



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Biosíntesis de polihidroxicanoatos de longitud de cadena media en
Azotobacter vinelandii OP a partir de ácidos grasos o sacarosa para la
obtención de bioplásticos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Biol. Gabriela Morales Flores

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Daniel Genaro Segura González
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Clarita Olvera Carranza
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Cuernavaca, Morelos, Septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dr. Daniel Genaro Segura González y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 255158, y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM, IG200219.

Agradezco la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 820652. Asimismo, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para la asistencia al congreso "*The Sixth International Symposium of Environmental Biotechnology and Engineering and 4to Congreso Nacional de Tecnologías y Ciencias Ambientales*" donde se presentó este proyecto.

“Feliz de ser quien soy,
sólo una gran mirada:
ojos de par en par
y manos despojadas”

Rosario Castellanos

“¡Cada átomo de silencio
es la posibilidad de un fruto maduro!”

Paul Valéry

AGRADECIMIENTOS

>> Gracias a mi madre por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada paso que doy. Gracias mami, te amo mucho. A mi tía Lidia que, junto con mi madre, es mujer que valoro y admiro mucho. Siempre voy a apreciar su esfuerzo de estas mujeres. A mis hermanas Carolina y Guadalupe por su cariño. Asimismo, a mi primo Rodrigo porque es como un hermano y siempre me ha apoyado en dónde me encuentre. A mi abuelo José y a mi abuelita Rita que ya no está presente, pero que siempre estará en mi corazón. A mi tío Juan por enseñarme que una condición física no es limitación para realizar lo que uno quiere. A mi Mérida. <<

Agradecimientos académicos

Al Dr. Daniel Segura por permitirme ser parte de su grupo y por enseñarme que siempre hay una pregunta que responder. Agradezco su apoyo académico y su gran paciencia durante este trayecto.

A la Dra. Cinthia Núñez y la Dra. Guadalupe Espín por cada aportación durante los seminarios de grupo.

A mi comité tutorial a la Dra. Clarita Olvera, al Dr. Mauricio Trujillo y al Dr. Carlos Peña que me cuestionaron e hicieron aportaciones al proyecto para tener un mejor desempeño académico.

A los miembros del Jurado Revisor; los Drs. Rosa María Gutiérrez, Gloria Saab, Juan Miranda, Edmundo Calva y Sergio Encarnación, por su tiempo invertido en leer y corregir el presente escrito.

A las técnicas del laboratorio, Soledad Moreno y Josefina Guzmán, por su apoyo en el laboratorio, por estar en la mejor disposición para apoyar en este proyecto y por su amistad.

A Alma Reyes porque fue mi *sensei* en el laboratorio y por su amistad. Al Dr. Raúl Noguéz por sus consejos académicos y por su apoyo como colega.

A la Dra. Celia por su apoyo en el cromatógrafo de gases. Al Dr. Alfredo Martínez y a la Dra. Estefanía Sierra por su colaboración en el uso del cromatógrafo de gases. A la M. C. Claudia Velázquez por su asesoría en el proceso de derivatización.

A Antonio Guillén y a Gloria Villa por su apoyo en todas las cuestiones académicas. A Rosalva González por su apoyo y completa disposición en las cuestiones administrativas y al M. en C. José Luis por su apoyo como laboratorista.

Agradecimientos personales

A mis amigos de la maestría, sede CdMx: Sandra Villegas y a Eloy Homobono, gracias por su apoyo. Sandra, otra etapa más que culminamos, te apreció mucho. También, a Andrea Celeste porque descubrí a una gran amiga y me ha ahorrado la consulta del psicólogo. A mi amigo Ricardo por su amistad durante estos años. Los quiero mucho.

A mi amiga Itzel Gaytán por escucharme y apoyarme en momentos difíciles y porque es una *follower* del café y del té matcha como yo. La quiero mucho.

A mi buen amigo Javier Ramos, gracias por su apoyo, amistad y consejos.

A mi amiga Jessica Ruiz por su amistad incondicional y a César por su apoyo. Ambos son grandes personas. Gracias por apoyarme en el laboratorio y escucharme en todo momento.

A mi amigo C. Leonel Ahumada aunque siempre buscaba hacerme enojar, pero a la vez me hacía reír mucho. Asimismo, me enseñó que, aunque fuera sábado o domingo, se tenía que llegar a las 9 al laboratorio. Además, siempre tuvo una buena disposición para ayudarme en algunas estrategias experimentales.

A mi amiga Nataly Morales, que he encontrado a una gran amiga, persona y aliada. Nunca me dice que no, y tiene un gran corazón. Naty gracias por escucharme y por apoyarme fueran asuntos académicos o personales. Gracias a estas últimas tres personas, son muy especiales para mí. Gracias por todo su apoyo que me brindaron en esta etapa. Los he llegado apreciar mucho. Los quiero mucho.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Espín: Citlalli Gonzaga (eres una gran niña), Marcela Martínez (Marce, te extraño), Chantal Martínez (gracias Chanty, me gustó conocer Miacatlán o ¿era Mazatepec?), Fernando Loyola (sigue siendo *fit*), Thalía Barrientos (por ser mi compañera de mesa, me gustó la excelente coordinación para el uso de la mesa de trabajo, sin ponernos de acuerdo jeje), Mariana López (aunque no se acuerde de mí, cuando llegó al laboratorio jeje), Cristian Camilo (por ser tan graciosoㄟㄟ), Ricardo Farrera, Karen Rodríguez, Andrea Moyao (gracias por permitirme conocer a tu familia), Víctor Barrientos, al Dr. Holjes Salgado y a Pablo Olache.

Asimismo, a las chicas Merino: Nori Castañeda (gracias por tu amistad, te quiero mucho), Josselyn Chavéz (siempre tan amable) y Diana Barceló (¡ahora señora Diana, Oops!) por permitirme compartir momentos muy especiales. A la Dra. Leidy Bedoya y a Adán Trejo que fueron amables cuando llegué al laboratorio. Por último, a Frida Shiadani, por entender mis explicaciones y por contribuir en este proyecto, y a una reciente personita que conocí, a Johanna Torres, por su comprensión de este proyecto.

Muchas gracias, chicos.

Abreviaturas

| | |
|------------------|---------------------------------|
| 3HA | 3-hidroxiacilos |
| 3HA-CoA | 3-hidroxiacil-CoA |
| 3HB | 3-hidroxi butirato |
| 3HB-CoA | 3-hidroxi butiril-CoA |
| 3HBME | Metil éster 3-hidroxi butirato |
| 3HD-CoA | 3-hidroxi decanoil-CoA |
| 3HDD-CoA | 3-hidroxi dodecanoil-CoA |
| 3HP-CoA | 3-hidroxi propionil-CoA |
| 3HH-CoA | 3-hidroxi hexanoil-CoA |
| 3HHx | 3-hidroxi hexanoato |
| 3HHxME | Metil éster 3-hidroxi hexanoato |
| 3HHp-CoA | 3-hidroxi heptanoil-CoA |
| 3HO-CoA | 3-hidroxi octanoil-CoA |
| 3HOME | Metil éster 3-hidroxi octanoato |
| 3HUD-CoA | 3-hidroxi undecanoil-CoA |
| 3HV | 3-hidroxi valerato |
| 3HV-CoA | 3-hidroxi valeril-CoA |
| 4HB | 4-hidroxi butirato |
| °C | Grados centígrados |
| %cdw | Porcentaje de peso seco |
| %v/v | Porcentaje de volumen a volumen |
| µg/mL | Microgramo por mililitro |
| µL | Microlitros |
| Acetil-CoA | Acetil coenzima A |
| ACP | Proteína acarreadora de acilos |
| BG | Burk con glucosa |
| BS | Burk con sacarosa |
| cDNA | DNA complementario |
| CoA | Coenzima A |
| C | Carbono |
| C-N | Carbono y nitrógeno |
| DEPC | Dietilpirocarbono |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FID | Detector de flama de ionización |
| GC | Cromatografía de gases |
| gL ⁻¹ | Gramo por litro |
| HA | Hidroxiacilos |
| Km | Kanamicina |

| | |
|----------------|---|
| LB | Luria Bertani |
| LDPE | Polietileno de baja densidad |
| mcl-3HA | Hidroxiacilos de cadena media |
| mcl-PHA | Polihidroxiacanoatos de longitud de cadena media |
| MDa | Mega Daltons |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| Mw | Peso molecular |
| Nal | Ácido nalídixico |
| PA3924 | 3-hidroxiacil-CoA ligasa |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PHA | Polihidroxiacanoato |
| PHAs | Polihidroxiacanoatos |
| PhaG | 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa |
| PhaJ | Enoil-CoA hidratasa R específica |
| PHB | Poli (3-hidroxiacetato) |
| PHB-co-mcl-3HA | Poli (3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacilo de longitud de cadena media) |
| PHBHHx | Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxihexanoato) |
| PHBV | Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) |
| PHBVHHx | Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxihexanoato) |
| PHV | Poli(3-hidroxiacetato) |
| P4HB | Poli(4-hidroxiacetato) |
| PHB4HB | Poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) |
| PHB4HBHHx | Poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato-co-3-hidroxihexanoato) |
| PHHx | Poli(3-hidroxihexanoato) |
| P3HO | Poli(3-hidroxiacetato) |
| PHHxHO | Poli(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxiacetato) |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PTFE | Tubos de cultivo con tapón de rosca resistente a cloroformo |
| PY | Medio de extracto de levadura y peptona |
| qPCR | PCR en tiempo real |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| scl-3HA | Hidroxiacilos de cadena corta |
| scl-PHAs | Polihidroxiacanoatos de longitud de cadena corta |
| TCPs | Placas de cultivo de tejido |
| Tg | Transición vítrea |
| Tm | Temperatura de fusión |

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1.1. Generalidades de los polihidroxicanoatos | 2 |
| 1.1.1 Bacterias productoras de polihidroxicanoatos | 2 |
| 1.1.2 Características físicas, químicas y mecánicas de los polihidroxicanoatos | 3 |
| 1.1.3 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos | 6 |
| 1.1.3.1 Industria de polímeros | 6 |
| 1.1.3.2 Biomedicina | 8 |
| 1.1.4 Rutas de biosíntesis de los polihidroxicanoatos | 10 |
| 1.1.5 Tipos de polihidroxicanoatos sintasas | 14 |
| 1.1.6 Fuentes de carbono para la producción de los polihidroxicanoatos | 16 |
| 1.2. <i>Azotobacter vinelandii</i> , una bacteria productora de polihidroxicanoatos | 17 |
| 1.2.1 Producción de polihidroxiacetato (PHA) en <i>A. vinelandii</i> | 17 |
| 2. ANTECEDENTES | 19 |
| 2.1 Biosíntesis de copolímeros de poli (3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato de longitud de cadena media) mediante la biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos | 19 |
| 2.2 PHA sintasa tipo II, enzima que polimeriza polihidroxicanoatos de longitud de cadena media (mcl-PHAs) | 20 |
| 2.3 Especificidad de la enoil-CoA hidratasa (PhaJ) en bacterias | 21 |
| 3. HIPÓTESIS | 23 |
| 4. OBJETIVOS | 23 |
| 4.1 General | 23 |
| 4.2 Particulares | 23 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 5.1 Microorganismos y plásmidos | 24 |
| 5.2 Condiciones de cultivo | 24 |
| 5.2.1 Cepas de <i>A. vinelandii</i> | 24 |
| 5.2.2 Cepas de <i>E. coli</i> | 25 |
| 5.3 Preinóculos | 26 |
| 5.4 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> | 26 |
| 5.5 Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> | 26 |
| 5.6 Reacciones de PCR | 27 |

| | |
|---|----|
| 5.7 Digestión de DNA con enzimas de restricción..... | 27 |
| 5.9 Construcción del plásmido p19phaC y pk18phaC..... | 28 |
| 5.10 Construcción del plásmido P19phaGPA y pk18phaGPA | 31 |
| 5.11 Conjugación de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i> | 34 |
| 5.12 Primer evento de recombinación: selección de colonias en Burk glucosa y Km 35 | |
| 5.13 Segundo evento de recombinación: selección de colonias en Burk sacarosa al 15%..... | 36 |
| 5.14 Cuantificación de proteína por el método de Lowry..... | 38 |
| 5.15 Cuantificación de peso seco celular | 38 |
| 5.16 Cuantificación de transcritos mediante PCR en tiempo real (qPCR) | 39 |
| 5.16.1 Extracción de RNA | 39 |
| 5.16.2 Tratamiento de RNA con DNAsa..... | 40 |
| 5.16.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)..... | 40 |
| 5.16.4 qPCR | 40 |
| 5.17 Identificación y cuantificación de PHAs por cromatografía de gases (GC) con detector de flama de ionización (FID) | 41 |
| 5.17.1 Estándares para la cromatografía de gases | 42 |
| 5.17.2 Derivatización de PHA | 42 |
| 5.17.3 Condiciones del cromatógrafo..... | 43 |
| 5.17.4 Determinación de PHA..... | 45 |
| 5.18 Análisis estadístico | 46 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 47 |
| 6.1 La cepa OPpAGMF con el operón <i>scrGPA</i> puede polimerizar el copolímero PHBHHx..... | 47 |
| 6.1.1 <i>Generación de la cepa OPpAGMF con el operón scrGPA bajo el promotor de scrX, inducible por sacarosa</i> | 47 |
| 6.1.2 <i>El crecimiento celular y la acumulación de PHA son similares en la cepa recombinante OPpAGMF y en la cepa OP en medio PY</i> | 51 |
| 6.1.3 <i>La expresión de phaG y PA3924 se encuentran bajo el control del promotor de scrX y es inducible por sacarosa</i> | 54 |
| 6.1.4 <i>La concentración del inductor no afecta el nivel de expresión ni el contenido de mcl-3HA en el copolímero</i> | 57 |
| 6.1.5 <i>La PHA sintasa de clase I de A. vinelandii puede incorporar monómeros de 3HHx</i> | 60 |
| 6.2 El remplazo de la PHB sintasa clase I por una clase II permite producir mcl-PHAs en <i>A. vinelandii</i> | 61 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.2.1 | <i>Generación de la cepa OPphaC, sustitución del operón phbBAC de A. vinelandii por una PHA sintasa de P. aeruginosa (PhaC1)</i> | 61 |
| 6.2.2 | <i>En la cepa OPphaC no se observan gránulos de PHA a partir de ácidos grasos</i> | 64 |
| 6.2.3 | <i>La cepa OPphaC sintetiza mcl-PHAs a partir de dos fuentes de carbono relacionadas: octanoico de sodio y decanoico de sodio</i> | 64 |
| 6.2.4 | <i>PhaJ tiene afinidad a 2-enoil-CoA de C6 y C8.</i> | 68 |
| 6.3 | Construcción de la cepa OPpMCL para la expresión de 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa, 3-hidroxiacil-CoA ligasa y la PHA sintasa tipo II para la síntesis de mclPHAs a partir de carbohidratos | 69 |
| 7. | CONCLUSIONES | 72 |
| 8. | PERSPECTIVAS | 72 |
| 9. | REFERENCIAS | 73 |
| 10. | APÉNDICE | 82 |

