



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Estudio de la Degradación Intracelular
del Polihidroxibutirato (PHB) en
Azotobacter Vinelandii”**

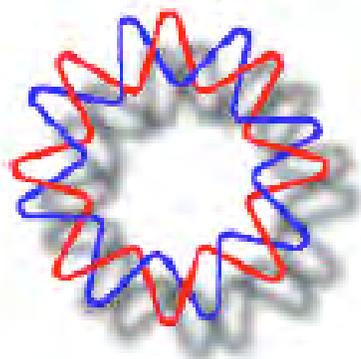
T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P r e s e n t a

I. B. Déborah Yanajara Parra



Cuernavaca, Morelos

Febrero de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología Molecular; en el laboratorio de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo y bajo la dirección del Dr. Daniel Segura González.

El proyecto se ejecutó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Proyecto IN221809, y del CONACyT, Fondo Ciencia Básica, Proyecto 127979.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo, por permitirme formar parte de su maravilloso grupo de trabajo.

A mi tutor, el Dr. Daniel Segura González, por su guía, enseñanzas, apoyo y sobre todo, por su enorme paciencia, durante mi formación académica.

A la Biol. Soledad Moreno León por su generosidad al por proporcionarme la cepa phbD, la cual fue parte muy importante del presente estudio.

De manera muy especial, agradezco a la M. en C. Josefina Guzmán Aparicio por su invaluable asesoría, supervisión y apoyo durante la realización del trabajo práctico en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial,

Dr. José Luis Puente García

Dr. Mario Soberón Chavez

Dr. Daniel Segura González

por contribuir con sus valiosas sugerencias al mejoramiento de este proyecto.

Al Dr. Cesar Batista y los miembros de la Unidad de Proteómica, por su trabajo en la identificación de las proteínas.

Al Dr. Paul Gaytán, M. en C. Santiago Becerra y demás miembros de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA por sintetizar los oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

A los miembros del Sínodo

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dr. Ismael Hernández Lucas

Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero

Dr. Juan Miranda Ríos

Y en especial, al Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, por las observaciones y sugerencias realizadas a este escrito.

Al M. en C. Luis Gabriel Contreras Ferrat, por las sugerencias durante la redacción de este trabajo de tesis.

Agradezco el apoyo económico de la beca otorgada por el CONACyT para la realización de los estudios de maestría.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
2.2 Biosíntesis del polihidroxiacetato	4
2.3 Organización y regulación transcripcional de los genes involucrados en la síntesis del PHB	5
2.4 Las phasinas	6
2.5 Degradación del PHB y otros PHAs	8
2.6 Estados físicos de los PHAs.	10
2.7 Las PHAs depolimerasas (PhaZ)	11
2.8 Aspectos relevantes sobre la degradación intracelular del PHB	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. JUSTIFICACIÓN	21
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1 Cepas, Plásmidos y Oligonucleótidos	23
8.2 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i> .	25
8.3 Reacciones de amplificación de genes	25
8.3.1 Amplificación de Avin27080 por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	25
8.3.2 Amplificación de Avin03910 y Avin34810 por PCR	26
8.4 Reacciones de digestión	26
8.4.1 Digestiones analíticas	26
8.4.2 Digestiones preparativas	26

8.5 Reacciones de purificación	26
8.5.1 Extracción de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i>	26
8.5.2 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)	27
8.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa (GeneClean)	28
8.6 Ligación de plásmidos e insertos digeridos	28
8.7 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	29
8.8 Preparación de células competentes	29
8.8.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método de CaCl ₂	29
8.8.2 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .	29
8.8.3 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	30
8.9 Transformación	30
8.9.1 Transformación de <i>E. coli</i> C41 por CaCl ₂	30
8.9.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por electroporación	30
8.9.3 <u>Transformación de <i>A. vinelandii</i></u>	30
8.10 Métodos de cuantificación	31
8.10.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	31
8.10.2 Cuantificación de PHB por conversión a ácido crotónico	31
8.11 Purificación de gránulos de PHB provenientes de <i>A. vinelandii</i>	32
8.11.1 Producción de gránulos nativos de PHB	32
8.11.2 Rompimiento celular mecánico con prensa tipo <i>French</i>	32
8.11.3 Ultracentrifugación con gradientes de glicerol de densidad discontinua	32
8.12 Espectrometría de masas por <i>Electro Spray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (ESI LC-MS)	33
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
9.1 Identificación de los genes de posibles PHB depolimerasas en <i>A. vinelandii</i>	34
9.2 Clonación de los genes identificados	39
9.3 Caracterización molecular del plásmido pDY27	39
9.4 Caracterización molecular del plásmido pDY34.	40
9.5 Caracterización molecular del plásmido pDY39	41
9.6 Generación de las mutantes DY27 y DY39 de <i>A. vinelandii</i>	41
9.7 Generación de la mutante phbD de <i>A. vinelandii</i>	42

9.8 Caracterización de las mutantes DY27, phbD y DY39	42
9.9 Experimento de depolimerización del PHB en la cepa UW136	45
9.10 Experimento de acumulación y movilización del PHB de las cepas UW136, DY27 y phbD.	46
9.11 Identificación de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB	50
X. CONCLUSIONES	57
XI. PERSPECTIVAS	59
XII. BIBLIOGRAFÍA	60
XIII. APÉNDICE	74

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Micrografía de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
2. Usos de los PHAs	2
3. Estructura molecular del polihidroxitirato	3
4. Esquema de la biosíntesis del PHB en <i>A. vinelandii</i>	5
5. Mapa genético del operón <i>phbBAC</i>	5
6. Esquema de la degradación del PHB en <i>A. vinelandii</i>	9
7. Esquema de los estados físicos de los PHAs	11
8. Clasificación de las PHAs depolimerasas	12
9. Diagrama del metabolismo del PHB	18
10. Estrategias experimentales	22
11. Mapa del plásmido pET24a(+)	24
12. Mapa del vector pCR 2.1-TOPO	25
13. Alineamiento del producto del gen <i>Avin27080</i> con la PHB depolimerasa PhaZ1 de <i>C. necator</i>	35
14. Mapa de la región cromosomal que contiene al gen <i>Avin03910</i>	36
15. Alineamiento del producto del gen <i>Avin34810</i> con la PHB depolimerasa PhaZd de <i>C. necator</i>	37
16. Alineamiento del producto del gen <i>Avin34810</i> con las depolimerasas extracelulares PhaZpst de <i>P. stutzeri</i> y PhaZ de <i>Pseudomonas</i> GM101	38
17. Productos de PCR de los genes <i>Avin27080</i> , <i>Avin34810</i> y <i>Avin03910</i> .	39
18. Construcción del plásmido pDY27	40
19. Construcción del plásmido pDY34	40
20. Construcción del plásmido pDY39	41
21. Digestión del plásmido pTOPO-3910::Gm con <i>SalI</i>	42
22. Fenotipos de las cepas UW136, DY27 y phbD	43
23. Fenotipo de la mutante DY39	44
24. Tipos celulares de las cepas UW136, DY27, phbD y DY39.	44
25. Experimento de depolimerización de PHB en la cepa UW136.	46
26. Experimento de acumulación del PHB en las cepas UW136, DY27 y phbD	47

27. Experimento de movilización del PHB en las cepas UW136, DY27 y phbD	48
28. SDS-PAGE de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB en <i>A. vinelandii</i>	50
29. Espectro del péptido perteneciente al producto génico de <i>Avin03910</i>	53
30. Mapa de la región cromosomal de <i>Avin34720</i> y la depolimerasa hipotética <i>Avin34710</i>	55
31. Alineamiento múltiple de proteínas OprI	55

ÍNDICE DE TABLAS

1. Cepas utilizadas en este trabajo	23
2. Plásmidos utilizados en este trabajo	23
3. Secuencias de Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	24
4. Proteínas identificadas en los gránulos de PHB mediante ESI LC-MS	51

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una de las bacterias que sintetizan polihidroxibutirato (PHB) como reserva de carbono y energía. Este material se almacena como gránulos intracelulares que se degradan durante períodos de deficiencia de nutrientes. Dichos gránulos poseen una cubierta compuesta por fosfolípidos, PHB sintetas, phasinas y PHB depolimerasas. El metabolismo del PHB es complejo, en él se coordinan ciclos de síntesis/degradación y participan las proteínas antes mencionadas. La síntesis del PHB en *A. vinelandii* se ha estudiado exhaustivamente. En contraste, la información sobre la degradación es escasa. Las enzimas que degradan el PHB son las PHB depolimerasas, y son específicas en cuanto a la composición y estado físico de su sustrato. El propósito de este trabajo fue identificar proteínas involucradas con la degradación intracelular del PHB en *A. vinelandii*. Para ello, se realizó un análisis *in silico* del genoma de este organismo y se escogieron para caracterizar los genes de depolimerasas hipotéticas *Avin27080*, *Avin34810* y *Avin03910*. Los genes se clonaron en el vector pET24a y se interrumpieron con cassetes de resistencia a antibiótico. Se generaron las mutantes DY27, phbD, DY39 en la cepa silvestre UW136 y se estudiaron sus fenotipos. Adicionalmente, se identificaron por espectrometría de masas las proteínas asociadas a gránulos de PHB en este organismo. Se encontraron varias proteínas que no están relacionadas con el metabolismo del PHB. De las proteínas involucradas en el metabolismo, se encontraron la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa que participan en la síntesis; la phasina que es el componente mayoritario de la cubierta de los gránulos y la depolimerasa de *Avin03910*, cuya mutante presentó un fenotipo de mayor acumulación de PHB. También encontraron el producto génico de *Avin34720*, cuya función es desconocida y que está ubicado junto al gen de la depolimerasa *Avin34710*; y la proteína de membrana externa OprI, cuya mutante presentó un fenotipo de menor acumulación del PHB.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii produces polyhydroxybutyrate (PHB) as a carbon and energy reservoir. This material is stored as intracellular granules that are degraded during nutrient-deficiency periods. PHB granules are covered with a layer composed by phospholipids and proteins; such as PHB synthases, phasins and PHB depolymerases. PHB metabolism is a complex cycle in which synthesis/degradation periods are coordinated, Synthesis of PHB in *A. vinelandii* has been extensively studied. In contrast, information related with degradation is scarce. PHB depolymerases are enzymes that realize degradation, they possess high specificity about substrate's physical state and composition. The purpose of this work was to identify proteins involved in intracellular degradation of PHB in *A. vinelandii*. An *in silico* analysis was made and sequences of hypothetical depolymerases *Avin27080*, *Avin34810* y *Avin03910* were selected for characterization. These genes were cloned in plasmid pET24a and interrupted with antibiotic resistance cassettes. Mutants DY27, *phbD* and DY39 were generated on UW136 wild type strain and their phenotypes were studied. Additionally, PHB granule associated proteins of this organism were identified by mass spectrometry. Some PHB metabolism non-related proteins were found on the granules surface. Proteins related with PHB metabolism were located, such acetoacetyl-CoA reductase and PHB synthase which are involved in synthesis; and phasin, the most abundant granule surface protein. They were also found depolymerase from *Avin03910* gene, which mutant showed a greater PHB accumulation phenotype; unknown function protein from *Avin34720*, which is located next to depolymerase gene *Avin34710*; and external membrane protein OprI, which mutant has a less PHB content phenotype.

I. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres naturales sintetizados por diversas especies de bacterias (Lee, 1995) y de arqueas (Poli *et al.*, 2011). Estos polímeros constituyen una reserva de carbono y de energía, que se acumula como gránulos intracelulares (Fig. 1) cuando se presentan un exceso de la fuente de carbono y la deficiencia de ciertos nutrientes como el nitrógeno, el oxígeno o el fósforo (Kessler y Witholt, 2001).



Figura 1. **Micrografía de *Azotobacter vinelandii*** con gránulos de PHB en su interior (Cortesía de L.F. Muriel).

Los PHAs han despertado un gran interés en el área industrial, debido a que poseen propiedades físicas muy similares a los termoplásticos derivados del petróleo, con la ventaja de que son biodegradables. Esto les confiere la posibilidad de utilizarse como materia prima para fabricar una amplia gama de productos comerciales (Fig.2), por ejemplo: utensilios desechables, fibras y biopelículas (Lenz y Marchessault, 2005).



Figura 2. **Usos de los PHAs.** A la izquierda, diferentes productos comerciales elaborados de PHAs. A la derecha, botellas fabricadas con PHAs en diferentes etapas de degradación a lo largo de 6 meses. (Madison y Huisman, 1999; Van der Walle *et al.*, 2001).

Los PHAs son polímeros constituidos por unidades de hidroxiacilos polimerizados en forma lineal. Hasta el momento se han identificado más de 100 hidroxialcanoatos (HAs) diferentes como componentes de estos poliésteres microbianos, siendo los más comunes el 3-hidroxibutirato (HB), 3-hidroxivalerato (HV), 3-hidroxihexanoato (HX) y 3-hidroxioctanoato (HO), con unidades de cuatro, cinco, seis y ocho carbonos respectivamente (Steinbüchel y Valentin, 1995). Los PHAs se clasifican por el número de átomos de carbono contenidos en sus monómeros. Los **PHAs de cadena corta (PHA_{SCL})** están conformados por hidroxiacilos de tres a cinco carbonos; los **PHAs de cadena mediana (PHA_{MCL})**, tienen monómeros de seis a 14 carbonos y los **PHAs de cadena larga (PHA_{LCL})** tienen unidades de más de 14 carbonos (Zinn *et al.*, 2001). Muchas bacterias sintetizan polímeros compuestos por más de un tipo de monómero, los cuales se conocen como copolímeros (Madison y Huisman, 1999).

Se han descrito más de 300 especies bacterianas capaces de producir PHAs (Lee, 1996). Sin embargo, solo algunas especies son capaces de acumular cantidades elevadas de estos polímeros. Entre ellas se encuentran *Cupriavidus necator* (antes *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, o *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Protomonas extorquens*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azotobacter vinelandii* y cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Choi y Lee, 1999).

El PHA más común y el principal polímero producido por la bacteria utilizada en este trabajo, *A. vinelandii*, es el polihidroxitirato (PHB, fig.3). Este compuesto puede representar hasta un 90% del peso seco de la bacteria (Page y Cornish, 1993). *A. vinelandii* también puede sintetizar un copolímero de hidroxibutirato e hidroxivalerato (poli[3-HB-co-3-HV]), con unidades de cuatro y cinco carbonos, respectivamente (Page *et al.*, 1992). La cantidad de PHB que puede producir esta bacteria depende de diversos factores, entre los que destacan la cantidad y tipo de nutrientes disponibles en el medio, los mecanismos de control que regulan la síntesis y la capacidad metabólica de la bacteria (Anderson y Dawes, 1990).

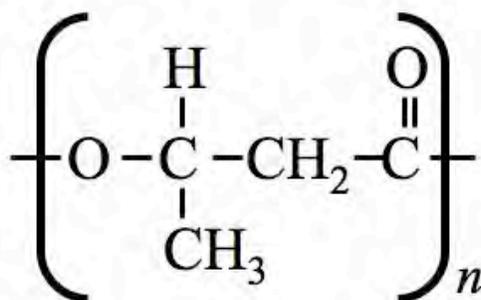


Figura 3. Estructura molecular del polihidroxitirato. (Lenz y Marchessault, 2005).

A. vinelandii es una especie muy atractiva desde el punto de vista biotecnológico, ya que exhibe una elevada producción de PHAs y puede utilizar sustratos de bajo costo, como los desechos agroindustriales; las melazas de caña y la remolacha; la peptona de pescado y los desechos provenientes de la porcicultura (Page y Knosp, 1989; Page, 1992; Chen y Page 1994; Page y Cornish, 1993), lo que indudablemente representa una ventaja, ya que disminuye los costos de producción y contribuye con el desarrollo sustentable.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii es una bacteria Gram-negativa de la rama de las gama-proteobacterias, móvil, con flagelos peritricos, que tiene como hábitat natural a los suelos y a las aguas continentales (Espín, 2006). El tamaño de la bacteria se encuentra en un rango de 1.5 a 2 μm de diámetro y es pleomórfica, ya que su morfología varía desde bacilos hasta cocos. Además, a esta especie bacteriana se le puede encontrar como células individuales, como pares o como agregados irregulares que pueden formar cadenas de tamaño variable. El metabolismo de *A. vinelandii* es quimioorganotrófico y aerobio, pero puede crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Esta especie se reproduce por fisión binaria y es poliploide (posee varias copias de su cromosoma; Maldonado *et al.*, 1994).

Esta bacteria ha sido objeto de estudio por presentar las siguientes características metabólicas: A) realiza fijación de nitrógeno atmosférico en presencia de oxígeno (Poole y Hill, 1997). B) posee alta capacidad respiratoria, que en condiciones diazotróficas (fijación de nitrógeno) es hasta diez veces mayor que la de *E. coli* (Espín, 2006). C) produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato. D) Experimenta un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación (Sadoff, 1975).

2.2 Biosíntesis del polihidroxibutirato.

En *A. vinelandii*, la biosíntesis de PHB (Fig. 4) se realiza a partir de acetil-coenzima A (CoA), por una ruta que involucra tres enzimas: la **β -cetotiolasa** que condensa dos moléculas de acetil-CoA para generar acetoacetil-CoA y está codificada por el gen *phbA*; la **acetoacetil-CoA reductasa** que reduce el acetoacetil-CoA a β -hidroxibutiril-CoA mediante NADPH y cuyo gen estructural es *phbB*, y, por último, la **PHB sintasa** que realiza la polimerización de β -hidroxibutiril-CoA y es producto del gen *phbC* (Manchak y Page, 1994).

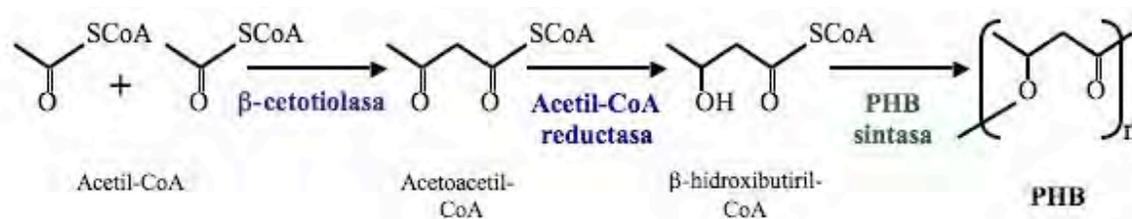


Figura 4. Esquema de la biosíntesis del PHB en *A. vinelandii*.

2.3 Organización y regulación transcripcional de los genes involucrados en la síntesis del PHB.

Los genes que codifican para estas enzimas forman el operón *phbBAC* (Fig. 5), cuya transcripción depende de 2 promotores sobrelapados, pB1 y pB2 (Peralta-Gil *et al.*, 2002). El producto génico de *phbR* actúa sobre el promotor pB1 como activador transcripcional. El gen *phbR* posee también 2 promotores: pR1, del cual no se conoce su regulación y pR2, que se induce en la fase estacionaria. Es posible que la inducción de pR2 dependa indirectamente de RpoS (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

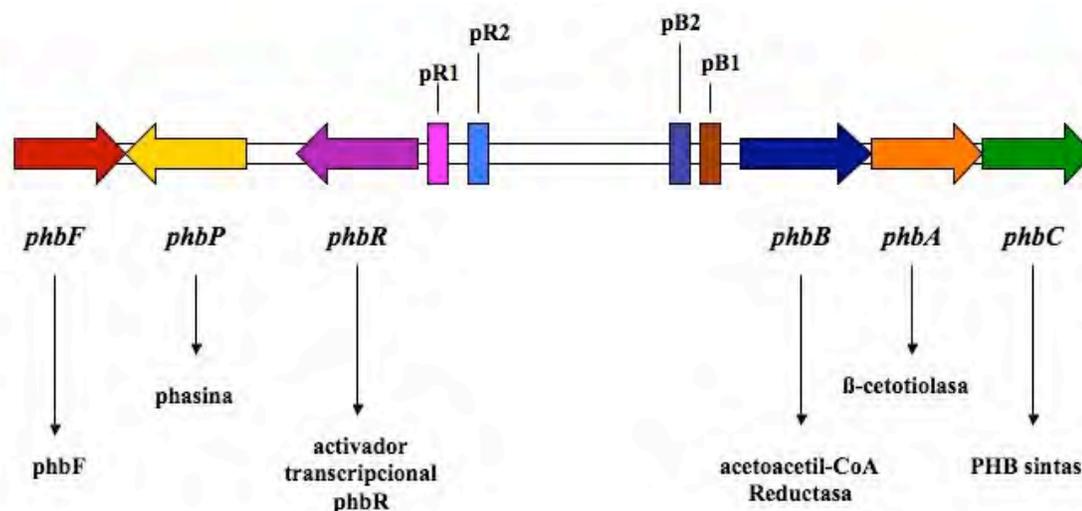


Figura 5. Mapa genético del operón *phbBAC*, del activador transcripcional *phbR*, del gen de la phasina, *phbP* y del regulador *phbF*.

En *A. vinelandii* existen otros genes relacionados con el metabolismo del PHB. Entre ellos destacan *phbP*, que codifica para la phasina, una proteína asociada a los gránulos de PHB y *phbF* (Fig. 5), un regulador putativo de *phbP* (Pettinari *et al.*, 2003). Se desconoce por

completo cómo se regula la expresión de estos genes. Se piensa que pueden compartir elementos del control de la expresión de los genes *phbBAC* y *phbR*.

La regulación de la biosíntesis del PHB en *A. vinelandii* es compleja: la expresión de los genes biosintéticos depende, como se indicó anteriormente, del activador PhbR y del factor sigma RpoS (Castañeda *et al.*, 2001). Participan también el sistema de la fosfotransferasa asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr}; Segura y Espín, 1998; Noguez *et al.*, 2008), el sistema de dos componentes GacS/GacA (Castañeda *et al.*, 2001) y el sistema RsmA/RsmZ (Cocotl, 2006; Hernández-Eligio, datos no publicados). Además de la regulación ejercida por todos estos componentes, existe un control alostérico de las enzimas biosintéticas, ya que la CoA libre inhibe a la β -cetotiolasa. Así, condiciones que favorecen la acumulación de este metabolito (ciclo de Krebs activo), disminuyen la síntesis de PHB (Senior y Dawes, 1973; Segura y Espín, 2004).

2.4 Las phasinas

Además de las enzimas que participan directamente en la biosíntesis de los PHAs, existen otras proteínas relacionadas con estos polímeros. Este es el caso de las llamadas phasinas, que son pequeños polipéptidos con un peso molecular entre 10 y 24 kDa y se han designado como PhaP. Se trata de un tipo de proteínas, aparentemente no catalíticas, compuestas por un dominio hidrofóbico que se asocia a la superficie de los gránulos de PHAs, y un dominio predominantemente hidrofílico que está expuesto al citoplasma. PhaP se adhiere con firmeza tanto a los gránulos nativos de PHAs, así como a los gránulos generados artificialmente (Pötter y Steinbüchel, 2005).

