

*Revisión crítica*

## ***Arthrospira platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido pipecólico.**

**Leopoldo Naranjo-Briceño<sup>1\*</sup>, Diego Rojas-Tortolero<sup>1</sup>, Héctor González<sup>2</sup>, Rubén Torres Parra<sup>2</sup>, Jorge Zegarra Narro<sup>2</sup>, Lucía Sena-D'Anna<sup>1</sup>, y Daynet Sosa del Castillo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dirección de Área de Energía y Ambiente, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).  
C/ Hoyo de la Puerta-Baruta, Sartenejas, Caracas 1080, Venezuela.

<sup>2</sup>Asociación Civil Gente de Ciencias (GDC)

<sup>3</sup>Dirección de Área de Agricultura y Soberanía Alimentaria,  
Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)

\* Autor de correspondencia: lnaranjo@idea.gob.ve

### **Resumen**

Las cianobacterias constituyen una alternativa innovadora para ser utilizadas como factorías celulares con el fin de producir grandes cantidades de metabolitos secundarios de interés farmacológico. El ácido pipecólico está relacionado con el metabolismo de lisina en diversos organismos y es un componente y precursor importante de la biosíntesis de diversos compuestos bioactivos tales como: inmunosupresores, péptidos no-ribosomales, poliquétidos y alcaloides en microorganismos y plantas. En este sentido, diversos análisis bioquímicos han demostrado la alta capacidad de *A. platensis* de acumular lisina intracelularmente. En la naturaleza, la síntesis de lisina tiene lugar por medio de dos rutas biosintéticas distintas; mientras que en hongos filamentosos el ácido pipecólico se sintetiza vía ácido  $\alpha$ -aminoadípico, a través de la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato para formar L-lisina, en plantas el ácido pipecólico se sintetiza vía sacaropina, a través del catabolismo de L-lisina. Sin embargo, en ambos casos, el intermediario piperideín-6-carboxílico (P6C) es el precursor inmediato del ácido pipecólico. La presente revisión tiene como objetivo principal el estudio del metabolismo de ácido pipecólico en diversos organismos y sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la industria farmacéutica. Asimismo, se plantea el uso de *A. platensis* como factoría celular para producir P6C, ácido pipecólico u otros metabolitos de interés farmacológico.

**Palabras clave:** *L-lisina,  $\alpha$ -aminoadipato, ácido pipecólico, biosíntesis, cianobacteria.*

### **Abstract**

The cyanobacteria are an innovative alternative to be used as cellular factories to produce large amount of secondary metabolites of pharmacological interest. Pipecolic acid is related to lysine metabolism in diverse organisms and is an important component and precursor for the biosynthesis of several bioactive compounds such as immunosuppressants, non-ribosomal peptides, polyketides and alkaloids in microorganisms and plants. In fact, several studies have demonstrated the biochemical capacity of *A. platensis* to accumulate lysine intracellularly. In nature, the synthesis of lysine occurs through two distinct biosynthetic pathways, whereas in

filamentous fungi the pipercolic acid is synthesized via  $\alpha$ -amino adipic acid, through the  $\alpha$ -amino adipate pathway to form L-lysine, in plants pipercolic acid is synthesized via saccharopine, through the catabolism of L-lysine. However, in both cases, the piperidine-6-carboxylic acid (P6C) metabolite is the immediate precursor of pipercolic acid. The present review is focused at the study of the pipercolic acid metabolism in diverse organisms and their potential biotechnological applications in the pharmaceutical industry. Likewise, the use of *A. platensis* as a cell factory to produce P6C, pipercolic acid or other metabolites with pharmacological interest is discussed.

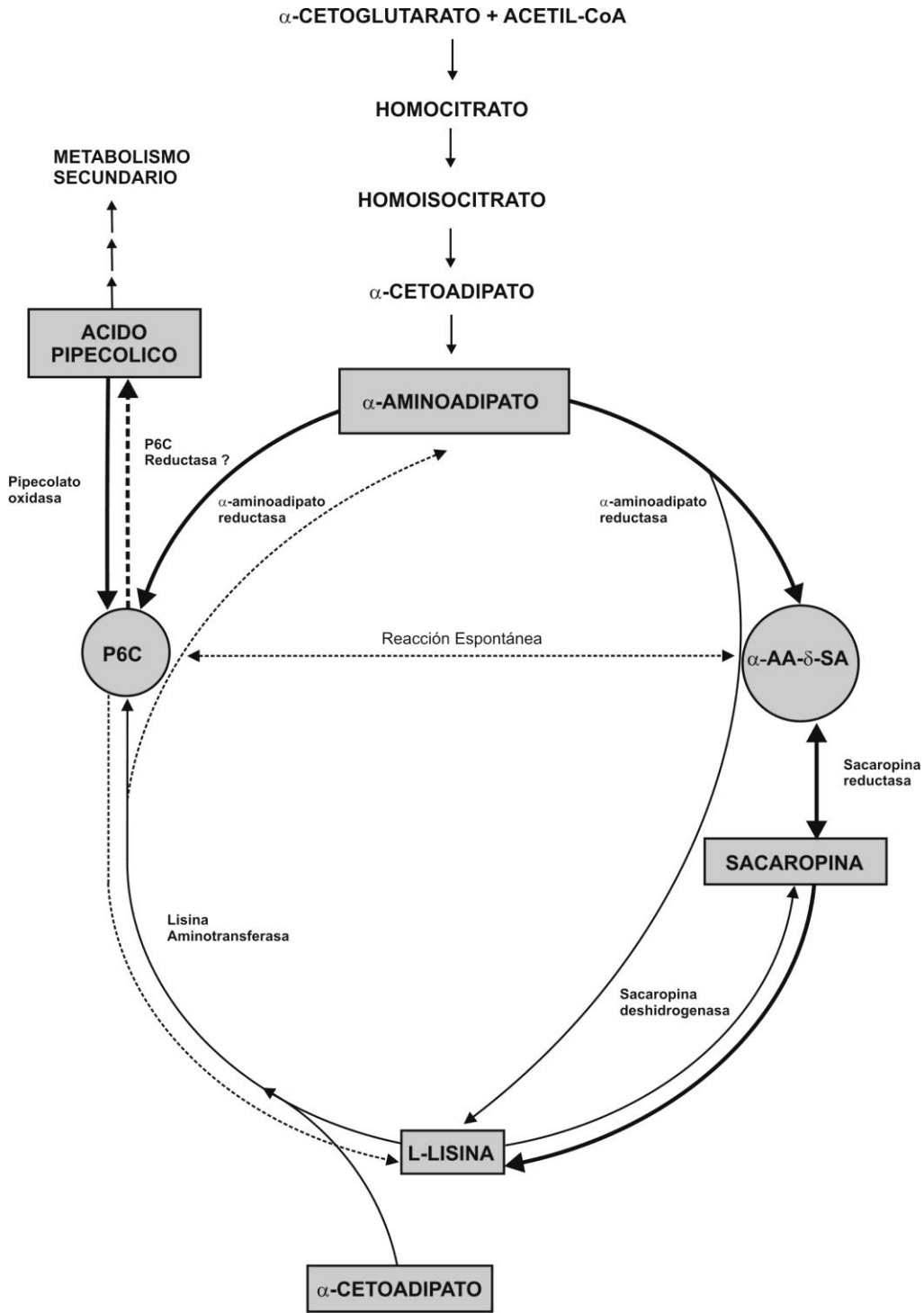
**Keywords:** *L-lysine,  $\alpha$ -amino adipate, pipercolic acid, biosynthesis, cyanobacteria.*

## 1. Introducción

*Arthrospira platensis* es una cianobacteria filamentosas fotosintética y alcalófila original de ambientes bicarbonatados que pertenece a la familia de las Oscillatoriaceae, División Cyanophyta (Ciferri, 1983). Desde épocas ancestrales *A. platensis* ha sido estimada por sus propiedades medicinales y nutricionales (Ciferri, 1983; Belay et al. 1993, Belay et al. 1996; Subhashini et al. 2004; Thajuddin y Subramanian, 2005; Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al. 2006;). Actualmente *A. platensis* tiene un alto interés biotecnológico y económico tanto para la industria alimentaria como farmacológica. Desde el punto de vista alimentario, además de ser fácilmente digerible (Ciferri, 1983; Jaime et al. 1996; Thajuddin y Subramanian, 2005; Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006), *A. platensis* constituye una fuente potencial de pigmentos, proteínas, vitaminas, ácidos grasos, minerales, carbohidratos, ácidos nucleicos y aminoácidos (Ciferri y Tiboni, 1985, Henrikson, 1989, Mosulishvili et al. 2002; Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Colla et al. 2007). Más recientemente, el potencial biotecnológico de *A. platensis* y otras microalgas se ha demostrado en una amplia gama de usos, tales como, en la degradación de herbicidas organofosforados (Lipok et al. 2007), la fijación de gases de efecto invernadero (de Moraes, 2007), como bioacumuladoras de metales pesados (Chojnacka, 2005, Gong, 2005, Pane et al.

2007, Lodi, 2007), como biocatalizadoras en procesos de biotransformación (Utsukihara et al. 2007), para la producción de hidrógeno (Juantorena et al. 2007) y en la producción de biocombustibles (Chisti, 2007), entre otros.

Desde el punto de vista farmacológico, las cianobacterias constituyen una alternativa innovadora para ser utilizadas como factorías celulares para producir grandes cantidades de metabolitos secundarios con interesantes actividades farmacológicas tales como antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas, agentes antitumorales, proteínas heterólogas, entre otros (Singh, 2005; Spolaore, 2006). En este sentido, la ingeniería metabólica surge como un campo interdisciplinario que apunta a mejorar las características celulares de los organismos usando la biología molecular como herramienta para modificar las rutas metabólicas y/o la regulación de las mismas (Stafford y Stephanopoulos, 2001). Esto, con la finalidad de disminuir o incrementar la biosíntesis de algún metabolito o un producto final en particular. En la naturaleza, la síntesis de lisina, un aminoácido esencial requerido en la dieta diaria de mamíferos, tiene lugar por medio de dos rutas biosintéticas completamente distintas: i) la ruta del ácido diaminopimélico y, ii) la ruta del  $\alpha$ -amino adipato (también denominada ruta del ácido  $\alpha$ -aminoadípico).



**Figura 1.** Ruta biosintética del  $\alpha$ -aminoadipato para la formación de L-lisina descrita en hongos. Se muestra la ruta de conversión de ácido pipercolico en lisina descrita en *P. chrysogenum* vía  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído y sacaropina. Así mismo, se muestra la conversión de ácido  $\alpha$ -aminoadípico en ácido pipercolico, componente y precursor de numerosos metabolitos secundarios con interesantes actividades biológicas.  $\alpha$ -AA- $\delta$ -SA:  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico. *lys7*: gen que codifica la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*.

Se ha descrito que los hongos y las euglenofitas utilizan la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato (Fig. 1) para la biosíntesis de lisina (Vogel, 1960; Rothstein y Saffran, 1963; Lejohn, 1971; Bhattacharjee, 1985; Garrad y Bhattacharjee, 1992; Weidner et al. 1997; Casqueiro et al. 1999a, 2001; Bañuelos et al. 1999, 2000; Hijarrubia et al. 2001; Naranjo et al. 2001; 2002; 2004; Teves et al. 2009). En este sentido, análisis bioquímicos han puesto en clara evidencia la alta capacidad de *A. platensis* de acumular lisina intracelularmente (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006).

La ruta biosintética del  $\alpha$ -aminoadipato comienza con la condensación de  $\alpha$ -cetoglutarato y acetil-CoA, y comprende siete reacciones enzimáticas consecutivas para formar lisina. Además, dicha ruta provee diversos precursores para el metabolismo secundario, tales como: el ácido  $\alpha$ -aminoadípico y el piperideín-6-carboxílico (P6C; en equilibrio químico constante con su cadena abierta el  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído). El ácido pipecólico es un importante metabolito secundario que se forma a partir del metabolismo de lisina en diversos organismos que incluye mamíferos, plantas, bacterias, levaduras y hongos (Aspen y Meister, 1962; Baginsky y Rodwell, 1967; Hartline y Rodwell, 1971; Kurtz y Bhattacharjee, 1975; Wickwire et al. 1990a, Wickwire et al. 1990b; Goncalves-Butruille et al. 1996; Sim y Perry, 1997; IJlst et al. 2000; Dodt et al. 2000; Naranjo et al. 2001; 2004). Mientras que en hongos filamentosos se ha descrito que el ácido pipecólico se sintetiza vía ácido  $\alpha$ -aminoadípico, a través de la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato (Aspen y Meister, 1962; Naranjo et al. 2004), en plantas, el ácido pipecólico se sintetiza vía sacaropina, a través del catabolismo de L-lisina (Goncalves-Butruille et al. 1996). No obstante, es importante resaltar que, en

ambos casos, el P6C es el precursor inmediato del ácido pipecólico.