ÍNDICE DE FIGURA

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de los polihidroxicanoatos..... | 3 |
| Figura 2. Biosíntesis de scl-PHAs: PHB o PHBV. | 11 |
| Figura 3. Reacción de la enzima PhaJ..... | 11 |
| Figura 4. Rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de scl-PHAs y mcl-PHAs. | 13 |
| Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de PHA sintasas..... | 15 |
| Figura 6. Enoil-CoAs hidratatas R específicas (PhaJ)..... | 22 |
| Figura 7. Construcción del plásmido p19phaC..... | 30 |
| Figura 8. Esquema del plásmido pk18phaC con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas..... | 30 |
| Figura 9. Construcción del plásmido p19phaGPA..... | 33 |
| Figura 10. Esquema del plásmido pk18phaGPA con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas..... | 33 |
| Figura 11. Esquema del uso del plásmido pK18mobsacB en <i>A. vinelandii</i> OP..... | 37 |
| Figura 12. Metanólisis acídica de PHA..... | 41 |
| Figura 13. Cromatogramas de los estándares. | 44 |
| Figura 14. Curva estándar para la determinación de peso seco de PHA..... | 46 |
| Figura 15. Ruta metabólica propuesta para la producción de scl-co-mclPHA en <i>A. vinelandii</i> OPpAGMF a partir de precursores provenientes de la biosíntesis de ácidos grasos y biosíntesis de PHB. | 48 |
| Figura 16. Clúster de genes <i>scr</i> , involucrados en el catabolismo de la sacarosa. | 49 |
| Figura 17. Construcción de la cepa OPpAGMF con el operón <i>scrGPA</i> , que tiene los genes <i>phaG</i> y <i>PA3924</i> que codifican la 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa y la 3-hidroxiacil-CoA ligasa, respectivamente, bajo el promotor <i>scrX</i> | 50 |
| Figura 18. Determinación del efecto de la inserción de los genes <i>phaG</i> y <i>PA3924</i> en <i>A. vinelandii</i> | 53 |
| Figura 19. Expresión de <i>phaG</i> y <i>PA3924</i> bajo el control del promotor de <i>scrX</i> | 57 |
| Figura 20. Determinación de la composición del copolímero PHBHHx sintetizado en diferentes concentraciones del inductor sacarosa..... | 59 |
| Figura 21. Sustitución del gen <i>phaC1</i> por el operón biosintético <i>phbBAC</i> de <i>A. vinelandii</i> | 61 |
| Figura 22. Construcción de la cepa OPphaC, que tiene una PHA sintasa tipo II (PhaC1)..... | 63 |
| Figura 23. Fenotipo de la cepa OPphaC. | 65 |
| Figura 24. Nivel de expresión de transcritos de <i>phaC1</i> en la cepa OPphaC en diferentes fuentes de carbono relacionadas, utilizando como control el medio BS..... | 66 |
| Figura 25. La cepa OPphaC produce mcl-PHA a partir de fuentes de carbono relacionadas..... | 67 |
| Figura 26. Construcción de la cepa OPpMCL..... | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Comparación de propiedades físicas de varios polihidroxicanoatos con plásticos convencionales..... | 6 |
| Tabla 2. Principales compañías productoras de polihidroxicanoatos (PHAs)..... | 8 |
| Tabla 3. Composición del medio de cultivo de <i>A. vinelandii</i> | 25 |
| Tabla 4. Composición del medio de PY-Glucosa al 2% | 25 |
| Tabla 5. Composición del medio LB de <i>E. coli</i> | 25 |
| Tabla 6. Composición del medio para cruzas..... | 35 |
| Tabla 7. Solución reactiva | 38 |
| Tabla 8. Mezcla de reacción para qPCR..... | 41 |
| Tabla 9. Gradiente de temperatura para la separación de los esteres metilos..... | 43 |
| Tabla 10. Acumulación de PHA por cepa OPphaC a partir de fuentes de carbono relacionadas..... | 69 |

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de biopolímeros sintetizados y acumulados por bacterias y arqueas como reserva de carbono y energía. Estos polímeros se utilizan industrialmente como plásticos, y sus propiedades térmicas y mecánicas dependen de su composición monomérica. Entre los PHAs hay dos tipos de composición, los PHAs de longitud de cadena corta (scl-PHAs), que contienen monómeros de 4-5 átomos de carbono, y los PHAs de longitud de cadena media (mcl-PHAs), formados por monómeros de seis o más átomos de carbono. Los mcl-PHA producen plásticos más flexibles, elásticos, con una mayor elongación de rotura que los scl-PHA, por lo que tienen un rango amplio de aplicaciones. *A. vinelandii* es una bacteria de suelo productora de scl-PHAs, la cual, al crecer sobre carbohidratos, sintetiza el homopolímero polihidroxibutirato (PHB), a partir de monómeros 3-hidroxibutiril-CoA provenientes de acetil-coenzima A. En mezclas de carbohidratos con ácidos grasos puede producir poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), un copolímero con unidades de cuatro y cinco carbonos, donde los monómeros de cinco carbonos provienen de la β -oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, *A. vinelandii* no puede producir mcl-PHAs; y por otro lado algunas *Pseudomonas* spp. tienen una 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa (*phaG*) y una 3-hidroxiacil-CoA ligasa (*PA3924*) que les permiten producir 3-hidroxiacil-CoA (3HA-CoA) precursores de mcl-PHAs a partir de carbohidratos, usando intermediarios de la ruta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos. En este trabajo se planteó que la expresión de *phaG* y de *PA3924* de *Pseudomonas* spp. en *A. vinelandii*, permitiría sintetizar mcl-PHAs a partir de sacarosa. En la cepa recombinante OPpAGMF, que contiene los genes *phaG* y *PA3924* bajo el promotor de *scrX* inducible por sacarosa, su expresión aumentó 41 ± 6.9 y 18 ± 2.8 veces respectivamente, 12 h después de la inducción con 10gL^{-1} de sacarosa. Esta expresión permitió la producción de un copolímero de poli(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) (PHBHHx) con 6.2 ± 2 % molar de monómeros de 3-hidroxihexanoatos 24 h después de la inducción. Diferentes concentraciones del inductor (0, 5, 10, 15 y 20gL^{-1} de sacarosa), modificaron la expresión de los genes *phaG* y *PA3924*, aunque sin afectar la incorporación % molar de monómeros de 3HHx.

Otro factor que determina la composición de los PHAs producidos es el tipo de PHA sintasa (enzima polimerizante) presente en el organismo, pues varían en su especificidad por los 3-hidroxiacil-CoAs precursores. La incorporación de monómeros 3HHx en la cepa OPpAGMF indica que la PHB sintasa de *A. vinelandii* tiene especificidad para 3HA-CoA de longitud de cadena media (mcl-3HA-CoA) sólo hasta 6 carbonos. Las *Pseudomonas* spp. generalmente tienen PHA sintasas tipo II que polimerizan mcl-PHAs. En este trabajo también se reemplazó el operón biosintético de PHA de *A. vinelandii* por una PHA sintasa tipo II (*phaC1*) de *P. aeruginosa*, buscando la producción de mcl-PHAs a partir de ácidos grasos. Esta segunda cepa (OPphaC) acumuló alrededor del 11.2 y 26.5% de PHA por peso seco, al crecer en octanoato de sodio y decanoato de sodio, respectivamente. En ambas fuentes de carbono, la cepa OPphaC sintetizó el copolímero poli(hidroxihexanoato-co-hidroxi octanoato) (PHHxHO). Estos resultados, indican que los monómeros provienen de la ruta β -oxidación y sugieren que la enzima enoil-CoA hidratasa (PhaJ) de *A. vinelandii*, tiene especificidad a 2-enoil-CoA de 6 y 8 carbonos; lo que permite proveer monómeros de mcl-3HA-CoA para la síntesis de mcl-PHAs. Por último, se construyó una cepa que tiene los genes *phaG*, *PA3924* y *phaC1* para la síntesis de mcl-PHAs a partir de sacarosa, pero no se obtuvieron gránulos de PHAs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de biopolíesteres compuestos por monómeros de 3-hidroxiácidos (3HA) diversos. Bajo condiciones de limitación de nutrientes —principalmente nitrógeno, fósforo u oxígeno—, se sintetizan y se acumulan intracelularmente como reserva de energía y carbono por diversas bacterias y arqueas (Chen, 2009; Peña *et al.*, 2015).

La composición monomérica de los PHAs depende de diferentes factores, como la fuente de carbono suministrada, el tipo de ruta metabólica, y el tipo de PHA sintasa (enzima polimerizante) presentes en la bacteria, lo que permite la síntesis de una gran variedad de PHAs con diferentes propiedades fisicoquímicas (Zakaria, 2014), descritas más adelante.

Los PHAs son utilizados como plásticos, pues son materiales que se pueden moldear por temperatura (termoplásticos), con la ventaja de ser materiales 100% biodegradables. No son tóxicos, son biocompatibles y presentan propiedades físicas y químicas que permiten su aplicación en el área de la biomedicina y en la industria de polímeros. Además, pueden ser sintetizados a partir de recursos renovables o residuos agroindustriales (Hoffmann *et al.*, 2000; Chen 2009; Mohammadi *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017).

1.1.1 Bacterias productoras de polihidroxicanoatos

Existe un rango amplio de grupo de bacterias y arqueas que acumulan PHAs como reserva de carbono y energía, y se depositan como gránulos insolubles en el citoplasma. Se han reportado más de 300 especies diferentes bacterias, incluyendo especies Gram negativas y positivas como *A. vinelandii*, *Ralstonia eutropha*, algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Micrococcus*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*. Igualmente, se han descrito algunos géneros de arqueas como *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*,

Haloterrigena, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* y *Natronorubrum* (Page, 1992; Chen, 2009; Mohammadi *et al.*, 2015).

Las bacterias productoras de PHAs pueden ser divididas en dos grupos con respecto a las condiciones que favorecen la producción de PHAs. En el primer grupo, las bacterias requieren limitación de un nutriente como fósforo, nitrógeno, oxígeno o magnesio para acumular PHAs y no pueden acumular polímero durante la fase exponencial de crecimiento. El segundo grupo, las bacterias acumulan PHAs durante todo su crecimiento y no requieren alguna limitación de nutrientes. Por ejemplo, las bacterias *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* y *P. putida* se incluyen en el primer grupo, mientras *Escherichia coli* recombinante pertenece al segundo grupo (Muhammadi *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2018).

1.1.2 Características físicas, químicas y mecánicas de los polihidroxicanoatos

Los PHAs están constituidos por cadenas lineales de hidroxicanoatos que tienen el grupo hidroxilo generalmente en posición 3, aunque hay algunos que lo tienen en posición 4 o 5 (poli(4-hidroxiбутirato) y poli(5-hidroxi valerato)). Este grupo hidroxilo de cada monómero forma un enlace éster con el grupo carboxilo del monómero vecino (Figura 1). En todos los PHAs, el átomo de carbono sustituido con un hidroxilo es de configuración R, excepto en algunos casos donde no hay quiralidad. Así, en la posición C-3 o β, el grupo alquilo puede variar desde un metilo a tridecilo (Madison & Huisman, 1999).

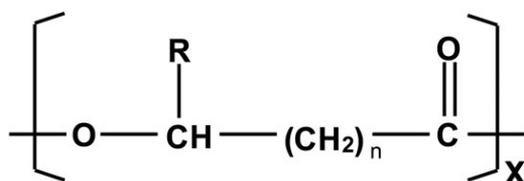


Figura 1. Estructura de los polihidroxicanoatos. R grupo alquilo, n longitud de las cadenas de carbono y x número de monómeros (Muhammadi *et al.*, 2015).

Existe una gran variedad de PHAs, pues se han descrito más de 100 hidroxiácidos (HA) diferentes como sus constituyentes. Estos incluyen 3HA insaturados, 3HA con un grupo metilo en diferentes posiciones, otros HA, tal como el 4-hidroxiбутirato (4HB), 3HA con diferentes grupos funcionales en el grupo R, como grupos carboxilos libres,

ácido málico, ácido benzoico, grupos acetoxi, entre otros. El carbono ω de los 3HA también puede tener sustituyentes, como los grupos ciano, o átomos como el flúor, cloro o bromo. También están los 3HA con diferente grado de insaturación en los átomos de carbono que constituyen la cadena principal del poliéster, esto es, 3-hidroxicanoatos con doble enlace, como el ácido 3-hidroxi-2-butenoico y varios 3HA con un grupo metilo en el átomo de carbono α (Steinbüchel & Valentin, 1995; Kessler *et al.*, 2001).