Las phasinas constituyen el componente mayoritario de la cubierta de los gránulos, se expresan preferentemente durante las condiciones de acumulación de los PHAs y pueden llegar a representar hasta el 5% del total de la proteína presente en los extractos celulares crudos de *C. necator* H16 (Wieczorek *et al.*, 1996). Estas proteínas reciben su nombre por analogía con las oleosinas, que son proteínas que recubren las inclusiones de los triacilglicerolos contenidos en las plantas (Steinbüchel *et al.*, 1995). En diversas bacterias los genes codificantes de las phasinas se han encontrado en el mismo locus de los genes

biosintéticos de PHAs (Liebergessel *et al.*, 1992; Valentin *et al.*, 1998), incluyendo a *A. vinelandii* (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

La función principal de las phasinas es actuar como barrera divisoria entre el polímero hidrófobo y el ambiente hidrofílico citoplásmico. La cubierta de PhaP estabiliza los gránulos de PHAs y previene el aglutinamiento de los gránulos dentro de la célula (Steinbüchel *et al.*, 1995). Mutantes de *C. necator* carentes de PhaP generaron un solo gránulo de PHB por célula, y la cantidad acumulada del polímero fue mucho menor en comparación con la cepa silvestre (Wieczorek *et al.*, 1996). Por otro lado, las células recombinantes que sobreexpresaron esta proteína generaron una mayor cantidad de gránulos de un tamaño muy pequeño (Pötter *et al.*, 2002). Con esto se demostró que las phasinas determinan la relación superficie/volumen de los gránulos de PHB dentro de la célula (Jendrosseck, 2009).

La expresión de las phasinas está regulada por el regulador transcripcional PhaR en *Rhodobacter sphaeroides* FJ1 (Chou *et al.*, 2009), *P. denitrificans* (Maehara *et al.*, 2001) y *C. necator* (York *et al.*, 2002), el cual ocasiona que la superficie de los gránulos de PHAs esté completamente cubierta por las phasinas, y que estas proteínas no se expresen en exceso (Pötter *et al.*, 2002).

Existen ejemplos de que algunas phasinas actúan como activadores de las depolimerasas intracelulares y/o de las sintasas en su función catalítica. Los experimentos *in vitro* realizados con la phasina ApdA (activator of polymer degradation) de *Rhodospirillum rubrum*, demostraron que la adición de esta proteína conlleva un aumento significativo en la actividad catalítica de la PhaZ de esta bacteria, utilizando como sustrato los gránulos de PHB aislados de diferentes organismos (Handrick *et al.*, 2004 b). También se observó en un ensayo *in vitro*, que al agregar PhaP1 (GA24) de *C. necator* hubo una disminución de la fase lag y un aumento del 50% en la actividad de la sintasa clase II de *Pseudomonas aeruginosa* (Qi *et al.*, 2000). Por otro lado, se demostró que en *C. necator* existe un complejo de 4 phasinas (PhaP1-4; Pötter *et al.*, 2004) de las cuales, PhaP1 afecta la tasa de movilización de PHB en este organismo (Kuchta *et al.*, 2007).

2.5 Degradación del PHB y otros PHAs.

Diversos microorganismos degradan el PHB y demás PHAs para los siguientes propósitos: obtener carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, realizar enquistamiento y esporulación, degradar compuestos tóxicos, y como fuente de poder reductor (Alameida *et al.*, 2004).

La degradación de los PHAs se debe diferenciar en dos tipos. La **degradación intracelular**, conocida también como movilización, es la utilización de los PHAs endógenos que almacenan los organismos productores. En cambio, la **degradación extracelular** consiste en la depolimerización de los PHAs exógenos que realizan organismos, no necesariamente productores, para utilizarlos como fuente de carbono. Estos polímeros se acumulan en el ambiente por la liberación de gránulos de los organismos productores muertos (Jendrosseck y Handrick, 2002; De Eugenio *et al.*, 2007).

La capacidad para degradar PHAs extracelulares está presente en muchas bacterias, por ejemplo: *Acidovorax facilis*, *Pseudomonas lemoignei* y *Variovorax paradoxus*, habitantes de los suelos; *Alcaligenes faecalis* y *Pseudomonas fluorescens*, que viven en lodos activados; *Comamonas testosteroni*, que vive en aguas marinas; *Ilyobacter delafieldii*, que se encuentra en lodos anaeróbicos; y *Pseudomonas stutzeri*, que proviene de aguas continentales (Lee, 1995). También son consumidores de estos polímeros varias especies de hongos como *Aspergillus ustus*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, que habitan en aguas marinas (Gonda *et al.*, 2000); y hongos terrestres que pertenecen a los phyla *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Myxomycota* (Matavulj y Molitoris, 1992). La existencia de numerosas especies con esta capacidad en diversos ecosistemas permite que los plásticos producidos a partir de PHB y otros PHAs sean biodegradados rápidamente en el ambiente.

Hayward y colaboradores (1959) observaron que el contenido intracelular de PHAs en organismos como *Rhizobium*, *Spirillum* y *Pseudomonas* spp. alcanza un máximo seguido por una disminución al inicio de la fase estacionaria. En otros experimentos se demostró que la

supervivencia de las bacterias en ausencia de una fuente exógena de carbono depende directamente del contenido intracelular de PHB (Jendrossek y Handrick, 2002).

La degradación del PHB en *A. vinelandii* se ilustra en la Figura 6. Este proceso se inicia con la hidrólisis de los enlaces éster, mediante enzimas especializadas denominadas **PHB depolimerasas**. Estas enzimas pueden liberar monómeros u oligómeros de β -hidroxibutirato. Los oligómeros se hidrolizan posteriormente a su unidad estructural por depolimerasas específicas llamadas **oligómero hidrolasas** (Kobayashi *et al.*, 2003). En *A. vinelandii* se desconoce si las depolimerasas liberan monómeros u oligómeros de hidroxibutirato. Posteriormente, la **β -hidroxibutirato deshidrogenasa** oxida el β -hidroxibutirato libre a acetoacetato y genera poder reductor (NADH). El acetoacetato resultante se activa con Coenzima A, proveniente de la succinil-CoA, mediante una **succinil-CoA transferasa**, obteniéndose acetoacetyl-CoA. El acetoacetyl-CoA producido se tioliza por una molécula de Coenzima A libre, por acción de la **β -cetotiolasa**, la misma enzima que realiza el primer paso de la biosíntesis (Fig. 5). El resultado final son dos moléculas de acetyl-CoA que se utilizan en el metabolismo según las necesidades de la bacteria (e.g. ciclo de Krebs, síntesis de ácidos grasos, o vía del glioxilato y gluconeogénesis; Manchak y Page, 1994).

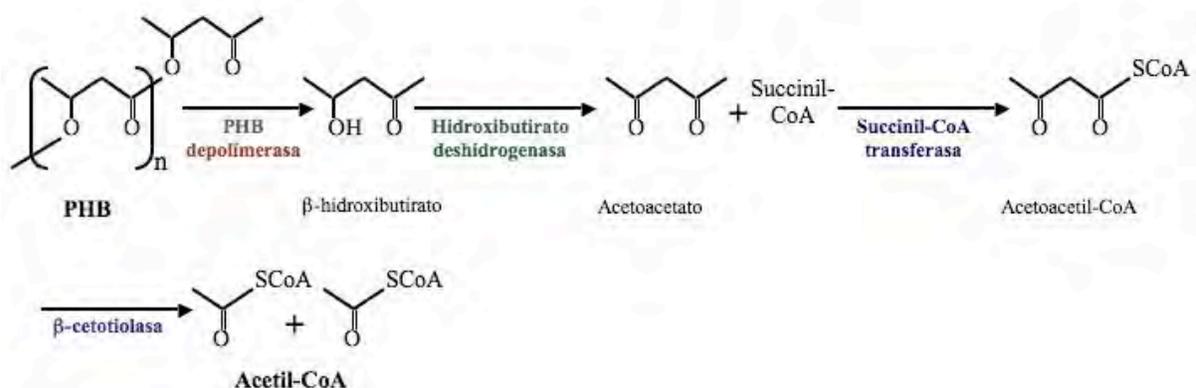


Figura 6. Esquema de la degradación del PHB en *A. vinelandii*.

A pesar de que en *A. vinelandii* se conocen numerosos detalles sobre la síntesis de PHAs y su regulación genética, se conoce muy poco sobre la degradación intracelular de PHB y de cómo se controla este proceso.

La regulación del catabolismo del PHB en este organismo se ha estudiado únicamente a nivel del control alostérico de las enzimas involucradas en la degradación (Manchak y Page, 1994). Al respecto, se conoce que el principal punto de control alostérico ocurre a nivel de la β -cetotiolasa que funciona como el primer paso de la biosíntesis o último de la degradación (Fig. 6), dependiendo de la relación entre las concentraciones de acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA y CoA libre. Sin embargo, existe evidencia de que el regulador transcripcional CytR, además de regular la expresión de los genes biosintéticos, está involucrado en el control de la expresión de al menos una de las enzimas de catabolismo de PHB: la succinyl-CoA transferasa (Wu *et al.*, 2001). Adicionalmente, datos de proteómica de una mutante de *A. vinelandii* en el sistema PTS^{Ntr} , indican que este regulador de la biosíntesis de PHB también controla la succinyl-CoA transferasa (Noguez *et al.*, datos no publicados).

2.6 Estados físicos de los PHAs.

Los PHAs pueden adquirir diferentes conformaciones que dependen principalmente de su localización intra o extracelular y del grado de ordenamiento entre las moléculas (Jendrossek y Handrick, 2002). Esto hace que existan distintos estados físicos del polímero. Así, los PHAs se pueden encontrar en estado nativo, en estado desnaturalizado o cristalino, y como PHA artificial (Fig. 7).

El estado nativo (nPHA) es el que poseen los PHAs *in vivo*. El polímero que conforma los gránulos se encuentra en un estado amorfo. Los gránulos de nPHA están formados por moléculas altamente móviles con una configuración desordenada. La superficie de dichos gránulos se encuentra cubierta por una capa compuesta principalmente de proteínas (phasinas PHA sintasas, PHA depolimerasas) y de fosfolípidos (Pöter *et al.*, 2004; Pöter y Steinbüchel, 2005).

El estado desnaturalizado o cristalino (dPHA) se presenta en PHAs liberados al ambiente tras la lisis celular de los organismos productores. El polímero adquiere una estructura helicoidal ordenada y desarrolla una fase cristalina. Los gránulos carecen de la capa de fosfolípidos y proteínas (Merrick y Doudoroff 1964; Cornibert y Marchessault 1972).

El **PHA artificial (aPHA)**, producto de un proceso sintético en el laboratorio, tiene una configuración amorfa. Esto se consigue disolviendo el PHA en un solvente y emulsificando con una solución de agente surfactante como dodecil sulfato de sodio (SDS) (Marchessault y Saracovan 1995; Merrick *et al.*, 1999). La suspensión de gránulos amorfos del polímero se obtiene tras la evaporación del solvente.

Estados físicos de los PHAs

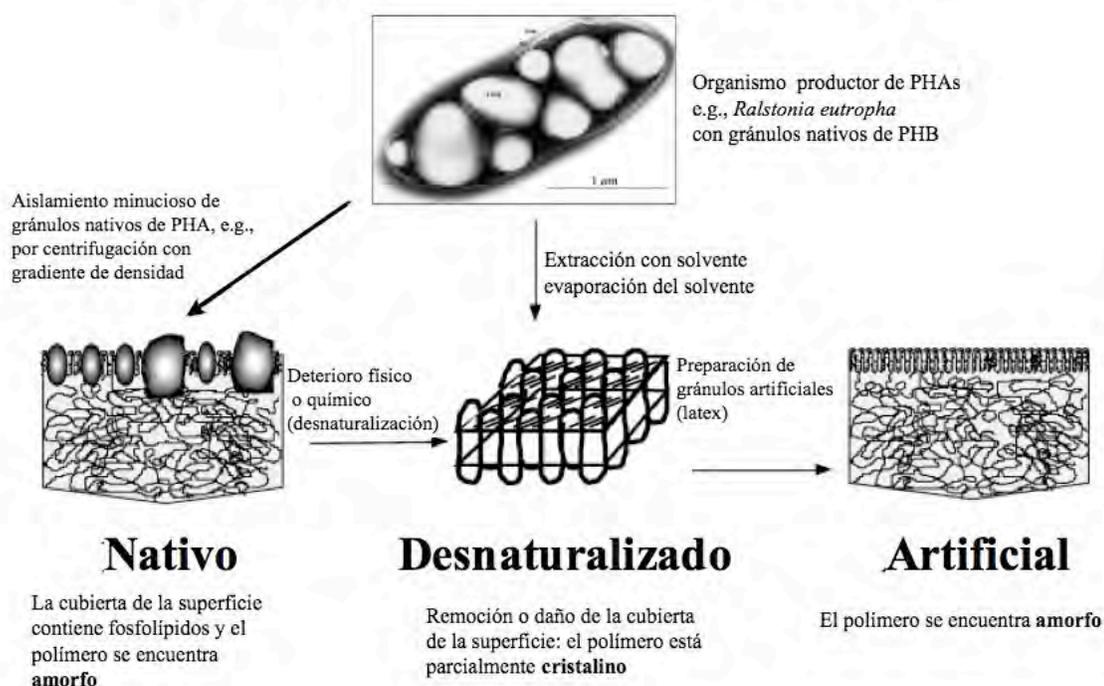


Figura 7. Esquema de los estados físicos de los PHAs. (Fuente: Jendrossek y Handrick, 2002).

2.7 Las PHAs depolimerasas (PhaZ)

Las PHAs depolimerasas son carboxiesterasas (EC 3.1.1.75 y 3.1.1.76) de la familia de las hidrolasas con plegamiento tipo α/β (Knoll *et al.*, 2009), cuya función consiste en liberar monómeros u oligómeros de los 3-hidroxicanoatos con configuración (R), mediante el rompimiento de sus enlaces éster (Abe y Doi 1996; Bachmann y Seebach, 1999; Doi *et al.*, 1992; Handrick *et al.*, 2001; Handrick *et al.*, 2004a). Hasta la fecha no se han encontrado depolimerasas capaces de degradar los enlaces éster de los polímeros con configuración (S) (Jendrossek y Handrick 2002). A las enzimas que realizan la depolimerización de los PHAs se

les ha designado PhaZ y son muy específicas en cuanto al estado físico del polímero que degradan, así como a la longitud del polímero y a las unidades estructurales que los conforman (Jaeger *et al.*, 1995).

En general, la mayoría de las depolimerasas realizan su función mediante una tríada catalítica compuesta por histidina, aspartato y serina. Este último residuo se encuentra dentro de una firma característica, llamada caja lipasa, con la siguiente configuración Gly-X₁-Ser-X₂-Gly (Jendrossek *et al.*, 1996; Tokiwa y Calabia, 2004; Knoll *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de la tríada es el siguiente: el grupo hidroxilo de la serina se desprotona y realiza un ataque nucleofílico en el átomo de carbono del enlace éster del polímero; mientras que la histidina y el aspartato estabilizan el estado desprotonado de la cadena lateral de la serina (De Eugenio *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha encontrado un residuo no catalítico de histidina conservado cerca de la cavidad oxianiónica, análogo a aquel que se encuentra en las lipasas. (Jaeger *et al.*, 1995; Jendrossek y Handrick 2002).

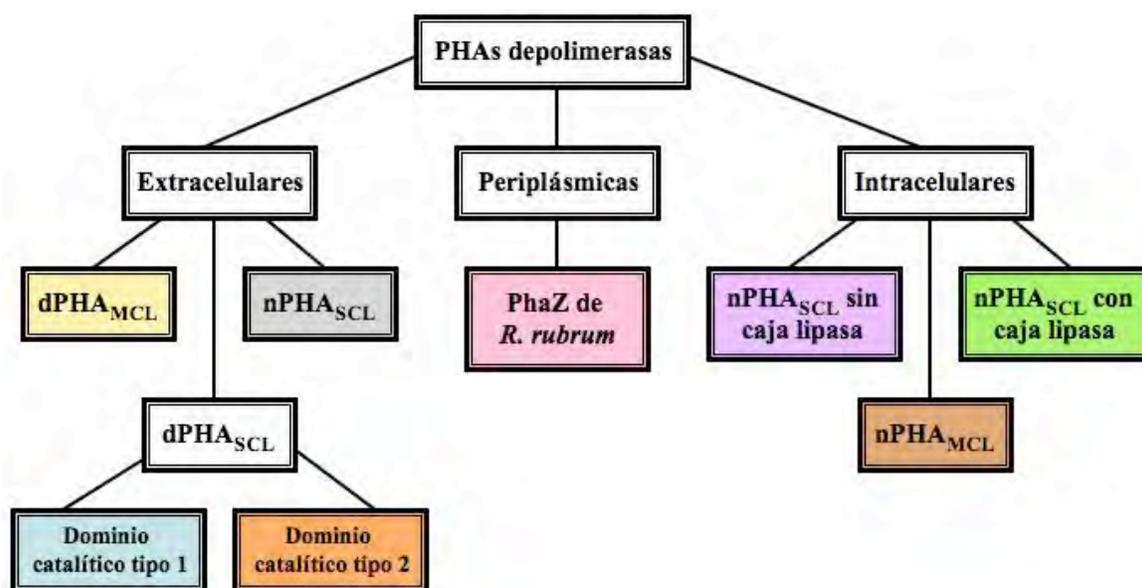


Figura 8. Clasificación de las PHAs depolimerasas (basado en información de Knoll *et al.*, 2009). En color se resaltan las ocho superfamilias en las que se agrupan actualmente estas enzimas.

Hasta la fecha, las PHAs depolimerasas se clasifican en tres tipos principales según su localización, con un total de ocho superfamilias dependiendo del tipo de PHAs

depolimerizado (nPHAs o dPHAs) y la composición monomérica del PHA degradado (SCL o MCL; Fig. 8; Knoll *et al.*, 2009); y 38 familias homólogas basadas en la similitud de las secuencias, que agrupan a un total de 587 depolimerasas ingresadas en la base de datos de la *Depolymerase Engineering Database* (DED). De estas familias homólogas, 33 están repartidas entre 3 superfamilias y existen 2 superfamilias integradas por un solo miembro.

1.-Las Depolimerasas extracelulares se encuentran tanto en microorganismos no productores de PHAs como en algunas especies productoras. Estas enzimas se transportan al exterior de la célula mediante un péptido señal de 22-58 residuos, el cual se elimina al pasar por la membrana plasmática. La mayoría comparten las siguientes características (Jendrossek, 2001):

1. Presentan alta estabilidad en amplios rangos de pH, de temperatura y de fuerza iónica (disolventes).
2. Su peso molecular es relativamente pequeño (<70 kDa) y consisten usualmente de un solo polipéptido.
3. Su pH óptimo es alcalino (7.5 a 9.8) con excepción de las depolimerasas de *Ralstonia pickettii*, *Penicillium funiculosum* y *Paecilomyces lilacinus*, cuyo rango óptimo de pH se encuentra de 5.5 a 7.0.
4. Se afectan por inhibidores de las serina-hidrolasas y por agentes reductores como ditioeritritol (DTT), lo que indica la presencia de puentes disulfuro esenciales, y
5. Tienen una fuerte afinidad por materiales hidrofóbicos.

La superfamilia de las **depolimerasas extracelulares de dPHA_{SCL} con dominio catalítico tipo 1**, compuesta por 16 familias homólogas, consisten en polipéptidos con elementos muy definidos: La proteína madura tiene el sitio catalítico en el extremo N terminal, donde se ubica la tríada catalítica Ser-Asp-His. La serina forma parte de una caja lipasa con configuración G-L-S-A/S-G que se localiza en el centro del dominio catalítico (aminoácidos 110 a 140) (Jendrossek y Handrick, 2001) y una cavidad oxianiónica en el lado N terminal con respecto a la caja lipasa (Jendrossek *et al.*, 1996). En el C-terminal se encuentra un sitio de unión a sustrato específico para la conformación de dPHA. Si se elimina este sitio, la enzima pierde su habilidad para unirse al polímero y por ende de hidrolizarlo (Fukui *et al.*, 1988). Estas depolimerasas poseen una región de enlace que conecta el N-terminal con el C-terminal, el cual puede ser de tres tipos: conector rico en treonina, como el de PhaZ1 de *P. legmoinei*; conector con una firma de fibronectina tipo III (Fn3) presente en la PhaZ de *R. pickettii*, y, por último, un conector tipo cadherina como el de PhaZ de *P. stutzeri*. La función de este dominio

de enlace se desconoce, sin embargo, existe la teoría de que necesario para mantener una distancia adecuada entre el sitio de unión al sustrato y el dominio catalítico de la enzima (Jendrossek y Handrick, 2002). Los productos finales usuales de este tipo de enzimas son oligómeros de 3HA (Jendrossek y Handrick, 2001).

Las **depolimerasas extracelulares de dPHA_{SCL} con dominio catalítico tipo 2**, donde se agrupan 8 familias homólogas, poseen los mismos elementos que las depolimerasas extracelulares de dominio catalítico tipo 1, con la diferencia de que su caja lipasa se encuentra en la región N- terminal, entre los residuos 20-25. El producto final de estas enzimas son monómeros de 3HB (Jendrossek y Handrick, 2001). Algunos ejemplos de estas depolimerasas son las PhaZs de *Delftia acidovorans* (Kasuya *et al.*, 1997), *Schlegelella* sp. KB1a (Romen *et al.*, 2004) *Streptomyces exfoliatus* (Klingbeil *et al.*, 1996) y *P. funiculosum* (Brucato y Wong, 1991).

Depolimerasas extracelulares de nPHA_{SCL}. Esta superfamilia posee un único miembro caracterizado, se trata de la PhaZ7 de *Paucimonas legmoinei* que no tiene homología con ninguna otra PHB depolimerasa, pero recientemente se determinó su estructura cristalográfica (Papageorgiu *et al.*, 2008). Esta enzima es específica para gránulos nativos (amorfo) de PHB y de PHV, así como oligómeros de seis o más unidades de 3HB. No reconoce como sustrato al polímero desnaturalizado a pesar de ser una enzima extracelular. Los productos principales de la hidrólisis enzimática son pentámeros de 3HB y 3HV. Presenta una mayor estabilidad y actividad catalítica a 60°C y tiene un pH óptimo de 12. Esta proteína solo presenta identidad en pequeñas secuencias relacionadas con el sitio activo de las serin-hidrolasas y no posee puentes disulfuro esenciales. Su caja lipasa tiene el motivo A-H-S-M-G, propia de las lipasas del género *Bacillus* (Handrick *et al.*, 2001).

Las **depolimerasas extracelulares de dPHA_{MCL}** son específicas para PHAs con monómeros de cadena media con más de seis carbonos en estado desnaturalizado (cristalino) y para los ésteres solubles como los p-nitrofenilacil-ésteres (Schirmer *et al.*, 1993). En contraste con las depolimerasas de cadena corta, la triada catalítica Ser-Asp-His se encuentra en el C-terminal y se piensa que la región N-terminal de la proteína porta el sitio de unión a sustrato (Jendrossek

et al., 1997). La enzima no se inhibe con DTT ni con EDTA, lo que sugiere que no cuenta con puentes disulfuro esenciales. Tampoco parece ser dependiente de Ca^{++} u otros cationes divalentes (Jendrossek *et al.*, 1997). Pertenecen a esta superfamilia de enzimas las depolimerasas de *P. alcaligenes* y *P. fluorescens*.