El interés farmacológico sobre el estudio del ácido pipecólico radica en el hecho de que este iminoácido es un componente y precursor de la biosíntesis de diversos compuestos bioactivos, tales como: inmunosupresores, péptidos no-ribosomales, poliquétidos y alcaloides.

La presente revisión tiene como finalidad el estudio del metabolismo de ácido pipecólico en diversos organismos y sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la industria farmacológica. Así mismo, se plantea el uso de *A. platensis* como biofactoría y de algunas estrategias de ingeniería biosintética del metabolismo de L-lisina para incrementar la síntesis de P6C, ácido pipecólico y otros metabolitos de interés farmacológico, tomando en cuenta sus ventajas comparativas.

## 2. Metabolismo del ácido pipecólico

### 2.1. El ácido pipecólico y su relación con el metabolismo de lisina en diversos organismos

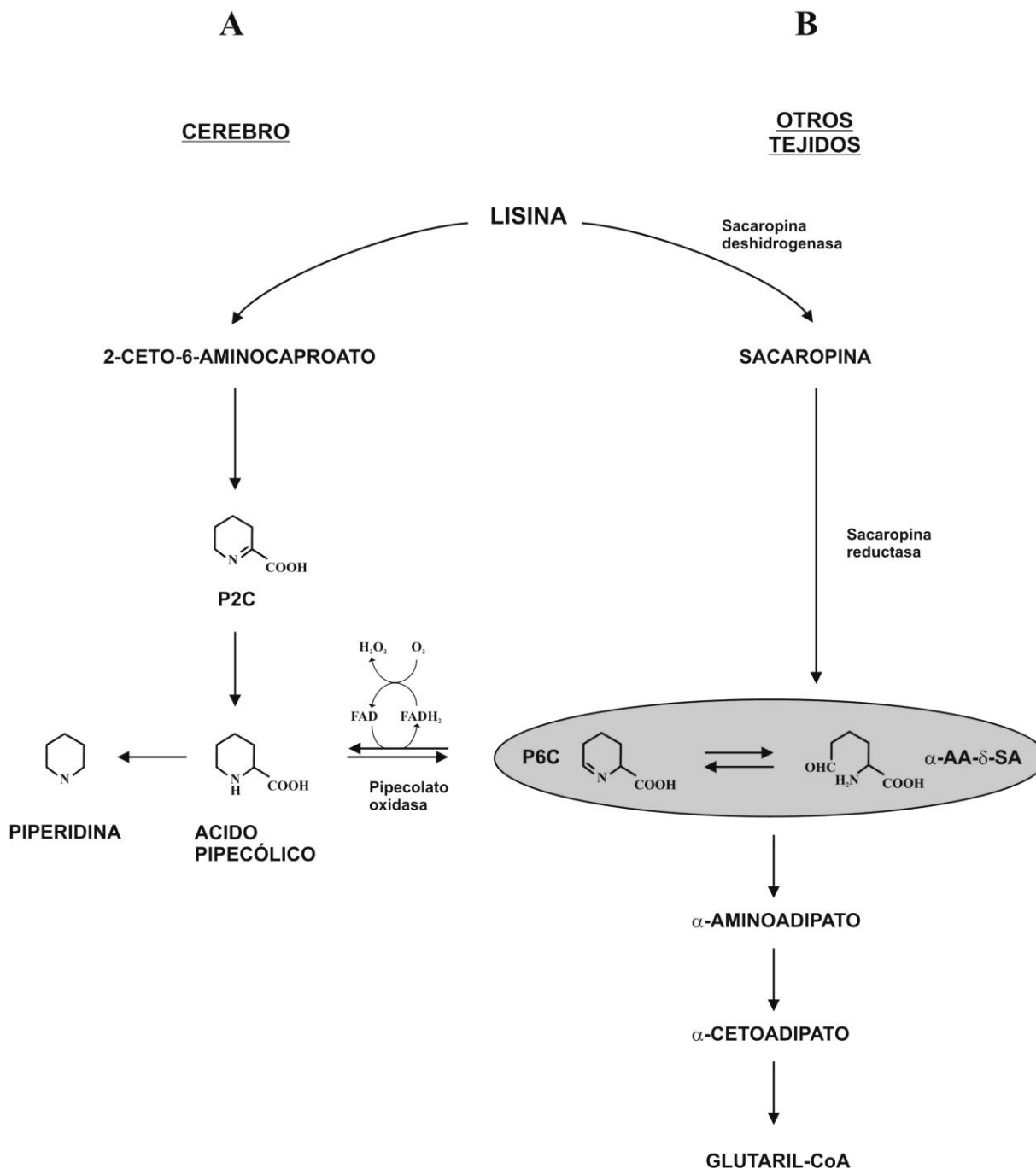
El ácido pipecólico es un iminoácido de seis átomos de carbono que desempeña distintas funciones metabólicas en diversos organismos. Además de ser un intermediario del catabolismo de lisina en mamíferos, plantas, bacterias, levaduras y hongos, el ácido pipecólico es un componente y un precursor importante de numerosos metabolitos secundarios de microorganismos y plantas. Desde el punto de vista nutricional, el ácido pipecólico tiene una gran importancia ya que es capaz de complementar la auxotrofia de lisina en cepas mutantes de levaduras y hongos, tales como *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* y *Rhodotorula glutinis*. Esto se debe a que en estos microorganismos el ácido pipecólico se convierte en L-lisina

utilizando  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído y sacaropina como intermediarios. Con relación a la biosíntesis de ácido piperídico, en la naturaleza existen dos vías principales que son: i) la vía sacaropina (a través del catabolismo de L-lisina) y, ii) la vía ácido  $\alpha$ -aminoadípico (a través de la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato para la formación de L-lisina). A continuación se describe el metabolismo de este importante iminoácido en algunos organismos.

### **Mamíferos**

En mamíferos, la lisina puede ser catabolizada por dos vías distintas: por la ruta de la sacaropina o por la ruta del ácido piperídico (IJlst et al. 2000; Dodt et al. 2000). Aunque la lisina se cataboliza principalmente a través de la ruta de la sacaropina en la mayoría de los tejidos, en el cerebro, la ruta del ácido piperídico es la más activa. En la ruta del catabolismo de lisina vía sacaropina, la lisina se transforma en P6C a través de dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa y la sacaropina reductasa. Tal como sucede en plantas (Goncalves-Butruille et al. 1996; Tang et al. 2000; Zhu et al. 2000a, Zhu et al. 2000b), estas dos reacciones son catalizadas por una única enzima bifuncional. Sin embargo, en el cerebro, la actividad de esta enzima bifuncional es muy baja, por lo que la lisina se cataboliza predominantemente vía ácido piperídico a través de dos reacciones enzimáticas usando ácido piperideín-2-carboxílico (P2C) y su cadena abierta 2-ceto-6-aminocaproato como intermediarios (IJlst et al. 2000; Dodt et al. 2000), tal como muestra la Figura 2.

La primera piperolato oxidasa caracterizada y purificada en mamíferos fue descrita en primates por Mihalik et al. (1991). Dicha proteína, un monómero amarillo, posee un peso molecular deducido de 46 kDa. En primates y humanos, Mihalik et al. (1991), demostraron que el ácido piperídico se oxida mediante dos reacciones consecutivas de deshidrogenación para formar ácido  $\alpha$ -aminoadípico (Mihalik y Rhead, 1989). Los resultados obtenidos por este grupo de investigación sugerían que la oxidación del ácido piperídico en primates y humanos se llevaba a cabo a través de una ruta similar a la encontrada en *Pseudomonas putida* (Baginsky y Rodwell, 1967). En esta bacteria, se había descrito que el ácido piperídico se oxida inicialmente a P6C a través de una piperolato oxidasa (ácido piperídico + O<sub>2</sub> → P6C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El P6C se encuentra en equilibrio químico constante con el  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído, de tal manera que el P6C se abre espontáneamente al pH fisiológico para formar  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído. Posteriormente, la oxidación del  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído produce ácido  $\alpha$ -aminoadípico. Reuber et al. (1997), aislaron y purificaron la piperolato oxidasa de conejos, la cual está constituida por 390 aminoácidos. Dicha enzima se caracteriza por tener en el extremo amino terminal un dominio de unión a ADP formado por una alternancia  $\beta\alpha\beta$ , un motivo altamente conservado en flavoproteínas. Además, Reuber et al. (1997) establecieron que la sarcosina, el ácido piperídico y la prolina eran buenos sustratos para esta enzima.



**Figura 2.** Representación esquemática de las dos rutas catabólicas de lisina presentes en mamíferos. (A) Ruta del catabolismo de lisina vía sacaropina y (B) Ruta del catabolismo de lisina vía ácido piperólico. Aunque la lisina se cataboliza principalmente a través de la ruta de la sacaropina en la mayoría de los tejidos, en el cerebro, la ruta del ácido piperólico es la más activa. α-AA-δ-SA: α-aminoadipato-δ-semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico; P2C: ácido piperideín-2-carboxílico.

Más adelante, IJlst *et al.* (2000) describieron la clonación del gen que codifica la pipecolato oxidasa en humanos a partir de ADNc usando la información de la secuencia de nucleótidos de genes que codifican pipecolato/sarcosina oxidasas descritas previamente en conejos y ratones. La hipotética pipecolato oxidasa de humanos presentó una alta homología con la sarcosina oxidasa de ratones y algunas de las sarcosinas oxidasas monoméricas descritas en bacterias. Además, la proteína deducida también mostraba un dominio de unión a ADP- $\beta\alpha\beta$  similar a la pipecolato oxidasa de conejos. En paralelo, Dodt *et al.* (2000) describieron la clonación del gen que codifica la pipecolato oxidasa de humanos por genética reversa usando la secuencia de aminoácidos de la pipecolato oxidasa purificada de primates. El ADNc clonado presentó un marco de lectura abierta de 1170 pares de bases que codifica una proteína de 390 aminoácidos con una alta identidad con todas las sarcosinas oxidasas y deshidrogenasas descritas, especialmente, con la sarcosina oxidasa monomérica de *Bacillus* sp. NS-129. Además, Dodt *et al.* (2000) también demostraron que esta enzima oxidaba tanto el ácido pipecólico como la sarcosina, tal como lo habían descrito previamente Reuber *et al.* (1997) con la pipecolato oxidasa de conejos.

Con relación a la localización subcelular, en humanos, ratones y primates el ácido pipecólico se metaboliza en los peroxisomas (IJlst *et al.* 2000; Dodt *et al.* 2000). En conejos, perros, cerdos y ovejas la oxidación del ácido pipecólico es predominantemente mitocondrial (Singh *et al.* 1989; Mihalik y Rhead, 1991) mientras que, en ratas, este compuesto puede ser metabolizado tanto en mitocondrias como en peroxisomas (Rao *et al.* 1993).

La identificación y caracterización de la pipecolato oxidasa humana tiene una gran importancia en el campo de la salud humana,

ya que se ha descrito que la acumulación de ácido pipecólico es una de las principales anomalías bioquímicas asociada con pacientes que sufren un desorden generalizado en la biogénesis de los peroxisomas (*peroxisome biogenesis disorder* o PBD), entre los que destacan: el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, una enfermedad genética que se caracteriza por la ausencia de peroxisomas morfológicamente distinguibles; la adrenoleucodistrofia neonatal y la hiperpipecólico acidemia (Wanders *et al.* 1989, 1988; Mihalik y Rhead, 1989; Mihalik *et al.* 1989; Rao *et al.* 1993).