Los PHAs se pueden clasificar con base en el número de átomos de carbono (C) de la unidad monomérica. Entre ellos, se encuentran los llamados PHAs de longitud de cadena corta (scl-PHAs, por sus siglas en inglés), que se forman por monómeros de 3HAs de cadena corta (scl-3HA), hasta cinco carbonos; por ejemplo, poli(3-hidroxi-*butirato*) (PHB), poli(4-hidroxi-*butirato*) (P4HB); y los PHA de cadena media (mcl-PHAs, por sus siglas en inglés), que contienen monómeros de 3HA de 6 o más carbonos; por ejemplo, poli(3-hidroxi-*hexanoato*) (PHHx) y poli(3-hidroxi-*octanoato*) (P3HO) (Peña *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2017). También, dependiendo del tipo de monómeros presentes, pueden clasificarse en homopolímeros, cuando contienen solo un tipo de hidroxicanoato, por ejemplo, PHB y PHHx, o en heteropolímeros, que contienen más de un tipo de hidroxicanoato, por ejemplo, poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato**) (PHBV), poli(3-hidroxi-*hexanoato-co-3-hidroxi-*octanoato**) (PHHxHO) y poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*hexanoato**) (PHBHHx) (Rai *et al.*, 2011).

La variación en la longitud de los monómeros de los PHAs, la presencia de grupos funcionales en sus cadenas laterales y la proporción de los diferentes monómeros, son la causa de variaciones en sus propiedades térmicas (que son expresadas en términos de la temperatura de transición vítrea (T_g) de su fase amorfa y la temperatura de fusión (T_m) de su fase cristalina) y mecánicas (rigidez, flexibilidad y elasticidad). Estas propiedades determinan sus aplicaciones (Madison & Huisman, 1999).

Los scl-PHAs son generalmente materiales altamente cristalinos, lo que los hace más rígidos y quebradizos que el polipropileno. Un ejemplo de estos es el homopolímero de PHB. El PHB tiene una T_m alta (alrededor de 170 grados centígrados, °C) (Tabla 1), muy cercana a la temperatura donde este polímero se

descompone térmicamente, por lo que su procesamiento es limitado (Doi *et al.*, 1995). En cambio, los mcl-PHAs son biopolímeros termoelastoméricos con bajo grado de cristalinidad, baja fuerza de tensión y alta elongación de rotura, debido a que sus valores de T_m y T_g son bajos, entre 42 y 65°C, y -25 y 65°C, respectivamente. Gracias a estas propiedades, los mcl-PHAs tienen muchas aplicaciones en comparación con PHB. Además, los mcl-PHAs tienen mayor diversidad de estructuras, lo que se traduce en un amplio rango de propiedades, y ello los convierte en productos con muchas aplicaciones potenciales (Rai *et al.*, 2011).

Así, las propiedades mecánicas y físicas de los copolímeros, tales como la rigidez, fragilidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea o resistencia a solventes orgánicos, pueden cambiar con base a la composición del monómero. Por ejemplo, se ha reportado que el porcentaje de monómeros de 3-hidroxivalerato (3HV) en el copolímero PHBV modifica el punto de fusión. Un copolímero que contiene alrededor de 30 a 40% mol de 3HV reduce su punto de fusión de 180°C a 75°C, con respecto al homopolímero PHB (Muhammadi *et al.*, 2015).

Por otra parte, la adición de monómeros de 3HAs de cadena media (mcl-3HA) a scl-PHAs, los hace menos rígidos y con mejores propiedades mecánicas que las del homopolímero PHB, y se pueden comparar en propiedades con los plásticos convencionales, tal como el polipropileno, poliestireno, polietileno tereftalato y polietileno de alta densidad (Tabla 1) (Brandl, *et al.*, 1990; Doi *et al.*, 1995; Asrar *et al.*, 2002).

Tabla 1. Comparación de propiedades físicas de varios polihidroxicanoatos con plásticos convencionales. Modificado a partir de Mohammadi *et al.*, 2015.

| Muestras | Tm (°C) | Tg (°C) | Resistencia tensil (Mpa) | Elongación de rotura (%) |
|--------------------|---------|---------|--------------------------|--------------------------|
| PHB | 177 | 4 | 43 | 5 |
| P(3HB-co-20% 3HV) | 145 | -1 | 20 | 50 |
| P(3HB-co-16% 4HV) | 150 | -7 | 26 | 444 |
| P(3HB-co-15% 3HHx) | 115 | - | 23 | 760 |
| P(HB-co-10% HV) | 150 | - | 25 | 20 |
| P(HB-co-20% HV) | 135 | - | 20 | 100 |
| P(HB-co-10% HHx) | 127 | -1 | 21 | 400 |
| P(HB-co-17% HHx) | 120 | -2 | 20 | 850 |
| Polipropileno | 170 | - | 34 | 400 |
| Poliestireno | 110 | - | 50 | - |
| Polietileno | 130 | -10 | - | 500 |
| HDPE | 135 | - | 29 | - |
| LDPE | 130 | -30 | 10 | 620 |
| PET | 262 | - | 56 | 7300 |

Nota: Tm temperatura de fusión; Tg: temperatura de transición vítrea; HB: 3-hidroxi-butarato; HV: 3-hidroxi-valerato; HHx: 3-hidroxi-hexanoato; LDPE: polietileno de baja densidad; HDPE: polietileno de alta densidad; PET: polietileno tereftalato

1.1.3 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos

1.1.3.1 Industria de polímeros

Los materiales de plásticos derivados de la petroquímica son resistentes, versátiles y económicos, por lo que están asociados con una vida confortable, y su uso se ha incrementado en aplicaciones domésticas e industriales. En el 2013, se registraron 299 millones de toneladas de materiales de plástico, y el 98% fue derivado del petróleo (Rodríguez-Perez *et al.*, 2018). El proceso de explotación del petróleo tiene consecuencias ambientales, tales como el calentamiento global, riesgos hacia la salud humana o toxicidad para el ecosistema. Aunado a esto, los materiales de plástico producidos desde fuentes petroquímicas son muy resistentes a la degradación microbiana; por lo que deben ser destruidos térmicamente, o bien, ser contenidos en un sistema gestionado, tal como los rellenos sanitarios o los vertederos abiertos en el

ambiente, por lo que en gran parte de los desechos plásticos se acumulan en el ambiente en el océano, el suelo y el aire. Estas son las razones por la que se han buscado alternativas, entre ellas la producción y utilización de biopolímeros degradables (Jambeck *et al.*, 2015; Geyer *et al.*, 2017).

Entre los diferentes biopolímeros se encuentran los PHAs, los cuales son termoplásticos biodegradables, tienen un alto grado de polimerización, son altamente cristalinos e insolubles en agua, pueden ser producidos desde fuentes renovables y no son tóxicos; gracias a estas características son utilizados en la producción de bioplásticos, que reemplazan a los plásticos derivados del petróleo (Muhammadi *et al.*, 2015; Mathuriya & Yakhmi, 2017).

Los PHAs son biodegradables, sus productos de degradación son dióxido de carbono y metano. Se ha demostrado que su tasa de degradación depende de muchos factores; primero, de las características del polímero, su peso molecular, su composición y longitud monomérica y su cristalinidad; y segundo, de las condiciones ambientales como la temperatura, nivel de humedad, pH y la disponibilidad de otros nutrientes para los microorganismos degradadores (Brandl *et al.*, 1990; Mathuriya & Yakhmi, 2017).

Existen diferentes industrias que han implementado la producción de los PHAs. En 1970, la empresa Imperial Chemical Industries (ICI, UK) empezó a manufacturar el polímero PHBV bajo el nombre comercial de BIOPOL® producido por *Cupriavidus necator* NCIB 11599 a partir de diferentes fuentes de carbono, como butirolactona 1,6-hexanodiol, entre otros. Otro copolímero de interés industrial es el PHBHHx producido por Meredian Inc. (USA) bajo el nombre de Nodax™, para su uso como espumas, fibras, látex, entre otros (Noda, *et al.*, 2010). Asimismo, existen otras compañías como Metabolix Inc. (USA), Shenzhen Ecomann Technology Co. Ltd. (China), Tianjin GreenBio Materials Co. Ltd. (China), y Biomer (Alemania) que están involucradas en la industria de bioplásticos (Tabla 2) (Mathuriya & Yakhmi 2017). Según, la Asociación de Bioplásticos Europea, se ha incrementado la capacidad de producción de los PHAs en la última década (Anjum *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016).

Tabla 2. Principales compañías productoras de polihidroxicanoatos (PHAs). Modificado de Anjum *et al.*, (2016).

| Compañía | Sustrato principal | Producto principal | Capacidad de producción (ton/año) |
|---|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Biomer (Krailling, Germany) | Sacarosa | P3HB | No disponible |
| Bio-on (Bologna, Italy) | Azúcar de remolacha | MINERV [®] -PHA | 10,000 |
| Tianjin Green Bio (Tianjin, China) | Azúcar | P3HB | 10,000 |
| Kaneka (Takasago, Japan) | Aceite vegetal | PHBH | 1000 |
| Biocycle PHA Industrial (Serrano, Brazil) | Azúcar de caña | P3HB | 100 |
| Tian'an (Ningbo, China) | Maíz | P3HB | 10,000 |
| Metabolix (Woburn, MA, USA) | Maíz | Mirel [™] -PHA | 50,000 |

PHA: polihidroxicanoato, P3HB: polihidroxitirato, PHBH: poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxihexanoato.

1.1.3.2 Biomedicina

La ingeniería de tejidos busca alternativas para la sustitución, reparación o regeneración de tejidos dañados, lo que involucra el uso de biomateriales y células cultivadas *in vitro*, o factores bioactivos para promover la regeneración de tejidos o ligamentos viables (Doroski *et al.*, 2007; Rathbone *et al.*, 2009). Los parámetros para el uso de un biomaterial o andamio en la ingeniería de tejidos son: la biocompatibilidad, la biodegradabilidad sin la formación de componentes tóxicos, la elasticidad, la resistencia a la adhesión celular, el crecimiento celular y por ende la formación de tejido y, por último, la capacidad de no interferir con la difusión de nutrientes y productos de desecho (Williams *et al.*, 1999; Rathbone *et al.*, 2009).

Los PHAs son biopolímeros biocompatibles y biodegradables con gran potencial biomédico, debido a que estos permiten la adhesión celular, la migración y la proliferación celular, han sido utilizado en la regeneración de tejidos, de hueso, de cartílago, en válvulas cardíacas, así como en dispositivos de suturas y andamios de médula ósea; (Zhao *et al.*, 2003; Chen & Zhang, 2018).

La biocompatibilidad de los PHAs se debe principalmente a que los monómeros de los PHAs, como el hidroxibutirato, son metabolitos que se encuentran normalmente en la sangre y otros tejidos (Zinn *et al.*, 2001). Adicionalmente, otras propiedades como: la cristalinidad, la hidrofiliidad o hidrofobicidad, la composición monomérica de los PHAs y el cambio de energía de la superficie de los PHAs favorecen la absorción de proteínas, la unión de integrinas y la interacción entre el polímero y las células (Yang *et a.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2008; Insomphun *et a.*, 2016; Chen & Zhang, 2018). Además, la biodegradabilidad de estas biomoléculas es vital, ya que los

productos de su descomposición, principalmente oligómeros y monómeros, no son tóxicos para las células y tejidos (Chen & Zhang, 2018). Esta característica es dependiente de la composición monomérica del PHA y por ende de sus propiedades mecánicas (Qu *et al.*, 2006).

Aunque se han reportado cerca de 90 estructuras de PHAs, sólo ocho se han estudiado como materiales de implantes médicos: homopolímeros como el PHB, P4HB y P3HO; copolímeros como el PHBV, el PHBHHx y el poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato) (PHB4HB); y terpolímeros como el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBVHHx) y el poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHB4HBHHx) (Chen & Zhang, 2018).

Se ha propuesto al copolímero PHBV como un biomaterial ortopédico y de regeneración. Se observó crecimiento celular de condrocitos de ovinos y osteoblastos en esponjas 3D de PHBV, y se pretende utilizar este polímero para la fabricación de tejidos ortopédicos como cartílago, fibrocartílago y hueso (Chen & Zhang, 2018).

Los copolímeros de PHBHHx presentan una mayor biocompatibilidad y degradación que el PHB, en fibroblastos de ratón y en implantes subcutáneos en conejos (Zhao *et al.*, 2003, Qu *et al.*, 2006). Asimismo, andamios de PHBHHx pueden ser utilizados en la reconstrucción de párpados (Zhou *et al.*, 2010). Se ha reportado que este copolímero PHBHHx y el terpolímero PHBVHHx, soportan mayor crecimiento celular de fibroblastos L929 y osteoblastos MC3T3, comparado con el PHB, el PHBV y el ácido poliláctico (PLA) (material de implante y estándar de comparación, bien conocido y aprobado por la *Food and Drug Administration*: Administración de Medicamentos y Alimento) (Liang *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el terpoliéster PHBVHHx soporta mayor crecimiento celular que otros PHAs, que el PLA y que placas de cultivo de tejido (TCPs). Las ventajas del biopolímero PHBVHHx, son la flexibilidad, la suavidad, y su resistencia al almacenamiento prolongado, por lo que ha sido utilizado en la ingeniería de tejido de piel (Ji *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2008). En lo que respecta a la ingeniería del tejido cardíaco, el polímero PHO (de tipo mcl-PHAs) ha sido utilizado como sustrato para células de mioblastos y cardiomiocitos (Bagdadi, *et al.*, 2017).