2.- Depolimerasas periplásmicas. Esta clase contiene exclusivamente la PhaZ1 de *R. rubrum*, la cual se clasificó aparte por su extraña localización en el periplasma y sus características inusuales. Esta enzima es específica para PHB nativo y oligómeros de tres unidades de HB en adelante. Sin embargo, su secuencia de aminoácidos es muy similar a aquellas de las depolimerasas extracelulares con dominio catalítico de tipo 1, con una caja lipasa. Posee un péptido señal de 23 residuos, para su transporte al periplasma. El pH óptimo para su actividad es 9.5. Para que realice su actividad catalítica se requiere de la presencia de un activador termoestable (PhaP) o de un pre-tratamiento del sustrato con tripsina (Handrick *et al.*, 2004a). Presenta principalmente actividad endo-hidrolasa. Se sugiere que esta enzima es una serina-hidrolasa, debido a que el diisopropilfluorofosfato inhibe casi por completo su actividad (Handrick *et al.*, 2004b).

3.- Las Depolimerasas intracelulares degradan PHAs endógenos y, por tanto, son exclusivas de los organismos productores de estos polímeros. Estas enzimas se localizan en el citoplasma y forman parte de la cubierta de los gránulos de PHAs. Las depolimerasas intracelulares son específicas para el estado nativo del polímero (PHA amorfo) y carecen de la capacidad para degradar PHAs desnaturalizados. La mayoría de ellas no tienen relación alguna a nivel de secuencia primaria con las depolimerasas extracelulares, ni se les ha identificado un sitio de unión a sustrato (Jendrossek 2007).

Las **depolimerasas de nPHA_{SCL} sin caja lipasa**, donde se agrupan nueve familias homólogas, poseen un triada catalítica compuesta por cisteína, aspartato e histidina (Kobayashi y Saito, 2003) que es diferente al resto de las depolimerasas (Ser-Asp-His). Esta triada catalítica alternativa, sorprendentemente también está presente en las PHAs sintasas, como la de *Chromatium vinosum* (Kobayashi *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2000). Mutantes en el residuo de cisteína de la triada catalítica de las depolimerasas PhaZ1 (antes PhaZa1) de *C.*

necator (Kobayashi y Saito, 2003) y *Rhodobacter spheroides* (Kobayashi *et al.*, 2004) perdieron su actividad, lo que demuestra la importancia de este residuo en la catálisis. Otra característica de los miembros de esta familia es la presencia de un residuo hidrofóbico, que generalmente es valina, en la posición Cis-1 (Knoll *et al.*, 2009). Los productos hidrolíticos de esta clase de depolimerasas son generalmente monómeros, dímeros o trímeros de 3HB y el pH óptimo para su actividad va en un rango de 7 hasta 10 (Kobayashi *et al.*, 2004; Uchino *et al.*, 2008). Algunas enzimas que pertenecen a este grupo son PhaZ1 de *C. necator* (Uchino *et al.*, 2008), PhaZ1 de *R. Sphaeroides* (Kobayashi *et al.*, 2004), PhaZ de *Paracoccus denitrificans* (Gao *et al.*, 2001), PhaZ de *Azospirillum brasilense* (Kadouri *et al.*, 2003).

Las **depolimerasas de nPHA_{SCL} con caja lipasa**. Hasta el momento la única enzima caracterizada de esta superfamilia es PhaZ de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* y no posee identidad significativa con ninguna otra depolimerasa intracelular o extracelular conocida hasta el momento (Tseng *et al.*, 2006). Su caja lipasa consiste en la secuencia (G-W-S₁₀₂-M-G) que es característica de las lipasas bacterianas (Jaeger *et al.*, 1995). En contraste con otras depolimerasas intracelulares conocidas, la PhaZ de *B. thuringiensis* libera la mayor proporción de monómeros de 3HB como producto hidrolítico (Tseng *et al.*, 2006).

Las **depolimerasas de nPHA_{MCL}** son específicas para PHAs de cadena media, principalmente polihidroxi octanoato y polihidroxi hexanoato, que comúnmente se encuentran en especies de *Pseudomonas*. Este tipo de depolimerasas poseen actividad de endo- y exo-hidrolasas, por lo que pueden degradar oligómeros grandes o pequeños y cuyos productos hidrolíticos consisten en dímeros y monómeros de Hx o HO (De Eugenio *et al.*, 2007). Todas las depolimerasas de esta familia tienen un arreglo común característico en su vecindario genético: dos genes de sintasa (phaC) que están separados por un gene que codifica para una PHA depolimerasa, que se transcriben, todos ellos, en la misma dirección (Handrick y Jendrossek 2002; De Eugenio *et al.*, 2007). Su actividad óptima se encuentra a pH 8.8, a una temperatura de 43 °C y requiere de la presencia de iones como Na⁺ K⁺ y Mg⁺⁺. En cambio, la presencia de Ca⁺⁺ inhibe la actividad catalítica. Hay que señalar que los inhibidores de las serina esterases, como el SDS y el fluoruro de metiletil sulfonilo, también inhiben la actividad de estas enzimas (Jendrossek *et al.*, 1996).

2.8 Aspectos relevantes sobre la degradación intracelular del PHB

La degradación intracelular se ha estudiado mejor en la bacteria que se considera el modelo en el estudio de la producción de PHB, *C. necator* H16. En este organismo se han caracterizado varias depolimerasas que integran un sistema hidrolítico complejo de al menos cuatro isoenzimas (Kobayashi *et al.*, 2005): PhaZ1, que degrada gránulos amorfos de PHB para liberar oligómeros de 3HB; PhaZb y PhaZc, que hidrolizan estos oligómeros hasta generar monómeros de 3HB; y PhaZd, que hidroliza PHB y presenta características estructurales similares a las depolimerasas extracelulares (Abe *et al.*, 2005).

Estas cuatro enzimas se han caracterizado *in vitro*, y PhaZ1 es la única enzima cuya funcionalidad se ha comprobado *in vivo* (Uchino *et al.*, 2008). En un ensayo se utilizó un sistema de dos plásmidos con promotores inducibles en *E. coli*, uno con el operón *phbCAB* de *C. necator* y el otro, a cada una de las depolimerasas a evaluarse. Las cepas se sometieron primero a condiciones de acumulación de PHB y posteriormente a condiciones de degradación. Al medir el contenido de 3HB liberado, las cepas de *E. coli* que contenían a PhaZb, PhaZc y PhaZd no secretaron cantidades significativas del monómero. En contraste, la cepa que portaba a PhaZ1 fue la única que liberó cantidades significativas de 3HB, a diferentes condiciones de pH (Uchino *et al.*, 2008).

Se tiene poca información sobre el control de la expresión de las depolimerasas intracelulares, y se ha propuesto que la degradación del polímero ocurre en forma simultánea a la síntesis. Esto se confirmó en experimentos que consistieron en la adición de un pulso de ¹⁴C-glucosa a células de *C. necator* que se encontraban en fase estacionaria, etapa en la que se degrada el PHB (Taidi *et al.*, 1995). En esta condición el carbono marcado se incorporó a los gránulos del polímero, demostrando que ambos fenómenos ocurren al mismo tiempo. En el mismo sentido, las células de *C. necator* en las que se silenciaron los genes *phaZ1*, *phaZc* y *phaZd* mostraron un incremento en la acumulación de PHB tanto en la fase logarítmica, que es donde empieza a acumularse el polímero, como en la fase estacionaria, cuando ocurre la degradación (Saegusa *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2005).

Lo anterior indica que el metabolismo del PHB (Fig. 9) está ocurriendo de manera cíclica, lo cual ya fue propuesto por Doi y colaboradores en 1990. Sin embargo, se desconocen los parámetros fisiológicos que mantienen activo este ciclo de síntesis y degradación simultáneas con gasto de energía. Es posible que aunque las depolimerasas se expresen durante la síntesis, su nivel de expresión esté regulado para asegurar una relación síntesis/degradación adecuada, pero esto aún no se ha estudiado. Se ha postulado que este ciclo funciona como un amortiguador metabólico que controla la disponibilidad del carbono almacenado sin la necesidad de encender una cascada de genes (Ren *et al.*, 2009). También se plantea que el PHB funciona como un regulador del poder reductor intracelular y la síntesis y degradación de PHB actuarían como moduladores de la cantidad de NAD(P)H disponible (Ren *et al.*, 2009).

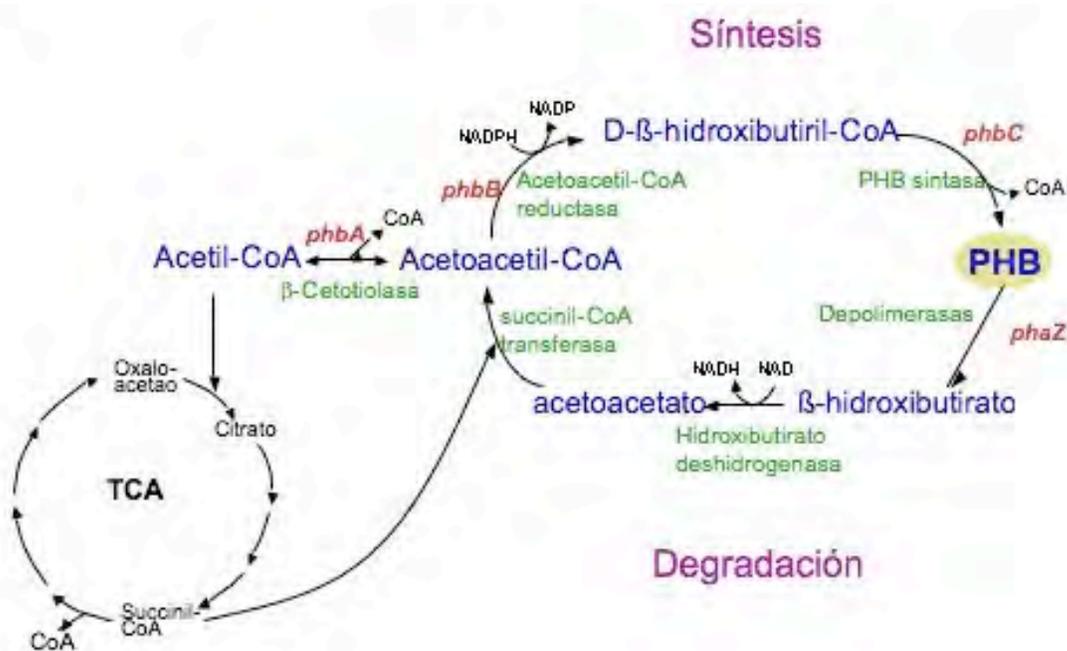


Figura 9. **Diagrama del metabolismo del PHB.** Aquí se puede apreciar cómo los procesos de síntesis y degradación conforman un ciclo metabólico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconocen los genes que codifican para las depolimerasas en *A. vinelandii*, así como los mecanismos de control de su expresión. La reciente secuenciación del genoma de la cepa DJ de este organismo (Setubal *et al.*, 2009) reveló la presencia de varios genes que posiblemente participen en el catabolismo del PHB. Mediante un análisis *in silico*, se identificaron siete posibles genes *phaZ* en el genoma de *A. vinelandii*. Cuatro de ellos presentan una identidad significativa con la depolimerasa PhaZ1, la enzima mejor caracterizada en *C. necator*. Los otros tres genes son homólogos de PhaZd de *C. necator* y de depolimerasas extracelulares caracterizadas en otros organismos, como *Schlegelella* sp. (Romen *et al.*, 2004), *Comamonas testosteroni* (Shinomiya *et al.*, 1997) y *P. funiculosum* (Hisano *et al.*, 2006).

Para comprender mejor el metabolismo de PHB en *A. vinelandii*, es necesario hacer estudios que comprueben si los genes identificados *in silico* como *phaZ*, realmente participan en el catabolismo del PHB en *A. vinelandii*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

-Caracterizar genes que codifican posibles depolimerasas en *A. vinelandii*

4.2 Objetivos Específicos:

- Seleccionar algunos de los genes *phaZ* hipotéticos del genoma de *A. vinelandii* para estudiar su función.
- Determinar si los genes *phaZ* seleccionados codifican para PHB depolimerasas intracelulares funcionales.
- Establecer la participación de dichas enzimas en el metabolismo de PHB mediante la generación y estudio de mutantes en los genes seleccionados..
- Determinar si alguna de las depolimerasas codificadas por los genes *phaZ* está presente en los gránulos de PHB en *A. vinelandii*.

V. HIPÓTESIS

Los genes *phaZ*, identificados mediante el análisis de la secuencia del genoma de *Azotobacter vinelandii*, codifican para PHB depolimerasas funcionales.

VI. JUSTIFICACIÓN

Es muy escasa la información disponible sobre la degradación intracelular de PHAs en las bacterias productoras de estos polímeros en general, y en particular en *A. vinelandii*. Encontrar los genes que codifican para las enzimas de degradación, permitirá estudiar el papel de ellas en el metabolismo de *A. vinelandii*, así como su regulación. Esto también contribuirá a una mejor comprensión sobre cómo las bacterias coordinan este ciclo metabólico y qué repercusiones tiene esto sobre la acumulación neta del polímero dentro de la célula.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los primeros tres objetivos específicos se diseñó la estrategia 1, que está basada en la identificación *in silico* de los posibles genes *phaZ* de *A. vinelandii*. Para realizar el cuarto objetivo se diseñó la estrategia 2, basada en la identificación de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB. Las estrategias experimentales utilizadas en este trabajo se muestran en la siguiente figura (Fig. 10).

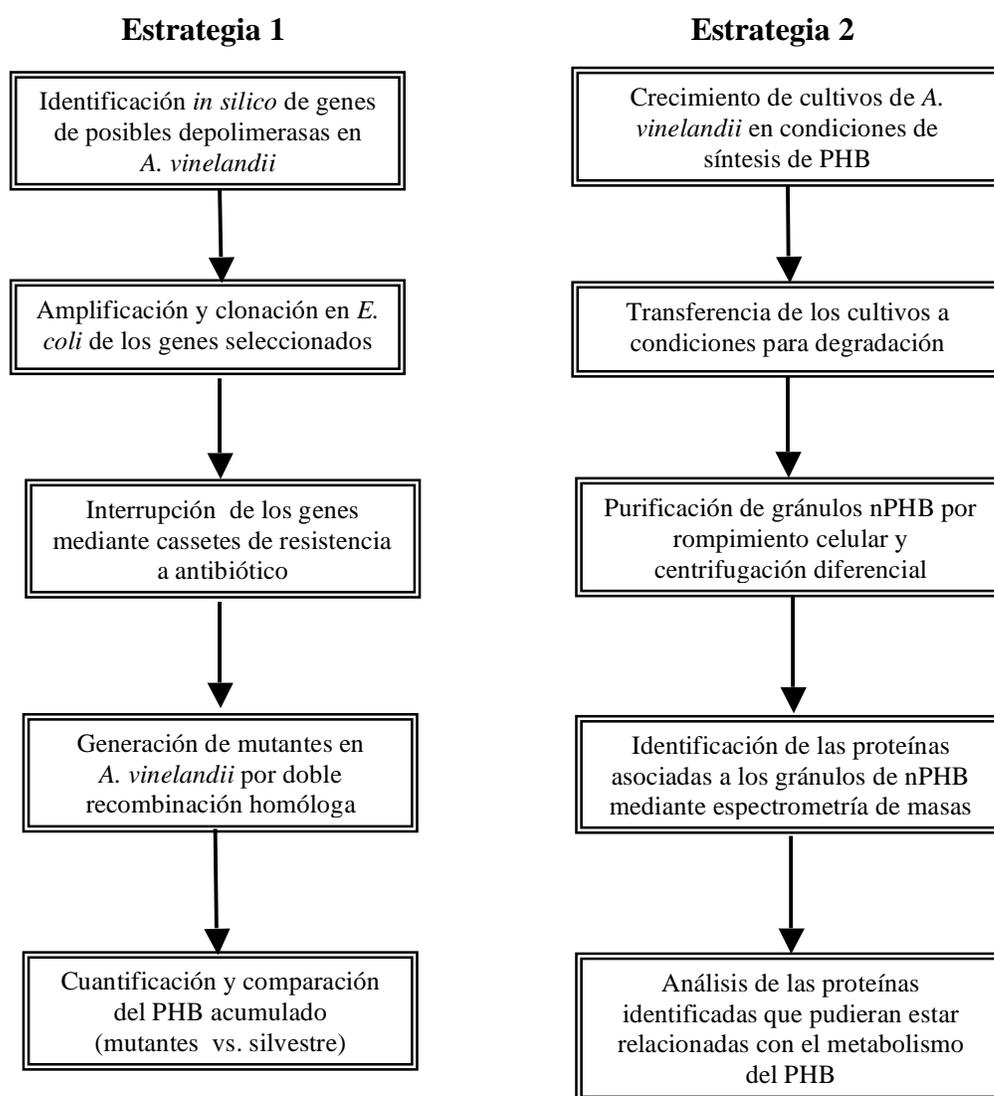


Figura 10. Estrategias experimentales.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas, Plásmidos y Oligonucleótidos.

Las cepas de *A. vinelandii* y de *E. coli* utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 1. Los plásmidos y los oligonucleótidos (en adelante, oligos) se enlistan en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Cepa	Fenotipo/genotipo	Referencia
<i>A. vinelandii</i>		
DJ (ATCC BAA-1303)	Nal ^r , mucoide, cepa silvestre.	Setubal <i>et al.</i> , 2009
UW136	DJ no mucoide (<i>algU-</i>), Rif ^r , mutante espontánea	Bishop y Brill, 1977
DY27	UW136 <i>Avin27080::Gm^r</i>	Este trabajo
phbD	UW136 <i>Avin34810::ΩSp^r</i>	Soledad Moreno, datos sin publicar
DY39	UW136 <i>Avin03910::Gm^r</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>lacZ-</i> , <i>recA</i>	Gibco, Brl
C41	Promotor T7, <i>LacUV5</i> ,	Miroux y Walker, 1996

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo

Plásmido	Característica	Referencia
pET24a	Vector de expresión (5310 pb), Km ^r , Promotor T7, <i>lacI</i>	Novagen
pCR 2.1-TOPO	Vector de clonación (3931 pb), Km ^r , Amp ^r , <i>lacZα</i> , sitio de clonación múltiple abierto <i>EcoRV</i> .	Invitrogen
pBSL98	Fuente del cassette de resistencia a gentamicina (Gm ^r)	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pHP45Ω-Sp	Fuente del cassette de resistencia a espectinomicina (Sp ^r)	Prentki y Krisch, 1984
pDY27	pET24a con PCR de 1116 pb conteniendo el gen <i>Avin27080</i> sin codón de paro, Km ^r	Este trabajo
pDY27GmII	Derivado de pDY27 con <i>Avin27080::Gm^r</i>	Este trabajo
pDY34	pET24a con PCR de 1503 pb conteniendo el gen <i>Avin34810</i> sin codón de paro, Km ^r	Este trabajo
pTOPO-3910	pCR 2.1-TOPO con PCR de 2743 pb conteniendo el gen <i>Avin03910</i> sin codón de paro, Km ^r , Ap ^r	Este trabajo
pTOPO-3910::Gm	Derivado de pTOPO-3910 con <i>Avin3910::Gm^r</i>	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Para diseñar los oligos utilizados para la amplificación de genes por PCR, se escogieron secuencias de los extremos de cada gen, de aproximadamente 18 pares de bases (pb) de longitud. A cada oligo se le agregó un sitio de restricción apropiado para la clonación en la región *polylinker* del vector pET24a(+) de Novagen, utilizado para la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* (Fig. 11).

Oligo	Secuencia	Sitio de Restricción
PCR		
3930R	5'-CTG TCA <u>AAG CTT</u> AGT ATT GTC GCT AGG CTG AG- 3'	<i>HindIII</i>
3930F	5'-TAG GTA <u>CAT ATG</u> AGC CAG ACT TTT TTT G-3'	<i>NdeI</i>
27080R	5'-GTG ACC <u>CTC GAG</u> CTG CGC GGC GAT CCA GC-3'	<i>XhoI</i>
27080F	5'-ATC GTA <u>CAT ATG</u> GCG GAA TCG CAA TCT- 3'	<i>NdeI</i>
34810R	5'-GTA ATT <u>CTC GAG</u> CCA GCC GCA GGC TTC CG- 3'	<i>XhoI</i>
34810F	5'-TAC GTC <u>CAT ATG</u> CCC CGG CAC TGG ATC- 3'	<i>NdeI</i>

Tabla 3. **Secuencias de Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.** El subrayado indica el sitio de restricción correspondiente.

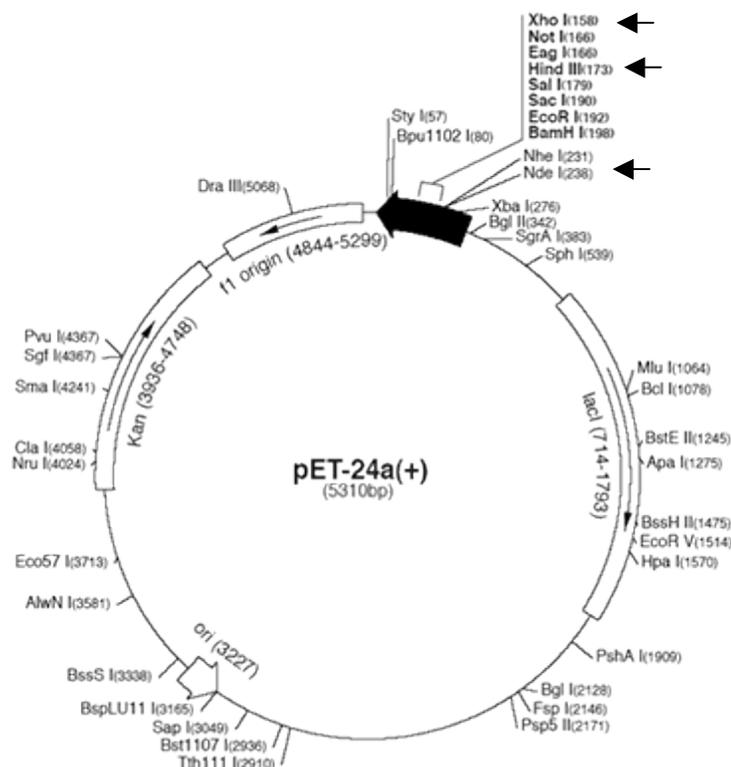


Figura 11. **Mapa del vector pET24a(+).** En la región *polylinker* se pueden observar los sitios *XhoI*, *Hind III* y *NdeI* a 158, 173 y 238 pb del origen de replicación, respectivamente. Fuente: Novagen.

Los oligos también fueron aptos para la clonación el vector pCR 2.1-TOPO de Invitrogen (Fig. 12), que posee un sitio *EcoRV* abierto.