También, se ha descrito que pacientes con enfermedades crónicas, especialmente, con encefalopatía hepática, presentan niveles altos de ácido pipecólico en plasma sanguíneo (Fujita *et al.* 1999). Los pacientes con PBD se caracterizan por presentar un profundo retraso mental, una migración neuronal anormal y una degeneración excesiva del sistema nervioso central. En los pacientes con PBD los peroxisomas se encuentran ausentes con la deficiencia concomitante de todas las enzimas peroxisomales. La acumulación de ácido pipecólico en estos pacientes se debe a una actividad deficiente de la enzima pipecolato oxidasa, lo que indica que esta enzima se encuentra fuertemente implicada en la degradación del ácido pipecólico a ácido  $\alpha$ -aminoadípico y que podría ser peroxisomal al menos en humanos y monos (IJlst *et al.* 2000; Mihalik y Rhead, 1989; Wanders *et al.* 1988).

Aunque se ha caracterizado la pipecolato oxidasa e identificado el producto de su reacción, el mecanismo exacto de oxidación del ácido pipecólico no está aún totalmente claro. Sin embargo, se ha descrito que la pipecolato oxidasa cataliza la conversión de ácido pipecólico en P6C el cual, de manera espontánea, se encuentra en equilibrio con su forma lineal el  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -

semialdehído (Kramar *et al.* 1989; Mihalik y Rhead, 1989; Wanders *et al.* 1989; Rao y Chang, 1990a; Dodt *et al.* 2000; IJlst *et al.* 2000). Posteriormente, el  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído se convierte a su vez en ácido  $\alpha$ -aminoadípico a través de una reacción de deshidrogenación dependiente de NAD (Chang *et al.* 1990; Rao y Chang, 1990b).

### **Plantas**

Las plantas producen una inmensa cantidad y variedad de compuestos orgánicos, de los cuales, la gran mayoría parecen no estar implicados directamente con los procesos de crecimiento y desarrollo de las mismas, es decir, son metabolitos secundarios (Croteau *et al.* 2003). En plantas, el ácido pipecólico se considera un metabolito secundario mientras que su análogo, el aminoácido prolina, se considera como un metabolito primario. En plantas, se ha descrito que el ácido pipecólico deriva del catabolismo de lisina vía  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído (Goncalves-Butruille *et al.* 1996). Posteriormente, el P6C podría reducirse a ácido pipecólico mediante una reacción análoga a la catalizada por la pirrolina-5-carboxilato (P5C) reductasa (EC 1.5.1.2) (Stewart y Larher, 1980; Rosenthal, 1982; Galili, 1995).

*Momordica charantia* (bitter melon), una planta de la familia Cucurbitaceae de gran interés en la medicina tradicional china y africana contiene en sus frutos y semillas, entre otros aminoácidos libres, ácido pipecólico (Salawu *et al.* 1999). Esta planta presenta propiedades antibióticas, antimutagénicas, antioxidantes, antivirales, antitumorales, astringentes, depurativas, afrodisíacas, inmunomodulares, citotóxicas, así como actividad inmunosupresora e insecticida, entre otras (Leung *et al.* 1987; Romeo, 1984). Tradicionalmente, se recomienda para combatir problemas de la piel (dermatosis, quemaduras, erupciones, soriasis, etc.), la gonorrea, el reumatismo, la artritis, el lupus, la diabetes, como

estimulante del apetito, para la regulación de la fertilidad, para tratamientos gastrointestinales y como insecticida. *M. charantia* ha sido utilizada para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer e infecciones virales (Leung *et al.* 1987) y se ha encontrado que el extracto hexánico de esta planta posee actividad inhibitoria sobre amastigotes y promastigotes de diversas especies de *Leishmania* (Jaramillo, 2000). Así mismo, el ácido pipecólico es un fitoquímico que se acumula en grandes cantidades en algunos miembros de la familia Fabaceae y se ha descrito que es el principal constituyente de la reserva de aminoácidos libres en el género *Medicago* (Stewart y Larher, 1980; Rosenthal, 1982). Además, el ácido pipecólico, se ha detectado en frutos inmaduros (pericarpio y semillas) de *Coffea arabica* y *Camellia sinensis* (Higuchi *et al.* 1995), mientras que en *Sophora secundiflora*, *Cycas circinalis* y *Phaseolus vulgaris* se ha identificado en semillas (Izaddoost *et al.* 1976; Li *et al.* 1996).

Las plantas conviven con una comunidad depredadora muy activa constituida por bacterias, insectos, hongos y vertebrados herbívoros, por lo cual han desarrollado diversos mecanismos de defensa que le han permitido su supervivencia en este medio tan hostil (Norton, 2002). El estudio de factores tóxicos y anti-nutritivos en las leguminosas *Albizia lebbek* y *Calliandra calothyrsus* permitió identificar la presencia de ácido pipecólico en sus hojas (Marlier *et al.* 1979; Romeo, 1984; Romeo, 1988). Es importante destacar que el ácido pipecólico y sus derivados que han sido aislados de las hojas de *C. calothyrsus* poseen propiedades insecticidas y fitotóxicas (Romeo, 1984), por lo cual, estos compuestos podrían tener un gran interés comercial en el campo de la industria agroalimentaria. Por otro lado, se ha observado que pequeñas concentraciones de ácido pipecólico inhiben el crecimiento



de la radícula de semillas germinadas en *Astragalus sinicus* y *Morus alba*, y se ha demostrado que la conversión de lisina a ácido pipercolico induce floración en *Lemna paucicostata* 151 (Fujioka et al. 1987). También, se ha descrito que el ácido pipercolico es un soluto asociado con la adaptación osmótica de *Ptelea* sp., una planta xerofita que se desarrolla en hábitats áridos y semiáridos (Steward y Larher, 1980; Romeo, 1988).

### **Bacterias**

En algunas especies de *Pseudomonas* se ha descrito que el ácido pipercolico proviene del catabolismo de lisina (Baginsky y Rodwell, 1967; Hartline y Rodwell, 1971). En *P. putida*, la L-lisina se convierte inicialmente en D-lisina y P2C. Posteriormente, el P2C se convierte en ácido pipercolico por acción de la P2C reductasa (Payton y Chang, 1982). Por otro lado, en *Streptomyces hygroscopicus*, el ácido pipercolico también deriva del catabolismo de L-lisina. Esta bacteria produce rapamicina, un inmunosupresor que contiene en su estructura una molécula de ácido pipercolico (Khaw et al. 1998). Además, se ha descrito que en el genoma de *Escherichia coli* existe una "P6C reductasa" que cataliza la reducción de P6C en ácido pipercolico. Fujii et al. (2002) demostraron con experimentos *in vivo* e *in vitro* que la actividad P6C reductasa la lleva a cabo la pirrolina-5-carboxilato (P5C) reductasa (EC 1.5.1.2) codificada por el gen proC. La P5C reductasa cataliza la reducción de P5C en L-prolina, una actividad enzimática encontrada en una gran variedad de organismos (Leisinger, 1987). Por otro lado, se ha estudiado la capacidad osmoprotectora del ácido pipercolico en *E. coli* (Gouesbet et al. 1994) y *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi et al. 2000), donde se ha demostrado que es un compuesto efectivo capaz de optimizar el crecimiento de estos microorganismos bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad.

### **Hongos filamentosos y levaduras**

Al igual que en otros organismos, en levaduras y hongos filamentosos el ácido pipercolico es un intermediario importante que se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de lisina. El ácido pipercolico tiene un papel nutricional importante en *Aspergillus nidulans* (Aspen y Meister, 1962) y *Rhodotorula glutinis* (Kurtz y Bhattacharjee, 1975), sin embargo, se ha descrito que no posee ninguna función en la ruta biosintética de lisina de *Saccharomyces cerevisiae* (Glass y Bhattacharjee, 1971; Kurtz y Bhattacharjee, 1975). A continuación se menciona el papel que desempeña el ácido pipercolico en el metabolismo de lisina en diferentes especies de hongos y levaduras.

### **2.2. Conversión de ácido pipercolico en L-lisina**

#### ***Rhodotorula glutinis***

La biosíntesis de lisina en *R. glutinis*, una levadura roja aeróbica obligada, se lleva a cabo a través de la ruta del  $\alpha$ -aminoadípico como ocurre en levaduras y otros hongos filamentosos (Broquist, 1971). Kurtz y Bhattacharjee (1975), demostraron que algunos mutantes auxótrofos de lisina de *R. glutinis* podían crecer en medio mínimo suplementado con ácido pipercolico, sugiriendo la importancia nutricional del ácido pipercolico en este microorganismo. Además, demostraron en la cepa silvestre de *R. glutinis* que el ácido pipercolico se convierte en  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído. Por otro lado, Kurtz y Bhattacharjee (1975) también demostraron que en *S. cerevisiae*, a diferencia de los resultados obtenidos en *R. glutinis*, el ácido pipercolico no jugaba ningún papel en la biosíntesis de lisina. Posteriormente, Kinzel y Bhattacharjee (1979) presentaron por primera vez evidencias genéticas y bioquímicas de los pasos específicos implicados en la ruta de conversión de ácido pipercolico se convertía en lisina vía  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído y sacaropina.

Así mismo, determinaron que, en presencia de la pipecolato reductasa, el ácido pipecólico se convertía en  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído (en equilibrio con el P6C), un intermediario de la ruta del ácido  $\alpha$ -aminoadípico para la formación de lisina (Fig. 1). Además, demostraron que la reacción llevada a cabo por la pipecolato oxidasa no requería ningún cofactor externo y el producto de su reacción, el  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído, se convertía enzimáticamente en sacaropina y lisina. Por otro lado, Kinzel y Bhattacharjee (1979), concluyeron que el ácido pipecólico era un precursor circunstancial de lisina en *R. glutinis* y que éste no era un intermediario de la ruta biosintética de lisina. Posteriormente, Kinzel y Bhattacharjee (1982), describieron por primera vez la purificación parcial y las propiedades de la pipecolato oxidasa de *R. glutinis*. La pipecolato oxidasa de *R. glutinis* presenta un peso molecular aproximado de 43 kDa, se caracteriza por ser soluble y tener un grupo sulfhidrilo esencial para su actividad. La detección de peróxido de hidrógeno indicó que la reacción de oxidación podía ser escrita como se indica a continuación: ácido pipecólico + O<sub>2</sub> →  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdehído + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, la capacidad que tiene la enzima purificada de oxidar el ácido pipecólico *in vitro* indicaba que, a diferencia de la pipecolato oxidasa de *Pseudomonas*, no requería de aceptores de electrones internos o de una cadena transportadora de electrones. Aunque para ese momento se había descrito que el ácido pipecólico estaba implicado en la biosíntesis de lisina en *A. nidulans* y en el alga *Euglena gracilis*, las bases bioquímicas, genéticas y enzimáticas de la conversión de ácido pipecólico en lisina solamente se habían determinado en *R. glutinis*.