1.1.4 Rutas de biosíntesis de los polihidroxicanoatos

Existen catorce diferentes rutas metabólicas para producir diferentes tipos de PHAs (Chuan *et al.*, 2014). A continuación, se describen las tres principales y más comunes rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de polihidroxicanoatos.

En la primera ruta se sintetizan scl-PHAs, como el PHB y poli (3-hidroxicanoato) (PHV), siendo el primero, el polímero más común y mejor caracterizado. La ruta biosintética consiste en tres reacciones enzimáticas catalizadas por tres proteínas distintas (Figura 2). La primera reacción (Figura 2A.1) consiste en la condensación de dos moléculas de acetil coenzima A (CoA), generadas del catabolismo de carbohidratos o ácidos grasos, para formar acetoacetil-CoA por la acción de una enzima 3-cetotiolasa, codificada por *phbA*. La segunda reacción (Figura 2A.2) es la reducción del acetoacetil-CoA a 3-hidroxicanoil-CoA (3HB-CoA) por una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH, codificada por *phbB*. En la tercera reacción, los monómeros de 3HB-CoA son polimerizados por una PHB sintasa (PHB polimerasa) codificada por *phbC* (Figura 2A.3). Esta ruta es típicamente representada por *Azotobacter vinelandii* y *Ralstonia eutropha* (sin. *Cupriavidus necator* o *Alcaligenes eutrophus*) (Doi *et al.*, 1988; Madison & Huisman, 1999; Segura *et al.*, 2003a; Chen *et al.*, 2015).

R. eutropha puede sintetizar PHBV mediante esta ruta metabólica, cuando se suministra propionato además de un carbohidrato. El propionato se activa con CoA para producir propionil-CoA y junto con un acetil coenzima A (acetil-CoA), se condensan para producir 3-cetovaleiril-CoA, que se reduce para producir 3-hidroxicanoil-CoA (3HV-CoA) de cinco carbonos. La polimerización de monómeros de 3HV-CoA y de 3HB-CoA por la PHB sintasa produce el copolímero PHBV (Figura 2B) (Brigham *et al.*, 2012). Esto no sucede en *A. vinelandii* porque su cetotiolasa no puede condensar propionil-CoA con un acetil-CoA para dar el de 5C (Page *et al.*, 1992).

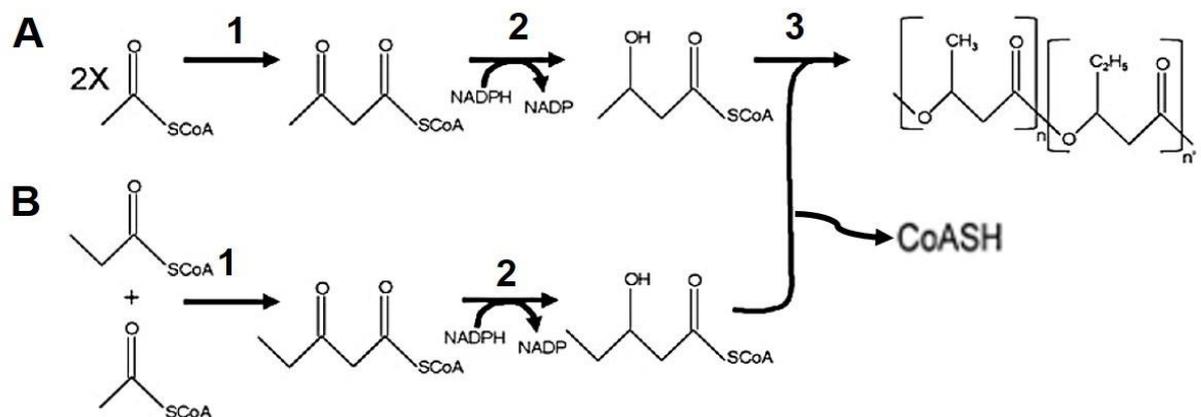


Figura 2. Biosíntesis de scl-PHAs: PHB o PHBV. Se involucran las siguientes enzimas: β -cetotiolasa (1), acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (2) y una PHA sintasa (3) que polimeriza (A) PHB o (B) PHBV (Brigham *et al.*, 2012).

La segunda ruta de síntesis produce mcl-PHAs a partir de compuestos intermedios generados del ciclo de la β -oxidación al utilizar ácidos grasos o compuestos relacionados como alcoholes o alcanos como fuente de carbono. En el catabolismo de ácidos grasos de algunas bacterias productoras de PHAs se presenta una enzima enoil-CoA hidratasa R específica (PhaJ), adicional a la enoil-CoA hidratasa S específica de la β -oxidación, que cataliza la adición de una molécula de agua a través de un enlace doble en enoil-CoA pero con estereoespecificidad R, que resulta en la generación de 3-hidroxiacil-CoA (3HA-CoA) (Figura 3), que subsecuentemente será polimerizado para formar PHA por una PHA sintasa (Hisano *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2011).

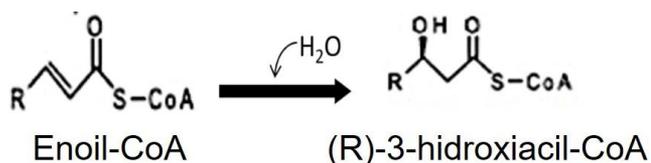


Figura 3. Reacción de la enzima PhaJ. En la ruta de la β -oxidación de ácidos grasos se incluye un paso de hidratación en que el intermediario enoil coenzima A (CoA) se convierte a (S)-3-hidroxiacil-CoA. La enzima PhaJ cataliza una reacción similar que produce el isómero (R)-3-hidroxiacil-CoA, precursor de PHAs.

La tercera ruta utiliza intermediarios de la vía de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Figura 4). Esta ruta involucra la participación de dos enzimas adicionales para la canalización del intermediario R-3-hidroxiacil-ACP, que se forma en esta vía de síntesis de ácidos grasos y que no puede ser polimerizado por las PHA sintasas por estar unido

a la proteína acarreadora de acilos (ACP), para convertirlo en 3HA-CoA, que se requiere para la síntesis de PHAs. La primera enzima es una 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa, codificada por el gen *phaG*, que separa el R-3-hidroxiacilo de la proteína acarreadora de acilos (ACP) a partir del R-3-hidroxiacil-ACP, intermediario de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos. El R-3-hidroxiacilo resultante se activa con CoA con la participación de la segunda enzima, la 3HA-CoA ligasa, codificada por el gen *PP0763* (en *Pseudomonas putida*) o *PA3924* (en *P. aeruginosa*). Así, el 3HA-CoA producido puede ser polimerizado, generalmente por una PHA sintasa tipo II para producir mcl-PHAs. Esta ruta permite la síntesis de mcl-PHAs a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los monómeros hidroxiacilos, tales como los carbohidratos, ya que durante el crecimiento en cualquier fuente de carbono existe una activa síntesis *de novo* de ácidos grasos para la generación de fosfolípidos de membrana (Wang *et al.*, 2012; Hokamura *et al.*, 2015).

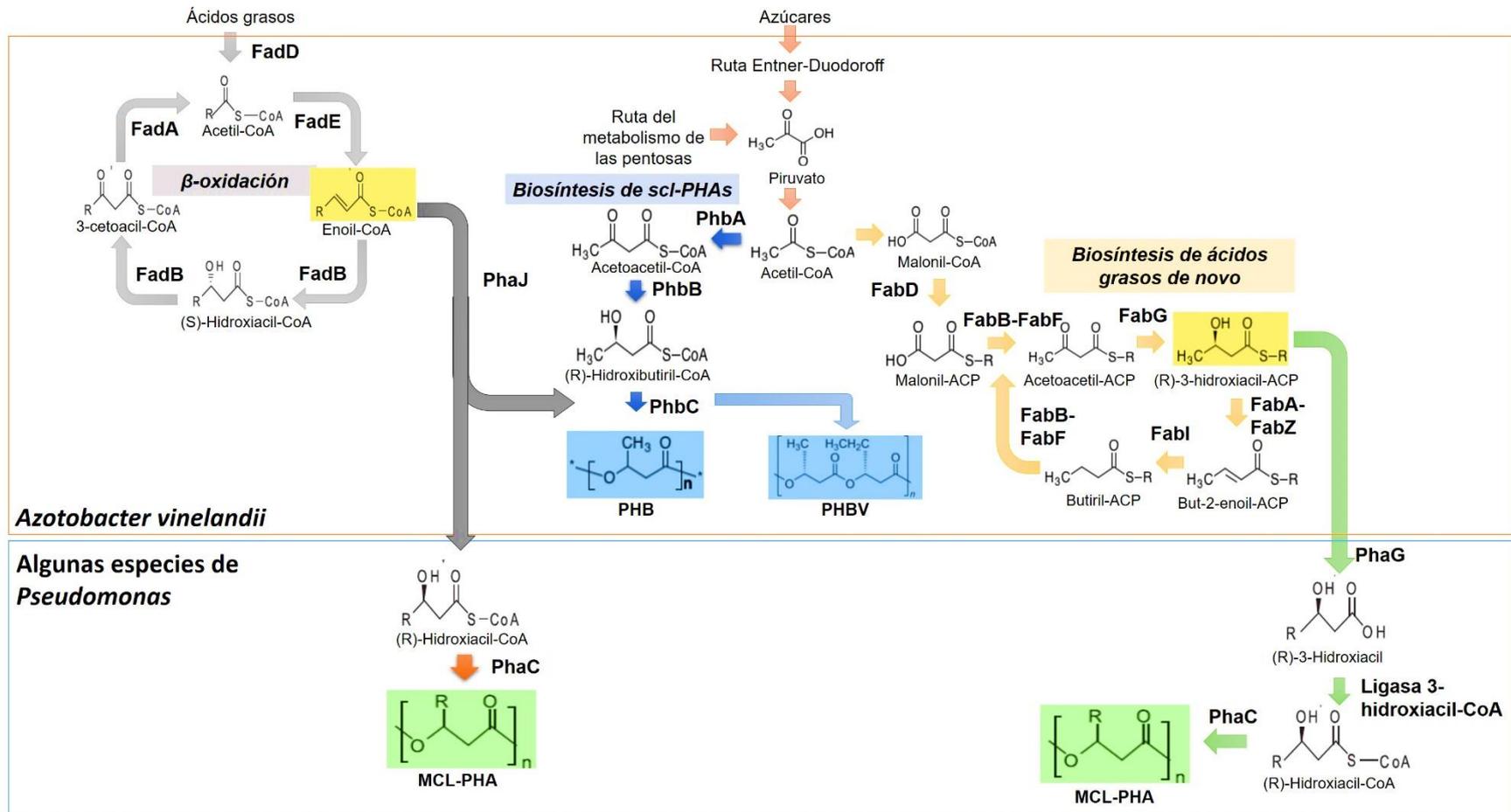


Figura 4. Rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de scl-PHAs y mcl-PHAs. En algunas especies de *Pseudomonas*, los intermediarios para 3HA-CoA provienen de la vía de β-oxidación y biosíntesis de ácidos grasos de novo (en cuadros amarillos) para la síntesis de mcl-PHAs (en cuadros verdes). *A. vinelandii* sintetiza dos tipos de scl-PHAs: PHB y PHBV (en cuadros azules).

1.1.5 Tipos de polihidroxicanoatos sintasas

La PHA sintasa es la enzima que cataliza la polimerización de los 3HA-CoAs para la síntesis de PHAs. Las PHA sintasas se clasifican en cuatro clases con base en su secuencia primaria, la composición de sus subunidades y su especificidad de sustrato. Las de clase I contienen un solo tipo de subunidad, PhaC, aunque forman un homodímero, mientras que en las de clase II contienen dos tipos de sintasas, PhaC1 y PhaC2, que pueden formar homodímeros o heterodímeros. Las sintasas de la clase III y IV forman heterodímeros que comprenden las subunidades PhaC-PhaE y PhaC-PhaR, respectivamente (Chek *et al.*, 2017; Mezzolla *et al.*, 2018).

Las enzimas de clase I, clase III y clase IV producen polímeros scl-PHAs con unidades de longitud de cadena corta (3C a 5C, dependiendo de los precursores, como 3-hidroxiopropionil-CoA (3HP-CoA), 3-hidroxi butiril-CoA (3HB-CoA), 4-hidroxi butiril-CoA (4HB-CoA) y 3-hidroxi valeril-CoA (3HV-CoA), mientras las enzimas de la clase II sintetizan polímeros de longitud de cadena media (C6 a C12), dependiendo de los precursores, como el 3-hidroxi hexanoil-CoA (3HH-CoA), 3-hidroxi heptanoil-CoA (3HHp-CoA), 3-hidroxi octanoil-CoA (3HO-CoA), 3-hidroxi decanoil-CoA (3HD-CoA), 3-hidroxi undecanoil-CoA (3HUD-CoA), 3-hidroxi dodecanoil-CoA (3HDD-CoA). La disponibilidad de los diferentes sustratos tioéster CoA se da a partir de tres rutas metabólicas diferentes, biosíntesis de ácidos grasos, β -oxidación y biosíntesis de scl-PHAs (Chek *et al.*, 2017; Mezzolla *et al.*, 2018).