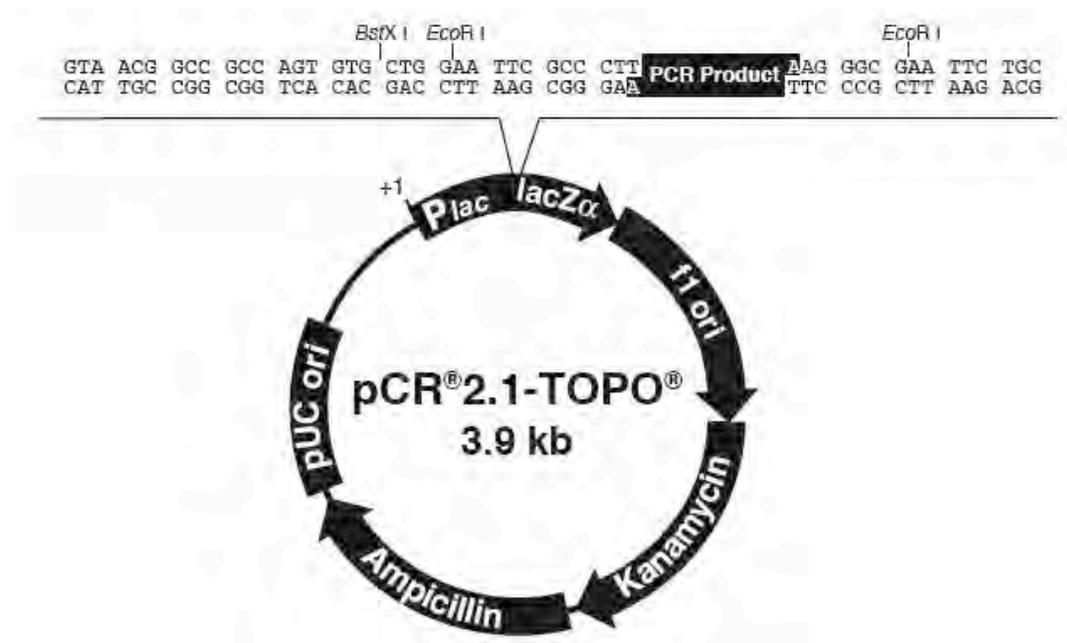


Figura 12. Mapa del vector pCR 2.1-TOPO. En la región del lacZα se puede observar el sitio de clonación múltiple abierto *EcoRV*. Fuente: Invitrogen.

8.2 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio rico *Luria-Bertani* (LB, ver apéndice) y se incubaron a 37°C por 12 horas a 200 rpm (en el caso del medio líquido). Las cepas de *A. vinelandii* se sembraron en medio Burk-Sacarosa (BS, ver apéndice) sólido a 30°C por 48 horas. Posteriormente se prepararon preinóculos líquidos con 18 horas de incubación. Los cultivos líquidos se realizaron en los medios BS y Burk-NH₄Cl (ver apéndice); se incubaron a 30°C y 200 rpm de 12 a 141 horas (aproximadamente 6 días).

8.3 Reacciones de amplificación de genes.

8.3.1 Amplificación de *Avin27080* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para amplificar el gen *Avin27080* se utilizó como molde DNA cromosomal de la cepa UW136. Los oligos usados fueron 27080R, que tiene un sitio de restricción *XhoI*, y 27080F con el sitio *NdeI* (tabla 3). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: Un ciclo inicial de

desnaturalización a 94°C por 3 minutos, 29 ciclos de amplificación (desnaturalización, 94°C por 40 segundos; alineamiento, 60°C por 40 segundos; extensión, 72°C por 3 minutos) y un ciclo terminal de extensión a 72°C por 5 minutos. La enzima utilizada fue *Taq-Pol* de Fermentas.

8.3.2 Amplificación de *Avin03910* y *Avin34810* por PCR. Ambas secuencias se amplificaron a partir de DNA cromosomal de la cepa UW136. Para el gen *Avin03910* se diseñaron los oligos 3930R, que tiene un sitio de restricción *HindIII*, y 3930F con un sitio *NdeI* (tabla 3). Los oligos del gen *Avin34810* fueron V34800R (con un sitio *XhoI*) y V34800F (con un sitio *NdeI*) (tabla 3). Para ambos genes las condiciones de reacción fueron las siguientes: Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 3.5 minutos, 4 ciclos de amplificación previa (desnaturalización, 94°C por 45 segundos; alineamiento, 54°C por 1 minuto; extensión, 72°C por 3 minutos). Siguió 25 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C por 45 segundos; alineamiento, 56°C por 1 minuto; y extensión, 72°C por 1 minuto). Por último se añadió un ciclo terminal de extensión a 72°C por 10 minutos. La enzima utilizada en estas reacciones fue *Taq-pol* de Altaenzymes.

8.4 Reacciones de digestión.

8.4.1 Digestiones analíticas. Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: 15-20 µg de DNA plasmídico, 0.5 µl de enzima (*XhoI*, *NdeI*, *HindIII*, *PstI*, *EcoRV* ó *BglII*), 1µl de buffer 10X, 3.5 µl de H₂O. El volumen total fue de 10 µl. La reacción se incubó por 2 horas a 37°C. Finalmente se toma una muestra de 5µl para realizar la electroforesis.

8.4.2 Digestiones preparativas. Las digestiones de los plásmidos se realizaron de la siguiente manera: DNA plasmídico 50 µl (15-20 ηg/µl), enzimas (*XhoI*, *NdeI*, *HindIII*) 2 µl, buffer 10X 6 µl, H₂O 2 µl. El volumen final fue de 60 µl y la reacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C.

8.5 Reacciones de purificación

8.5.1 Extracción de DNA cromosomal de *A. vinelandii*. Se cultivó *A. vinelandii* en medio líquido durante 48 horas. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 8000 rpm por 5 minutos. La

pastilla celular se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, y después se resuspendió en 450 μ l de amortiguador TE (50:20, ver apéndice). Se adicionaron 50 μ l de lisozima (10 mg/ml, recién preparada). La mezcla se incubó a 37°C, por 30 minutos. Después se añadieron 50 μ l de proteasa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se agregaron 50 μ l de SDS (10 %) y se incubó a 37°C por 15 minutos, hasta observar una solución turbia y viscosa. Se agregaron 100 μ l de NaCl (5M), y se incubó 10 minutos a 65°C. Se agregaron 80 μ l de CTAB (10%) / NaCl (0.7M) y se incubó 20 minutos a 65°C. Posteriormente, se realizó una extracción con 400 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13,000 rpm y se conservó el sobrenadante. El DNA se limpió con 400 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Este paso se realizó tres veces; cada vez se obtuvo una interfase limpia que se centrifugó por 10 minutos, para recuperar después la fase acuosa. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y se conservó el precipitado. Este último se lavó 3 veces con etanol (70%). Cuidadosamente se retiró el etanol; la pastilla se dejó secar a 37°C por 10 minutos. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 μ l de H₂O con RNAsa (ribonucleasa 20 mg/ml), incubando la muestra por 1 hora a 37°C (Sambrook *et al.*, 1989).

8.5.2 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep). Se inocularon 5 ml de medio LB (con el antibiótico respectivo) con células transformadas de *E. coli* y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se transfirió el cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Lo anterior se repitió las veces que fuera necesario para obtener la pastilla celular. Dicha pastilla se resuspendió en 100 μ l de solución I fría (solución de resuspensión, ver apéndice) y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A la muestra se le agregaron 200 μ l de solución II (solución de lisis, ver apéndice), se mezcló el contenido por inversión. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar 5 minutos y se agregaron 150 μ l de solución III fría (solución de neutralización, ver apéndice), se mezcló el contenido agitando suavemente en posición invertida durante 10 segundos y se colocó en hielo por 5 minutos. El tubo se centrifugó 10 minutos a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Al tubo se le adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se mezcló en vortex; después se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf nuevo. Posteriormente, al

tubo se le agregó un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se volvió a transferir a un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó en vortex y se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó por 8 minutos a 13,000 rpm y se recuperó la pastilla, la cual se lavó dos veces con etanol (70%). La pastilla se secó y finalmente se agregaron 15 µl de solución de RNAsa y se incubó a 37 °C por 30 minutos (Sambrook *et al.*, 1989).

8.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa (GeneClean). Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa a 110 volts durante 40 minutos aproximadamente. Se identificó la banda con el fragmento en un transluminador de rayos UV con longitud de onda corta. En seguida se cortó la banda del gel y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 3 volúmenes de NaI (6M), y se incubó a 55°C por 10 minutos. Una vez disuelto el fragmento de gel, se enfrió a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregaron 20 µl de “Glass Milk” y se dejó reposar por 15 minutos, mezclando por inversión ocasionalmente. Después se centrifugó la mezcla por 20 segundos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con 1 ml de solución “New wash”, desechando el sobrenadante en cada ocasión. El precipitado se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se calentó a 55°C por 10 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante (conteniendo el DNA) a un tubo nuevo sin tomar la resina (Sambrook *et al.*, 1989).

8.6 Ligación de plásmidos e insertos digeridos.

Una vez que se obtuvo el fragmento de DNA deseado, se ligó a un vector previamente digerido con una enzima de restricción, en una relación molar 3 (inserto): 1 (vector). Se utilizó la enzima DNA ligasa T4 siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). La reacción de ligación se incubó por 12 horas a 22°C, posteriormente transformó la cepa DH5α de *E.coli*.

8.7 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador de TRIS-acetatos (TAE, ver apéndice). Como marcador de peso molecular se utilizó *DNA ladder Mix* de Fermentas. La electroforesis se realizó a 110 volts, por 45-60 minutos en amortiguador TAE al 1X. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 3-5 minutos, se lavó con agua por 5 minutos y posteriormente se observó en el transiluminador de luz UV, para visualizar el DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

8.8 Preparación de células competentes.

8.8.1 Preparación de células competentes de *E.coli* por el método de CaCl_2 . Se inocularon 5 ml de medio LB líquido con una asada de la cepa DH5 α de *E.coli* y se incubaron por 16-20 horas a 37 °C y 200 rpm. Después se inocularon 100 ml de LB líquido (en matraz Erlenmeyer de 250 ml) con 1 ml de este cultivo y se incubó por 3 horas, a 37 °C y 200 rpm hasta que se alcanzó una D.O._{.650} ~ 0.4-0.5. Posteriormente, se transfirió el cultivo a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Enseguida, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el paquete celular y se resuspendió en 30 ml de CaCl_2 (50mM). Después se incubó en hielo por 15 minutos. Las células se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. La pastilla celular se resuspendió en 3-5 ml de CaCl_2 (50mM) frío por cada 50 ml del cultivo original. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y se conservaron a -70°C en solución estéril de glicerol al 14 % hasta el momento de usarlas (Sambrook *et al.*, 1989).

8.8.2 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*. Se inocularon 500 ml de medio YT 2X líquido (ver apéndice) con un preinóculo de 5 ml del mismo medio incubado durante 12 horas, y se dejó crecer hasta que se alcanzó una D.O._{.600} ~ 0.4 - 0.5. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó por 20 minutos a 13,000 rpm y 4°C. Después se resuspendió en 500 ml de agua milliQ estéril fría y se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm y 4°C por 20 minutos. Esto se repitió 3 veces, desechando en cada ocasión el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 30 ml solución estéril de glicerol al 10% preparado con agua milliQ, y se transfirieron a un tubo de centrífuga de 50 ml. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm y 4°C por 20 minutos. Se

eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en el líquido remanente en el tubo. Se verificó que la pasta celular tuviera una $D.O_{600} = 3.10$ y se guardó en alícuotas de 50 μ l a -70°C (Sambrook *et al*, 1989).

8.8.3 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*. Se cultivaron las cepas de *A. vinelandii* dos veces en medio de competencia sólido (CM, ver apéndice) y se incubaron a 30°C por 48 horas cada vez. Después se recolectó toda la masa celular para inocular 50 ml de medio CM líquido. El cultivo se incubó a 30°C por 48 horas a 200 rpm. Posteriormente se recolectaron las células centrifugando a 8000 rpm y 4°C por 10 minutos, y se lavaron con MgSO_4 (10mM). Finalmente se resuspendieron las células en 2 ml de medio CM con 16 mM de MgSO_4 .

8.9 Transformación

8.9.1 Transformación de *E. coli* C41 por CaCl_2 . Se mezclaron 0.1 μ g de DNA con 0.2 ml de células competentes de *E. coli*. Esta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos; posteriormente, se le dio un choque térmico a 42°C por 2 minutos y se incubó de nuevo en hielo por 2 minutos. A la muestra se le adicionó 1 ml de medio LB líquido (sin antibiótico) y se cultivó por 1 hora a 37°C y 200 rpm. Después, se sembraron de 0.1 a 0.2 ml del cultivo en cajas con medio sólido LB y el antibiótico correspondiente (Sambrook *et al*, 1989).

8.9.2 Transformación de *E. coli* DH5 α por electroporación. Se mezclaron 0.1 μ g de DNA con 0.2 ml de células electrocompetentes de *E. coli*. Esta mezcla se incubó en hielo por 10 minutos, posteriormente, se electroporó a 1.8 volts y se le adicionó 1 ml de medio LB líquido (sin antibiótico). El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm durante 1 hora. Después, se sembraron de 0.1 a 0.2 ml del cultivo en cajas con medio sólido LB con el antibiótico correspondiente (Sambrook *et al.*, 1989).

8.9.3 Transformación de *A. vinelandii*. Se tomaron 0.1 ml de células competentes de *A. vinelandii* y se mezclaron con 10 μ g de DNA. Esta mezcla se incubó por 1 hora, sin agitación. Después, se sembraron las células en cajas con medio CM sólido, dejando incubar por 48

horas. Posteriormente, se levantaron las células con un asa de siembra y se resuspendieron en 0.5 ml de medio CM; enseguida se sembraron 0.1 ml del cultivo en medio BS sólido con el antibiótico correspondiente (Glick *et al.*, 1985).

8.10 Métodos de cuantificación.

8.10.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry. Se tomaron muestras de 0.5 ml de un cultivo de *A. vinelandii* a diferentes tiempos y se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante. Cada paquete celular se resuspendió en 1 ml de $MgSO_4$ (10mM). Se tomó un volumen de 200 μ l de la suspensión, se agregó 1 ml de reactivo de Lowry (ver apéndice) y se dejó reposar 10 minutos. En seguida se agregó a la mezcla 0.1 ml de reactivo de Folin (dilución 1:2 en agua, ver apéndice) que reposó por 30 minutos. Se midió absorbancia a $\lambda=595$ nm. Al mismo tiempo se realizó una curva de calibración usando como estándar albúmina bovina. Con esta curva se extrapoló el contenido de proteína presente en la muestra problema (Lowry *et al.*, 1951).

8.10.2 Cuantificación de PHB por conversión a ácido crotonico. Se tomaron muestras de 0.5 ml de un cultivo de *A. vinelandii* a diferentes tiempos. Se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto y se desechó el medio de cultivo. Cada paquete celular se resuspendió en 1 ml de NaClO comercial (Cloralex) diluido al 30%, y se incubó a 30°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó cada muestra por 5 minutos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 1 ml de agua, 1 ml de etanol absoluto y 1 ml de acetona, centrifugando a 13,000 rpm y desechando el líquido en cada ocasión. Las muestras se secaron en un concentrador con vacío por 10 minutos a 45°C. Cada pastilla de PHB se resuspendió en 1 ml de H_2SO_4 concentrado y se calentó a 95°C por 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a $\lambda=235$ nm en una celda de cuarzo, para estimar la formación de ácido crotonico (PM=86 g/mol; Law y Slepecky, 1961). Para cuantificar la concentración de PHB se usó la ecuación de Lambert-Beer: $C=A/Eb$

Donde: C= Concentración (μ g/ml); A= Absorbancia (nm); E= Coeficiente de extinción del ácido crotonico ($15600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); b= Longitud de la celda (1 cm)

El contenido de PHB corresponde al cociente de la concentración de PHB entre la concentración de proteína en cada muestra.

8.11 Purificación de gránulos de PHB provenientes de *A. vinelandii*.

8.11.1 Producción de gránulos nativos de PHB. Se prepararon cultivos de la *A. vinelandii* en 100 ml de medio BS líquido. Los cultivos se incubaron por 48 horas a 30°C y 200 rpm para favorecer la acumulación del PHB. Posteriormente los cultivos se centrifugaron y lavaron dos veces con MgSO₄, centrifugando a 6000 rpm. Los cultivos se resuspendieron en medio B-NH₄ (ver apéndice) y se incubaron por 12 horas para promover la movilización del PHB acumulado.

8.11.2 Rompimiento celular mecánico con prensa tipo French. Los cultivos se lavaron con 50 ml de solución amortiguadora Tris:HCl pH 7.5, 50 mM, se centrifugaron a 8000 rpm y resuspendieron en la misma solución amortiguadora para obtener un volumen total de 3 ml de masa celular (5 ml/g peso húmedo de células). Los paquetes celulares se rompieron mediante 3 pases por la prensa tipo French a una presión de 900 psi.

8.11.3 Ultracentrifugación con gradientes de glicerol de densidad discontinua. Se prepararon soluciones de glicerol con solución amortiguadora Tris:HCl 50 mM, pH 7.5, con las siguientes concentraciones: 87, 80, 60, 50 y 40 % (v/v). El primer gradiente se formó con 5 ml de solución al 87% y 10 ml de solución al 50% en tubos *Ultra-Clear* (Beckman) de 30 ml para rotor de ultracentrífuga. Los extractos celulares se colocaron cuidadosamente en la cima del gradiente. Los tubos con los gradientes se insertaron con precaución en las camisas del rotor SW28 y se realizó la centrifugación en una ultracentrífuga *Beckman Optima*[™] modelo L-90K a 20,000 rpm y 4°C por 40 minutos. Los gránulos se recuperaron de la interfase de ambas soluciones. A continuación se preparó un segundo gradiente con 5 ml de cada una de las soluciones de 87, 80, 60 y 40% de glicerol. En la superficie de la preparación se colocaron los gránulos recuperados en el primer gradiente. De nuevo se realizó una ultracentrifugación con el rotor SW28 a 20,000 rpm y 4°C por 40 minutos. Los gránulos purificados se recuperaron de la interfase entre las soluciones de 80 y 60% (Handrick *et al.*, 2000).

8.12. Espectrometría de masas por *Electro Spray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (ESI LC-MS)

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separar por peso molecular las proteínas asociadas a los gránulos purificados. En la Unidad de Proteómica, las bandas correspondientes a cada proteína se cortaron, se redujeron con ditioneitol (DDT) y se alquilaron con iodoacetamida. Posteriormente se sometieron a digestión con tripsina. Los péptidos generados se procesaron en un sistema LC-MS constituido por un cromatógrafo líquido de nano-flujo *Accela* con fragmentador (1/20) (Thermo Fisher Co. San Jose, CA) y se analizaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La cromatografía se realizó con un flujo de 400 nL/min utilizando una columna capilar Pico Frit Proteopep 2 C18 75 μ m ID x 50mm (New Objective Inc., Woburn, MA). Los péptidos resultantes se eluyeron con ácido acético 0.1% v/v a través de un gradiente de 5-70% de acetonitrilo / ácido acético 0.1v/v durante 120 minutos. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). En los eventos de disociación de los péptidos se descartaron iones con carga uno ($z:1^+$), superiores a cuatro ($z:4^+$) y de carga no definida. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Para la captura automática de los datos se realizó exclusión dinámica de iones, con un tiempo de exclusión de 3 minutos. Los datos se sometieron a comparación contra la base de datos del NCBI (general y específica) a través de los programas computacionales Protein Prospector, Sequest y Mascot (Chalkley *et al.*, 2008; Eng *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 2008).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Identificación de los genes de posibles PHB depolimerasas en *A. vinelandii*

Las PHB depolimerasas intracelulares mejor caracterizadas son las de *C. necator* (Handrick *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2003; Saegusa *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 1995; Saito y Kobayashi, 2001; York, *et al.*, 2003). A nivel de secuencia de aminoácidos, estas enzimas no están muy relacionadas con la mayoría de las depolimerasas extracelulares. Por otro lado, comparten similitud significativa entre sí y con otras posibles PHB depolimerasas intracelulares no caracterizadas (Handrick *et al.*, 2004). Debido a la información disponible sobre las depolimerasas intracelulares de *C. necator*, se escogieron las secuencias de este organismo para buscar ortólogos en el genoma de *A. vinelandii*. Para ello, se realizaron análisis comparativos con el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de las depolimerasas PhaZ1 y PhaZd de *C. necator* con el genoma de *A. vinelandii*. Adicionalmente, se utilizó el gen de la depolimerasa extracelular PhaZpst de *Pseudomonas stutzeri*, un organismo muy cercano filogenéticamente a *A. vinelandii*. Se escogieron 3 genes de posibles depolimerasas en el genoma *A. vinelandii* cepa OP de acuerdo con el grado de identidad que presentaron con las depolimerasas arriba mencionadas. Estos genes corresponden a las secuencias *Avin27080*, *Avin03910* y *Avin34810*.

El gen *Avin27080* consiste en una secuencia de 1119 pares de bases (pb) que codifica para 372 residuos de aminoácidos. Comparte 25% de identidad (41% de similitud) con PhaZ1 de *C. necator* (AB017612, Fig. 13), que es la depolimerasa intracelular mejor caracterizada de este organismo.

El producto de *Avin27080* presenta un dominio α/β hidrolasa que se extiende entre las posiciones 117-364. Este dominio es común en un gran número de enzimas hidrolíticas con origen filogenético y función catalítica diferentes; entre ellas, varias PHB depolimerasas (Jendrossek y Handrick, 2002). Tiene además en la posición 184-372 un dominio característico presente en el C-terminal de PHB depolimerasas extracelulares.