#### ***Penicillium chrysogenum***

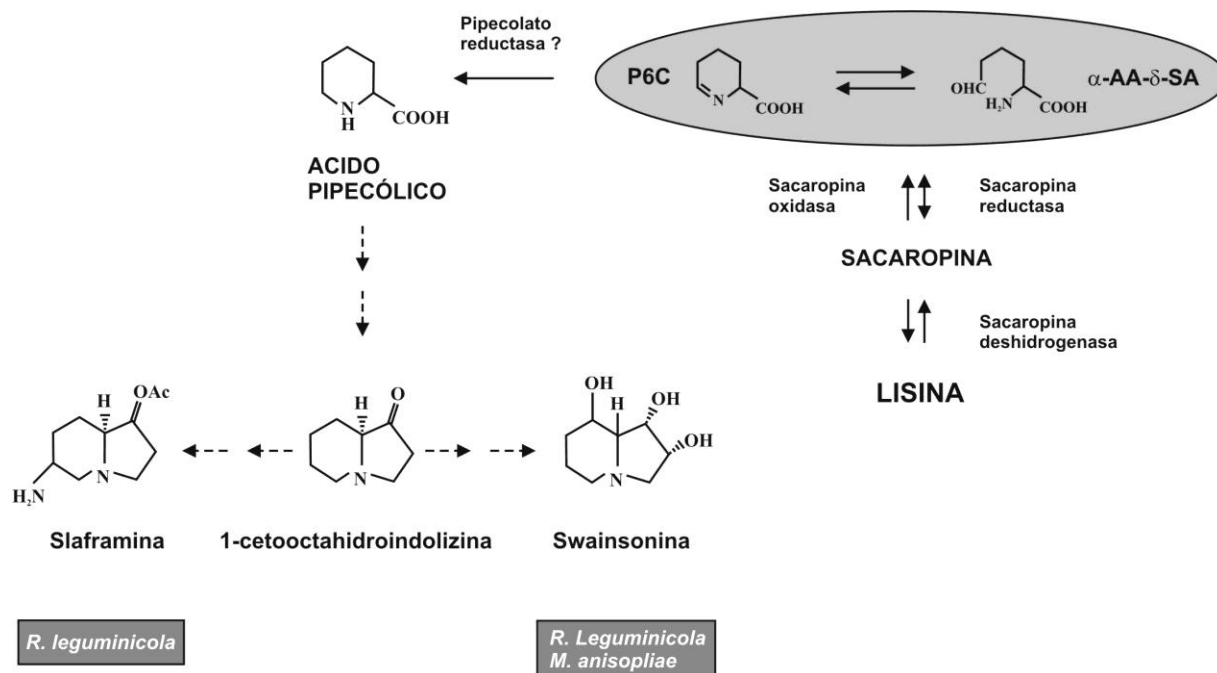
Naranjo et al. (2001) demostraron que *P. chrysogenum* es capaz de utilizar ácido pipecólico para complementar los requeri-

mientos nutricionales de varios mutantes auxótrofos de lisina (lys<sup>-</sup>). La clonación del gen que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* (denominado gen *lys7*), así como la caracterización bioquímica y molecular de mutantes auxótrofos de lisina que eran incapaces de utilizar ácido pipecólico para complementar dicha auxotrofia (lys<sup>-</sup>/Pip), permitió determinar que en este hongo filamentoso el ácido pipecólico se convierte en lisina a través de su conversión en ácido piperidín-6-carboxílico (P6C) por acción de la pipecolato oxidasa, y el P6C se convierte en sacaropina y lisina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa respectivamente (Fig. 1).

### **2.3. Biosíntesis de ácido pipecólico vía sacaropina**

#### ***Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola***

El interés de estudiar el metabolismo de lisina y del ácido pipecólico en *M. anisopliae* y el hongo parásito *R. leguminicola*, se basa en que estos aminoácidos están implicados en la biosíntesis de alcaloides octahidro-indolizínicos (Sim y Perry, 1997; Wickwire et al. 1990a, Wickwire et al. 1990b). A diferencia de *N. crassa*, donde la D-lisina es el precursor del ácido pipecólico (Fangmeier y Leistner, 1980), se ha descrito que en *M. anisopliae* y *R. leguminicola* la L-lisina es el precursor en la biosíntesis de ácido pipecólico (Wickwire et al. 1990a; Guengerich y Broquist, 1973; Sim y Perry, 1997). En estos hongos filamentosos, el ácido pipecólico es un producto del catabolismo de lisina y un precursor inmediato para la formación de alcaloides octahidroindolizínicos tales como: la slaframina (1S,6S,8aS-1-acetoxi-6-aminooctahidroindolizina) y la swainsonina (1,2,8-trihidroxi-8-hidroindolizina), tal como muestra la Figura 3.



**Figura 3.** Representación esquemática de la biosíntesis de ácido pipecólico vía sacaropina en los hongos filamentosos *Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola*. El ácido pipecólico deriva del catabolismo de L-lisina y es un precursor inmediato para la síntesis de alcaloides octahidroindolizínicos. Mientras que *R. leguminicola* es capaz de sintetizar ambos alcaloides, *M. anisopliae* solamente es capaz de producir swainsonina, un metabolito secundario que tiene una potente actividad antitumoral. α-AA-δ-SA: α-aminoadipato-δ-semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico.

La slaframina es un alcaloide con actividad parasimpatomimética, mientras que la swainsonina es un potente inhibidor de α-manosidasas que tiene una importante actividad antitumoral y es usado como agente quimioterapéutico en pacientes con cáncer (Sim y Perry, 1997; Goss *et al.* 1995; Dennis *et al.* 1990; Dennis, 1986; Humphries *et al.* 1986). Mientras que *R. leguminicola* es capaz de sintetizar ambos alcaloides, *M. anisopliae* solamente es capaz de producir swainsonina. Los resultados obtenidos por Wickwire *et al.* (1990a), Wickwire *et al.* (1990b) demostraron que en *R. leguminicola* el P6C se forma a partir del catabolismo de L-lisina; además, el P6C es el precursor inmediato del ácido pipecólico. Experimentos biológicos, bioquímicos y la identificación de los productos de las reacciones por espectrometría de masas o RMN, permitieron determinar inequívoca-

mente que el P6C, y no el P2C, se encuentra implicado en la conversión de L-lisina en ácido pipecólico en *R. leguminicola*. Por otro lado, Wickwire *et al.* (1990a), Wickwire *et al.* (1990b) también demostraron en *R. leguminicola* que la conversión de sacaropina en P6C no era catalizada por la acción de una sacaropina reductasa dependiente de NADP como se esperaba, sino que se llevaba a cabo por acción de una flavoenzima no descrita anteriormente a la que denominaron sacaropina oxidasa. La reacción llevada a cabo por la sacaropina oxidasa se resume a continuación:  $\text{Sacaropina} + \text{O}_2 \rightarrow \text{P6C} + \text{Glutamato} + \text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 2.4. Biosíntesis de ácido pipecólico vía ácido α-aminoadípico Hongos filamentosos

Se ha descrito en varios organismos que el ácido pipercolico se forma a través del catabolismo de lisina. Sin embargo, Aspen y Meister (1962) demostraron en *A. nidulans* que el ácido pipercolico deriva de la ruta biosintética de lisina (vía anabólica) y no de su catabolismo (Fig. 1). Estos autores, identificaron algunas mutantes auxótrofas de lisina de *A. nidulans* que eran capaces de acumular ácido pipercolico cuando crecían sobre medio mínimo con cantidades limitantes de lisina y que este procedía mayoritariamente del ácido  $\alpha$ -aminoadípico. Es interesante resaltar, que esta fue la primera evidencia descrita en hongos filamentosos de que el ácido pipercolico deriva de la ruta biosintética de lisina.

Más recientemente, Naranjo et al. (2004) demostraron que *P. chrysogenum* es capaz de sintetizar ácido pipercolico a partir del ácido  $\alpha$ -aminoadípico. El gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* fue interrumpido de manera dirigida por la técnica de la doble recombinación homóloga. La cepa interrumpida (denominada *P. chrysogenum* SR1<sup>-</sup>) carece de actividad sacaropina reductasa, la cual, se recupera después de la transformación de dicha mutante con el gen *lys7* intacto presente en un plásmido de replicación autónoma. La cepa *P. chrysogenum* SR1<sup>-</sup> es auxótrofa de lisina y acumula P6C. Cuando el mutante *P. chrysogenum* SR1<sup>-</sup> se crece con L-lisina como única fuente de nitrógeno y se añade ácido D, L- $\alpha$ -aminoadípico al medio de cultivo, se acumulan intracelularmente niveles altos de ácido pipercolico. La comparación de la cepa SR1<sup>-</sup> con una cepa interrumpida en el gen *lys2* que codifica la  $\alpha$ -aminoadipato reductasa, demostró que *P. chrysogenum* sintetiza ácido pipercolico a partir del ácido  $\alpha$ -aminoadípico y no a partir del catabolismo de lisina (Fig. 1). En *P. chrysogenum* la ruta de biosíntesis de ácido  $\alpha$ -aminoadípico es muy activa, por lo tanto,

este mutante podría ser utilizado para producir metabolitos secundarios de importancia farmacológica que contengan ácido pipercolico.

### 3. Algunas aplicaciones biotecnológicas del ácido pipercolico en la industria farmacológica

#### 3.1. Obtención de ácido pipercolico y sus derivados por biotransformación

La industria química fina (Fine Chemicals Industry) ha tenido un gran auge durante los últimos años, sobre todo en el área biofarmacéutica y de la agricultura (Stinson, 2000; Thayer, 2008). Mercian y Lonza, entre otras, son dos compañías farmacéuticas que se dedican a manufacturar químicos finos, entre ellos ácido pipercolico. El proceso de obtención de ácido pipercolico que emplea la compañía Mercian es un claro ejemplo del poder enantioselectivo de las bacterias. Este proceso se basa en utilizar una cepa recombinante de *E. coli* y L-lisina como iniciador para llevar a cabo la biotransformación de L-lisina a ácido pipercolico. Para lo cual, Fujii et al. (2002), insertaron en *E. coli* JM109 el gen *lat* de *Flavobacterium lutescens* que codifica la L-lisina-6-aminotransferasa (LAT) descrito previamente por Fujii et al. (2000). En este sistema, la LAT convierte L-lisina en P6C y éste se reduce a ácido pipercolico por acción de la P5C reductasa presente en el genoma de la bacteria. Los resultados obtenidos por Fujii et al. (2002), demostraron que ambas enzimas son necesarias para llevar a cabo la bioconversión de L-lisina a ácido pipercolico en *E. coli*. Por otro lado, el proceso de obtención de ácido pipercolico que emplea la compañía "Lonza" consiste en utilizar picolinonitrilo como iniciador de la biotransformación, el cual se convierte sucesivamente en picolinamida, pipercolamida racémico y finalmente en ácido pipercolico. El método usado en el

último paso de la conversión es la fermentación con especies de *Pseudomonas*. Un aspecto que se debe considerar se refiere al desarrollo del denominado “P6C World” usando biotransformación (Asano y Ito, 2002). Aunque la actividad enzimática implicada en la reducción de P6C a ácido pipecólico ha sido encontrada en varios microorganismos, no se ha podido caracterizar la enzima que cataliza dicha conversión, ya que su sustrato, el P6C, es un compuesto químicamente inestable (Fujii *et al.* 2002). No obstante, la compañía farmacológica “Mercian” (Fujii *et al.* 2002; Asano y Ito, 2002) actualmente está explorando el “P6C World” y obteniendo una colección de productos químicos útiles para la farmacología derivados del P6C usando biotransformación, entre dichos productos se encuentran: el ácido  $\alpha$ -aminoadípico y el ácido pipecólico.

La ruta del  $\alpha$ -aminodipato para la biosíntesis de lisina de *P. chrysogenum* es muy activa ya que el ácido  $\alpha$ -aminoadípico, un intermediario de la ruta, es un precursor esencial para la biosíntesis de penicilina. Además, se conoce que cepas de *P. chrysogenum* interrumpidas en el gen *lys2* que codifica la  $\alpha$ -aminoadipato reductasa acumulan niveles altos de ácido  $\alpha$ -aminoadípico (Casqueiro *et al.* 1998; 2001; 2002). Por otro lado, se ha descrito que la cepa de *P. chrysogenum* SR1, interrumpida en el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa, acumula niveles altos de P6C y de ácido pipecólico, por lo que podría utilizarse para producir metabolitos secundarios de importancia farmacológica que contengan ácido pipecólico (Naranjo *et al.* 2004).

### **3.2. El ácido pipecólico como osmoprotector**

Osmoprotectores son aquellos compuestos que son capaces de optimizar el crecimiento celular bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad. Los mecanismos de

osmoregulación son muy similares en todos los organismos vivos, incluyendo plantas, animales y bacterias. En respuesta a la elevada osmolaridad del ambiente, ellos acumulan concentraciones intracelulares relativamente altas de iones inorgánicos y solutos compatibles. Los solutos compatibles son moléculas orgánicas de bajo peso molecular recién sintetizadas, entre las se encuentra el ácido pipecólico. Luego de haber disminuido la osmolaridad ambiental, los compuestos compatibles pueden ser liberados al ambiente y subsecuentemente ser utilizados como osmoprotectores por otros organismos que se encuentren bajo estrés hiperosmótico (Gouffi *et al.* 2000; Bayles y Wilkinson, 2000). En bacterias, la capacidad osmoprotectora de ácido pipecólico ha sido solamente estudiada en *E. coli* (Gouesbet *et al.* 1994) y *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al.* 2000), donde se ha demostrado que la osmoprotección de las células al estrés salino solamente es efectivo cuando están presentes los dos isómeros del ácido pipecólico, mientras, que otros estudios señalan que es preferible usar un sólo enantiómero de la molécula como osmoprotector. En plantas, se ha descrito que el ácido pipecólico y sus derivados están relacionados con la adaptación osmótica en algunas leguminosas y especies xerófitas que se desarrollan en hábitats secos y alcalinos, sometidas a altas temperaturas y a severas y prolongadas épocas de sequía (Stewart y Larher, 1980; Romeo, 1988).

