleo de PHAs en cultivos inoculantes

El uso de cultivos microbianos utilizados como formulaciones comerciales (también llamados cultivos inoculantes) para ser aplicados a suelos, es una práctica habitual en agricultura. Suelen comercializarse como polvo mezclado con turba, como gránulos, o bien como formulaciones líquidas y se suelen añadir directamente al suelo donde se van a plantar semillas, o bien mezclados con las semillas, antes de que éstas sean depositadas en semilleros. Pues bien, se ha comprobado que ciertas especies pertenecientes a los dos géneros bacterianos más utilizados en este tipo de cultivos facilitadores (es decir *Rhizobium* y *Azospirillum*), soportan mejor las condiciones estresantes y colonizan más rápidamente las raíces de las plantas si acumulan intracelularmente PHBs (Chen, 2010).

##### - Uso de los PHA como vehículo de insecticidas

Como ya advertíamos al analizar las fasinas implicadas en la formación del gránulo de PHA, el análisis de la estructura molecular de esas proteínas (sobre todo la de PhaF), ha permitido, mediante estrategias muy ingeniosas, diseñar sistemas de vehiculización de insecticidas que permiten acceder directamente al organismo diana y combatirlo, mucho más eficazmente, que empleando proce-

dimientos de fumigación habituales. Así, ciertos insecticidas pueden incorporarse a gránulos de PHAs y ser añadidos a formulaciones que se ponen en contacto con, o son ingeridas por, el insecto que se pretende combatir (Moldes *et al.*, 2006).

### Purificación de proteínas

Dentro de las múltiples aplicaciones de los PHAs, una de las más prometedoras y, probablemente, una de las más sofisticadas, es la que hace referencia a su uso para la purificación de cualquier proteína con interés biotecnológico (Moldes *et al.*, 2004).

Utilizando la biología sintética se han fabricado diferentes construcciones genéticas en las que, a la secuencia del gen que codifica la proteína deseada (la que se pretende purificar), se ha añadido la secuencia de DNA de una inteína (esto es, una proteína que se autoescinde por variación del pH), y, unida al gen que codifica la inteína, la secuencia del péptido BioF (aquel que, como ya vimos, era responsable de la unión de la faseína PhaF al gránulo de PHA). El gen producto de esta fusión se superexpresa *in vivo*, en *E. coli* y de esta manera, se consigue una proteína híbrida (BioF-Inteína-Proteína deseada) que posee la facultad de unirse a PHAs a través del péptido BioF. El extracto libre de células de *E. coli*, se incuba con gránulos de PHAs, de modo que el complejo BioF-Inteína-Proteína queda adherido al gránulo y se separa del resto de las proteínas por centrifugación a baja velocidad. Luego, mediante un simple cambio de pH, la proteína que se pretende purificar, se libera al sobrenadante por autoescisión de la inteína, quien junto al péptido BioF se mantiene pegado a las partículas de PHAs en el precipitado. Este método permite la producción y purificación de proteínas con un alto valor añadido, de un modo continuo, rápido y a un coste muy bajo.

### Uso como aditivos alimentarios

En los últimos años, debido a la aparición y proliferación de bacterias que han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos, se han aplicado políticas sanitarias que pretenden disminuir la utilización de estos compuestos como promotores del crecimiento en explotaciones ganaderas.

Algunas moléculas, como son los ácidos grasos de cadena corta, podrían ser unos buenos substitutos de los antibióticos ya que pueden actuar como bacteriostáticos y, además, ejercer un control negativo sobre la expresión de algunos factores de virulencia. Esto es, una vez ingeridos, influyen positivamente sobre la salud del hospedador.

Pues bien, teniendo en cuenta que los PHAs al degradarse, durante su



paso a través del tubo digestivo de los animales, liberan monómeros (bien alifáticos o bien aromáticos) que cumplen las mismas funciones que los ácidos grasos de cadena corta, la adición de PHAs al pienso podría ejercer un efecto de biocontrol similar al descrito para aquellas moléculas. Nuestro grupo de investigación ha evaluado el potencial de los PHAs como agentes preventivos de infecciones causadas por diferentes bacterias en crustáceos, peces, aves y en cerdos.