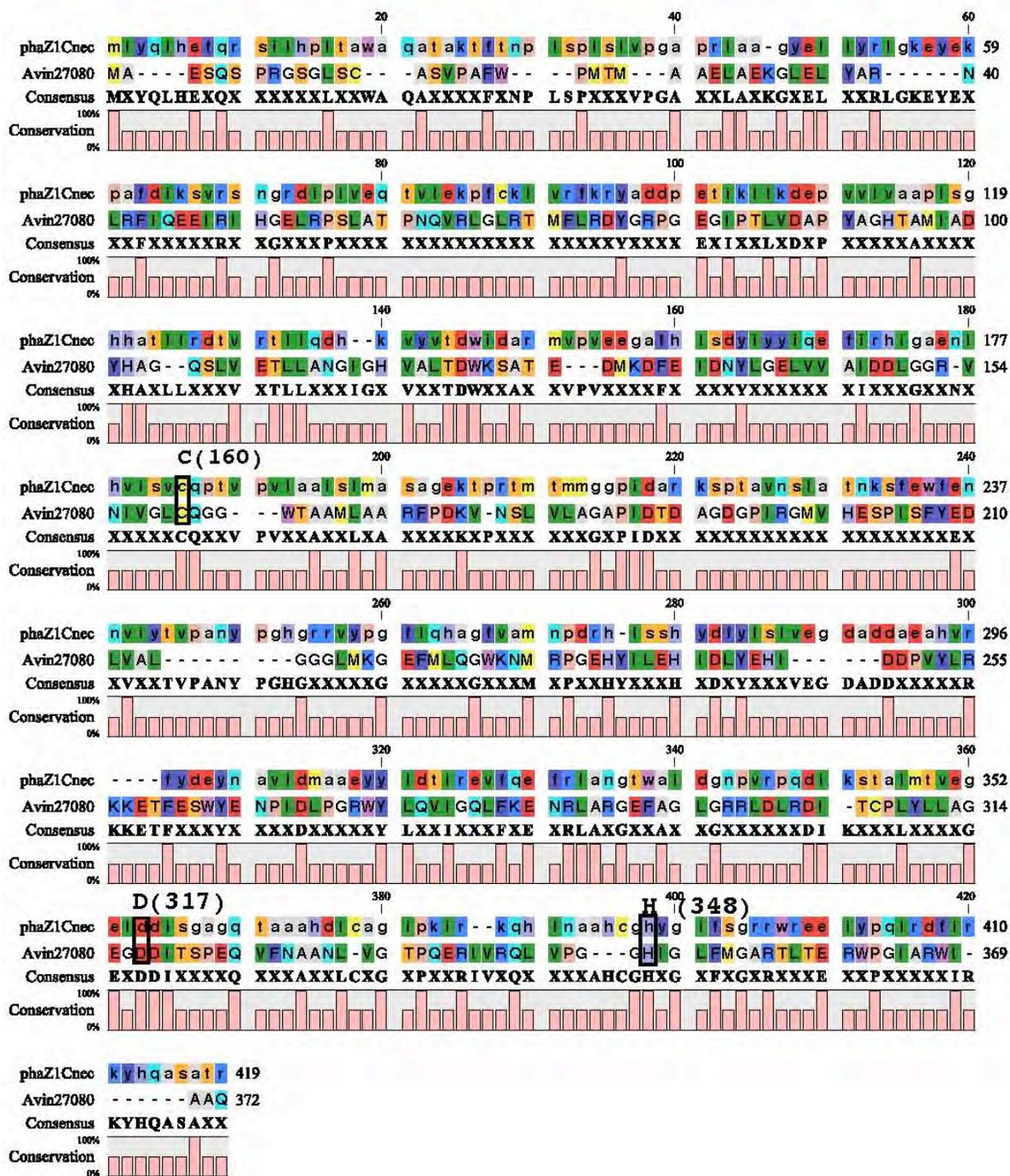


Figura 13. Alineamiento del producto del gen *Avin27080* con la PHB depolimerasa *PhaZ1* de *C. necator* (AB017612). Los aminoácidos de la triada catalítica e C^{160} - D^{317} - H^{348v} están indicados en recuadros.

Esta secuencia presenta características de la superfamilia de las depolimerasas intracelulares de nPHAscl sin caja lipasa, familia homóloga número tres, descrita por Knoll y colaboradores (2009). Su tríada catalítica podría estar compuesta por los residuos C^{160} - D^{317} - H^{348} , de acuerdo

a la homología presentada con PhaZ1 de *C. necator* (Fig. 13). Dentro del genoma de *A. vinelandii*, existen además dos parálogos de *Avin27080* (*Avin44010* y *Avin03910*). Los productos de estos genes podrían ser depolimerasas de la familia de PhaZ1 de *C. necator*, o bien, PHA sintasas tipo III, ya que además de presentar similitud con depolimerasas, son parecidas a PHB sintasas de esta familia, (Identities de 25-30 %). Sin embargo, este tipo de enzimas requiere de una subunidad denominada PhbE (Liebergesell *et al.*, 1994), y en el genoma de *A. vinelandii* no se encontró algún homólogo del gen correspondiente.

El gen *Avin03910* (2745 pb) codifica para una proteína de 914 residuos de aminoácidos. Este gen es un parálogo de *Avin27080*, con el que comparte sólo un 24% de identidad. La proteína también posee el dominio α/β hidrolasa, entre las posiciones 128-434. Llama la atención el hecho de que esta proteína no encaja dentro ninguna de las familias de PHB depolimerasas descritas por Knoll y colaboradores (2009). Una característica importante del gen *Avin03910* es que se encuentra adyacente al gen *Avin03930* (Fig. 14). Este gen es un parálogo de *phbP*, que codifica para una phasina y se encuentra ligado a los genes biosintéticos *phbBAC* y al regulador *phbR* (Fig. 5). Esto sugiere que el producto de *Avin03910* podría participar metabolismo de PHB. Lo anterior fue un criterio adicional importante para tomar la decisión de estudiarlo.

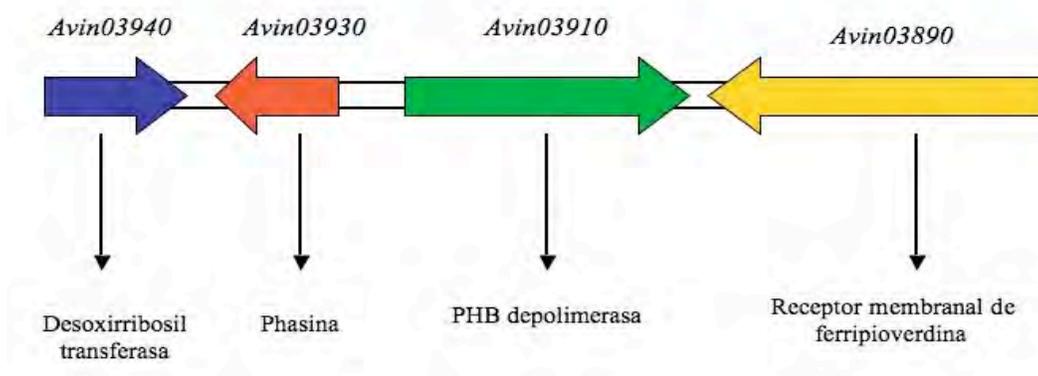


Figura 14. Mapa de la región cromosomal que contiene al gen *Avin03910*.

El gen *Avin34810* (1506 pb) codifica para una proteína de 501 residuos de aminoácidos. A nivel de secuencia de aminoácidos comparte 30% de identidad con la depolimerasa intracelular PhaZd de *C. necator* (Fig. 15). Adicionalmente, posee una identidad de alrededor

del 50% con PhaZpts de *P. stutzeri* y PhaZ de *Pseudomonas* GM101 (Fig. 16), dos depolimerasas extracelulares bien caracterizadas experimentalmente. El producto génico de *Avin34810* posee un péptido señal de 24 residuos en el extremo N-terminal. A nivel de secuencia, esta proteína se clasifica dentro de la familia de depolimerasas extracelulares de dPHA con dominio catalítico tipo 1 familia homóloga 9 (Knoll *et al.*, 2009). Sin embargo, a la fecha no hay evidencia de que *A. vinelandii* realice asimilación de PHB exógeno. Posee la caja lipasa G¹⁴⁷-L¹⁴⁸-S¹⁴⁹-S¹⁵⁰-G¹⁵¹, y su tríada catalítica podría estar conformada por los residuos S¹⁴⁹-D²²⁶-H²⁷⁶ (Fig. 16). Adicionalmente, posee un residuo no catalítico de histidina conservado en la posición H⁶⁴, la región donde se encuentra este residuo se asemeja a la cavidad oxianión contenida en las lipasas (Jaeger *et al.*, 1995). El gen *Avin34810* posee un parálogo dentro del genoma (*Avin33500*). Una característica interesante de *Avin34810* es que posee un dominio de esterasa entre las regiones 45-259.

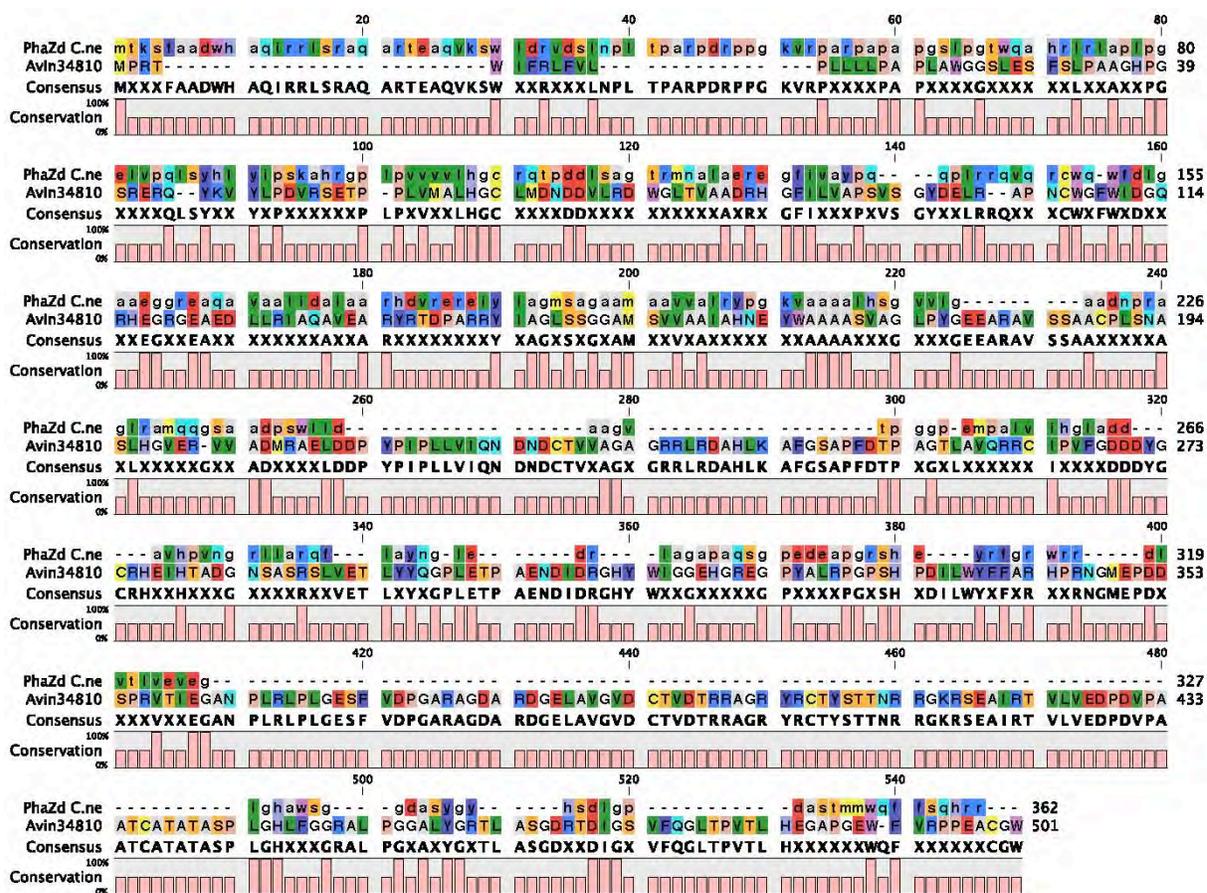


Figura 15. Alineamiento del producto del gen *Avin34810* con la PHB depolimerasa PhaZd de *C. necator* (AB206256).

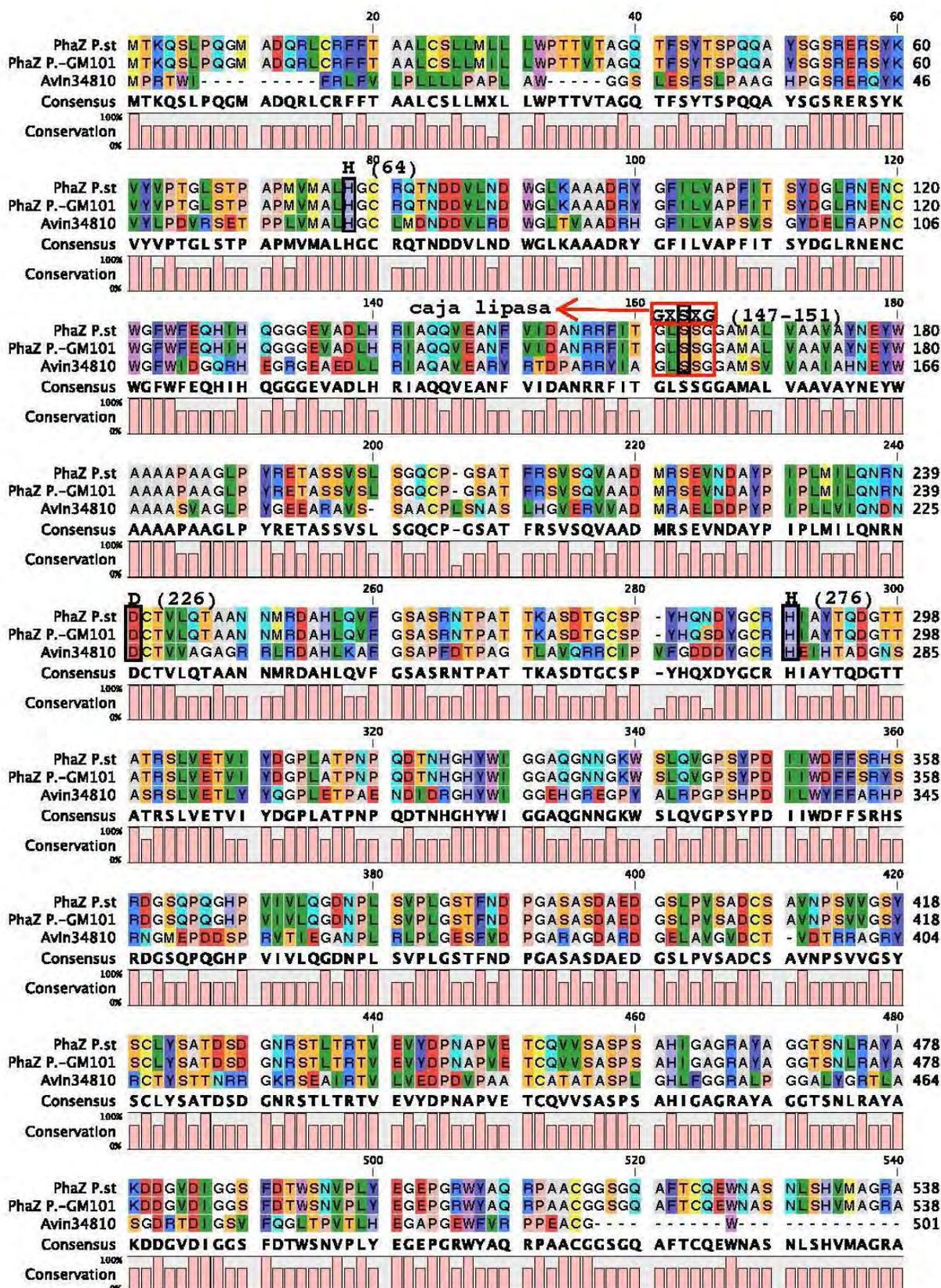


Figura 16. Alineamiento del producto del gen *Avin34810* con las depolimerasas extracelulares PhaZpst de *P. stutzeri* (AB012225) y PhaZ de *Pseudomonas* GM101 (AAG00611).

9.2 Clonación de los genes identificados.

Se diseñaron oligos para la amplificación por PCR de los genes seleccionados (*Avin27080*, *Avin34810* y *Avin03910*). Como molde se usó DNA cromosomal de la cepa UW136 de *A. vinelandii*. Los productos de PCR obtenidos fueron los esperados (Fig. 17): el producto de *Avin27080* presentó una banda de 1.1 Kb; el gen *Avin34810* amplificó un fragmento de 1.5 Kb y la secuencia de *Avin03910* mostró una banda de 2.75 Kb.

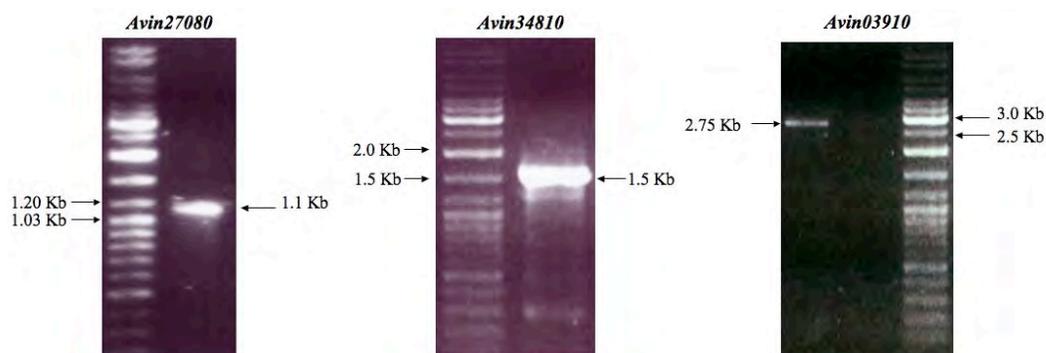


Figura 17. Productos de PCR de los genes *Avin27080*, *Avin34810* y *Avin03910*.

Los productos de PCR *Avin27080* y *Avin34810* se clonaron dentro de la región *polylinker* del vector pET24a(+) (utilizado para la expresión heteróloga de proteínas), en los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (Fig. 11). Se obtuvieron las clonas pET24a-*Avin27080* y pET24a-*Avin34810*. El fragmento de PCR de *Avin03910* se clonó en el vector pCR 2.1-TOPO en el sitio abierto *EcoRV* (Fig. 12).

9.3 Caracterización molecular del plásmido pDY27.

Para constatar la presencia de *Avin27080* en las transformantes, se extrajeron los plásmidos de 22 colonias seleccionadas al azar. Se determinó el patrón de restricción de los plásmidos con la enzima *PstI* a fin de observar el tamaño del vector/inserto linealizado. El tamaño de la construcción pET24a-*Avin27080* que se esperaba obtener fue de 6.3 Kb (Fig. 18, izq.). Un análisis de secuencia demostró que el DNA de los plásmidos recombinantes de las colonias 0 y 19 estaba libre de errores, y se eligió un plásmido que se nombró como pDY27 (Fig. 18, der.).

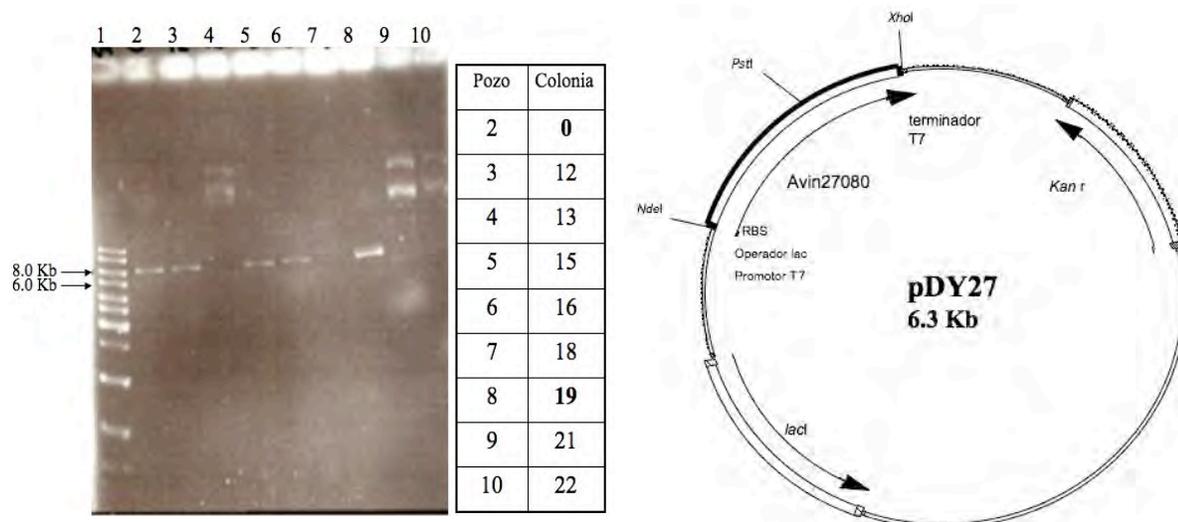


Figura 18. **Construcción del plásmido pDY27.** Izquierda: Digestiones de colonias que contienen el plásmido pDY27. Derecha: Mapa del plásmido pDY27

9.4 Caracterización molecular del plásmido pDY34.

De las transformantes con pET24-*Avin34810*, se seleccionaron 50 colonias al azar para purificar sus plásmidos. Se analizó el patrón de restricción de estos plásmidos con la enzima *EcoRV*. El patrón de restricción liberó dos bandas (Fig. 19, izq.) una de 4.5 Kb y otra de 2.2 Kb, que sumadas corresponden al tamaño esperado en la construcción de 6.7 Kb. Se seleccionaron las colonias 22 y 23 para secuenciar y se nombró al plásmido pDY34 (Fig. 19, der.).

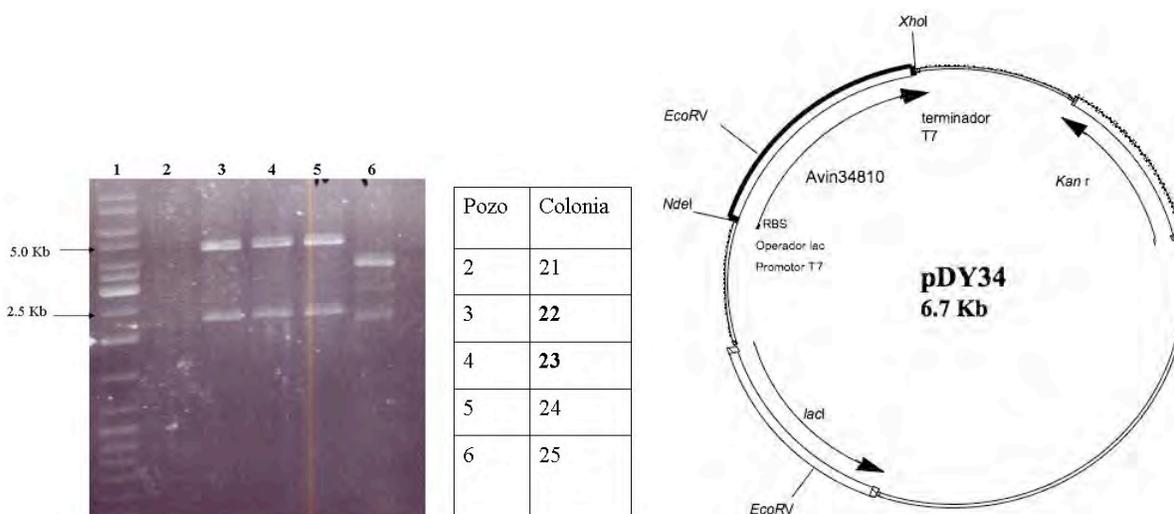


Figura 19. **Construcción del plásmido pDY34.** Izquierda: Digestiones de colonias que contienen el plásmido pDY34 con *EcoRV*. La digestión liberó dos bandas, una de 4.5 Kb y la segunda de 2.2 Kb. Derecha: Mapa del plásmido pDY34.

9.5 Caracterización molecular del plásmido pDY39

Se realizó la clonación del fragmento *Avin03910*, de 2.75 Kb, en el vector pCR2.1-TOPO de Invitrogen (Fig. 12), con un tamaño de 3.9 Kb. Se obtuvo el vector pTOPO-3910, con longitud de 6.6 Kb. La inserción del fragmento se verificó por digestión con la enzima *Hind*III (Fig. 20, izq.). Posteriormente, se realizó la clonación del fragmento en el vector pET24a. La construcción, de 8 Kb, se verificó por el patrón de restricción de las enzimas *Nde*I y *Hind*III. Se liberaron dos fragmentos, uno de 5.3 y otro de 2.75 Kb (Fig. 20, centro), que corresponden al vector y al inserto, respectivamente. Una vez verificado el tamaño de la construcción se denominó al plásmido como pDY39 (Fig. 18, der.).