### **3.3. El ácido pipecólico como precursor de alcaloides octahidroindolizínicos**

En *R. leguminicola* y *M. anisopliae* se ha descrito que el ácido pipecólico es un intermediario del catabolismo de lisina y un precursor inmediato en la síntesis de alcaloides octahidroindolizínicos (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.* 1990a; Wickwire *et al.* 1990b). Estos alcaloides tienen interesantes aplicaciones en el campo

de la salud humana, como la swainsonina, que tiene una potente actividad antitumoral. En este sentido, se ha demostrado experimentalmente que inhibe la tasa de crecimiento de melanomas y metástasis humanos produciendo una mínima toxicidad cuando es administrada en pacientes con cáncer (Sim y Perry, 1997; Goss et al. 1995; Dennis et al. 1990; Dennis, 1986; Humphries et al. 1986). En estos hongos filamentosos, el catabolismo de lisina procede vía sacaropina (Fig. 3). Se ha observado que la adición de L-lisina a los caldos de cultivo de *M. anisopliae* incrementa significativamente la producción de swainsonina, lo cual indica que modificaciones genéticas en la ruta biosintética de lisina podrían inducir un aumento de la síntesis de dicho alcaloide en este microorganismo. Con el objetivo de monitorizar el efecto que producen los cambios en las condiciones de cultivo o las provocadas por modificaciones genéticas sobre la producción del metabolito secundario swainsonina, Sim y Perry (1997) desarrollaron métodos analíticos mediante HPLC con los que es posible estudiar los niveles intracelulares de cada uno de los metabolitos precursores de la swainsonina: lisina, sacaropina, ácido  $\alpha$ -aminoadípico y ácido piperólico.

### **3.4. El ácido piperólico como sustrato de péptidos sintetasas no-ribosomales (NRPS)**

Los péptidos sintetasas no ribosomales son proteínas que están organizadas en unidades funcionales interactivas denominadas módulos, los cuales catalizan un conjunto de reacciones catalíticas que llevan a la formación de un péptido (Doekel y Marahiel, 2001). La arquitectura modular entre los péptidos sintetasas no ribosomales (NRPS) y los poliquétidos sintetasas (PKS) presenta una fuerte analogía. De hecho, ambos sistemas se han encontrado combinados de manera natural (NRPS-PKS),

representando biofactorías que permiten obtener una diversidad estructural ampliamente extendida de productos naturales (Cane y Walsh, 1999). La primera mezcla NRPS-PKS fue identificada en la agrupación de genes biosintéticos de rapamicina en *Streptomyces hydroscopius* (Schwecke et al. 1995; Molnar et al. 1996). Esta mezcla NRPS-PKS consiste en un módulo de NRPS para la incorporación de ácido piperólico integrada en un PKS. Una organización análoga ha sido encontrada en la agrupación de genes biosintéticos de FK506 en *Streptomyces* sp. MA6548 (Motamedi y Shafiee, 1998). Se ha descrito que *S. hydroscopius* es capaz de sintetizar ácido piperólico a partir de L-lisina (Paiva et al. 1993). Además, se ha descrito en este microorganismo que el ácido piperólico es un precursor de la rapamicina (Molnar et al. 1996; Cheng y Demain, 1995). La adición de L-lisina a los caldos de cultivo de *S. hydroscopius* incrementa la producción de rapamicina en un 150 %, lo cual, puede ser debido a su conversión en ácido piperólico. En la actualidad, el ácido piperólico se utiliza como sustrato de algunas PKS en *S. hydroscopius* con los que se obtienen metabolitos secundarios (análogos de la rapamicina) con nuevas o incrementadas actividades farmacológicas, tales como: inmunosupresores, antitumorales y antifúngicos (Reynolds y Demain, 1997). Por otro lado, Nielsen et al. (1991), han descrito en *S. hydroscopius* var. *ascomyceticus* una enzima que activa ácido piperólico que se encuentra implicada en la biosíntesis de la inmunomicina, un inmunosupresor relacionado con FK506 en este microorganismo. En los últimos años se ha incrementado el número de secuencias descritas de NRPS. Basados en estos datos y en estudios bioquímicos avanzados, se puede obtener una sólida interpretación sobre los principios básicos de organización y arquitectura de los NRPS. El potencial de la

maquinaria biosintética se ha visto desarrollado por la reciente identificación de dominios enzimáticos integrados (Doekel y Marahiel, 2001). El estudio del principio de los mecanismos que integran los NRPS podría permitir la modificación racional de sus multi-dominios, lo cual, abriría un camino lleno de posibilidades para “rediseñar” productos naturales existentes y ampliar la complejidad química que nos ofrece la naturaleza (Doekel y Marahiel, 2001). Todo ello, permitiría enriquecer las alternativas terapéuticas actuales en la lucha contra las enfermedades en general.

#### **4. A. *platensis* como biofactoría para producir P6C, ácido piperólico y otros metabolitos secundarios de interés farmacológico**

Uno de los principales problemas con el desarrollo de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales es el hecho de que estas proveen un suministro limitado. A pesar de que las microalgas ofrecen ventajas comparativas en la denominada “fase de descubrimiento” de nuevos compuestos de interés biológico, la disponibilidad de procesos estandarizados se ve restringida (Olaizola, 2003). Se han investigado y propuesto diferentes aproximaciones fisiológicas y tecnológicas para maximizar la productividad del cultivo masivo de microalgas (Chaumont, 1993; Grobbelaar, 2000; Richmond 1996; 2000). En este sentido, los sistemas de producción de microalgas han sido clasificados en dos grandes grupos, i) los sistemas abiertos, los cuales, son principalmente canales de poca profundidad tipo “pista de carreras” en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y, ii) los sistemas cerrados (fotobiorreactores y biorreactores del tipo fermentadores), en los cuales el contacto con la atmósfera es limitado o nulo (Contreras-Flores *et al.* 2003). En el primer caso, biotecnólogos de

microalgas coinciden en el hecho de que el perfeccionamiento de la tecnología asociada a los sistemas de cultivo a cielo abierto llegó a su límite. La baja densidad celular obtenida en estos sistemas origina varios inconvenientes que incluyen: la baja productividad, fácil contaminación, costosa recuperación del producto de medios diluidos y la dificultad en el control de la temperatura. Además de los inconvenientes asociados a los sistemas de cultivo a cielo abierto, los fotobiorreactores cerrados presentan una serie de ventajas que incluyen: el cultivo en altas densidades, mayor control de las condiciones y mantenimiento de un cultivo puro, facilidad para la cosecha y un menor costo de inversión (Contreras-Flores *et al.* 2003). Sin embargo, y a pesar del consenso entre los biotecnólogos de microalgas de que la producción fotoautotrófica de metabolitos secundarios de alto valor industrial requiere del uso de fotobiorreactores cerrados y de su operación exitosa a nivel experimental, su utilización a nivel comercial es escasa y limitada a unas pocas especies (Olaizola, 2003).

Un aspecto que debe ser considerado en la producción microalgal masiva es la existencia de “restricciones” en el sistema “costo-productividad de biomasa”. En este sentido, el factor “costo de la tierra” es determinante tanto para el establecimiento de un sistema de producción microalgal abierto o cerrado. El costo por este recurso debe ser bajo por lo que generalmente se escogen sitios de bajo valor comercial, económico y agronómico, tales como: zonas desérticas, con baja fertilidad natural, tierras impactadas por la actividad antrópica o tierras baldías. Por lo tanto, independientemente del sistema de producción, el costo por este recurso deberá ser bajo. Por otro lado, se conoce que en los sistemas abiertos existen costos asociados al establecimiento y operación (transferencia de masa y agitación) que suelen ser más

altos, mientras, que los sistemas cerrados poseen costos menores “aguas abajo”, por alcanzar mayores densidades de cultivo. En cualquier caso, la consecuencia lógica es que la productividad volumétrica de biomasa tanto en los sistemas cerrados como abiertos debe ser lo suficientemente alta como para compensar estos costos. Más allá, los fotobiorreactores parecen ser la vía más prometedora para el futuro de la producción de microalgas a gran escala (para una revisión ver Olaizola, 2003).

Otros investigadores, por lo contrario, afirman que las cantidades producidas por unidad de área, tanto en fotobiorreactores como en sistemas abiertos, son comparables. Lee (2001) reporta que la principal limitación del crecimiento de microalgas a cielo abierto podría no estar en la captura de la energía lumínica, sino en los pasos para la conversión del carbono fotosintéticamente fijado en biomasa estructural. Por tanto, el diseño de fotobiorreactores podría estar alcanzando su límite en lo que se refiere a la reducción de los costos de producción. Una aproximación propuesta para lograr el aumento de la productividad es la combinación de sistemas de cultivo que combinen distintas formas de nutrición (fototrófica, heterotrófica, mixotrófica) de forma cíclica, dependiendo de los productos específicos que se requieran y de la duración de los ciclos de luz y oscuridad. Por último, Lee (1990; 2001) afirma que el sistema fotosintético y el metabolismo post-fotosintético requiere ser modificado genéticamente para vencer la limitación en la utilización de la energía lumínica para el crecimiento y formación de productos.

La utilización de las cianobacterias como factorías celulares para producir metabolitos secundarios con importantes actividades biológicas tales como antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas, agentes antitumorales, osmoprotectores, proteínas heterólogas, entre otros, representa un

especial interés para la industria farmacológica. En este sentido, Olaizola (2003) describe que el proceso para la producción de compuestos bioactivos contempla al menos dos etapas: 1) la identificación de nuevos compuestos, así como el mejoramiento de los ya identificados y; 2) desarrollo de sistemas de producción adecuados que permitan el escalamiento a nivel industrial. No obstante, el autor advierte que aunque las microalgas poseen una alta productividad primaria, muchos compuestos químicos de interés son producto del metabolismo secundario, este último activado en condiciones no conducentes al crecimiento rápido. Este hecho ha sido corroborado en la obtención de pigmentos de interés a partir de *A. platensis* (Rojas, comunicación personal). Aunado al aumento de la productividad volumétrica a nivel de fotobiorreactores, el incremento de la producción de compuestos químicos a partir de microalgas requiere de la obtención de nuevas cepas con características fisiológicas y bioquímicas mejoradas orientadas a incrementar: la velocidad de crecimiento, la tolerancia al estrés abiótico y el flujo metabólico de productos bioquímicos. Más allá, la ruta biosintética asociada a un determinado compuesto podría ser transferida a un organismo más fácilmente cultivable. La superproducción de metabolitos secundarios ha sido abordada habitualmente por mutagénesis clásica de las cepas de producción. Este método, aunque es muy laborioso, ha sido generalmente muy efectivo sobre todo para incrementar la producción de antibióticos en diversos hongos filamentosos (Gutiérrez *et al.* 2000). No obstante, los adelantos biotecnológicos proporcionan una vía mucho más racional y vanguardista para incrementar la eficiencia de los programas de mejora de cepas a través del uso de la ingeniería metabólica. Las tendencias de investigación más recientes



consideran que para mejorar la producción de un determinado compuesto hay que actuar, no sólo sobre la ruta de biosíntesis de dicho compuesto, sino adicionalmente sobre otras rutas que indirectamente pudieran afectar la primera, tales como rutas de secreción, transporte, regulación génica, etc. (Gutiérrez et al. 2000). Unas de las estrategias más utilizadas en ingeniería metabólica son: i) el incremento del número de copias de los genes de la ruta biosintética de interés y, ii) el incremento de la expresión de genes mediante el cambio de sus regiones promotoras por promotores de genes constitutivos o de genes de expresión fuerte del metabolismo secundario. Por otro lado, si se requiere modificar el flujo metabólico en alguna ruta biosintética con la finalidad de inducir la acumulación de algún metabolito de interés, se procede a la interrupción dirigida del gen asociado a su conversión enzimática mediante diversas técnicas moleculares tales como de recombinación simple o doble recombinación homóloga (Casqueiro et al. 1999b; Liu et al. 2001; Naranjo et al. 2004; 2005).