Azotobacter vinelandii tiene una sintasa PhaC de clase I, que como en otras sintasas de esta clase, sintetiza scl-PHAs. Sin embargo, existen sintasas clase I, como las de *Chromobacterium* spp. y *Aeromonas caviae*, que pueden incorporar 3HA-CoA de longitud de cadena corta y media (3-hidroxi hexanoil-CoA), formando copolímeros de PHAs de longitud de cadena corta con longitud de cadena media (scl-co-mcl) (Doi *et al.*, 1995; Bhubalan *et al.*, 2010). La PHA sintasas clase II se encuentra generalmente en *Pseudomonas* spp., como *P. aeruginosa*, que puede incorporar 3HA-CoA de 6C a 12C (Qi *et al.*, 1997). Ejemplos de enzimas clase III se pueden encontrar en *Thiocapsa pfennigii* y *Chromotium vinosum*. Se ha reportado que, aunque las enzimas de esta clase producen generalmente scl-PHAs, la de *T. pfennigii* puede

sintetizar copolímeros de 3HB-CoA, 3HH-CoA y pequeñas cantidades de 3HO-CoA (2.6-5-5 mol%), a partir de octanoato (Liebergesell *et al.*, 2000). Por último, la clase IV se encuentra en algunas especies de *Bacillus* spp. como *Bacillus* sp. INT005, que puede incorporar 3HA-CoA de scl (Agus *et al.*, 2006).

Las PHA sintasas pertenecen a una superfamilia de α/β hidrolasas, que tienen una caja lipasa modificada (G-X₁-C-X₂-G), donde X₁ y X₂ representan cualquier residuo de aminoácido y la cisteína se encuentra reemplazando a la serina normalmente presente en las lipasas (Chek *et al.*, 2017). En la enzima de *Chromobacterium* sp. USM2, cuya estructura cristalina de alta resolución ya ha sido determinada, se ha reportado que el residuo Cys291 forma parte del sitio activo y forma una triada catalítica con His477 y Asp477 (Figura 5). El residuo Cys291 participa en la polimerización del sustrato 3HA-CoA (Chek *et al.*, 2017). Asimismo, la actividad de la enzima y la especificidad del sustrato se ven afectados por los aminoácidos que se encuentran alrededor de la triada catalítica de la PHA sintasa (Chen *et al.*, 2014).

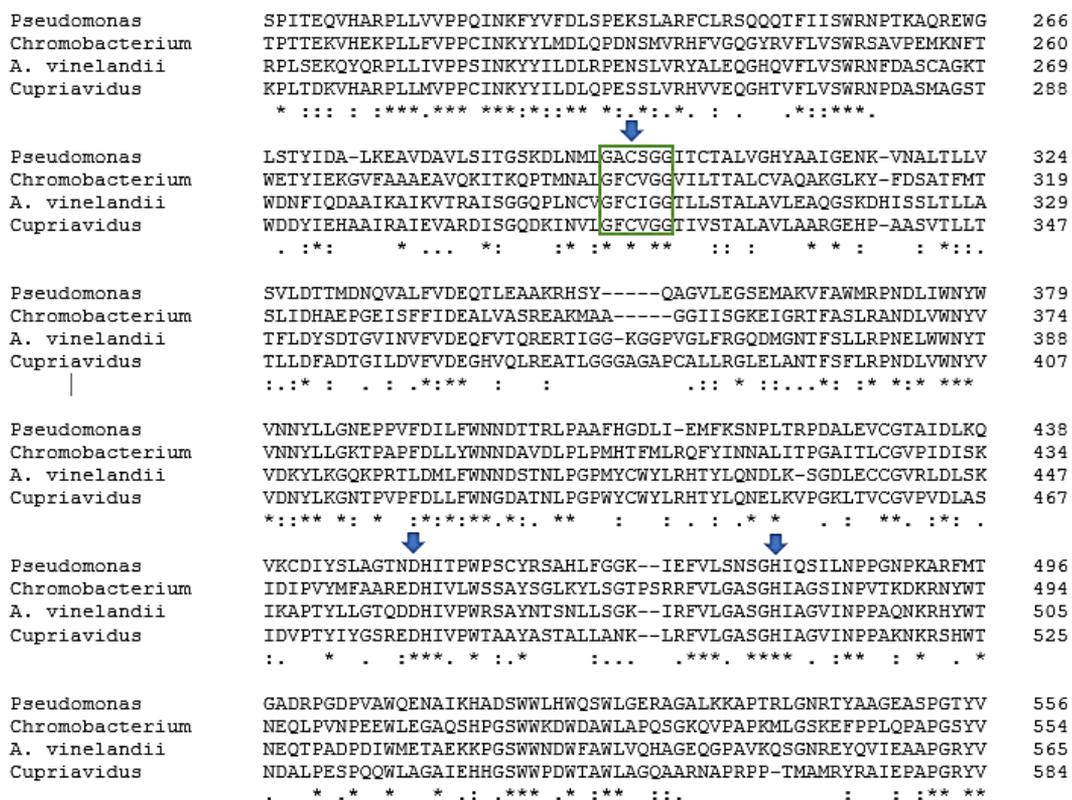


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de PHA sintasas. Se utilizaron las siguientes secuencias de aminoácidos de la PHA sintasa de tipo II, *Pseudomonas putida*

(*Pseudomonas*), y PHA sintasa de tipo I como *Chromobacterium sp.* USM2 (*Chromobacterium*), *A. vinelandii* (*A. vinelandii*) y *Cupriavidus necator* (*Cupriavidus*) desde el residuo 200-554. La flecha azul indica la tríada catalítica, Cys291, Asp457 y His477. El rectángulo verde indica el consenso del motivo pentapeptídico (como caja lipasa) G-X-C-X-G.

1.1.6 Fuentes de carbono para la producción de los polihidroxicanoatos

Los PHAs pueden ser producidos desde un rango amplio de sustratos. Algunos sustratos principales en la producción de PHA incluyen: carbohidratos, triacilgliceroles y sus derivados (ácidos grasos) e hidrocarburos. La mayoría de los microorganismos productores de PHAs pueden utilizar carbohidratos, y en menor cantidad hay microorganismos que utilizan triacilgliceroles e hidrocarburos. Los carbohidratos pueden ser derivados de sacarosa, melaza de remolacha, caña de azúcar y lactosa; los triacilgliceroles se encuentran en aceites de plantas y grasas animales; y los hidrocarburos en metano, polialquenos, poliestireno y tereftalato de polietileno (Jiang *et al.*, 2016).

Los sustratos para la acumulación de PHA pueden ser clasificados en fuentes de carbono estructuralmente relacionadas y en fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas (Wang & Chen, 2017). Por ejemplo, en las fuentes de carbono relacionadas se han utilizado propionato de sodio o ácido valérico como precursores para la síntesis de PHV (Savenkova *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 2003). De igual importancia, la sacarosa, gluconato, glucosa y glicerol se han utilizado como fuente de carbono no relacionada para la síntesis de PHB, mcl-PHAs (C6, C8, C10 y C10) o PHB-co-mcl-PHAs (Hoffmann *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012; García *et al.*, 2019). Es decir, en la primera fuente, hay una relación en la estructura química entre el sustrato y el producto; y en la segunda no la presenta. El uso de fuentes de carbono relacionados no es óptimo para la producción a gran escala por su alto costo; a comparación de la glucosa, sacarosa o sustratos más baratos como celulosa para la producción de PHA (Wang & Chen, 2017).

Por otra parte, el tipo de fuente de carbono suministrada al microorganismo puede determinar el tipo de PHAs sintetizados. Se pueden producir mcl-PHAs a partir de ácidos grasos, como el ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico (Preusting *et al.*, 1990), ácidos grasos libres derivados de

biodiesel y aceite de canola. Por ejemplo, estos últimos tres, permiten que *P. chlororaphis* sintetice mcl-PHAs (Sharma *et al.*, 2017). También se ha reportado que *A. vinelandii* sintetiza el copolímero PHBV cuando se crece en azúcares y con la adición de ácidos grasos como valerato (pentanoato), heptanoato, octanoato, nonanoato, o trans-2-pentenoato, ya que éstos pueden generar el precursor 3-hidroxisvaleril-CoA a partir de la ruta de β -oxidación (Pettinati *et al.*, 2001; Page *et al.*, 1992). En cambio, cuando se crece esta bacteria en azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa, sintetiza el homopolímero PHB, pues la producción de este polímero se lleva a cabo mediante la ruta de biosíntesis de scl-PHAs a partir de acetil-CoA. Lo mismo ocurre en extracto de malta, jarabe de maíz, lo que permite tener fuentes de carbono de más bajo costo, comparadas con el uso de glucosa o sacarosa industrial (Page, 1992; Page & Manchak, 1995). También existen ejemplos de la síntesis de copolímeros de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxiacilo de longitud de cadena media (PHB-co-mcl-3HA) o mcl-PHAs en *Pseudomonas sp.* 61-3 o *P. aeruginosa* a partir de azúcares (Rehm *et al.*, 1998, Matsumoto *et al.*, 2001).

1.2. *Azotobacter vinelandii*, una bacteria productora de polihidroxicanoatos

A. vinelandii es un organismo aerobio estricto que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y está cercanamente relacionada al género *Pseudomonas*. *A. vinelandii* es una bacteria de suelo, fijadora de nitrógeno que produce polímeros de importancia industrial como el PHB o el alginato y lípidos alquilresorcinoles. El PHB se acumula como gránulos en las células vegetativas durante la fase estacionaria y también es un componente mayor del cuerpo central de los quistes (Segura *et al.*, 2003a).

1.2.1 Producción de polihidroxi butirato (PHB) en *A. vinelandii*

Como se mencionó en la sección 1.1.4, *A. vinelandii* produce principalmente el PHB y lo sintetiza en tres pasos a partir de acetil-CoA. Los genes biosintéticos que codifican las enzimas para la síntesis de PHB, se encuentran organizados en el operón *phbBAC*, el cual se transcribe a partir de dos promotores: p_{B1} y p_{B2} . La transcripción desde el promotor p_{B2} mostró ser dependiente de RpoS; mientras que para la activación del promotor p_{B1} es necesario el regulador PhbR, cuyo gen (*phbR*) está localizado

corriente arriba y en dirección opuesta del operón *phbBAC*, y es un activador transcripcional de los genes *phbBAC* y pertenece a la familia de activadores AraC (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

Asimismo, con el fin de obtener una alta acumulación de PHB en *A. vinelandii* se han estudiado proteínas involucradas en la regulación génica de la síntesis de PHB. Se ha reportado que la enzima IIA^{Ntr} (*ptsN*), la cual forma parte del sistema fosfotransferasa relacionada a nitrógeno, actúa como un regulador negativo de la síntesis de PHB en su estado no fosforilado, por lo que una mutante de *ptsN* permite acumular hasta dos veces más de PHB que la cepa silvestre (Noguez *et al.*, 2008). Otra proteína clave es RsmA (*rsmA*), la cual reprime post-transcripcionalmente la expresión de PhbR, por lo que una mutante de *rsmA* incrementa la producción del polímero un 25% comparado con la cepa silvestre de *A. vinelandii* (Hernández-Eligio *et al.*, 2012). Asimismo, una delección en el gen *algA*, que codifica la enzima que cataliza el primer paso de la ruta biosintética del alginato, y la producción de PHB, permite incrementar hasta el 75% de acumulación de PHB en un tiempo de 48h y tres veces más que la cepa silvestre (Segura *et al.*, 2003b). Recientemente, Adaya *et al.*, (2018) determinaron que la mutante de una PHB depolimerasa (*phbZ1*), la cual tiene actividad hidrolítica sobre PHB amorfo, acumula hasta el 90.0±1.0% de PHB durante la fase estacionaria y se obtiene un polímero de ultra peso molecular (M_w) de 5.5-6.2 MDa durante 48 horas de cultivo.

También, se han desarrollado estrategias de fermentación para mejorar la producción de PHB como: la alimentación de cultivos fed-batch, la proporción de carbono y nitrógeno (C-N) y la tasa de agitación. Esto permitió aumentar la acumulación de PHB en *A. vinelandii* hasta el 85% de biomasa total con una concentración de PHB de 29±4.5 gramos por litro (gL^{-1}) y ultra M_w entre 2.3 mega Daltons (MDa) y 6.6 MDa (Castillo *et al.*, 2017; García *et al.*, 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biosíntesis de copolímeros de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxiacilo de longitud de cadena media) mediante la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos

Como se mencionó anteriormente, en algunas especies de *Pseudomonas* existen enzimas que permiten generar 3HA-CoA, precursores de mcl-PHAs, a partir de intermediarios de la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos *de novo*. Estas enzimas son PhaG, que funciona como una 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa (gen *phaG*), y la 3HA-CoA ligasa PA3924 (de *Pseudomonas aeruginosa*) o PP0763 (de *Pseudomonas putida*) (Wang *et al.*, 2012; Hokamura *et al.*, 2015).

Se reportó en 1998 (Rehm *et al.*, 1998) que en *Pseudomonas* la proteína PhaG está involucrada en la síntesis de mcl-PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas. Se había descrito que PhaG tenía la actividad de una 3HA-CoA-ACP transacilasa, catalizando la transferencia de un residuo 3-hidroxiacilo desde ACP a CoA (Hoffmann *et al.*, 2000); sin embargo, posteriormente se identificó en *P. putida*, que esta enzima en realidad tiene actividad de una tioesterasa sobre 3-hidroxiacil-ACPs. Por otro lado, se identificó que la formación de precursores mcl-3HAs requería adicionalmente de una CoA ligasa de ácidos grasos de cadena media producto del gen *PP0763*, que genera el 3HA-CoA utilizando el 3-hidroxiacilo liberado por PhaG, para la biosíntesis de mcl-PHAs (Wang *et al.*, 2012; Hokamura *et al.*, 2015). Por lo tanto, las proteínas PhaG y PP0763 pueden producir mcl-3HA-CoA para la biosíntesis de PHAs, a partir fuentes de carbono no relacionadas como glicerol, glucosa y fructosa; lo que indica que estos precursores derivan de la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* (Wang *et al.*, 2012; Heinrich *et al.*, 2016).