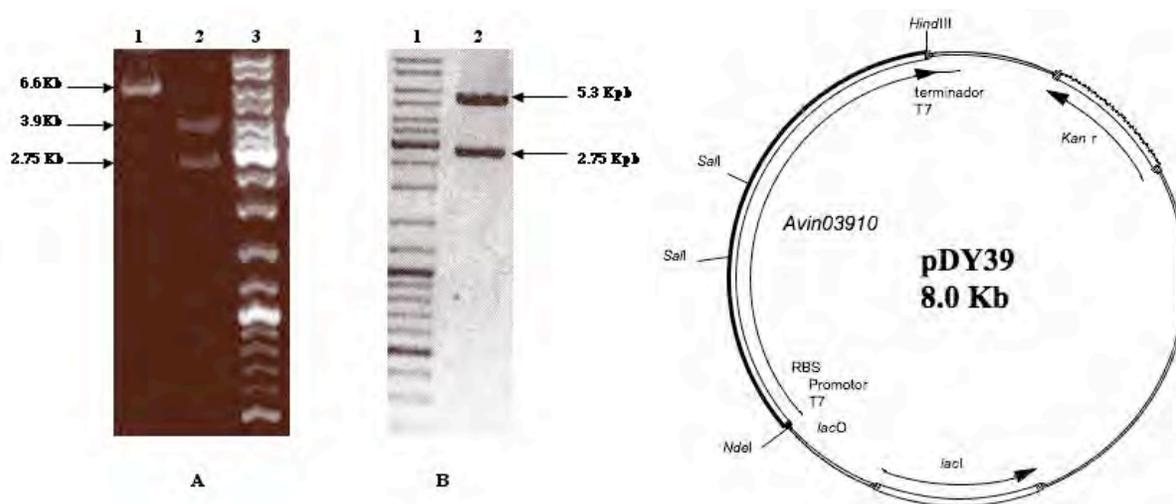


Figura 20. **Construcción del plásmido pDY39.** Izquierda: Digestión del plásmido pTOPO-3910 con *Hind*III. Centro: Digestión del plásmido pDY39 con *Nde*I y *Hind*III. Derecha: Mapa del plásmido pDY39.

9.6 Generación de las mutantes DY27 y DY39 de *A. vinelandii*.

Para generar la mutante en el gen *Avin27080* se interrumpió la secuencia génica clonada en el vector pDY27 con un cassette de resistencia a gentamicina en el sitio *Sph*I. Así se construyó el plásmido pDY27::Gm, el cual se utilizó para generar una mutante sencilla mediante doble recombinación homóloga en el cromosoma de *A. vinelandii*. A esta mutante se le denominó DY27. La mutante presentó crecimiento en el medio de selección BS-gentamicina, confirmando así la inserción del cassette de resistencia al antibiótico correspondiente.

Para generar la mutante DY39, se insertó un cassette de resistencia a gentamicina (0.8 Kb) en el sitio *SalI* del fragmento de DNA de *Avin03910* clonado en el plásmido pTOPO-3910. Se obtuvo la construcción pTOPO-3910::*Gm*, con un tamaño de 7.4 Kb. Dicha construcción se verificó mediante digestiones con la enzima *SalI*. Se liberaron fragmentos de 6.6 y 0.8 Kpb, que corresponden al vector pTOPO-3910 y al cassette de *Gm*, respectivamente (Fig. 21). Con la construcción pTOPO-3910::*Gm* se generó la mutante por doble recombinación homóloga en la cepa UW136 de *A. vinelandii*.

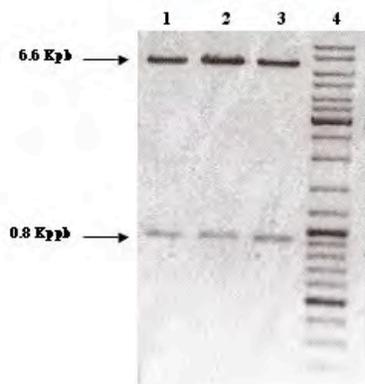


Figura 21. Digestión del plásmido pTOPO-3910::*Gm* con *SalI*

9.7 Generación de la mutante *phbD* de *A. vinelandii*.

Para generar la mutante *phbD* se clonó el gen *Avin34810* en el vector pMOS-blue. Posteriormente se realizó la mutagénesis por inserción del cassette de resistencia a espectinomicina (Sp^r) con una fusión *gusA* en el sitio *EcoRV* de la secuencia *Avin34810*. La mutante se generó por doble recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa UW136 (Moreno-León, datos sin publicar).

9.8 Caracterización de las mutantes DY27, *phbD* y DY39

El fenotipo de la cepa silvestre UW136 de *A. vinelandii* consiste en colonias de color verde brillante. Esta coloración es producida por la azotobactina, un péptido verde fluorescente que funciona como quelante para la asimilación del hierro reducido (Page y Huyer, 1984). Las colonias se van tornando de un color blanco opaco con el transcurso del tiempo (Fig. 22, izq).

Esta opacidad se debe a la acumulación del PHB en el interior de las células, ya que éste compuesto impide el paso de la luz. Al agotarse la fuente de carbono, las colonias opacas se tornan transparentes debido a la movilización del PHB.

Al observar colonias cultivadas en medio sólido se encontró que la mutante DY27 (Fig. 22, centro) posee el mismo fenotipo de la cepa silvestre. Esto sugiere que el silenciamiento de la secuencia *Avin27080* no tiene ninguna repercusión sobre el fenotipo de la cepa. La apariencia de las colonias en la mutante DY27 no varían respecto a la cepa silvestre.

En contraste, la mutante *phbD* (Fig. 22, der.) presentó un fenotipo diferente. Las colonias de esta cepa permiten un mejor paso de la luz, es decir, son más transparentes. Al envejecer el cultivo, las colonias de la cepa *phbD* se vuelven de un tono pardo. Estas observaciones demuestran que la interrupción del gen *Avin34810* sí afecta el fenotipo de producción de PHB de la cepa; y sugieren que el producto génico de *Avin34810* participa en el metabolismo de este polímero, ya que la mutante *phbD* acumuló menos PHB que la cepa silvestre.

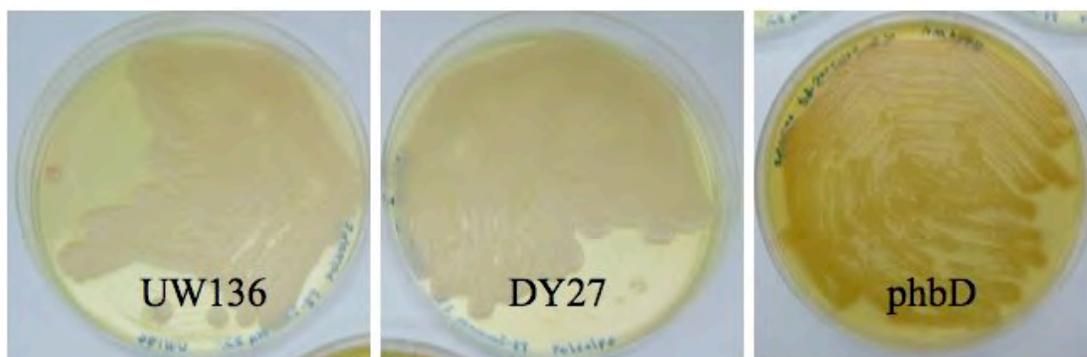


Figura 22. **Fenotipos de las cepas UW136, DY27 y *phbD***. Colonias de las cepas UW136, DY27 y *phbD* con 144 horas de crecimiento en medio sólido PY-sacarosa 2% .

La mutante DY39 presentó un fenotipo más blanquecino y opaco que el de la cepa silvestre a las 48 horas de crecimiento (Fig. 23, izq.). Este fenotipo se acentúa más a las 144 horas de incubación (Fig. 23, der.). Esta evidencia sugiere que la mutante DY39 tiene afectada su capacidad para movilizar el PHB, por lo que acumula una mayor cantidad del polímero desde las etapas tempranas de su crecimiento.

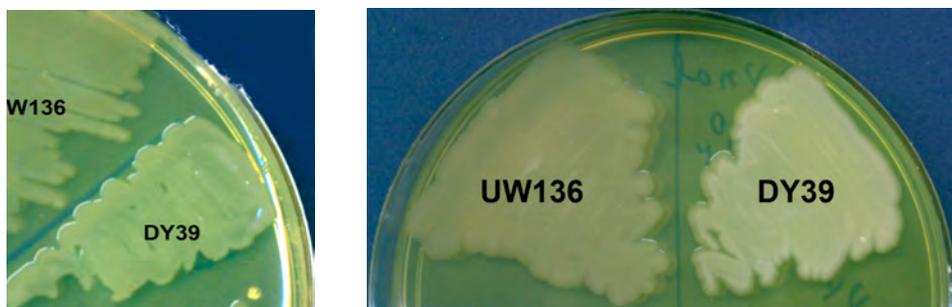


Figura 23. **Fenotipo de la mutante DY39.** Izquierda: Colonias de UW136 y DY39 a las 48 horas de crecimiento (condiciones de acumulación de PHB) en medio PY-sacarosa 2%. Derecha: Las colonias con un crecimiento de 144 horas (condiciones de movilización de PHB).

Se observaron a nivel microscópico las células de las diferentes cepas de *A. vinelandii* con un crecimiento de 48 horas. La cepa UW136 (Fig. 24, sup. izq.) presentó células con forma de bacilos o cocos con un contorno irregular generado por la presencia de los gránulos intracelulares de PHB de un color blanco brillante. La mutante DY27 (Fig. 24, sup. der) presentó el mismo fenotipo que la cepa silvestre con cantidad y tamaño de gránulos similares, siendo imposible distinguir entre ambos tipos celulares.

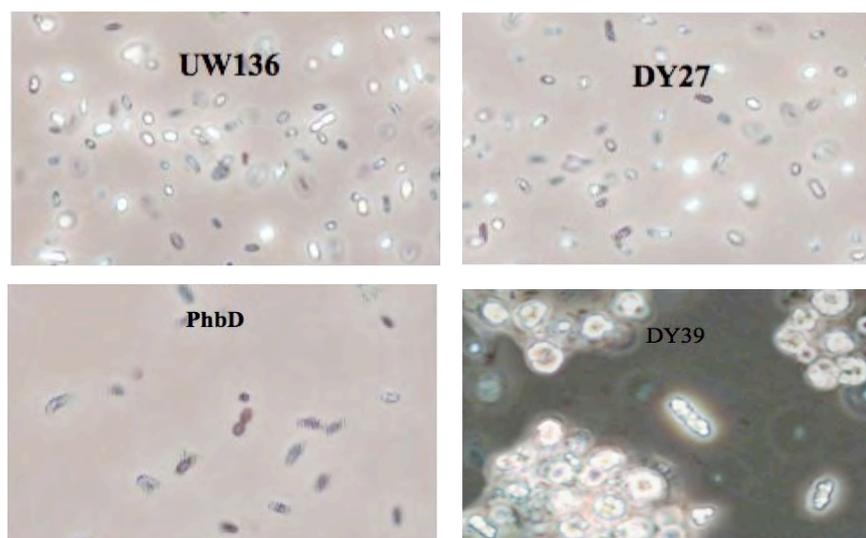


Figura 24. **Tipos celulares de las cepas UW136, DY27, phbD y DY39.** Células vistas al microscopio de las diferentes cepas de *A. vinelandii* con 48 horas de crecimiento en medio BS líquido. Los gránulos de PHB corresponden a los cuerpos blancos brillantes presentes en el interior de las bacterias.

En contraste, la mutante *phbD* (fig. 24, inf. Izq.) presentó células más oscuras que la cepa silvestre, de contorno regular, y que no brillaban al reflejo de la luz, fenotipo ocasionado por un número y tamaño de gránulos inferior al de la cepa silvestre. En la mutante DY39 (Fig. 24 inf. der.) se encontraron células de forma y tamaño irregular, que eran más brillantes a la luz que la cepa silvestre. Este fenotipo es consecuencia de un mucho mayor contenido de gránulos de PHB en el interior de las células.

9.9 Experimento de depolimerización del PHB en la cepa UW136

Para determinar los factores que favorecen la movilización del polímero, se cuantificó el contenido de PHB y proteína de la cepa UW136 de *A. vinelandii* a distintos tiempos y condiciones. Las condiciones de depolimerización establecidas se utilizaron para observar los fenotipos de las mutantes construidas y para obtener gránulos en condiciones de degradación. Estos gránulos se utilizaron para identificar proteínas asociadas a ellos durante la degradación (posibles depolimerasas).

Para esto se analizaron dos condiciones: en el primer caso, los cultivos se incubaron en medio BS líquido (ver apéndice) por un período de 139 horas (Fig. 25, izq.). Se observó que a las 56 horas se alcanzó una concentración máxima de 2.2 μg de PHB/ μg de proteína. A las 115 horas la concentración del polímero disminuyó a 1.7 μg de PHB/ μg de proteína y a las 139 horas se obtuvo un valor de 1.45 μg de PHB/ μg de proteína. En resumen, hubo un decremento total de 0.75 μg de PHB/ μg de proteína, que representa una degradación total del 34% del polímero acumulado. Con esto se comprueba que bajo estas condiciones la degradación está teniendo efecto después de las 56 horas.

Tomando como referencia el punto de máxima acumulación (56 horas), se realizó un segundo experimento (Fig. 25, der.): cultivos de UW136 con 56 horas de crecimiento en medio BS se cosecharon y se lavaron para eliminar la fuente de carbono del medio de cultivo. A continuación, las células se transfirieron al medio B-NH₄. Este medio carece de fuente de carbono y posee NH₄Cl como fuente de nitrógeno; dichas condiciones favorecen la movilización del polímero acumulado (Hermanwan y Jendrossek, 2007). Los cultivos

transferidos al nuevo medio se incubaron por 85 horas más. Al momento de la transferencia al medio BNH_4 , las células tenían una concentración de 1.83 μg de PHB/ μg de proteína.

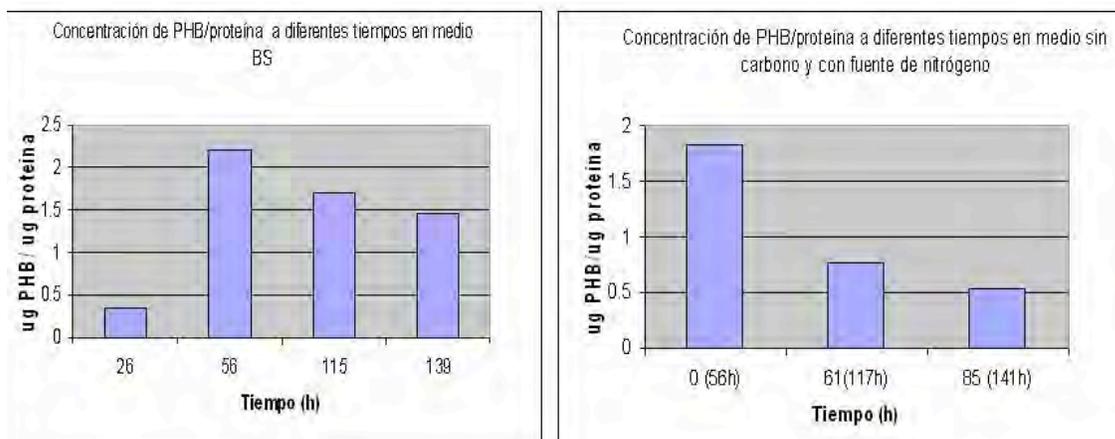


Figura 25. **Experimentos de depolimerización de PHB en la cepa UW136.** Izquierda: concentración de PHB/proteína a diferentes tiempos de un cultivo en medio BS. Derecha: concentración de un cultivo en medio $\text{B-NH}_4\text{Cl}$ (sin carbono) a tiempos similares al primer cultivo. A simple vista se puede observar que la degradación del polímero aumenta de manera notoria en ausencia de carbono.

La muestra de 61 horas tuvo una concentración de 0.76 μg de PHB/ μg de proteína (perdió 1.07 μg) y la de 85 horas contenía solo 0.54 μg de PHB/ μg de proteína (disminuyó 0.22 μg) obteniéndose una disminución total de 1.29 μg de PHB/ μg de proteína, que representa una pérdida del 70% del total de PHB contenido en la muestra inicial. Estos datos demuestran que bajo condiciones de ausencia de carbono y presencia de nitrógeno, la degradación ocurre con mayor rapidez.

Con estos datos se determinó que las condiciones favorables para observar la degradación son las del segundo experimento, las cuales se utilizaron con el fin de comprobar si las mutaciones en los genes que codifican para posibles depolimerasas afectan el contenido celular del PHB.

9.9 Experimento de acumulación y movilización del PHB en las cepas UW136, DY27 y phbD. Para observar el efecto de las mutaciones en la acumulación y movilización del polímero, se cuantificó el contenido de PHB en cultivos líquidos, usando como patrón los tiempos y condiciones determinadas en experimentos previos. Estas condiciones incluyeron: el crecimiento en medio BS por 60 horas (fase de acumulación, fig. 26); la sustracción del medio

de cultivo y el lavado de las células; y la resuspensión en medio B-NH₄Cl con incubación por 84 horas adicionales (condiciones de movilización, fig. 27). Para efectos de comparación, las concentraciones de PHB determinadas en este experimento se expresaron en porcentajes.

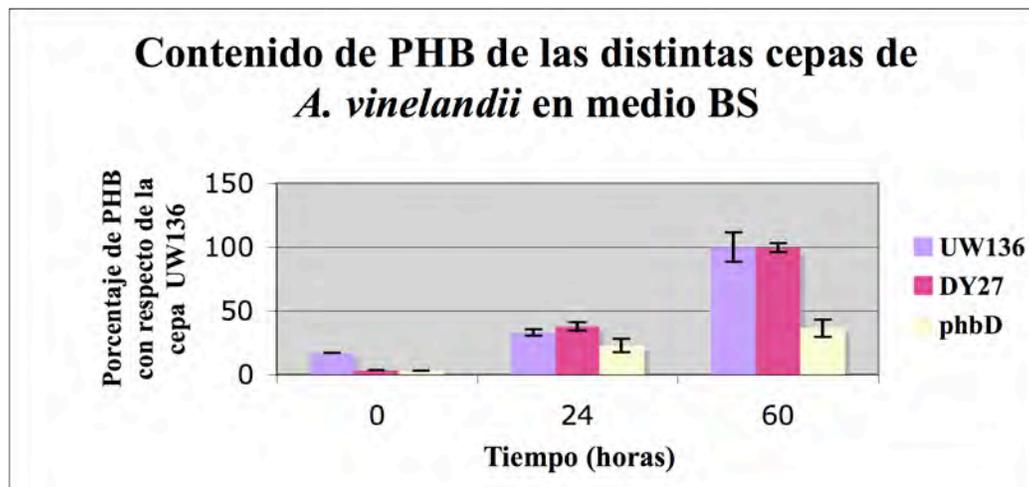


Figura 26. **Experimento de acumulación del PHB en las cepas UW136, DY27 y phbD.** Las muestras de las 0 horas corresponden al contenido de PHB en el inóculo. A las 60 horas los cultivos alcanzaron el máximo contenido del polímero.

Al momento de la inoculación, la cepa silvestre UW136 contenía el 16.7% de la concentración total de PHB acumulado por ésta cepa a las 60 horas (punto de máxima acumulación). En esta misma etapa, la mutante DY27 acumuló sólo el 3.6% del contenido de polímero alcanzado a las 60 horas de incubación. La mutante phbD presentó al inicio de la incubación el 8.4% del PHB total que contenía esta cepa a las 60 horas de crecimiento.

Al comparar entre sí las distintas cepas de *A. vinelandii* durante etapas específicas del crecimiento, se pudieron observar los siguientes resultados: La mutante DY27 presentó 21.7% del PHB acumulado por la cepa UW136 al inicio del experimento, y la mutante phbD presentó el 18.4 % del contenido de PHB con respecto de la cepa silvestre al momento de la inoculación. Después de 24 horas, la mutante DY27 presentó 114.7% del contenido de UW136, mientras que la mutante phbD acumuló el 69.2% del polímero con respecto de la cepa silvestre durante la misma etapa. A las 60 horas de incubación, la mutante DY27 acumuló el 99.4% del contenido de PHB de la cepa silvestre, mientras que la mutante phbD sólo presentó el 36.3% de lo que acumuló la cepa UW136.

Al llegar a este punto, los cultivos se transfirieron de su medio original al medio B-NH₄ para favorecer la movilización del PHB (figura 27).

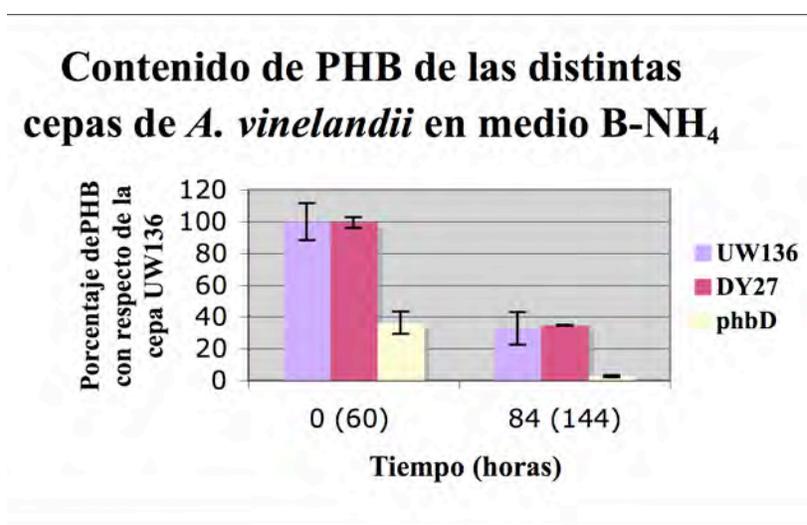


Figura 27. Experimento de movilización del PHB en las cepas UW136, DY27 y phbD. Las muestras del tiempo 0 provienen de los cultivos con 60 horas de incubación bajo condiciones de acumulación del PHB. Las muestras finales se analizaron a 84 horas de incubación bajo condiciones de degradación, que corresponden a 144 horas totales de desarrollo de todo el experimento.

Transcurridas 84 horas de la transferencia de los cultivos al medio sin fuente de carbono, la cepa silvestre UW136 movilizó el 67.3% del PHB contenido al inicio de la etapa de movilización. Por su parte, la mutante DY27 disminuyó 65% del contenido total a las 60 horas, mientras que la mutante phbD degradó 92.7% del contenido de PHB en ese mismo tiempo.

La mutante DY27 mostró el mismo comportamiento en la acumulación y movilización del PHB que la cepa silvestre. En este sentido, la mutante DY27 posee el mismo fenotipo que la silvestre UW136. Lo anterior sugiere que el producto génico de *Avin27080* no tiene una participación significativa en la degradación del PHB. Por otro lado, se debe tomar en cuenta la existencia de dos parálogos de *Avin27080* (*Avin03910*, que también fue objeto de estudio de este trabajo y *Avin44010*) y de otras tres secuencias en el genoma de *A. vinelandii* que codifican para posibles depolimerasas (*Avin33500*, *Avin34710* y *Avin46290*). Cualquiera de estos genes podría compensar la actividad perdida en la mutante DY27.