En este caso, para incrementar el flujo metabólico hacia la acumulación de P6C y biosíntesis de ácido piperólico en *A. platensis*, se propone la utilización de la tecnología del ADN recombinante. Se ha reportado que el ácido piperólico se forma a partir del metabolismo de lisina en diversos organismos incluyendo mamíferos, plantas, hongos, levaduras y bacterias. En hongos, el ácido piperólico se sintetiza vía ácido  $\alpha$ -aminoadípico a través de la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato (Aspen y Meister, 1962; Naranjo et al. 2004), mientras que en plantas el ácido piperólico se sintetiza vía sacaropina, a través del catabolismo de L-lisina (Goncalves-Butruille et al. 1996).

Partiendo del caso de que *A. platensis* posea una ruta similar a la del  $\alpha$ -aminoadipato para biosintetizar lisina y de que el ácido piperólico se sintetice vía ácido  $\alpha$ -

aminoadípico (Fig. 1), la desviación del flujo metabólico para la biosíntesis de lisina hacia la acumulación intracelular de P6C y ácido piperólico podría llevarse a cabo mediante la interrupción dirigida del gen que codifica la sacaropina reductasa; enzima dependiente de NADPH que cataliza la conversión de P6C y glutamato a sacaropina en la ruta del  $\alpha$ -aminoadipato (Johansson et al. 2000a; 2000b; Bhattacharjee, 1985; Naranjo et al. 2001; 2004). Dicha interrupción génica provocaría la acumulación de P6C, intermediario inmediato anterior a la sacaropina y precursor directo del ácido piperólico (Fig. 1). Así mismo, el suministro ajustado de ácido  $\alpha$ -aminoadípico a los caldos de cultivo podría incrementar la acumulación de P6C y de ácido piperólico.

Por otro lado, partiendo del caso de que *A. platensis* posea una ruta similar a la del ácido diaminopimélico para biosintetizar lisina y de que el ácido piperólico se sintetice vía sacaropina, a través del catabolismo de L-lisina (Fig. 3), sería aconsejable incrementar el número de copias de los genes estructurales que codifican la sacaropina deshidrogenasa, la sacaropina reductasa o ambos, a la vez que se suministre concentraciones ajustadas de L-lisina o sacaropina a los caldos de cultivo. Esto se debe a que dichos genes son responsables de las dos primeras reacciones enzimáticas de la ruta catabólica de L-lisina descrita tanto en plantas como en hongos filamentosos, donde la L-lisina se cataboliza en sacaropina y P6C mediante dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa y sacaropina reductasa, respectivamente. Posteriormente, el P6C podría reducirse a ácido piperólico mediante la acción de la piperolato reductasa (Fig.1).

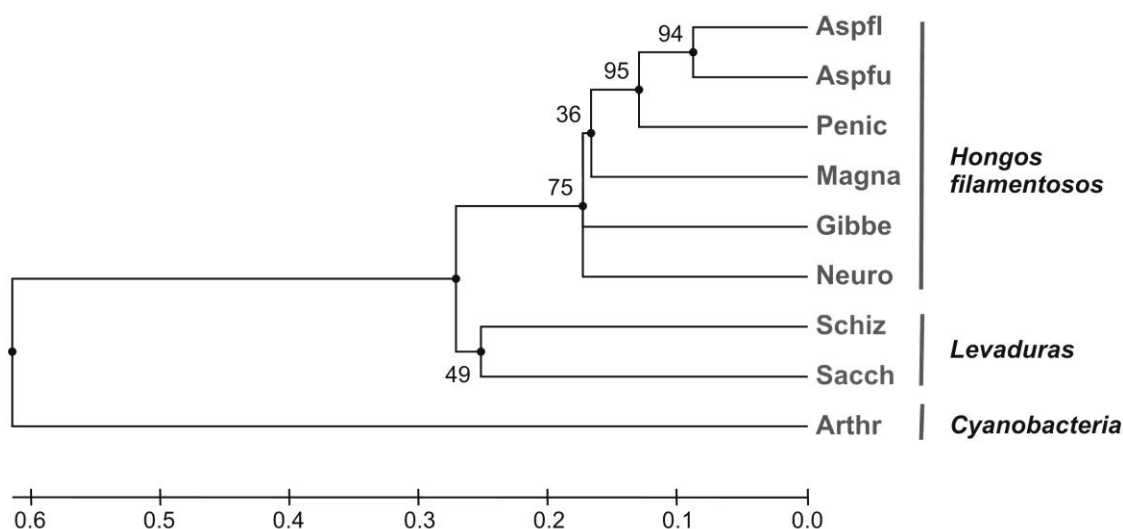
En este sentido, Naranjo y Moret (2008), llevaron a cabo el primer reporte sobre la identificación parcial de genes biosintéticos de lisina en cianobacterias. Para ello, se

amplificó por PCR un fragmento de ADN interno del gen que codifica hipotéticamente la sacaropina reductasa de la cepa *A. platensis* Lefevre 1963/M-132-1 (No. Acceso GenBank FJ798612) empleando los oligonucleótidos SR-F (5'-GACTTGGTGAT(C/T)TCGCTGAT(C/T)-3') y SR-R (5'-CTCGAACTTGTGCTGGAGCAT-3').

Dichos oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta las secuencias aminoacídicas de hongos y levaduras depositadas en el GeneBank, tales como: *Penicillium chrysogenum* (NCBI CAC87475; 449 aa); *Neurospora crassa* (NCBI CAC28679; 448 aa); *Magnaporthe grisea* (NCBI AAF91081; 450 aa); *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI P38999; 446 aa); y *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI Q09694; 450 aa), y el uso de codones reportado para *A. platensis* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=118562>).

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de una secuencia nucleotídica de 653 pb (No. Acceso GenBank FJ798613) en el genoma de *A. platensis* cepa Lefevre que muestra un 40% de identidad con los genes *lys7* y *lys3* que codifican la sacaropina reductasa de los hongos Ascomycetes *P. chrysogenum* y *M. grisea*, respectivamente. Así mismo, la búsqueda de secuencias de ADN homólogas a la clonada en *A. platensis* contra genomas de diferentes hongos depositados en Bases de Datos de acceso público, mostró la existencia de un marco abierto de lectura con una identidad de 40% en el genoma de *Neurospora crassa* (Broad Institute; ORF; No. Acceso XM\_956002)

que codifica una hipotética sacaropina reductasa. La figura 4 muestra un árbol filogenético obtenido por MEGA 3.1 (método Neighbour-Joining con Bootstrap de 2.000 repeticiones y el modelo Jukes Cantor) basado en el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas parciales de los genes que codifican la sacaropina reductasa de: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *P. chrysogenum*, *M. grisea*, *Gibberella zea*, *N. crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y la secuencia obtenida a partir del ADN genómico de la cepa *A. platensis* Lefevre. El árbol obtenido muestra dos grupos claramente definidos constituidos por las 6 especies de hongos filamentosos y las 2 especies de levaduras, los cuales se separan visiblemente entre sí y de *A. platensis* Lefevre. Tomando en cuenta que las secuencias de ADN estudiadas pertenecen a dos tipos celulares radicalmente diferentes, los hongos y levaduras (Eucariota) y la cyanobacteria en estudio (Procariota), es de esperarse la discriminación de estos debido a su evidente distancia evolutiva. Sin embargo, el porcentaje de identidad obtenido con los genes que codifican la sacaropina reductasa reportada en hongos y levaduras podrían sugerir que: i) el fragmento de ADN clonado corresponde a una región interna del gen que codifica la sacaropina reductasa de *A. platensis* y; ii) la existencia de una ruta similar a la del  $\alpha$ -aminoácido descrita en hongos presente en el genoma de esta cyanobacteria.



**Figura 4.** Árbol filogenético de fragmento de ADN clonado de *A. platensis* Lefevre y secuencias nucleotídicas internas de los genes que codifican sacaropinas reductasas en diversos hongos y levaduras. Nótese la presencia de 2 grupos bien diferenciados correspondientes a los hongos y las levaduras, separados entre sí y de la cianobacteria. **Aspfl:** *A. flavus*, **Aspfu:** *A. fumigatus*, **Penic:** *P. chrysogenum*, **Magna:** *M. grisea*, **Gibbe:** *G. zeae*, **Neuro:** *N. crassa*, **Schiz:** *S. pombe*, **Sacch:** *S. cerevisiae*, **Arthr:** *A. platensis* Lefevre.

No obstante, se debe tomar en cuenta que en plantas y animales se ha descrito que el catabolismo de L-lisina tiene lugar vía sacaropina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa (SDH) y la sacaropina reductasa (SR), las cuales son sintetizadas a partir de un único gen que codifica un polipéptido bifuncional (Epelbaum *et al.* 1997; Tang *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2000a, b). Así mismo, se ha descrito que existe una gran similitud entre las proteínas bifuncionales SR/SDH y las proteínas monofuncionales SR y SDH; y que en las proteínas bifuncionales SR/SDH los dominios SR y SDH se encuentran localizados en el extremo carboxilo terminal y en el extremo amino terminal de la proteína, respectivamente (Kemper *et al.* 1999). En este sentido, el alineamiento de la proteína monofuncional SR de *P. chrysogenum* con proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas (*Zea mays* y *Arabidopsis thaliana*) y animales (*Homo sapiens* y *Mus musculus*), reveló un porcentaje de identidad

considerable con la región carboxilo terminal de las proteínas bifuncionales estudiadas (28, 26, 31 y 31%, respectivamente) (Naranjo, 2003). Por lo tanto, los resultados obtenidos preliminarmente deberán confirmarse a través de sólidos experimentos moleculares y bioquímicos para determinar si el fragmento de ADN clonado en *A. platensis* corresponde realmente al gen que codifica la SR monofuncional en la ruta del  $\alpha$ -aminoacético para la biosíntesis de lisina o, por el contrario, se trata de un gen que codifica una proteína bifuncional SR/SDH asociada al catabolismo de la lisina, tal como ocurre en las plantas y animales (Goncalves-Butruille *et al.* 1996).

Por otra parte, desde el punto de vista productivo, existen ventajas comparativas de la utilización de *A. platensis* como posible factoría celular para producir P6C, ácido pipercolico u otros metabolitos secundarios de interés farmacológico, las cuales se resumen a continuación (Olguín, 2003; Olaizola, 2003; Hallmann, 2007):

- Fácilmente cultivable y cosechable a niveles industriales, tanto en sistemas abiertos como en cerrados,
- Ciclo de vida corto, con posibilidad de ser cultivada axénicamente,
- Cultivable en medios de bajo costo (inclusive aguas residuales),
- Alta productividad volumétrica,
- Capacidad de acumular compuestos de alto valor agregado y la fácil extracción de los mismos,
- Capacidad de crecer a valores de pH elevados, lo cual aumenta la probabilidad de mantener los cultivos monoalgales,
- Capacidad de algunas cepas de crecer bajo condiciones heterotróficas y mixotróficas,
- Capacidad de soportar altas temperaturas,
- Sumidero de gases que acompañan al CO<sub>2</sub> en los sistemas típicos de combustión (en caso de que sean usados para el cultivo y el secuestro de carbono), tales como los del tipo SO<sub>x</sub> y NO<sub>x</sub>,
- Presenta múltiples usos para la biomasa una vez extraídos los compuestos de interés.
- Ha sido ampliamente investigada desde múltiples puntos de vista (molecular, bioquímica, fisiológica y ecológica).

## 5. Conclusiones

El interés farmacológico sobre el estudio del ácido pipercolico radica en el hecho de que este iminoácido es un componente y precursor de la biosíntesis de una amplia diversidad de compuestos biológicamente activos. En la presente revisión se propone la utilización de *A. platensis* como posible factoría celular para producir P6C, ácido pipercolico u otros metabolitos secundarios con interesantes actividades farmacológicas, tales como antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas, agentes antitumorales, proteínas heterólogas, entre otros, los cuales tendrían una aplicación importante en el campo de la salud humana y animal.

## Reconocimientos

Este trabajo de investigación fue financiado por el Sub-Proyecto BID-FONACIT No. 2006000537 “Desarrollo y optimización del cultivo de microalgas promisorias en la nutrición animal (aves, porcinos, peces y camarones) y creación de la Red Venezolana de Investigación en Microalgas”, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Los autores agradecen a la Lic. Moret por su apoyo técnico.