Los copolímeros de PHAs que contienen tanto monómeros de scl como mcl, tienen propiedades interesantes, porque pueden ser desde rígidos hasta flexibles, dependiendo de la fracción molar de los diferentes hidroxiacilos. Por lo tanto, la proporción de los monómeros de scl y mcl ejerce una influencia considerable en las propiedades físicas y mecánicas de PHAs como plásticos (Hokamura *et al.*, 2015).

En *Pseudomonas* sp. 61-3 se reportó, que se puede incrementar el contenido de monómeros mcl-3HA en PHAs a partir de azúcares como glucosa y gluconato,

mediante la expresión de la enzima PhaG heteróloga (Matsumoto *et al.*, 2001). Esta bacteria puede producir un copolímero con composición de monómeros de 94% molar de 3-hidroxibutirato (3HB) y 6 % molar de mcl-3HA de unidades de C6 a C12; lo que le permite tener propiedades mecánicas similares al polietileno de baja densidad (LDPE) (Matsusaki *et al.*, 2000).

Por otra parte, en *E. coli* se expresaron los genes *phaG* y *PP0763* de *P. putida* junto con la PHA sintasa de *Pseudomonas* sp. 61-3 para la biosíntesis de mcl-PHAs (400 mgL⁻¹) con composición monomérica de C6 a C12 desde fuente de carbono no relacionadas, como glucosa y glicerol (Wang *et al.*, 2012). De la misma forma, en la cepa *E. coli* LS5218 se coexpresó el gen de la ligasa *PA3924* de *P. aeruginosa* con los genes de la PHA sintasa 1 (*phaC1*) y el gen *phaG* provenientes de *Pseudomonas* sp. 61-3; y con la β-cetotiolasa (*phbA*) y la acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) de *Ralstonia eutropha*. La cepa *E. coli* LS5218 produjo siete veces más concentración de PHB-co-mcl-3HAs con la expresión del gen *PA3924* que con el gen *PP0763*. El copolímero tiene una proporción molar de 94.6 % de 3HB y 5.4 % de mcl-3HA (de unidades de C8, C10, C12 y C14) a partir de glucosa. Además, este copolímero sintetizado tiene un M_w relativamente alto (233x10³) y un porcentaje alto de elongación de rotura (195%) a diferencia del homopolímero de PHB (5%) y PHBV (50%) (Hokamura *et al.*, 2015).

2.2 PHA sintasa tipo II, enzima que polimeriza polihidoxialcanoatos de longitud de cadena media (mcl-PHAs)

Otro de los factores que puede determinar la composición de los PHAs es el tipo de PHA sintasa. En la sección 1.1.5 se describieron los tipos de enzimas existentes y, como se mencionó, las de tipo II, presentes en algunas especies del género *Pseudomonas*, son capaces de polimerizar mcl-3HAs con longitudes de 6C a 12C. En este género generalmente presentan dos enzimas de PHA sintasas de clase II.

En *P. aeruginosa* se han reportado las PHA sintasas, PhaC1 y PhaC2, las cuales tienen un 60% de identidad en secuencia de aminoácidos, presentan una pequeña diferencia en la composición de los PHAs que sintetizan y en la masa molecular del polímero que producen. Los PHAs tienen mayor M_w cuando son sintetizados por la proteína PhaC1 (106x10³) que por la PhaC2 (67x10³) (Qi *et al.*, 1997). La expresión

de la PHA sintasa, PhaC1 de *P. aeruginosa*, en una cepa recombinante de *E. coli* permite la síntesis de mcl-PHAs (1-3% de peso seco celular) a partir de un medio de Luria Bertani (LB) suplementado con ácido graso decanoato como fuente carbono. En *E. coli* con la delección del gen *fadB*, que codifica a una enoil-CoA hidratasa (DiRusso, 1990); la cual, forma el estereoisómero S-3-hidroxiacil-CoA, aumentó la acumulación de mcl-PHAs hasta un 21% del peso seco celular a partir de LB con ácido graso decanoato. Al contrario, al crecer en glucosa solo hay acumulación de trazas de PHAs. Estos resultados indican la conexión entre la ruta de β -oxidación de ácidos grasos con la biosíntesis de mcl-PHAs mediante la actividad de la enzima PhaJ; la cual cataliza la conversión por hidratación de 2-enoil-CoA a 3HA-CoA con la configuración R, para proveer el sustrato para la polimerización de mcl-PHAs por PhaC1. (Langenbach *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2007)

2.3 Especificidad de la enoil-CoA hidratasa (PhaJ) en bacterias

Como se mencionó anteriormente, las enoil-CoA hidratasas R específicas canalizan 3HA-CoAs a partir de intermediarios de la ruta β -oxidación de ácidos grasos hacia la biosíntesis de PHAs. Las PhaJs reportadas tienen diferente especificidad del sustrato, 2-enoil-CoA de scl (C4-C6) o mcl (mayores a C6). En *Ralstonia eutropha* existen tres PhaJ con diferente especificidad hacia sustratos 2-enoil-CoA de cuatro a ocho carbonos. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran cuatro enzimas PhaJ, también con diferente especificidad de sustratos 2-enoil-CoA, de scl y mcl. (Tsuge *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). Se ha reportado que la enzima PhaJ_{1Pa} junto con una PHA sintasa de *Pseudomonas* sp. 61-3 en un sistema heterólogo, sintetizan PHAs con alto porcentaje de monómeros de 3-hidroxihexanoato (3HHx) (78%mol) y 3HO (7%mol) (Tsuge *et al.*, 1999).

Por otro lado, en el trabajo de Page (1992) se reportó que *A. vinelandii* puede sintetizar PHBV a partir del sustrato 3HV-CoA proveniente de la ruta β -oxidación, lo que indica la posible actividad de la enzima PhaJ. En la base de datos KEGG se encuentra anotada la enzima PhaJ en el genoma de *A. vinelandii* (PhaJ_{Av}) (Figura 6A). La proteína tiene 156 aminoácidos y presenta el motivo de hidratasa 2 ([YF]-X_(1,2)-[LVIG]-[STGC]-G-D-X-N-P-[LIV]-H-X₍₅₎[AS]) que conservan las enzimas enoil-CoA

hidratasas con especificidad R. En la figura 6B se muestra el motivo hidratasa 2 que se conserva en las seis PhaJs y el posible residuo de ácido aspártico del sitio activo marcado por un asterisco, que está conservado en todas las proteínas PhaJ (Qin *et al.*, 2000). La similitud de PhaJ_{Av} y PhaJ_{1Pa} es de 69% de identidad de aminoácidos (Figura 6C). Se desconoce la especificidad de la enzima PhaJ de *A. vinelandii*.

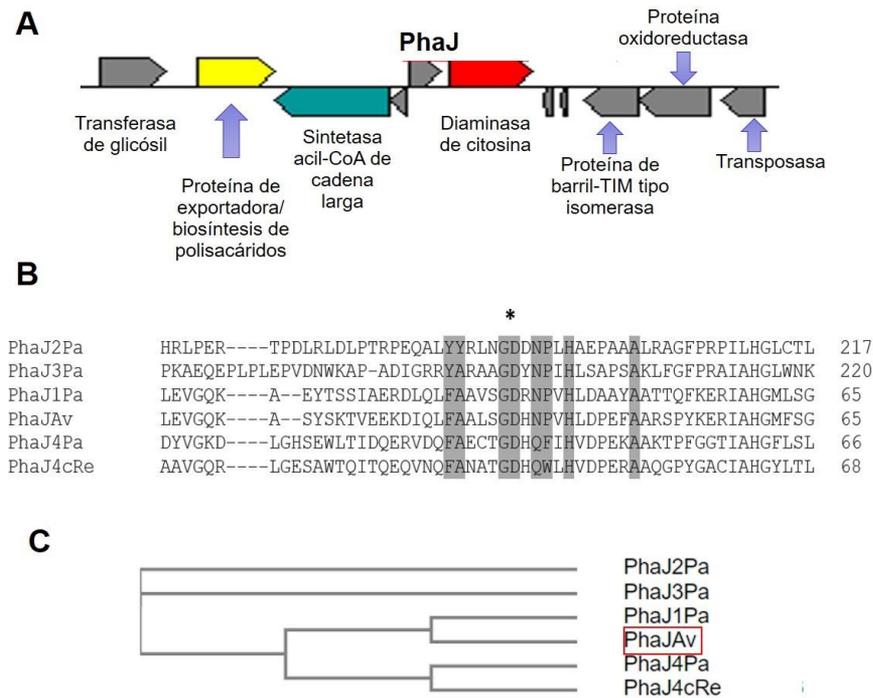


Figura 6. Enoil-CoAs hidratasas R específicas (PhaJ). **(A)** Contexto genómico de PhaJ en *A. vinelandii* (PhaJ_{Av}). **(B)** Secuencia conservada del motivo 2 de hidratasa entre enoil-CoAs hidratasas R específica de bacterias (sombra gris). **(C)** Árbol filogenético de homólogos de la proteína PhaJ de *P. aeruginosa*, *Ralstonia eutropha* y *A. vinelandii*. PhaJ_{1-3Pa}, PhaJs de *P. aeruginosa*; PhaJ_{Av}, PhaJ de *A. vinelandii*; PhaJ_{4cRe}; PhaJ de *Ralstonia eutropha*.

3. HIPÓTESIS

La expresión de las enzimas 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa (*phaG*) y 3-hidroxiacil-CoA ligasa (*PA3924*) de *Pseudomonas spp.* en *Azotobacter vinelandii*, permitirán obtener precursores 3HA-CoA de longitud de cadena media para la producción del copolímero PHBHHx a partir de sacarosa. Por otra parte, la sustitución del operón biosintético de PHA en *A. vinelandii* por una PHA sintasa tipo II (*phaC1*) de *P. aeruginosa* permitirá la producción de mcl-PHAs a partir de ácidos grasos.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Biosintetizar diferentes tipos de PHAs de longitud de cadena media en *Azotobacter vinelandii* OP.

4.2 Particulares

- Conocer el efecto de la expresión de los genes *phaG* y *PA3924* que codifican para una 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa y una 3-hidroxiacil-CoA ligasa, respectivamente, sobre la composición de los PHAs sintetizados por *A. vinelandii* OP.
- Determinar si la PHB sintasa de *A. vinelandii* OP tiene la capacidad de sintetizar precursores de polihidroxiacanoatos de cadena media provenientes de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos
- Determinar el efecto del reemplazo del operón biosintético *phbBAC* de *A. vinelandii* OP por una PHA sintasa tipo II (gen *phaC1*) de *Pseudomonas* sobre la composición de los copolímeros producidos a partir de fuentes de carbono relacionadas.
- Conocer la especificidad del sustrato de la enoil coenzima A hidratasa R específica (PhaJ).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos y plásmidos

Las cepas de bacterias y plásmidos utilizados en este estudio se describen en el apéndice 1.

5.2 Condiciones de cultivo

5.2.1 Cepas de *A. vinelandii*

Las cepas de *A. vinelandii* se preservaron en glicerol al 50% a -70°C con 1 mililitro (mL) de medio Burk con glucosa (BG) o medio Burk con sacarosa (BS) con su respectivo antibiótico. La concentración de los antibióticos utilizados fue de 1 microgramo por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Kanamicina (Km) y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido Nalídixico (Nal), respectivamente. Se realizaron siembras de las cepas de *A. vinelandii* a partir de glicerol en medio sólido de BG o BS, para la obtención de cultivos de 24-48h antes de cada experimento. La composición del medio BG y BS se muestra en la tabla 3.

Para la preparación del medio sólido se utilizó agar al 1.5% esterilizado. Todas las soluciones mostradas en la Tabla 3 se esterilizaron a 120°C durante 20 min., excepto el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el cual fue filtrado para evitar una rápida oxidación del hierro.

El medio para cruces se empleó para la conjugación entre *A. vinelandii* y *E. coli*, el cual se describe más adelante. También, se utilizó el medio de extracto de levadura y peptona (PY) con glucosa al 2%, para la realización de cinéticas de crecimiento para la cepa recombinante OPpAGMF. La composición del medio PY se describe en la Tabla 4.

Los cultivos sólidos y líquidos de *A. vinelandii* se incubaron a 30°C y el medio líquido con una agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de *A. vinelandii* (BS o BG)

| Reactivo | Concentración en g/L |
|---------------------------------------|----------------------|
| Sacarosa o Glucosa | 20 |
| Buffer de fosfatos (pH=7.2) | |
| K ₂ HPO ₄ | 0.8 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.073 |
| Na ₂ SO ₄ | 0.183 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0.160 |
| NaMoO ₄ ·2H ₂ O | .0002 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | .005 |

Tabla 4. Composición del medio de PY-Glucosa al 2%

| Reactivo | Concentración en g/L |
|----------|----------------------|
| Glucosa | 20 |
| Levadura | 3 |
| Peptona | 5 |

5.2.2 Cepas de *E. coli*

E. coli se cultivó en medio LB con el antibiótico correspondiente. La concentración de los antibióticos utilizados fue de 200 µg/mL de ampicilina (Ap) y 30 µg/mL de Km. La composición del medio LB se muestra en la Tabla 5. Se incubó a 37°C durante 12-16 h y en caso de medio líquido se agitó a 200 rpm.