En contraste, la mutante *phbD* presentó una menor acumulación de PHB a lo largo de todo el experimento con respecto a la cepa silvestre. Durante la etapa de movilización, el polímero acumulado por la mutante *phbD* fue degradado con mayor rapidez a lo observado en la cepa silvestre. El fenotipo de menor acumulación del PHB es contrario al que se esperaría al mutagenizar una depolimerasa. Una posibilidad es que la producción del polímero esté afectada en dicha mutante. Se ha reportado que en una cepa de *A. vinelandii* donde se silenció al gen *phbC*, que codifica para la sintasa, la producción del PHB disminuyó considerablemente, pero no se abatió por completo. También se determinó la actividad sintasa de la mutante *phbC* y se observó que presentaba un poco de esta actividad enzimática (Segura y Espín, 2003). Estos datos sugieren que en *A. vinelandii* existe otra enzima que pudiera realizar la síntesis del PHB. El fenotipo de menor acumulación del polímero en la mutante *phbD* sugiere que la proteína Avin34810 podría participar en el proceso de síntesis. Existen depolimerasas que poseen un alto grado de identidad en secuencia con las sintasas tipo III, inclusive en la posición de los aminoácidos catalíticos. Sin embargo, este no es el caso del producto génico de Avin34810 el cual, como se mencionó anteriormente, se clasifica dentro de la familia de depolimerasas extracelulares de dPHA con dominio catalítico tipo 1 familia homóloga 9, pues presenta una identidad alta (50%) con depolimerasas extracelulares bien caracterizadas. Es poco probable que la proteína Avin34810 sea una PHB sintasa. El fenotipo de menor acumulación de PHB de la mutante *phbD* también podría ser resultado de una elevada movilización del polímero. La proteína Avin34810 podría estar interaccionando con las proteínas de síntesis o de degradación, o con algún elemento que participe en la regulación del metabolismo de PHB, y de esta manera afectaría la acumulación del polímero.

Sobre la mutante DY39, los análisis de cuantificación de la movilización no se realizaron. Esto se debió a que al analizar su genotipo por hibridación tipo *Southern* se determinó que, además de existir copias del gen *Avin03910* mutagenizadas por inserción del cassette de resistencia a gentamicina, aun existían copias silvestres del gen (*A. vinelandii* es una bacteria polipliote). Tras numerosos intentos por segregarse la mutación mediante resiembra en presencia del antibiótico, no fue posible obtener una mutante DY39 con todas las copias del gen mutagenizadas. Sin embargo, el fenotipo observado en los cultivos sólidos (Fig.21) muestra

claramente que el producto génico de *Avin03910* muy probablemente participa en la degradación de PHB.

9.11 Identificación de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB.

Se identificaron las proteínas asociadas a los gránulos de PHB. Los gránulos se purificaron a partir de cultivos de la cepa UW136 de *A. vinelandii* incubados por 48 horas bajo condiciones de síntesis y de degradación. Las proteínas adheridas a estos gránulos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 28). Se analizaron las proteínas provenientes de gránulos en condiciones de degradación. Estas se identificaron por espectrometría de masas, en la Unidad de Proteómica. La identificación de las bandas de proteína arrojó los siguientes resultados (Fig. 28 y Tabla 4):

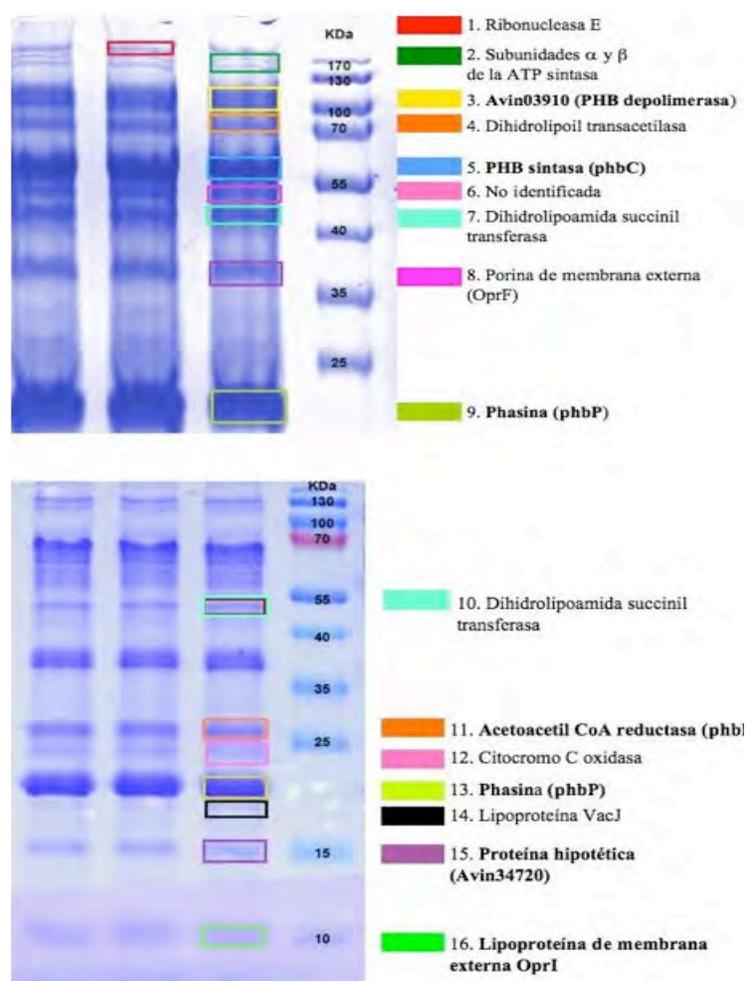


Figura 28. SDS-PAGE de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB en *A. vinelandii*. Las proteínas involucradas en el metabolismo del PHB aparecen resaltadas.

No.	No. ID	ID de Avin OP	Proteína	Nombre corto	Masa teórica KDa	P. I.	péptidos identificados	Cover tura	Función
1	gij67154531	Avin14810	Ribonucleasa E	RneE	128.961	4.90	18	17%	Maduración del RNA 5S
2	gij67087723	Avin52160	Subunidades α y β de la ATP sintasa	AtpD	49.660	5.1	4	8%	Biosíntesis del ATP
3	gij67154819	Avin03910	PHB depolimerasa	PhaZ	101.058	5.52	16	20%	Degradación del PHB
4	gij580740	Avin44910	Dihidrolipoil acetil transferasa, componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa	Ipd	65.033	5.34	4	6%	Descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA
5	gij67153457	Avin23630	PHB sintasa	PhbC	64.404	6.05	8	14%	Polimerización de hidroxibutiril-CoA en la biosíntesis del PHB
6	-	-	NO IDENTIFICADA	-	-	-	-	-	-
7 y 10	gij67156806	Avin29760	Dihidrolipoil succinil transferasa, componente E2 del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa	SucB	41.976	5.39	10	35%	Descarboxilación oxidativa de la oxoglutarato a succinil-CoA
8	gij67153428	Avin23330	Porina de membrana externa	OprF	37.612	4.44	17	71%	Componente de la membrana externa
9 y 13	gij67153461	Avin23670	Phasina	PhbP	20.266	4.93	12	78%	Cubierta de los gránulos de PHB
11	gij67153459	Avin23650	Acetoacetil CoA reductasa	PhbB	26.709	6.18	3	20%	Reducción del acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA en la biosíntesis del PHB
12	gij67157344	Avin20000	Citocromo C oxidasa	CcoO	22.616	7.02	1	9%	transporte de electrones
14	gij67153928	Avin32730	Lipoproteína	VacJ	25.969	4.91	7	57%	Componente de la membrana
15	gij226945523	Avin34720	Proteína hipotética	none	21.776	4.63	1	6%	desconocida
16	gij67153407	Avin23100	Proteína de membrana externa	OprI	8.729	7.89	2	24%	Componente de la membrana

Tabla 4. Proteínas identificadas en los gránulos de PHB mediante ESI LC-MS

En la muestra 1 se encontró la Ribonucleasa tipo E (Tabla 4), que pertenece al complejo multienzimático del degradosoma. Este complejo ejecuta el procesamiento y la degradación del RNA en *E. coli* y en otras bacterias (Chauhan *et al.*, 1991).

En la muestra 2 se encontraron las subunidades α y β de la ATP sintasa (Tabla 4), complejo enzimático unido a la membrana plasmática. Este complejo acopla la síntesis/hidrólisis de ATP con el transporte de protones a través de la membrana. El complejo F1 de la ATPasa es el centro catalítico y está compuesto por 5 subunidades (α , β , γ , δ y ϵ). Las subunidades beta tienen una función catalítica mientras que las alfa son reguladoras (Rappas *et al.*, 2004).

El espectro de masas de la muestra 3 (Fig. 29) correspondió al producto génico de *Avin03910*, la PHB depolimerasa cuya mutante se describió en el apartado 9.8 de esta sección de resultados. La localización de un gen cuyo producto es homólogo a phasinas en la región cromosomal de *Avin03910* (Fig. 14), el fenotipo de mayor acumulación del polímero de la mutante DY39 (Fig. 23), y el hallazgo de la proteína correspondiente asociada a los gránulos del PHB es una fuerte evidencia de la participación de esta proteína en el metabolismo del polímero. Estos datos en conjunto indican que el producto génico de *Avin03910* desempeña un papel muy importante en el metabolismo del PHB.

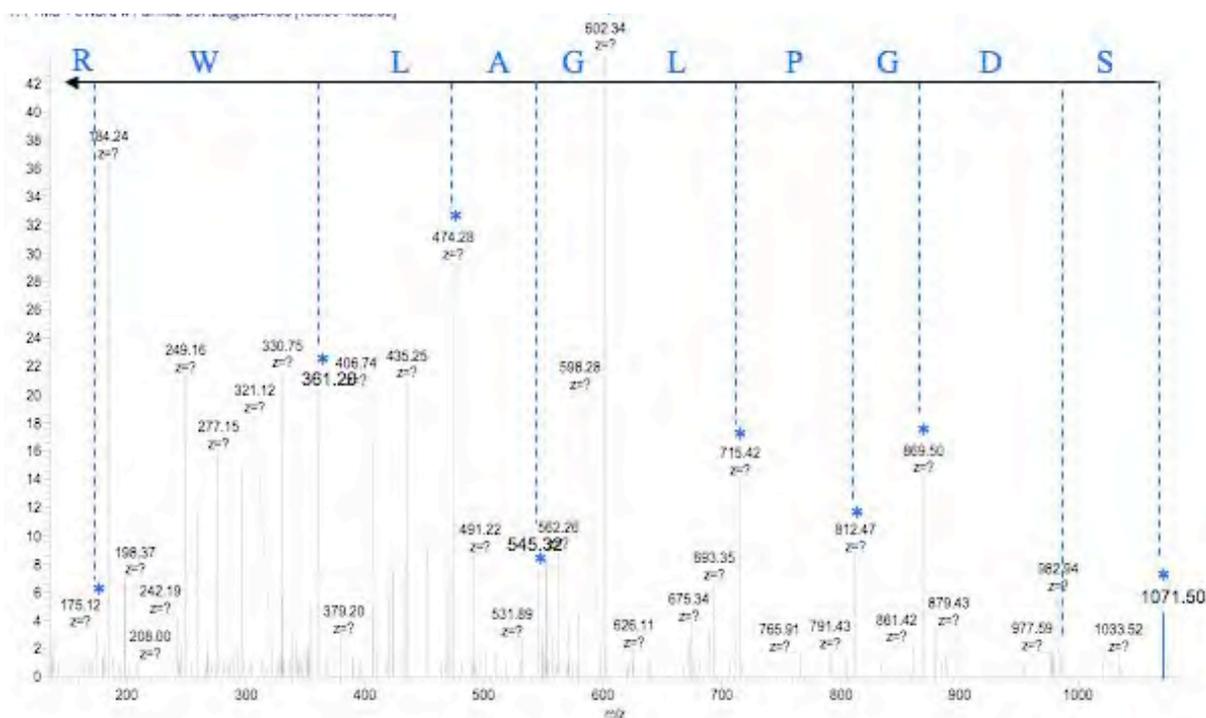


Figura 29. Espectro del péptido perteneciente al producto génico de *Avin03910*.

En la muestra 4 se encontró la dihidrolipoamida-acetil transferasa (Tabla 4), componente E2 del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa. Este complejo multienzimático

realiza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA. La dihidrolipoil acetil transferasa transfiere el grupo acetilo, contenido en el lipoato y proveniente del piruvato, al tiol de la coenzima A (Nelson y Cox, 2005).

En la muestra 7 se encontró la dihidrolipoamida-succinil transferasa (Tabla 4), que forma parte del complejo enzimático alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (componente E2). Este complejo realiza la descarboxilación oxidativa del alfa-cetoglutarato para convertirlo en succinil-CoA. La enzima transfiere el grupo succinilo contenido en el lipoato al grupo tiol de la coenzima A. El complejo alfa-cetoglutarato deshidrogenasa es muy parecido en estructura y función al de la piruvato deshidrogenasa, descrito en la muestra 4. (Nelson y Cox, 2005). Llama la atención el hecho de haber encontrado en los gránulos del PHB dos componentes de enzimas con funciones análogas, y que están directamente relacionadas con la coenzima A, que es un elemento de regulación alostérica de las enzimas involucradas en el metabolismo del PHB. La localización de la subunidad E2 de estos dos complejos enzimáticos puede deberse a que estas dos proteínas contienen un cofactor lipoato unido covalentemente, y durante la ruptura celular realizada para obtener los gránulos de PHB esta molécula hidrofóbica podría adherirse a ellos por su hidrofobicidad y porque éstos contienen fosfolípidos. Sin embargo, es interesante hacer notar que la piruvato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa son enzimas muy relacionadas metabólicamente con distintos pasos del metabolismo de PHB. Son las dos enzimas proveedoras de las moléculas que se necesitan para el metabolismo de PHB (aparte de los acarreadores de electrones NADPH y NAD). La piruvato deshidrogenasa produce el acetil-CoA que se utiliza como sustrato para producir el polímero (Fig. 9). La alfa-cetoglutarato deshidrogenasa por su parte produce el succinil-CoA que es requerido como donador de CoA para la activación del acetoacetato generado la movilización de PHB (Fig. 9). Existe la posibilidad de que estas dos enzimas proveedoras de metabolitos para el ciclo metabólico del PHB se encuentren localizadas en el gránulo por su relación metabólica con este polímero y para facilitar interacciones e intercambios con otros componentes de estas vías.

La muestra 5 corresponde a la PHB sintasa (Tabla 4), la enzima que realiza la polimerización del PHB al unir moléculas de D-(-)-3-hidroxi-butiril-CoA mediante la formación de enlaces éster, y producto génico de *phbC* (Jendrosseck, 2009).

En la muestra 8 se identificó a la porina de membrana externa OprF. Las porinas son proteínas de barril que atraviesan la membrana celular, y funcionan como un poro a través del cual se difunden ciertas moléculas. A diferencia de otras proteínas de transporte membranal, las porinas forman canales suficientemente grandes para permitir la difusión pasiva de pequeños metabolitos, como carbohidratos, iones y aminoácidos. Están presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, de las mitocondrias y de los cloroplastos (Klebba, 2005).

Las muestras 9 y 13 corresponden a la phasina (Tabla 4), producto génico de *phbP*, el cual está ubicado en la región cromosomal del operón biosintético *phbBAC* (Fig. 5). Las phasinas son proteínas pequeñas (20 Kda) que recubren los gránulos de PHB, y conforman la mayor parte de la superficie del gránulo (Jendroseek, 2009). Las phasinas constituyen el componente mayoritario de la cubierta de los gránulos, pueden llegar a representar hasta el 5% del total de las proteínas presentes en los gránulos de estos polímeros (Wieczorek *et al.*, 1995). Como se puede observar en la imagen del gel (Fig. 29), se trata de proteína muy abundante. Esta es la primera vez que se tiene evidencia de la phasina y su relación con los gránulos de PHB en *A. vinelandii*.

La muestra 14 corresponde a VacJ (Tabla 4), una lipoproteína de membrana externa. En las bacterias Gram-negativas las lipoproteínas actúan como estabilizadores estructurales, formando enlaces no covalentes con el peptidoglicano de la membrana celular (Suzuki *et al.*, 1994).

En la muestra 15 se identificó a la proteína hipotética correspondiente al gen *Avin34720* (Tabla 4). La secuencia consta de 203 residuos y tiene un peso molecular de 21.77 kDa. El gen *Avin34720* se encuentra adyacente y orientado en la misma dirección a la secuencia de *Avin34710*, el gen de una posible depolimerasa (Fig. 30), con la cual podría estar formando un operón. La ubicación del gen *Avin34720* ligado a una depolimerasa y la presencia de la proteína en los gránulos son evidencias de que la proteína de *Avin34720* está involucrada en el metabolismo del PHB. Es interesante destacar que se realizaron análisis comparativos de esta

secuencia en las bases de datos existentes para encontrar homólogos en otros organismos, productores o no de PHB, y/o firmas características que pudieran sugerir una función. La proteína Avin34720 sólo se encontró en *A. vinelandii*. De esta manera es destacable que se identificó una proteína completamente nueva relacionada con el metabolismo de PHB.

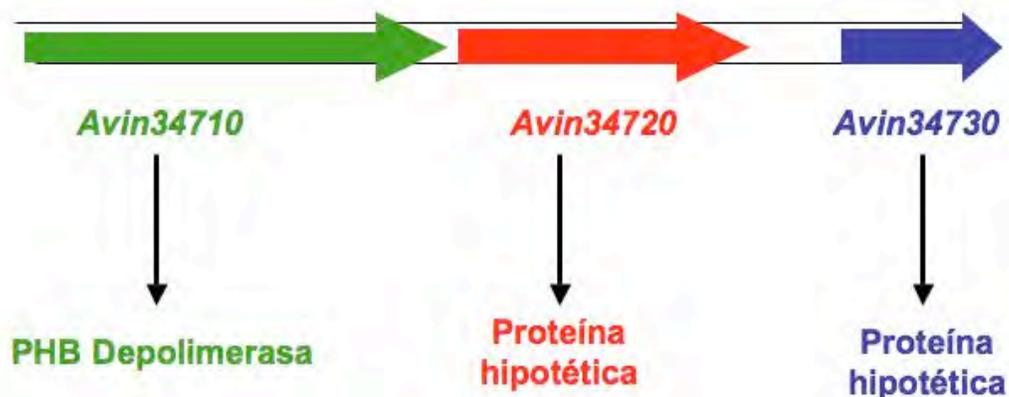


Figura 30. Mapa de la región cromosomal de Avin34720 y la depolimerasa hipotética Avin34710.

En la muestra 16 se localizó a la proteína de membrana externa OprI (Tabla 4). Se trata de una lipoproteína pequeña de 83 residuos con un peso molecular de 8.72 kDa, que está muy conservada entre diversas especies de *Pseudomonas* (Fig 31). Este grado de conservación, con identidades superiores a 85% a nivel de secuencia de aminoácidos, hace que OprI se considere como un posible marcador filogenético (De Vos *et al.*, 1998).

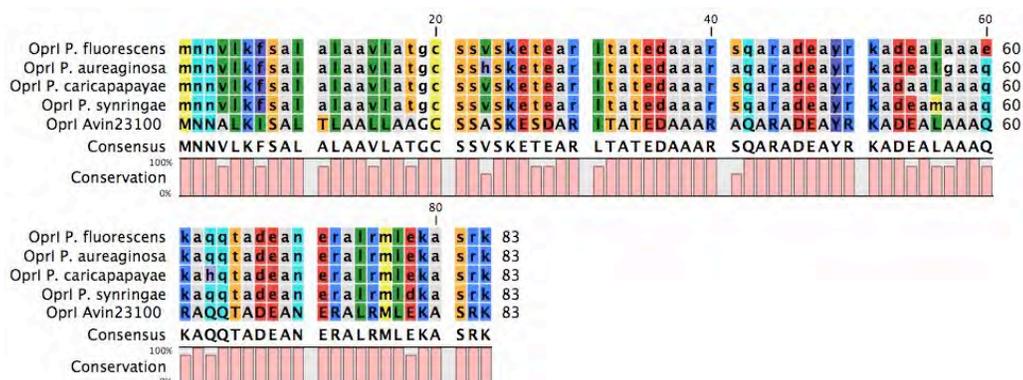


Figura 31. Alineamiento múltiple de proteínas OprI provenientes de distintas especies de *Pseudomonas* y de *A. vinelandii*.

Algunas lipoproteínas participan en la estabilización de la membrana externa, el transporte de sustratos, el ensamblaje de otras proteínas y en la señalización celular. Muchas de ellas son funcionales en el periplasma e interactúan con otras proteínas (Bernstein, 2011).

También se obtuvieron secuencias parciales de otras proteínas de membrana externa. Es importante comentar que muchas de las proteínas encontradas en los gránulos nativos purificados se encuentran normalmente en membrana. Es posible que muchas de estas proteínas no se encuentren en los gránulos de PHB *in vivo*, pero por su hidrofobicidad se adhieran a éstos durante el rompimiento. Sin embargo, no se puede descartar que alguna de ellas tenga una participación en el metabolismo de PHB. Tal es el caso de la proteína OprI. En *A. vinelandii* se observó que una mutación en el gen *oprI* presenta un fenotipo de menor acumulación de PHB en cultivos sólidos con 72 horas de incubación, con respecto a la cepa silvestre UW136 (Muriel, L. F., datos sin publicar). La presencia de OprI en los gránulos del polímero y el fenotipo de la mutante OprI son una fuerte evidencia de la participación de esta proteína en el metabolismo del PHB. Es necesario realizar estudios para determinar el papel que desempeña esta proteína en el metabolismo del PHB.

Con esta estrategia, además de encontrar proteínas como la PHB sintasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la phasina PhbP1 que usualmente se encuentran en los gránulos en los organismos productores de PHB, se logró identificar varias proteínas que participan en el metabolismo de PHB. Una de ellas es la depolimerasa Avin03910, cuya desactivación provoca una sobreproducción de PHB y que es incapaz de movilizar el PHB acumulado. Estos resultados permiten establecer que ésta PHB depolimerasa debe ser la principal responsable de degradar el polímero bajo las condiciones utilizadas.