## Referencias

- Asano, Y., y Ito, T. 2002. Selected abstract from the 5th Japanese Symposium on the Chemistry of Biocatálisis. ELSEVIER, *J Mol Catal B-Enzym* 18:173-197.
- Aspen, A.J., y Meister A. 1962. Conversion of  $\alpha$ -amino adipic acid to L-pipercolic acid by *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* 1:606-611.
- Baginsky, M.L., y Rodwell, V.W. 1967. Metabolism of pipercolic acid in a *Pseudomonas* species. V. Pipercolate oxidase and dehydrogenase. *J Bacteriol* 94(4):1034-1039.
- Bañuelos, O., Casqueiro, J., Fierro, F., Hijarrubia, M.J., Gutiérrez, S., Martín, J.F. 1999a. Characterization and lysine control expression of the lys1 gene of *Penicillium chrysogenum* encoding homocitrate synthase. *Gene* 226:51-59.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press Cambridge, UK.
- Belay, A., Ota Y., Miyakawa K. y Shimamatsu H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol* 5:235-241.
- Belay, A., Kato, T., Ota, Y. 1996. *Spirulina* (*Arthrospira*): potencial application as an animal feed supplement. *J Appl Phycol* 8:303-311.

- Bhattacharjee, J.K. 1985.  $\alpha$ -aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. In: Critical Reviews in Microbiology. CRC Press. Boca Ratón, FL, vol. 12, pp 131-151.
- Broquist, H.P. 1971. Lysine biosynthesis. *Methods Enzymol* 17:112-129.
- Casqueiro, J., Bañuelos, O., Gutiérrez, S., Hijarrubia, M. J., Martín, J.F. 1999b. Intrachromosomal recombination in *Penicillium chrysogenum*: Gene conversion and deletion events. *Mol Gen Genet* 261:994-1000.
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M.J., Martín, J.F. 1999a. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the lys2 gene leads to penicillin overproduction. *J Bacteriol* 181:1181-1188.
- Casqueiro, J., Bañuelos, O., Gutiérrez, S., Hijarrubia, M. J., Martín, J. F. 1999. Intrachromosomal recombination between direct repeats in *Penicillium chrysogenum*: gene conversion and deletion events. *Mol Gen Genet* 261:994-1000.
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Fierro, F., Velasco, J., Martín, J.F. 1998. Characterization of the lys2 gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-aminoadipic acid reductase. *Mol Gen Genet* 259(5):549-56.
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M.J., Martín, J.F. 1999. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the lys2 gene leads to penicillin overproduction. *J Bacteriol* 181(4):1181-8.
- Chang, Y.F., Ghosh, P., Rao, V.V. 1990. L-pipecolic acid metabolism in human liver: L- $\alpha$ -aminoadipate- $\delta$ -semialdehyde oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 8; 1038(3):300-305.
- Cheng, Y.R., Fang, A., Demain, A.L. 1995. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43(6):1096-8.
- Chisti, Y. 2007 Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294-306.
- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H. 2005. Biosorption of Cr<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* 59:75-84.
- Ciferri, O. y Tiboni, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Ann Rev Microbiol* 39:503-26
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, The edible microorganism. *Microbiol Rev* 47:551-78
- Colla, L.M., Oliveira, C., Reichert, C., Vieira, J.A. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technol* 98:1489-1493.
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J.M., Flores-Cotera L.B., y Cañizares-Villanueva, R.O. 2003. Avances en el Diseño Conceptual de Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 8(8):450-456.
- Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N. 2003. Natural Products (Secondary Metabolites). American Society of Plant Biologist, Chapter 24. [On line] <http://www.aspb.org/publications/biotext/intros/ch24.cfm>
- de Morais, M.G. y Costa, J.A.V. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol* 129:439-445
- Dennis, J.W. 1986. Effects of swainsonine and polyinosinic: polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* 46(10):5131-6.
- Dennis, J.W., Koch, K., Yousefi, S., y VanderElst, I. 1990. Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. *Cancer Res* 50(6):1867-72.
- Dodt, G., Kim, D.G., Reimann, S.A., Reuber, B., MacCabe, K., Gould, S., Mihalik, S. 2000. L-pipecolic acid oxidase, a human enzyme essential for the degradation of L-pipecolic

- acid, is most similar to the monomeric sarcosine oxidases. *Biochem J* 345:487-494.
- Doekel, S., y Marahiel, M.A. 2001. Biosíntesis of natural products on modular peptide synthetases. Review. *Metab Eng* 3:64-77.
- Fangmeier, N., y Leistner, E. 1980. A <sup>15</sup>N NMR study on D-lysine metabolism in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 255:10205-10209.
- Fujii, T., Aritoku, Y., Agematu, H., Tsunekawa, H. 2002b. Increase in the rate of L-pipecolic acid production using lat-expressing *Escherichia coli* by lysP and yeiE amplification. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(9):1981-1984.
- Fujii, T., Mukaihara, M., Agematu, H., y Tsunekawa, H. 2002. Biotransformation of L-lysine to L-pipecolic acid catalyzed by L-lysine 6-aminotransferase and pyrroline-5-carboxylate reductase. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:622-627.
- Fujii, T., Narita, T., Agematu, H., Agata, N., Isshiki, K. 2000. Cloning and characterization of pcd encoding delta<sup>c</sup>-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase from *Flavobacterium lutescens* IFO3084. *J Biochem (Tokyo)* 128(6):975-82.
- Fujioka, S., Sakuri, A., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., Takimoto, A. 1987. Isolation and identification of L-pipecolic acid and nicotinamide as flower-inducing substances in *Lemna*. *Plant Cell Physiol* 28:995-1003.
- Fujita, T., Hada, T., y Higashino, K. 1999. Origin of D- and L-pipecolic acid in human physiological fluids: a study of the catabolic mechanism to pipecolic acid using the lysine loading test. *Clin Chim Acta* 287:145-156.
- Galili, G. 1995. Regulation of lysine and threonine síntesis. *Plant Cell* 7:899-906.
- Garrad, R.C. y Bhattacharjee, J.K. 1992. Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned LYS1 gene of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 174:7379-7384.
- Glass, J. y Bhattacharjee, J.K. 1971. Biosynthesis of lysine in *Rhodotorula*: accumulation of homocitric, homoaconitic and homosicitric acids in a leaky mutant. *Genetics* 67:356.
- Grobbelaar, J.U. 2000. Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J Appl Phycol* 12:201-206.
- Goncalves-Butruille, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A., Arruda, P. 1996. Purification and characterization of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol* 110:765-771.
- Gong, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q., Liu, Z. 2005. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere* 58:125-13.
- Goss, P.E., Baker, M.A., Carver, J.P., Dennis, J.W. 1995. Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 1(19):935-44.
- Gouesbet, G. Jebbar, M., Talibart, R., Bernard, T., Blanco C. 1994. Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology* 140(Pt9):2415-22.
- Gouffi, K., Bernard T., Blanco C. 2000. Osmoprotection by pipecolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2358-64.
- Guengerich, F.P., y Broquist, H.P. 1973. Biosynthesis of slaframine (1S,6S,8aS)-1-acetoxy-6-aminooctahydroindolizine, a parasympathomimetic alkaloid of fungal origin. II. The origin of pipecolic acid. *Biochemistry* 12:4270-4274.
- Gutiérrez S., Casqueiro J., Martín, J.F. 2000. Filamentous fungi as cellular factories: Biodiversity of secondary metabolites. *Rev Iberoam Micol* 17(1):54-60.
- Hartline, R.A., y Rodwell, V.W. 1971. Metabolism of pipecolic acid in a *Pseudomonas* species. VI. Precursors of glutamate. *Arch Biochem Biophys* 142(1):32-39.

- Henrikson, R. 1989. Earth food *Spirulina*, Cited from Reolina Ltd., Ronore Enterprises Inc., Launa Beach, California, pp. 27-65.
- Higuchi, K., Suzuki, T., y Ashihara, H. 1995. Pipecolic acid from the developing fruits (pericarp and seeds) of *Coffea arabica* and *Camellia sinensis*. 16th Colloquium. Association Scientifique Internationale du café. ASIC Conference. Kyoto.
- Hijarrubia, M.J., Aparicio, J.F., Casqueiro, J., Martín, J.F. 2001. Characterization of the lys2 gene of *Acremonium chrysogenum* encoding a functional alpha-amino adipate activating and reducing enzyme. *Mol Gen Genet* 264(6):755-62.
- Humphries, P. 1986. Polymorphic DNA markers genetically linked to disease-causing genes: a review. *Ir. J Med Sci* 155(12): 425-30.
- IJlst, L., Kromme, I., Oostheim, W., Wanders, R.J. 2000. Molecular Cloning and Expression of Human L-Pipecolate Oxidase. *Biochem Bioph Res Co* 270:1101-1105.
- Izaddoost, M., Harris, B.G., Gracy, R.W. 1976. Structure and toxicity of alkaloids and amino acids of *Sophora secundiflora*. *J Pharm Sci* 65(3):352-4.
- Jaime, B., Artiles, A.M., Galindo, J., Fraga, I. 1996: Evaluación de alimentos micro-particulados en el cultivo larval de *Penaeus schmitti*. *Rev. Cub Invest Pesq* 20(2):22-24.
- Jaramillo, M.C. 2000. Acción Leishmanicida *in vitro* de la cáscara del fruto de *Annona muricata* y aislamiento y caracterización de compuestos activos de hoja de *Annona muricata* y *Momordica charantia*. Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB). Trabajo Especial de Grado de Maestría en Química. [En Internet] [http://investigacion.udea.edu.co/gru/consolidados/sustan\\_bioactivas9900.htm](http://investigacion.udea.edu.co/gru/consolidados/sustan_bioactivas9900.htm)
- Johansson, E., Steffens, J.J., Emptage, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. 2000a. Cloning, expression, purification and cristalization of saccharopine reductase from *Magnaporthe grisea*. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr* 56:662-664.
- Johansson, E., Steffens, J.J., Lindquist, Y., Schneider, G. 2000b. Crystal structure of saccharopine reductase from *Magnaporthe grisea*, an enzyme of the alpha-amino adipate pathway of lysine biosynthesis. *Struct Fold Des* 8:1037-1047.
- Juantorena, A.U., Sebastian, P.J., Santoyo, E., Gamboa, S.A., Lastres, O.D., Sánchez-Escamilla, D., Bustos, A., Eapen, D. 2007. Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis. *Int J Hydrogen Energ* 32:3133-3136.
- Khaw, L. E., Böhm, G. A., Metcalfe, S., Staunton, J., Leadlay, P. F. 1998. Mutational Biosynthesis of Novel Rapamycins by a Strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 Disrupted in rapL, Encoding a Putative Lysine Cyclodeaminase. *J Bacteriol* 180:809-814
- Kinzel, J. J., y Bhattacharjee, J. K. 1979. Role of Pipecolic Acid in the Biosynthesis of Lysine in *Rhodotorula glutinis*. *Bacteriol* 138:410-417.
- Kinzel, J. J., y Bhattacharjee, J. K. 1982. Lysine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*: properties of pipecolic acid oxidase. *J Bacteriol* 151:1073-1077.
- Kramar, R., Kremser, K., Schon, H. 1989. Peroxisomal oxidation of pipecolic acid in the rat. *J Clin Chem Clin Biochem* 27(5):319-321.
- Kurtz, M., y Bhattacharjee, J.K. 1975. Biosynthesis of lysine in *Rhodotorula glutinis*: role of pipecolic acid. *J Gen Microbiol* 86:103-110.
- Leisinger, T. 1987. Biosynthesis of proline. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. Low, K.B., Magasanic, B., Schaechter, M., y Umbarger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. In: "American Society for Microbiology". Washington, DC. pp.345-351.
- Lejohn, H.B. 1971. Enzyme regulation, lysine pathways, and cell structures as indicators of major lines of evolution in fungi. *Nature* 231 (5299):164-168.