#### Uso de los PHAs como fuente de energía calorífica

Ciertos ésteres derivados de los monómeros que integran algunos PHAs (p. ej. los ésteres metílicos del ácido 3-hidroxi-butírico y de los ácidos 3-hidroxi-alcanoicos de cadena media) pueden ser utilizados como biocombustibles. De hecho, se ha comprobado que esos compuestos tienen un calor de combustión parecido al del etanol y que la adición de un 10% de esos ésteres a este alcohol, incrementa su calor de combustión en más de un 30 % (Chen, 2010).

#### **Conclusiones y perspectivas de futuro**

Todas las consideraciones anteriormente expuestas nos permiten establecer que los PHAs representan una alternativa real a los plásticos de origen petroquímico. El gran número de compuestos que pueden obtenerse en función del microorganismo productor (bien sea una cepa silvestre o aquella manipulada genéticamente); el hecho de que sean biodegradables y sus múltiples aplicaciones biotecnológicas, ha hecho que estos polímeros puedan solventar problemas ecológicos, clínicos, farmacológicos e industriales.

Adicionalmente, la descripción de nuevos PHA (p. ej. los denominados inusuales) en microbios aislados de hábitats hasta hace poco desconocidos; el diseño de nuevos métodos para detectar pequeñas cantidades de estos polímeros (incluso en poblaciones microbianas complejas); los avances en genética, metagenómica y en ingeniería metabólica; la síntesis química de nuevos polímeros en los que se ha modificado la estructura de algunos monómeros, o la obtención por fermentación de PHA en los que se alternan los diferentes monómeros en proporciones estrictamente controladas, han incrementado el número de PHA susceptibles de ser utilizados en un futuro próximo. Además, el hecho de que estos bioplásticos puedan ser sintetizados por diferentes organismos (bacterias, levaduras, hongos filamentosos e incluso por plantas) cuando se cultivan en medios que contienen fuentes de carbono de diferente naturaleza, tiene la ventaja de que estos biomateriales pueden ser obtenidos en cualquier país del mundo, lo que contribuirá al desarrollo industrial de muchas zonas, incluso las más deprimidas, de nuestro planeta. No es de extrañar, pues, que los PHAs descubiertos por

Lemoigne en 1926, hoy día, casi un siglo después, constituyan uno de los biomateriales más atractivos y con un futuro industrial más prometedor.

### Bibliografía

- Arias, S., Sandoval, A., Arcos, M., Cañedo, L.M., Maestro, B., Sanz, J.M., Naharro, G. y Luengo, J.M. 2008. Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies. *Microbial Biotechnology* 1:170–176.
- Baekeland, L.H. 1910. Bakelite, a condensation product of phenols and formaldehyde, and its uses. *Journal of Franklin Institute* 169:55–60.
- Bian, Y.-Z., Wang, Y., Aibaidoula, G., Chen, G.-Q. y Wu, Q. 2009. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 30:217–225.
- Bogdawa, H., Delessert, S. y Poirier, Y. 2005. Analysis of the contribution of the beta-oxidation auxiliary enzymes in the degradation of the dietary conjugated linoleic acid 9-cis-11-trans-octadecanoic acid in the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1735:204–2013.
- Chen, G.-Q. 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. En: "Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications". Editor: G.-Q. Chen. *Microbiology Monographs* Vol. 14, pp.17-37. Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- de Eugenio, L.I., Galán, B., Escapa, I.F., Maestro, B., Sanz, J.M., García, J.L. y Prieto, M. A. 2010. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environmental Microbiology* 12:1591–1603.
- de Eugenio, L.I., García, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., Román, J.S., García, J.L. y Prieto, M.A. 2007. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 282:4951-4962.
- Doudoroff, M. y Stanier, R.Y. 1959. Role of poly-β-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature* 183:1440-1442.
- García, B., Olivera, E.R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L.M., Prieto, M.A., García, J.L., Martínez, M. y Luengo, J.M. 1999. Novel bio-degradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and bio-chemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *The Journal of Biological Chemistry* 274:29228–29241.
- Gilbert, M. (2017) *Plastics Materials: Introduction and Historical Development*. En "Brydson's Plastics Materials" (Eighth Edition). Editor: M. Gilbert. pp. 1–18. Elsevier (Butterworth-Heinemann), Oxford, Reino Unido.
- Iwata, T. y Tanaka, T. 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. En "Plastics from Bacteria: Natural Functions and