X. CONCLUSIONES

- La mutación del gen *Avin27080* no afecta la movilización del PHB en *A. vinelandii*, lo que sugiere que esta enzima no tiene una participación significativa en el metabolismo del PHB.
- El fenotipo de baja acumulación de PHB (aún bajo condiciones de síntesis del polímero) de la mutante *phbD* es contrario al esperado para una mutante afectada en la degradación del polímero. Esto sugiere que la proteína codificada por *Avin34810* está involucrada en la síntesis del PHB, más que en su degradación. Para confirmar esta hipótesis, es necesario caracterizar la actividad enzimática que posee esta proteína y determinar el efecto de la mutación de este gen en las actividades de las enzimas biosintéticas o en su expresión.
- La presencia del producto génico de *Avin03910* en los gránulos de PHB y el fenotipo de la mutante DY39 constituyen evidencias importantes de la participación de esta enzima en la degradación de dicho polímero. El fenotipo obtenido sugiere que esta enzima es la depolimerasa principal, al menos bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de la cepa mutante, así como demostrar bioquímicamente la actividad enzimática de *Avin03910* para confirmar el papel de esta proteína en el proceso de movilización del PHB.
- Las proteínas *PhbC* y *PhbB*, que participan en la síntesis del polímero, también se encuentran presentes en los gránulos de PHB en *A. vinelandii*.
- Al igual que en otros organismos, en *A. vinelandii* la phasina constituyen un componente muy importante de la cubierta de los gránulos de PHB. Es necesario determinar el papel que juega esta proteína mayoritaria en el metabolismo del polímero.

- La presencia del producto génico de *Avin34720* en los granúlos de PHB confirma que este gen anotado como hipotético codifica para una proteína que se expresa. La localización y organización de *Avin34720* y *Avin34710*, el gen de la depolimerasa hipotética, refuerzan la hipótesis de que ambas proteínas tienen participación en el metabolismo del PHB, aunque es necesario estudiar sus respectivas funciones.
- La presencia de OprI en los granúlos de PHB y el fenotipo de su mutante obtenida en nuestro grupo confirman la participación de esta proteína en el metabolismo del polímero. Sin embargo, no se tiene idea de el papel que desempeña esta proteína.

XI. PERSPECTIVAS.

- Caracterizar las actividades enzimáticas de las depolimerasas *Avin27080*, *Avin34810* y *Avin03910* por medio de la expresión heteróloga de las proteínas en los vectores *pDY27*, *pDY34* y *pDY39*, que ya fueron construidos.
- Obtener la mutante *DY39* con todas las copias del gen mutadas para realizar la cuantificación de PHB en cultivos de la cepa mutante *DY39* y comparar el contenido del polímero con respecto a la cepa silvestre *UW136*.
- Determinar el peso molecular del PHB producido por la mutante *DY39* para establecer si la desactivación de la principal depolimerasa de PHB, además de favorecer una mayor acumulación del polímero, tiene efectos en el tamaño del polímero producido.
- Determinar los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de PHB y cuantificar las actividades biosintéticas en la mutante *phbD* para establecer la razón por la que esta cepa acumula una menor cantidad de PHB.
- Generar mutantes en la phasina *PhbP* para estudiar los efectos del silenciamiento de esta enzima la formación de los gránulos y la acumulación o degradación del PHB .
- Generar mutantes en las secuencias de la depolimerasa putativa *Avin34710* y la proteína *Avin34720* para determinar su participación en el metabolismo del PHB, así como verificar si realmente conforman un operón.
- Determinar el papel que desempeña la proteína *OprI* en el metabolismo del PHB mediante un análisis mas profundo de su mutante.
- Realizar complementaciones de todas las mutantes generadas con el fin de confirmar los fenotipos observados.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H.; Doi, Y. 1996. Enzymatic and environmental degradation of racemic poly(3-hydroxybutyric acid)s with different Stereoregularities. *Macromolecules* 29: 8683-8688.
- Abe, T.; Kobayashi, T.; Saito, T. 2005. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 187: 6982-6990.
- Alameida de, A.; Ruiz, J. A.; López, N. I.; Pettirani, M. J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Quimica viva* 3: 122-133.
- Alexeyev, M.F.; Shokolenko, I.N.; Croughan, T.P. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* 160: 63-67.
- Anderson, A.J.; Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Reviews* 54: 450-472.
- Bachmann, B. M.; Seebach, D. 1999 Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules* 32: 1777-1784.
- Bernstein, H. D. 2011. The double life of a bacterial lipoprotein. *Mol. Microbiol.* 79: 1128-1131.
- Bishop, P.E.; Brill, W.J. 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.* 130: 954-956.

- Brucato, C.L.; Wong, S.S. 1991. Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 497-502.
- Chauhan, A. K.; Miczak, A.; Taraseviciene, L.; Apirion, D. 1991. Sequencing and expression of the rne gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 19:125-129
- Castañeda, M.; Sanchez, J; Moreno, S; Nuñez, C.; Espin G. 2001. The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.
- Chalkley, R.J.; Baker, P.R.; Medzihradszky, K.F.; Lynn, A.J.; Burlingame; 2008. In-depth analysis of tandem mass spectrometry data from disparate instrument types. *Mol. Cell Proteomics* 7: 2386-2398.
- Chen, G.Q.; Page, W.J. 1994. The effect of substrate on the molecular weight of poly-beta-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* 16:155-160.
- Choi, J.; Lee, S. Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:13-21.
- Chou M. E.; Chang W.T.; Chang Y. C.; Yang M. K. 2009. Expression of four *pha* genes involved in poly-beta-hydroxybutyrate production and accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. *Mol. Genet. Genomics.* 282: 97-106.
- Cocotl, M. 2006. Caracterización del gen *rsmA* involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura, BUAP, Puebla, México.
- Cornibert, J.; Marchessault, R.H. 1972. Physical properties of poly-beta-hydroxybutyrate: conformational analysis and crystalline structure. *J. Mol. Biol.* 71:735-756.

-De Eugenio, L.I.; García P.; Luengo, J.M.; San, J.M.; San Román, J.; García, J.L.; Prieto, M.A. 2007. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442. *J. Biol. Chem.* 282: 4951-4962.

-De Vos, D.; Bouton, C.; Sarniguet, A.; De Vos, P.; Vauterin, M.; Cornelis, P. 1998. Sequence diversity of the *oprI* gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* 180: 6551–6556.

-Doi, Y.; Segawa, A.; Kawaguchi, Y.; Kunioca, M. 1990. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 165-170.

- Doi, Y.; Kumagai, Y.; Tanahashi, N.; Mukai, K. 1992. Structural effects on biodegradation of microbial and synthetic poly(hydroxyalkanoates). En “*Biodegradable Polymers and Plastics*”, Ed. M.Vert. London: R. Soc. Chem. pp. 139–48.

-Eng, J.K.; McCormack, A.L.; Yates, J.R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5: 976–989.

-Espín, G. 2006. Capítulo 9: Biología de *Azotobacter vinelandii*. Microbios en línea. (http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf).

- Fukui, T.; Narikawa, T.; Miwa, K.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K. 1988. Effect of limited tryptic modification of a bacterial poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase on its catalytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 952: 164-171.

-Gao, D.; Maehara, A.; Yamane, T.; Ueda, S. 2001. Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 159-164.

-Glick, B. R.; Brooks, H. E.; Pasternak, J. J. 1985. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 162: 276-279.

-Gonda, K. E.; Jendrossek, D.; Molitoris, H. P.; 2000. Fungal degradation of the thermoplastic polymer poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) under simulated deep sea pressure. *Hydrobiologia* 426: 173–183.

-Handrick, R.; Reinhardt, S.; Jendrossek, D. 2000. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182:5916–5918.

-Handrick, R.; Reinhardt, S.; Focarete, M.L.; Scandola, M.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Jendrossek, D. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.* 276: 36215-36224.

-Handrick, R.; Reinhardt, S.; Schultheiss, D.; Reichart, T.; Schüler, D.; Jendrossek, V.; Jendrossek, D. 2004a. Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *J. Bacteriol.* 186: 2466– 2475.

-Handrick, R.; Reinhardt, S.; Kimmig, P.; Jendrossek, D. 2004b. The “Intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* 186: 7243–7253.

-Hayward, A. C.; Forsyth, W. G. C.; Roberts, J. B. 1959. Synthesis and breakdown of poly β -hydroxybutyric acid by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 20: 510–518.

-Hermawan, S.; Jendrossek, D. 2007 Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 266: 60-64.

- Jaeger, K. E.; Steinbüchel, A.; Jendrossek, D. 1995. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(ω -hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3113–3118.
- Jendrossek, D.; Schirmer, A.; Schlegel, H. D. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 451- 463.
- Jendrossek, D.; Schirmer, A.; Handrick, R. 1997. Recent advances in characterization of bacterial PHA depolymerases. In *International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Ed. G. Eggink, A. Steinbüchel, Y. Poirier, B. Witholt, pp. 89–101. Ottawa, Can.: NRC Res.
- Jendrossek, D. 2001. Microbial degradation of polyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71: 293-325.
- Jendrossek, D.; Handrick, R. 2001. Diversität bakterieller PHB-depolymerasen am beispiel von *Paucimonas* gen. nov. *lemoinei* comb. nov. *BIOspektrum* 6: 521-526.
- Jendrossek, D., Handrick, R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:403–32.
- Jendrossek, D. 2007. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1186–1196.
- Jendrossek, D. 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191: 3195-3202.
- Jia, Y.; Kappock, J.; Frick, T.; Sinkey, A.J.; Stubbe, J. 2000. Lipases provide a new mechanistic model for poly hydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. *Biochemistry* 39: 3927-3936.

- Kadouri, D.; Jurkevitch, E.; Okon, Y. 2003. Poly beta-hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. *Arch. Microbiol.* 180: 309-318.
- Kasuya, K.I.; Inoue, Y.; Tanaka, T.; Akehata, T.; Iwata, T.; Fukui, T.; Doi, Y. 1997. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609 isolated from freshwater. *Appl. Environ. Microb.* 63:4844-4852.
- Kessler, B.; Witholt, B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* 86: 97–104.
- Klebba P.E. 2005. "The porinologist". *J. Bacteriol.* 187: 8232–8236.
- Klingbeil, B.; Kroppenstedt, R.M.; Jendrossek, D. 1996. Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 142: 215-221.
- Knoll, M.; Hamm, T.M.; Wagner, F.; Martinez, V.; Pleiss, J. 2009. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* 10:89.
- Kobayashi, T.; Saito, T. 2003. Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bios. Bioeng.* 96 : 487-492.
- Kobayashi, T.; Shiraki, M.; Abe, T.; Sugiyama, A.; Saito, T. 2003. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.* 185: 3485-3490.

- Kobayashi, T.; Nishikori, K.; Saito, T. 2004. Properties of an intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Curr. Microbiol.* 49: 199–202.
- Kobayashi, T.; Uchino, K.; Abe, T.; Yamazaki, Y.; and Saito, T. 2005. Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 187: 5129-5135.
- Koenig, T.; Menze, B.H.; Kirchner, M. 2008. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J. Proteome Res.* 7: 3708-3717.
- Kuchta, K.; Chi, L.; Fuchs, H.; Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2007. Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Biomacromolecules* 8: 657-662.
- Lee, S. Y. 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. and Bioengineering.* 49: 1-14.
- Lee, S. Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology.* 14: 431-438.
- Lenz, R. W.; Marchessault, R. H. 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules.* 6:1-8.
- Liebergesell, M.; Schmidt, B.; Steinbüchel, A. 1992. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 227-232.
- Liebergesell, M.; Sonomoto, K.; Madkour, M.; Mayer, F.; Steinbüchel, A. 1994. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum*

and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *Eur. J. Biochem.* 226: 71-80.

-Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

-Madison, L.; Huisman, G. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Rev.* 63: 21-53

-Maehara, A.; Doi, Y.; Nishiyama, T.; Takagi, Y.; Ueda, S.; Nakano, H.; Yamane, T. 2001. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 9–15.

-Maldonado, R.; Jiménez, J.; Casadesús, J. 1994. Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* 176: 3911-3919.

-Manchak, J.; Page, W. J. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology.* 140: 953-963.

-Marchessault, R. H.; Sarakovan, I. 1995. Artificial granules suspension of long side chain poly(3-hydroxyalkanoate). *Can. J. Microbiol.* 41: 138-142.

-Matavulj, M.; Molitoris, H. P. 1992. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 323-332.

-Merrick, J. M.; Doudoroff, M. 1964. Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88: 60–71.

-Merrick, J. M.; Steger, R.; Dombrosky, D. 1999. Hydrolysis of native poly (hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Macromol.* 25:129-134.

-Miroux, B.; Walter, J. E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260: 289-298.

-Nelson, D.; Cox, M. "Lehninger Principles of Biochemistry" 4^o Ed. Freeman and Company, New York, 2005. pp 604-610.

-Noguez, R.; Segura, D.; Moreno, S.; Hernández, A.; Juárez, K.; Espín, G. 2008. Enzyme ^INtr, NPr and ^{IIA}Ntr are involved in regulation of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15:244-254.

-Page, W.J.; Huyer, M. 1984. Derepression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore system, using iron-containing minerals to limit iron repletion. *J. Bact.* 158: 496-502.

-Page, W.J.; Knosp, O. 1989. Hyperproduction of poly-3-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1334-1339.

-Page, W.J. 1992. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 329-333.

-Page, W. J.; Cornish, A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4236-4244.

- Papageorgiou, A.; Hermanwan, S.; Singh, C.B.; Jendrossek, D. 2008. Structural basis of poly(3-hydroxybutyrate) hydrolysis by PhaZ7 depolymerase from *Paucimonas lemoignei*. *J. Mol. Biol.* 382: 1184–1194.
- Peralta-Gil, M.; Segura, D.; Guzman, J.; Servin-Gonzalez, L.; Espin, G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol.* 184: 5672-5677.
- Pettinari, M.J.; Chaneton, L.; Vazquez, G.; Steinbüchel, A.; Méndez, B. 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid* 50:36-44.
- Poli, A.; Di Donato, P.; Abbamondi, G. R.; Nicolaus, B. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea* 2011: 1-13.
- Poole, R. K.; Hill, S. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*: roles of the terminal oxidases. *Biosci. Rep.* 17: 303-317.
- Pötter, M.; Madkour, M. H.; Mayer, F.; Steinbüchel, A. 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148: 2413-2426.
- Pötter, M. 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* 150: 2301-2311.
- Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6:552-560.

Prentki, P.; Krisch, H.M. 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313.

-Qi, Q.; Steinbüchel, A.; Rehm, B.H. 2000. *In vitro* synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 37- 43.

-Rappas, M.; Niwa, H.; Zhang, X. 2004. Mechanisms of ATPases: a multi-disciplinary approach. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 5: 89-105.

-Ren, Q.; de Roo, G.; Ruth, K.; Witholt, B.; Zinn, M.; Thöny-Meyer, L. 2009. Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* 10: 916-922.

-Romen, F.; Reinhardt, S.; Jendrossek, D. 2004. Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of *Schlegelella* sp. KB1a. *Arch. Microbiol.* 182: 157-164.

-Sadoff, H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev.* 39: 516-539.

-Saegusa, H.; Shiraki, M.; Kanai, C.; Saito, T. 2001. Cloning of an intracellular poly(D)-3-hydroxybutyrate depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* 183: 94-100.

-Saito, T.; Takizawa, K.; Saegusa, H. 1995. Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. *Can. J. Microbiol.* 41: 187-191.

-Saito, T.; Kobayashi, T. 2001. Intracellular degradation of PHAs. In A. Steinbüchel and Y. Doi (ed.), "Biopolymers" vol. 3b. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. p. 24-40.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. "Molecular Cloning: a laboratory manual" 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory, Press*, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Schirmer, A.; Jendrossek, D.; Schlegel, H.G. 1993. Degradation of poly(3 hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1220-1227.
- Segura, D.; Espín, G. 1998. Mutational inactivation of gene homologous to *Escherichia coli* *ptsP* affects poly-(3)-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 180: 4790-4798.
- Segura, D.; Guzmán, J.; Espín, G. 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 159-163.
- Segura, D.; Espín, G. 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 414-418.
- Senior, P.J.; Dawes, E.A. 1973. The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 134: 225-238.
- Setubal, J. C.; dos Santos, P.; Goldman, B. S.; Ertesvåg, H.; Espin, G.; Rubio, L. M.; Valla, S.; Almeida, N. F.; Balasubramanian, D.; Cromes, L.; Curatti, L.; Du, Z.; Godsy, E.; Goodner, B.; Hellner-Burris, K.; Hernandez, J. A.; Houmiel, K.; Imperial, J.; Kennedy, C.; Larson, T. J.; Latreille, P.; Ligon, L. S.; Lu, J.; Mærk, M.; Miller, N. M.; Norton, S.; O'Carroll, I. P.; Paulsen, I.; Raulfs, E. C.; Roemer, R.; Rosser, J.; Segura, D.; Slater, S.; Stricklin, S. L.; Studholme, D. J.; Sun, J.; Viana, C. J.; Wallin, E.; Wang, B.; Wheeler, C.; Zhu, H.; Dean, D. R.; Dixon, R.; Word, D. 2009. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* 191: 4534-4545.

- Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219 - 228.
- Steinbüchel, A.; Aerts, K.; Babel, W.; Follner, C.; Liebergesell, M.; Madkour, M. H.; Mayer, F.; Pieper-Fürst, U.; Pries, A.; Valentin, H. E.; Wieczorek, R. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41: 94-105.
- Suzuki, T.; Murai, T.; Fukuda, I.; Tobe, T.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. 1994. Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 11: 31-41.
- Taidi, B.; Mansfield, D. A.; Anderson, A. J. 1995. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 201-206.
- Tokiwa, Y.; Calabia, B. P. 2004. Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol. Lett.* 26: 1181-1189.
- Tseng, C. L.; Chen, H. J.; Shaw, G. C. 2006. Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis phaZ* gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase. *J. Bacteriol.* 188: 7592-7599.
- Uchino, K.; Saito, T.; Gebauer, B.; Jendrossek, D. 2007. Isolated poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* 189: 8250-8256.
- Uchino, K.; Saito, T.; Jendrossek, D. 2008. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *App. Env. Microbiol.* 74: 1058-1063.

- Valentin, H. E.; Stuart, E.S.; Fuller, R.C.; Lenz, R.W.; Dennis, D. 1998. Investigation of the function of proteins associated to polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas putida* BMO1. *J. Biotechnol.* 63: 145-157.
- Van Der Walle, G.; De Koning, G.; Weusthuis, R.; Eggink, G. 2001. Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 71: 263-291.
- Wieczorek, R.; Pries, A.; Steinbüchel, A.; Mayer, F. 1995. Analysis of a 24 kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 177: 2425-2435.
- Wieczorek, R.; Steinbüchel, A.; Schmidt, B. 1996. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 23-30.
- Wu, G. Moir, A. J.; Sawers, G.; Hill, S.; Poole, R. K. 2001. Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 215-220.
- York, G. M.; Stubbe, J.; Sinskey, A. J. 2002. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J. Bacteriol.* 184: 59-66.
- York, G. M.; Lupberger, J.; Tian, J.; Lawrence, A. G.; Stubbe, J.; Sinskey, A. J. 2003. *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly-D-3-hydroxybutyrate depolymerase genes. *J. Bacteriol.* 185: 3788-3794.
- Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 53: 5-21.

XIII. APÉNDICE

1.- Composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo

Medio Luria-Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad		Reactivo	Cantidad
Bacto-triptona	10 g/l		Bacto-triptona	16 g/l
Extracto de levadura	5 g/l		Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l		NaCl	5 g/l
H ₂ O se aforó a	1 litro		H ₂ O se aforó a	1 litro

Medio 2X YT**Medio Burk-sacarosa (BS)**

Reactivo	Cantidad		Reactivo	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0.8 g/l		K ₂ HPO ₄	0.8 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l		KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
Sacarosa	0.2 g/l		NH ₄ Cl	0.8 g/l
Na ₂ SO ₄	0.183 g/l		Na ₂ SO ₄	0.183 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.073 g/l		CaCl ₂ .2H ₂ O	0.073 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.16 g/l		MgCl ₂ .6H ₂ O	0.16 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005 g/l		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005 g/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0002 g/l		H ₂ O se aforó	1 litro
H ₂ O se aforó a	1 litro			

Medio Burk-NH₄ (B-NH₄)**Medio de competencia (CM)**

Reactivo	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0.8 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
Sacarosa	0.2 g/l
Na ₂ SO ₄	0.183 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.073 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.16 g/l
H ₂ O se aforó a	1 litro

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C 1.5 kg/cm² por 20 minutos.

2.- Soluciones utilizadas para la extracción de DNA plasmídico

Solución I (de resuspensión)

Reactivo	Concentración		Reactivo	Concentración
Tris-HCl (pH 8)	25 mM		NaOH	0.2 N
EDTA (pH 8)	10 mM		SDS	2 % m/v
Glucosa	50 mM		H ₂ O	100 ml
H ₂ O	100 ml			

Solución II (de lisis)

La solución se esterilizó a 120 °C 1.5 kg/cm² por 20 minutos.

Solución III (de neutralización)

Reactivo	Volumen
Acetato de Potasio 5M	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

3.- Soluciones utilizadas para la extracción de DNA cromosomal

Solución amortiguadora TE

Solución CTAB 10 % / NaCl 0.7 M

Reactivo	Cantidad		Reactivo	Cantidad
Tris-Cl (10 mM)	1.57 g/l		CTAB 10 %	100 g
EDTA (1 mM)	0.372 g/l		NaCl (0.7 M)	40.9 g
H ₂ O se aforó a	1 litro		H ₂ O se aforó a	1 litro

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH.

4.- Soluciones utilizadas en electroforesis de DNA en gel de agarosa

Solución amortiguadora TAE 10X.

Gel de agarosa al 1%

Reactivo	Cantidad		Reactivo	Cantidad
Tris Base	48.4 g		Agarosa pura	1 g
Ácido acético glacial	22.48 ml		Solución TAE 1X	100 ml
EDTA hidratado	37.22 g			
H ₂ O	988 ml			

5.- Soluciones utilizadas para la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%

Mezcla para gel de acrilamida al 12 %

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida 30%	2 ml	--
Bisacrilamida 2.7%	--	0.402 ml
Tris-Cl 1.5M pH 8.8	1.25 ml	--
Tris-Cl 0.5M pH 6.8	--	0.625 ml
SDS 10%	50 ul	25 ul
H ₂ O	1.67 ml	1.433 ml
Persulfato de amonio 10%	25 ul	12.5 ul
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	2.5 ul	1 ul

Solución amortiguadora 1X

Reactivo	Cantidad
Tris Base	12g
Glicina	57.6g
SDS 10%	40 ml
H ₂ O se aforó a	1 litro

Solución para teñir el gel

Reactivo	Volumen
Azul de Coomasie R-250 al 1%	31.25 ml
Metanol	125 ml
Acido acético	25 ml
H ₂ O se aforó a	250 ml

Solución para desteñir el gel

Reactivo	Volumen
Metanol	250 ml
Acido acético	50 ml
H ₂ O se aforó a	500 ml

Buffer de carga para proteínas

Reactivo	Volumen
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2-mercaptoetanol	1.0 ml
H ₂ O se aforó a	10 ml

6.- Soluciones utilizadas para la determinación de proteína por el método de Lowry

Solución A

Solución B

Reactivo	Concentración		Reactivo	Concentración
Na ₂ CO ₃	2% m/v		Tartrato de sodio y potasio	2% m/v
NaOH	0.1N		H ₂ O	10 ml
H ₂ O	100 ml			

Solución C

Reactivo	Concentración
CuSO ₄	1% m/v
H ₂ O	10 ml

Solución reactiva

Solución A	98 ml
Solución B	1 ml
Solución C	1 ml

Esta solución se preparó al instante antes de utilizarla