Tabla 5. Composición del medio LB de *E. coli*.

| Reactivo | Concentración en g/L |
|----------------------|----------------------|
| Bacto triptona | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| Cloruro de sodio | 10 |

5.3 Preinóculos

Se sembró la cepa de *A. vinelandii* en un medio sólido de BG-Nal y se tomó una asada para inocular 25 mL de medio BG líquido en un matraz de 125 mL. Se incubó a 30°C durante 16-18 h con agitación de 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular matraces de 250 mL de BG líquido; los cuales se utilizaron para la realización de: cinéticas de crecimiento, por triplicado, durante 60 horas y en dónde cada doce horas se tomaron muestras para la cuantificación de proteína, peso seco celular y cuantificación de PHAs o PHB, se describe más adelante. También se utilizaron preinóculos para la extracción de ácido ribonucleico (RNA).

5.4 Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la realización de células competentes de *E. coli DH5 α* , se partió de una placa fresca, 16-20 horas de cultivo. Se hizo un preinóculo de *E. coli DH5 α* en 5 mL de medio LB y se cultivó toda la noche (12-16 h) con agitación vigorosa. Se inoculó 100 mL de medio LB contenido en un matraz de 250 mL con 1 mL del preinóculo. Se incubó aproximadamente 3 h a 37°C o hasta que la densidad óptica de 650 nm fuera de 0.4-0.5. Se transfirió el cultivo a tubos de polipropileno estériles, se enfrió en hielo durante 10 minutos. Se recuperaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet con 30 mL de CaCl₂ (0.1 M) frío y se dejó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se resuspendió la pastilla en 2 mL de una solución fría de CaCl₂ (0.1 M), 14% de glicerol por cada 50 mL de cultivo original, se hicieron alícuotas de 400 microlitros (μ L) en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C.

5.5 Transformación en células competentes de *E. coli*

Se mezcló aproximadamente 100 ng de ácido desoxirribonucleico (DNA) con 50 μ L de células competentes y se dejó en hielo durante 30 minutos. Se dio un choque térmico de 2 minutos a 42°C, se dejó incubando 2 minutos en hielo y se le añadió 200 μ L de LB líquido y se dejó incubando la mezcla a 37°C durante una hora. Por último, se plaqueó un volumen de 100 μ L de este cultivo en un medio sólido con su respectivo antibiótico a 37°C durante 12-16 horas. De manera simultánea se corrió un control

negativo, el cual consistió en someter a todo el proceso células competentes sin plásmido.

5.6 Reacciones de PCR

Se utilizaron las enzimas de alta fidelidad *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*) y *High-Fidelity DNA Polymerase* (*Jena Bioscience*), siguiendo los parámetros establecidos dentro de sus protocolos correspondientes.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonia se utilizó *Taq DNA Polymerase (recombinante)* de *Thermo Scientific*. El DNA molde para la PCR se obtuvo por lisado celular, se resuspendió una asada de una caja fresca en 100 μL de agua miliQ y se incubó a 95°C durante 10 min, posteriormente se centrifugó 5 min a 13 000 rpm para separar los restos celulares del sobrenadante. Se tomaron 1.5 μL de este sobrenadante para un volumen final de 20 μL de reacción. Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 1 X de Buffer HF, 200 μM de dNTPs, 0.5 μM de cada oligo, 3% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0.02 U/ μL . El programa de la reacción fue: 98°C durante 30 segundos, 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, temperatura de alineamiento de acuerdo con los oligos y 72°C durante 30 s/kb y por último a 72°C durante diez minutos como temperatura final de extensión.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en la síntesis de oligonucleótidos en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

5.7 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron: *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI*, *HindIII* y *XbaI* y se siguió las instrucciones del fabricante (Fermentas). En un tubo eppendorf de 0.6 mL se adicionaron 3-5 μL de plásmido que se extrajo mediante perclorato de sodio, 2 a 5 unidades de enzimas y su buffer correspondiente. Para las digestiones dobles se utilizó la plataforma *DoubleDigest Calculator* (*Thermo scientific*) para la selección del buffer y la concentración de las enzimas para un mayor rendimiento de la digestión. Se homogenizó la solución y se incubó a 37°C durante 2 horas. En ocasiones se dejó toda la noche, sin observarse efecto estrella por parte de alguna de las enzimas utilizadas. Se visualizó la digestión mediante un gel de agarosa

1%.

5.8 Ligación en los plásmidos

Para las reacciones de ligación se utilizó T4 DNA ligasa (Fermentas). En las reacciones de ligación de vector-fragmento, se utilizaron 1-50 nanogramos del vector y dos o tres veces más del fragmento a ligar, una unidad de T4 DNA ligasa (Fermentas), 2 μ L de buffer ligasa, 1 μ L de ATP y 1 μ L de DMSO en un volumen final de 20 μ L. Se dejó incubando a 22°C durante toda la noche, en el caso de pJET, la incubación fue de 30 min a una hora. El producto de estas ligaciones se utilizó para transformar en TOP10 o DH5 α de *E. coli*.

5.9 Construcción del plásmido p19phaC y pk18phaC

Con la finalidad de construir la cepa *A. vinelandii* OPphaC en la que se reemplazó el operón biosintético *phbBAC* de *A. vinelandii* por el gen *phaC1* de *P. aeruginosa* se realizaron dos plásmidos p19phaC y pk18phaC. Para la construcción del plásmido p19phaC se utilizaron tres fragmentos: upBAC, phaC1 y downBAC y fueron insertados en este orden en el plásmido pUC19. La construcción se subclonó en el plásmido pk18mobsacB y se denominó pk18phaC. Cabe mencionar, que los fragmentos upBAC y downBAC permitieron el remplazo alélico por doble recombinación y el fragmento phaC1 que pertenece al gen *phaC1* de *P. aeruginosa*.

Los fragmentos upBAC, phaC1 y downBAC, fueron amplificados con una enzima de alta fidelidad (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific*) y se clonaron individualmente en el plásmido pJET 1.2/Blunt. El primer fragmento, upBAC (Figura 7A), que contiene la región promotora (509 pb río arriba del operón *phbBAC*) y el sitio de unión a ribosoma del operón *phbBAC* de *A. vinelandii* se amplificó utilizando los oligonucleótidos upBAC-F y upBAC-R a partir de DNA genómico de *A. vinelandii*. Se obtuvo un producto de 595 pb y con los sitios de restricción *EcoRI* y *KpnI*, el cual se insertó en el plásmido pJET 1.2/Blunt; a este plásmido resultante se denominó pJupBAC (Figura 7A).

El segundo fragmento, phaC1 (Figura 7B), contiene solo la región codificante del gen *phaC1* *P. aeruginosa* PA01, este gen fue amplificado empleando los oligonucleótidos phaC-F y phaC-R a partir de DNA genómico de *P. aeruginosa* PA01

para la obtención de un producto de 1.6kb con los sitios de restricción *KpnI* y *BamHI* y se insertó en el plásmido pJET 1.2/Blunt, resultando el plásmido pJphaC (Figura 7B).

El tercer fragmento, downBAC (Figura 7C), está constituido después del codón de término de *phbC* y la región intergénica debajo de este gen. Se amplificó el fragmento utilizando los oligonucleótidos downBAC-F y downBAC-R a partir de DNA genómico de *A. vinelandii*. Se obtuvo un producto de 614 pb y con los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII*, el cual se insertó en el plásmido pJET 1.2/Blunt, a este se denominó pJdownBAC (Figura 7C).

Teniendo los fragmentos individuales clonados, éstos se secuenciaron para confirmar que no existieran mutaciones, para luego ensamblar las tres piezas en el plásmido P19phaC. El ensamble empezó con la inserción del fragmento *EcoRI/KpnI* upBAC del plásmido pJupBAC en los mismos sitios del plásmido pUC19. El nuevo plásmido se denominó P19up (Figura 7D). Subsecuentemente, se adicionó el fragmento *KpnI/BamHI* del plásmido pJphaC y que contiene el gen *phaC1* en los sitios de *KpnI/BamHI* del plásmido P19up. El plásmido con las dos piezas se denominó P19upphaC (Figura 7E). Por último, a este plásmido se le incorporó el fragmento *BamHI* y *HindIII* downBAC del plásmido P19upphaC en los sitios correspondientes y se denominó al nuevo plásmido con las tres piezas P19phaC (derivado de pUC19) (Figura 7F).

Una vez que se obtuvo el plásmido P19phaC, la construcción con los tres fragmentos que se encuentra entre los sitios *EcoRI* y *HindIII* se subclonó en el plásmido pK18mobsacB y se denominó al resultante pk18phaC (Figura 8).

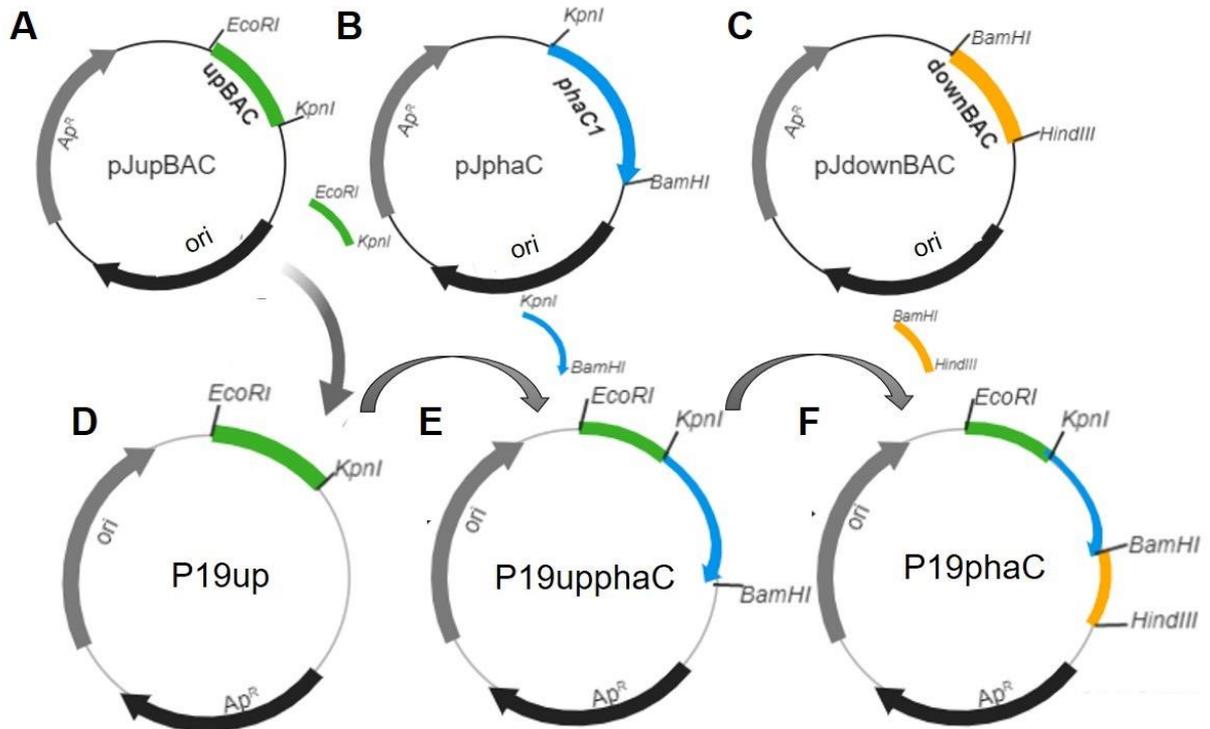


Figura 7. Construcción del plásmido p19phaC. (A) El plásmido pJupBAC tiene el promotor de *phbBAC* en el plásmido pJET 1.2/Blunt. (B) El plásmido pJphaC tiene el gen *phaC1* proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en el plásmido pJET 1.2/Blunt. (C) El plásmido pJdownBAC está constituido después del codón de término de *phbC* y la región intergénica debajo de este gen en el plásmido pJET 1.2/Blunt. (D-F) Construcción del plásmido P19phaC, a partir de los plásmidos pJupBAC, pJphaC y pJdownBAC en los sitios de restricción *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI* y *HindIII* del plásmido pUC19. Ap^R, gen de resistencia a ampicilina, ori: origen de replicación.

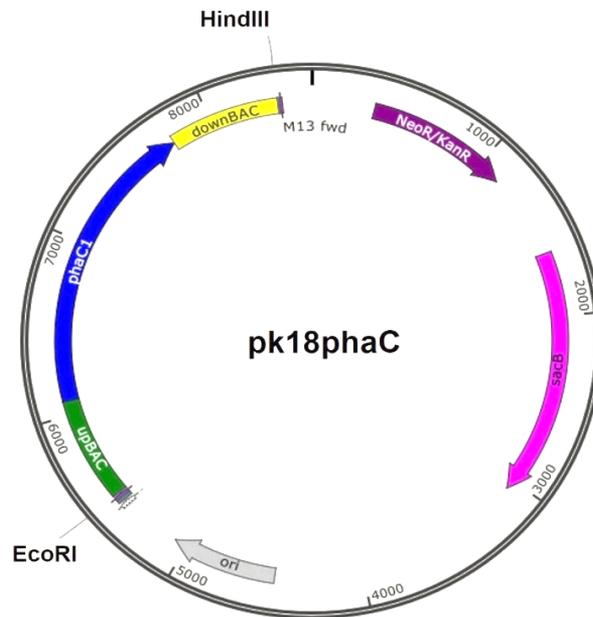


Figura 8. Esquema del plásmido pk18phaC con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas. Plásmido que tiene el promotor del operón *phbBAC* (color verde), el gen *phaC1* (color azul) y una región que está constituida después del codón de término de *phbC* y la región intergénica debajo

de este gen (color amarillo) insertado en el plásmido de pK18mobsacB con los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El plásmido pK18mobsacB que tiene resistencia a kanamicina (KanR, color morado) y el gen *sacB* (color rosa).