- Applications". Editor: G.-Q. Chen. Microbiology Monographs Vol. 14, pp.257-282. Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- Jendrossek, D. y Pfeiffer, D. 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* 16:2357-2373.
- Khandal, D., Pollet, E. y Avérous, L. 2015. Polyhydroxyalkanoate-based multiphase materials. En: "Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites". Editores: I. Roy y P.M. Visakh RSC Green Chemistry No. 30, pp.119-140. The Royal Society of Chemistry, Londres, Reino Unido.
- Kobayasi, T., Uchino, K., Abe, T., Yamazaki, Y. y Saito, T. 2005. Novel intracelular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology* 187:5129-5135.
- Lemoigne, M. 1923. Production d'acide b-oxybutyrique par certaines bactéries du groupe du *B. subtilis*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 176:1761.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. y Olivera, E. R. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* 6:251-260.
- Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M.A. y Sanz, J.M. 2013. A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PloS One* 8:e56904.
- Moldes, C., Farinós, G.P., de Eugenio, L.I., García, P., García, J.L., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Castañera, P. y Prieto, M.A. 2006. New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:88-93.
- Moldes, C., García, P., García, J.L. y Prieto, M.A. 2004. In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Applied Environmental Microbiology* 70:3205-3212.
- Noda, I., Lindsey, S.B. y Caraway, D. 210. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. En "Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications". Editor: G.-Q. Chen. Microbiology Monographs Vol. 14, pp.237-255. Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- Obeso, J.I., Maestro, B., Sanz, J.M., Olivera, E.R. y Luengo, J.M. 2015. The loss of function of PhaC1 is a survival mechanism that counteracts the stress caused by the overproduction of poly-3-hydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*Δ*fadBA*. *Environmental Microbiology* 17:3182-3194.
- Olivera, E.R., Arcos, M., Naharro, G. y Luengo, J. M. 2010 Unusual PHA biosynthesis. En: "Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications". Editor: G.-Q. Chen. Microbiology Monographs Vol. 14, pp. 133-186. Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodrá, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Román, J.S., García, J.L., Naharro, G. y Luengo, J.M. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology* 3:612-618.

- Parkes, A. 1866. On the properties of Parkesine, and its application to the arts and manufactures. *Journal of Franklin Institute* 81:264–271.
- Porier Y. y Brumbley S.M. (2010) Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. En: "Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications". Editor: G.-Q. Chen. Microbiology Monographs Vol. 14, pp.187-211. Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E.R. y Luengo, J.M. 2007. Genetic and ultrastructural analysis of different mutants of *Pseudomonas putida* affected in the poly-3-hydroxy-n-alkanoate gene cluster. *Environmental Microbiology* 9:737–751.
- Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Bermejo, F., Cañedo, L., Naharro, G., Olivera, E.R. y Luengo, J. M. 2005. Production of 3-hydroxy-n-phenylalkanoic acids by a genetically engineered strain of *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:97–105.
- Slater, S.C., Voige, W.H. y Dennis, D.E. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *The Journal of Bacteriology* 170:4431-4436.
- Villarrubia-Gómez, P., Cornell, S. y Fabres, J. 2018. Marine plastic pollution as a planetary boundary threat-The drifting piece in the sustainability puzzle. *Marine Policy* 96:213-220
- Wang, L., Wang, Z.-H., Shen, C.-Y., You, M.-L., Xiao, J.-F. y Chen, G.-Q. 2010. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials* 31:1691–1698.
- Williams, S. F. y Martin, D. P. (2005) Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy. En: "Biolymers Online". Editores: Y. Doi y A. Steinbüchel, Polyesters, Part 4, pp.91-128. John Wiley & Sons, Weinheim, Alemania.
- Williams, S.F., Rizk, S. y Martin, D.P. 2013. Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedical Technology* 58:439–452.
- Williamson, D.H. y Wilkinson, J.F. 1958. The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *The Journal of General Microbiology* 19:198-209.
- Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H. y Kawashima, Y. 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release* 102:373–381.
- Zou, X.H., Li, H.M., Wang, S., Leski, M., Yao, Y.C., Yang, X.D., Huang, Q.J. y Chen G.-Q. 2009. The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice. *Biomaterials* 30:1532-1541.