- Leung, S.O., Yeung, H.W., Leung, K.N. 1987. The immunosuppressive activities of two abortifacient proteins isolated from the seeds of Bitter Melon (*Momordica charanti*). *Immunopharmacology* 13:159-71.
- Li, C.J., Brownson, D.M., Mabry, T.J., Perera, C., Bell, E.A. 1996. Nonprotein amino acids from sedes of *Cycas circinalis* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 42: 443-445.
- Lipok, J., Owsiak, T., Młynarz, P., Forlani, G., Kafarski, P. 2007. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme Microb Tech* 41:286-291.
- Lodi, A., Soletto, D., Solisio, C., Converti, A. 2007. Chromium(III) removal by *Spirulina platensis* biomass. *Chem Eng J* 136(2-3):152-155.
- Marlier, M., Dardenne, G., Casimir, J. 1979. 2S, 4R-carboxy-2-acetylamino-4-piperidin in the leaves of *Calliandra haematocephala*. *Phytochemistry* 18:479-481.
- Márquez F.J., Nishio N., Nagai S. 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. *J Chem Tech Biotechnol* 62:159-164.
- Márquez F.J., Sasaqui K., Kakizono T., Nishio N., Nagai S. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioengng* 75:408-410.
- Mihalik, S.J. y Rhead, W.J. 1989. L-pipecolic acid oxidation in the rabbit and cynomolgus monkey. Evidence for differing organellar locations and cofactor requirements in each species. *J Biol Chem* 264(5):2509-2517.
- Mihalik, S.J., McGuinness, M., Watkins, P.A. 1991. Purification and characterization of perioxosomal L-pipecolic acid oxidase from monkey liver. *J Biol Chem* 266:4822-4830.
- Mihalik, S.J. y Rhead, W.J. 1991. Species variation in organellar location and activity of L-pipecolic acid oxidation in mammals. *J Comp Physiol B* 160(6):671-676.
- Mihalik, S.J., Moser, H.W., Watkins, P.A., Danks, D.M., Poulos, A., Rhead, W.J. 1989. Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatric Res* 25(5):548-552.
- Mohn, F.N. 1988. Harvesting of micro-algal biomass. In: Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J. (Eds.), *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 395 p.
- Molnar, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., Konig, A., Staunton, J., Leadlay, P.F. 1996. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169(1): 1-7.
- Mosulishvili, L.M., Kirkesali, E.I., Belokobylsky, A.I., Khizanishvili, A.I., Frontasyeva, M.V., Pavlov, S.S., Gundorina, S.F. 2002. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *J Pharmaceut Biomed* 30:87-97.
- Motamedi, H. y Shafiee, A. 1998. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur. J Biochem* 256:528-534
- Naranjo, L., Martín de Valmaseda, E., Bañuelos, O., López, P., Riaño, J., Casqueiro, J., 2001. Conversion of pipecolic acid into lysine in *Penicillium chrysogenum* requires pipecolate oxidase and saccharopine reductase: characterization of the *lys7* gene encoding saccharopine reductase. *J Bacteriol* 183(24):7165-72.
- Naranjo, L., Martín de Valmaseda, E., Casqueiro, J., Ullán, R.V., Lamas-Maceiras, M. 2004. Inactivation of the *lys7* gene, encoding saccharopine reductase in *Penicillium chrysogenum*, leads to accumulation of the secondary metabolite precursors piperidine-6-carboxylic acid and pipecolic acid from alpha-amino adipic acid. *Appl Environ Microbiol* 70(2):1031-9.



- Naranjo, L.; Lamas-Maceiras, M., Ullán, R.V., Campoy, S., Teijeira, F., Casqueiro J., Martín, J.F. 2005. Characterization and expression studies of the *oat1* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an omega-aminotransferase: Induction by L-lysine, L-ornithine and L-arginine and repression by ammonium. *Mol Genet Genomics* 274(3):283-94.
- Naranjo, L., y Moret, J. 2008. Informe del Sub-Proyecto de Biotecnología N°: 2006000537 "Desarrollo y optimización del cultivo de microalgas promisorias en la nutrición animal (Aves, Porcinos, peces y Camarones) y creación de la "Red Biotecnológica Venezolana de Investigación en Microalgas". Componente Investigación y Desarrollo, Objetivo No. 9. Segundo Programa de Ciencia y Tecnología "Fortalecimiento del Sector Biotecnológico como apoyo a la Seguridad Alimentaria del País" Unidad Especial de Biotecnología (BID-FONACIT II).
- Naranjo, L. 2003. "Caracterización Bioquímica y Molecular del Metabolismo del Ácido Pipecólico en *Penicillium chrysogenum*". Trabajo especial para optar al título de doctor. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. España.
- Nielsen, J.B., Hsu, M.J., Byrne, K.M., Kaplan, L. 1991. Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: The enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry* 30:5789-5796.
- Norton, B.W. 2002. Anti-nutritive and toxic factors in forage tree legumes. In: R.C. Gutteridge & H.M. Shelton (eds.) Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture Chapter 4.3. [En Internet] <http://fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Publicat/Gutt-shel/x5556e01.htm>
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20:459-466
- Olguín, E.J. 2000. The cleaner production strategy applied to animal production. In: Olguín E.J., Sánchez G. and Hernández E. (eds), Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses. Taylor and Francis, London, pp. 227-243.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Angúlo-Guerrero, O., Hernández, E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on pig waste. *Bioresour Technol* 77:19-24.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Camacho, R., Mercado, G., Pérez, T.J. 1997. Production of *Spirulina* sp. in seawater supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:242-247.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Pérez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J Appl Phycol* 15:249-257, 2003.
- Pane, L., Solisio, C., Lodi, A., Luigi, Mariottini, G., Converti, A. 2008. Effect of extracts from *Spirulina platensis* bioaccumulating cadmium and zinc on L929 cells. *Ecotoxicol Environm Safety* 70(1):121-6
- Paiva, N.L., Demain, A.L. y Roberts, M.F. 1993. The cyclohexene moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Indust Microbiol* 12:423-428
- Payton, C.W. y Chang, Y.F. 1982.  $\Delta^1$ -piperideine-2-carboxylate reductase of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 149:864-871.
- Ramirez-Moreno, L., y Olvera Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp). *Interciencia* 31:657-663.
- Rao, V. V., Chang, Y. F. 1990a. L-Pipecolic acid metabolism in human liver: detection of L-pipecolic oxidase and identification of its reaction product. *Biochim Biophys Acta* 1038: 295-299.
- Rao, V., and Y. F. Chang. 1990b. L-pipecolic acid metabolism in human liver: L-alpha-amino adipate delta-semialdehyde

- oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1038:300-305.
- Rao, V.V., Tsai, M.J., Xiaoming, P., Chang, Y.F. 1993. L-pipecolic acid oxidation in rat: subcellular localization and developmental study. *Biochim Biophys Acta* 1164: 29-35.
- Reuber, B.E., Karl, C., Reimann, S.A. Mihalik, S.J., y Dodt, G. 1997. Cloning and functional expression of a mammalian gene for a peroxisomal sarcosine oxidase. *J Biol Chem* 272:6766-6776.
- Reynolds, K.A., y Demain, A.L. 1997. Rapamycin, FK506, and ascomycin-related compounds, pp. 497-520. *In: Biotechnology of Antibiotics*. Strohl, W.R. (Ed.). Marcel Dekker Inc, NY.
- Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC, Boca Raton: 528 pp.
- Richmond, A. 1996. Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: A survey. *J Appl Phycol* 8:381-387.
- Richmond, A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J Appl Phycol* 12:441-451.
- Romeo, J.T. 1984. Insecticidal amino acids in the leaves of *Calliandra*. *Biochem Syst Ecol* 12:293-297.
- Romeo, J.T. 1988. Functional multiplicity among nonprotein amino acids in *Mimosoid legumes*: a case against redundancy. *Ecoscience* 5(3). J. McNeil (Ed.) En Internet: ([http://www.bio.ulaval.ca/ecoscience/ARTICLE\\_ENG/vol5n3.htm](http://www.bio.ulaval.ca/ecoscience/ARTICLE_ENG/vol5n3.htm)).
- Rosenthal, G.A. 1982. Plant nonprotein amino acids. Biological, Biochemical and Toxicological Properties. Academic Press, New York.
- Rothstein, M. y Saffran, E.M. 1963. Lysine biosynthesis in algae. *Arch Biochem Biophys* 101:373.
- Salawu, M. B., Acamovic, T., Stewart, C. S. and Roothaert, R. L. 1999. Composition and degradability of different fractions of *Calliandra* leaves, pods and seeds. ELSEVIER. *Anim Feed Sci Tech* 77:181-199.
- Sánchez, M., Bernal, J., Rozo, C., Rodríguez, I. 2006. *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism. A Review. *Univ Sci* 8(1).
- Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnar, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J.B. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci* 92:7839-7843.
- Sim, K.L., & Perry, D. 1997. Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of *Metarhizium anisopliae*. *Glycoconjugate J.* 14:661-668.
- Singh, H., Usher, S., Poulos, A. 1989. Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyldihydroxyacetone phosphate synthase activities in rat liver subcellular fractions and human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 268(2):676-686.
- Singh, S., Kate, B.N., Banerjee, U.C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25:73-95.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87-96.
- Stafford, D.E., y Stephanopoulos, G., 2001. Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Curr Opin Microbiol* 4(3):336-340.
- Stewart, G. R., & F. Larher. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. *In: B.J. Mifflin (ed.) The Biochemistry of plants, vol. 5.* Academic Press, New York. p. 609-635.
- Stinson, S. 2000. Chiral Drugs. Science/Technology. Cover Story. American Chemical Society. Vol. 78, No. 43. pp.55-78. [En Internet] <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/7843/7843scit1.html>
- Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Reddy, M. C., Mallikarjuna Reddy, M., Rachamalla, A., Reddanna, P. 2009. Molecular mechanisms in

- C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* 68:453-462.
- Tang, G., Zhu, X., Tang, X., Galili, G. 2000. A novel composite locus of *Arabidopsis* encoding two polypeptides with metabolically related but distinct functions in lysine catabolism. *Plant J* 23(2):195-203.
- Teves, F., Lamas-Maceiras, M., García-Estrada, C., Casqueiro, J., Naranjo, L., Ullán, R.V., Scervino, J.M., Wu, X., Velasco-Conde, T., Martín, J.F. 2009. Transcriptional up-regulation of four genes of the lysine biosynthetic pathway by homocitrate accumulation in *Penicillium chrysogenum*: homocitrate as a sensor system of the pathway distress. *Microbiology* 155(pt 12):3881-92.
- Thajuddin, N., y Subramanian, G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr Sci* 89:47-57.
- Thayer, A. 2008. Optimism Prevails In Fine Chemicals. *Chemical & Engineering News*. American Chemical Society. January 28, 2008, Volume 86, Number 04, pp. 31-36. [En Internet] <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/86/8604cover3.html>
- Utsukihara, T., Okada, S., Kato, N., Horiuchi, C.A. 2007. Biotransformation of  $\alpha$ -bromo and  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dibromo alkanone to  $\alpha$ -hydroxyketone and  $\alpha$ -diketone by *Spirulina platensis*. *J Mol Catal B-Enzym* 45:68-72.
- Vogel, H. J. 1960. Two models of lysine synthesis among lower fungi: evolutionary significance. *Biochim Biophys Acta* 41:172.
- Wanders, R.J., Romeyn, G.J., van Roermund, C.W., Schutgens, R.B., van den Bosch, H., Tager, J.M. 1988. Identification of L-pipecolate oxidase in human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 154(1): 33-8.
- Wanders, R.J., Romeyn, G.J., Schutgens, R.B., Tager, J.M. 1989. L-pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem Biophys Res Commun* 164(1):550-555.
- Weidner, G., Stefan, B., Brakhage, A.A. 1997. The *Aspergillus nidulans* lysF gene encodes homoaconitase an enzyme involved in the fungus-specific lysine biosynthesis pathway. *Mol Gen Genet* 355:237-247.
- Wickwire, B.M., Harris, C.M., Harris, T.M., Broquist, H.P. 1990a. Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*; I. The lysine, saccharopine  $\Delta^1$ -piperidine-6-carboxylic acid pathway. *J Biol Chem* 265: 14742-14747.
- Wickwire, B.M., Wagner, C., Broquist H.P. 1990b. Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*. II. Saccharopine oxidase: a unique flavine enzyme involved in pipecolic acid biosynthesis. *J Biol Chem* 265: 14748-14753.
- Zhu, X., Tang, G., Galili, G. 2000a. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite AtLKR/SDH locus of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:1363-1372.
- Zhu, X., Tang, G., Galili, G. 2000b. The catabolic function of the alpha-amino adipic acid pathway in plants is associated with unidirectional activity of lysine-oxoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase. *Biochem J* 351(pt1):215-20.