5.10 Construcción del plásmido P19phaGPA y pk18phaGPA

En la construcción de la cepa *A. vinelandii* OPpAGMF, dónde se reemplazó el gen *scrX* por los genes *phaG* y *PA3924* de diferentes *Pseudomonas*, se realizaron dos plásmidos p19phaGPA y pk18phaGPA. Para la construcción del plásmido p19phaGPA se utilizaron cuatro fragmentos: *upscrX*, *phaG*, *PA3924* y *downscrX* y fueron insertados en este orden en el plásmido pUC19. La construcción del plásmido p19phaGPA se subclonó en el plásmido pK18mobsacB y se denominó pk18phaGPA. Cabe mencionar, que los fragmentos *upscrX* y *downscrX* permitieron el reemplazo alélico de los genes *phaG* y *PA3924* por el gen *scrX* en *A. vinelandii* mediante doble recombinación.

El plásmido P19phaGPA se compone de cuatro fragmentos: *upscrX*, *phaG*, *PA3924* y *downscrX*, los cuales fueron amplificados con una enzima de alta fidelidad (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific* y *High-Fidelity DNA Polymerase, Jena Bioscience*), se clonaron cada uno individualmente en el plásmido pJET 1.2/Blunt y se mandaron a secuenciar para la verificación de ausencias de mutaciones. El primer fragmento, *upscrX*, contiene la región promotora del gen *scrX* (*Avin_51780*) de *A. vinelandii*, el cual se amplificó empleando los oligonucleótidos *upscrX-F* y *upscrX-R* a partir de DNA de *A. vinelandii*. Se obtuvo un producto de 711 pb y con los sitios de restricción *EcoRI* y *KpnI*, este se insertó en el plásmido pJET 1.2/Blunt, el plásmido resultante se denominó pJupscrX (Figura 9A).

El segundo fragmento incluye la región codificante y el sitio de unión de ribosoma del gen *phaG* de *P. putida* KT2440. Este gen fue amplificado empleando los oligonucleótidos *phaG-F* y *phaG-R* a partir de DNA de *P. putida* para obtener un producto de 910 pb con los sitios de restricción *KpnI* y *BamHI*. El amplificado fue insertado en el plásmido pJET 1.2/Blunt y se denominó pJphaG (Figura 9B).

El tercer fragmento incluye el sitio de unión a ribosoma y su región codificante es del gen *PA3924* de *P. aeruginosa* PA01; el cual fue amplificado empleando los oligonucleótidos *PA3924-F* y *PA3924-R* a partir de DNA genómico de *P. aeruginosa* para obtener un producto de 1724 pb flanqueado por sitios *BamHI*. El amplificado fue

insertado en el plásmido pJET 1.2/Blunt y se denominó pJPA3924 (Figura 9C). El último fragmento consta de 422 pb a partir del codón de término hacia 5' de la cadena 5'a 3'y 277 pb de la región intergénica a partir del codón término de *scrX*. Para la amplificación de este fragmento se utilizaron los oligonucleótidos downscrX-F y downscrX-R a partir de DNA de *A. vinelandii* para obtener un producto de 706 pb con los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I. El amplificado se insertó en el plásmido pJET 1.2/Blunt y se denominó pJdownscrX (Figura 9D).

La construcción del plásmido P19phaGPA se inició con la inserción del fragmento *Eco*RI/*Kpn*I upscrX del plásmido pJupscrX en los sitios correspondientes del plásmido pUC19 y se denominó P19ups (Figura 9D). Subsecuentemente, se adicionó el gen *phaG* del plásmido pJphaG en los sitios *Kpn*I/*Bam*HI correspondientes del plásmido P19ups y se denominó al resultante P19upG (Figura 9E). Enseguida se adicionó el gen *PA3924* del plásmido pJPA3924 en el sitio *Bam*HI del plásmido P19upG y se denominó al plásmido con las tres piezas P19upGA (Figura 9F). Por último, se incorporó el cuarto fragmento downscrX cortado del plásmido pJdownscrX en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido P19upGA y se denominó P19phaGPA al plásmido con las cuatro piezas (Figura 9G).

Una vez que se obtuvo el plásmido P19phaGPA, la construcción con los cuatro fragmentos que se encuentra entre los sitios *Eco*RI y *Xba*I se subclonó en el plásmido pK18mobsacB, resultando el plásmido pk18phaGPA (Figura 10). Se utilizó el plásmido pK18mobsacB porque tiene un excelente marcador de resistencia, kanamicina, y tiene el gen *sacB* que confiere sensibilidad a sacarosa a bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas. El gen *sacB* codifica a la enzima secretora levansacarasa; la cual, hidroliza sacarosa y la síntesis de levanos. Estos son polímeros de fructosa de alto peso molecular acumulados en el periplasma y son letales para la bacteria. Por otra parte, el plásmido pK18mobsacB podría facilitar la disrupción de genes y el intercambio alélico mediante recombinación homóloga. (Schäfer *et al.*, 1994; Pelicic *et al.*, 1996).

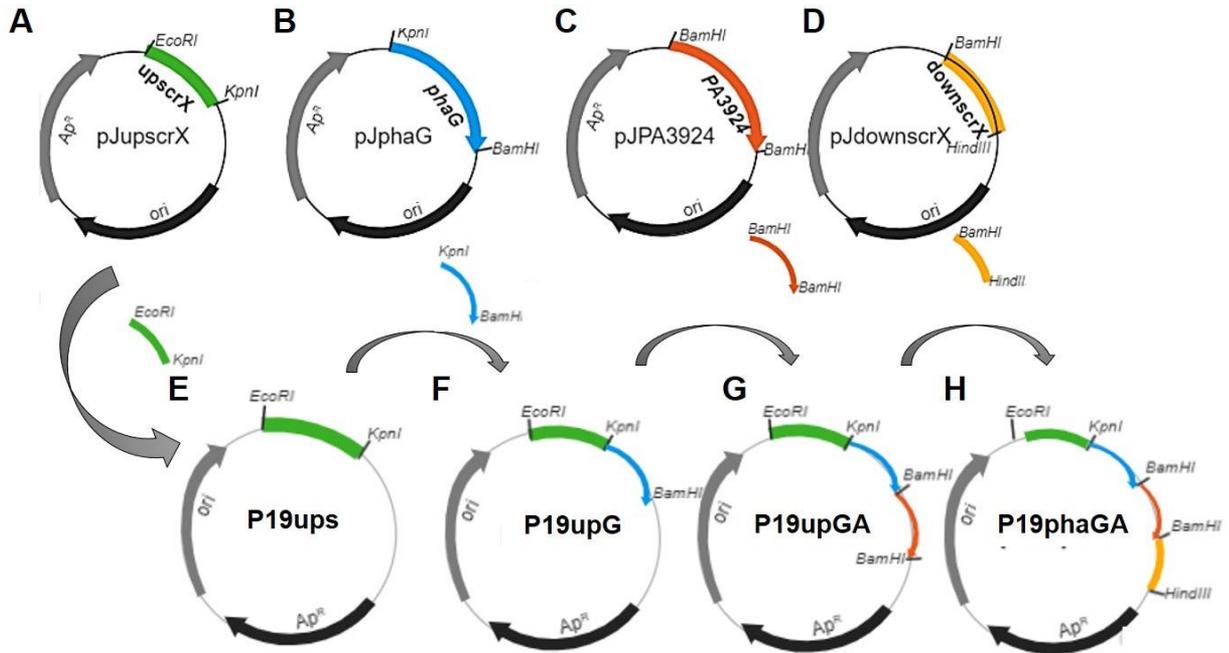


Figura 9. Construcción del plásmido p19phaGPA. **(A)** Plásmido pJupscrX, que tiene el promotor del gen *scrX* (Avin_51780) en el plásmido pJET 1.2/Blunt. **(B)** Plásmido pJphaG tiene el gen *phaG* proveniente de *Pseudomonas putida* KT2440 en el plásmido pJET 1.2/Blunt. **(C)** Plásmido pJPA3924 tiene el gen *PA3924* proveniente de *P. aeruginosa* PA01 en el plásmido pJET 1.2/Blunt. **(D)** Plásmido pJdownscrX consta de 422 pb a partir del codón de término hacia 5' de la cadena 5' a 3' y 277 pb de la región intergénica a partir del codón término en el plásmido pJET 1.2/Blunt. **(E-H)** Construcción del plásmido P19phaGPA, a partir de los plásmidos pJupscrX, pJphaG y pJPA3924 y pJdownscrX en los sitios de restricción *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI* y *XbaI* del plásmido pUC19. Ap^R, gen de resistencia a ampicilina, ori: origen de replicación.

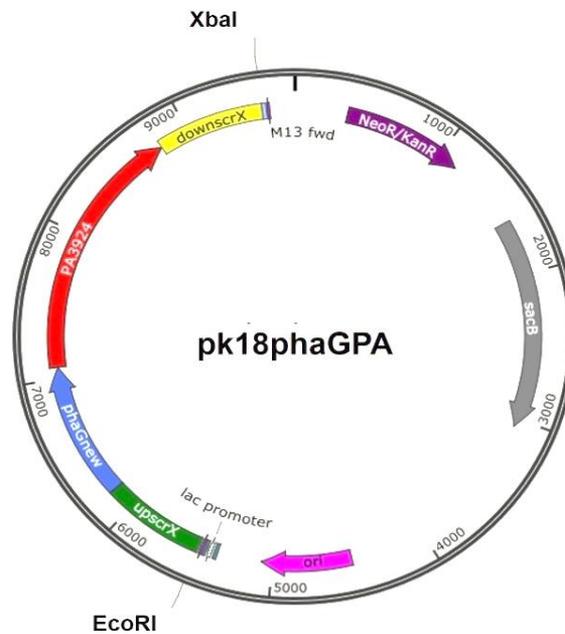


Figura 10. Esquema del plásmido pk18phaGPA con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas. Este plásmido tiene el promotor del gen *scrX* (color verde), el gen *phaG* (color azul), *PA3924*

(color rojo) y una región que consta de 422 pb a partir del codón de término hacia 5' de la cadena 5' a 3' y 277 pb de la región intergénica a partir del codón término de *scrX* (color amarillo) insertado en el plásmido de pK18mobsacB con los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El plásmido pK18mobsacB que tiene resistencia a kanamicina (KanR, color morado) y el gen *sacB* (color gris).

5.11 Conjugación de *A. vinelandii* y *E. coli*

Con la finalidad de introducir en *A. vinelandii* OP el plásmido pk18phaC o el pk18phaGPA, para posteriormente identificar las colonias en las que hubiera ocurrido la cointegración de plásmido por recombinación homóloga sencilla, se realizó una conjugación entre la cepa *E. coli*, con el respectivo plásmido, y la cepa *A. vinelandii* OP. Los plásmidos pk18phaC y pk18phaGPA tienen un casete de resistencia a Km que proviene del plásmido pK18mobsacB y no replicables en esta bacteria, descrito en la sección 5.9 y 5.10.

El procedimiento de conjugación se describe a continuación. Se creció *A. vinelandii* durante 24-48 horas en una caja BG-Nal. Se tomó una asada de este cultivo y se sembró en 50 mL de Burk glucosa (BG) líquido en un matraz de 250 mL y se incubó durante 16 horas a 30°C y 200 rpm. Al mismo tiempo, se sembró *E. coli* S17, con los respectivos plásmidos pk18phaC o pk18phaGPA durante toda la noche en LB-Km y al día siguiente se tomaron 750 µL de este cultivo y se colocaron en un volumen final de 7.5 mL de medio LB (con el antibiótico correspondiente). Se incubaron durante tres horas a 200 rpm y 37°C. Posteriormente, se centrifugaron todas las células de *A. vinelandii* y *E. coli* S17 a 6000 rpm durante diez minutos y se lavaron las células en dos ocasiones en sulfato de magnesio (MgSO₄) 10 milimolar (mM) con la finalidad de obtener una pastilla sin rastros de medio. Se resuspendió la pastilla de *A. vinelandii* en 1 mL de MgSO₄ (10 mM) y se tomó 200 µL para resuspender la cepa S17.

Se colocó una gota de la mezcla sobre cajas de Petri con medio para cruza (Tabla 6), se secó la gota en la campana y se incubó durante 24 horas. Al término del tiempo, se recolectó el tapete con 1 mL de MgSO₄ 10 mM y se sembró un volumen de 100 µL en BG-Km y se incubó a 30°C durante 48-72 h. Al término del tiempo de incubación se obtuvieron colonias resistentes a Km, que cointegraron el plásmido pK18mobsacB en el cromosoma de *A. vinelandii* OP.

Tabla 6. Composición del medio para cruzas

| Reactivo | Concentración/volumen |
|-------------------|-----------------------|
| BG | 250 mL |
| LB | 70 mL |
| Acetato de amonio | 15 mM |
| Glucosa | 2% |

5.12 Primer evento de recombinación: selección de colonias en Burk glucosa y Km

Para permitir el intercambio alélico de un gen o genes heterólogo (s) en *A. vinelandii* se llevaron a cabo dos eventos de recombinación homóloga (Figura 11). En el primer evento de recombinación homólogo (integración sitio específica), se esperó un fenotipo sensible a sacarosa y resistente a Km por lo descrito en la sección 5.10 y un genotipo que tenga el gen silvestre y el gen heterólogo como se muestra en la figura 11.B.

En el segundo evento de recombinación se esperó a que se escindiera el plásmido pk18mobsacB; por lo tanto, se esperó un fenotipo sensible a Km y resistente a sacarosa y con un genotipo con la restauración del genotipo silvestre o con el genotipo recombinante, en los cuales se sustituyó el gen silvestre por el gen o genes heterólogo (s) como se observa en la figura 11.C.

En la primera recombinación homóloga se obtuvieron candidatas de *A. vinelandii* OP con el plásmido pk18phaC o pk18phaGPA integrado a su cromosoma. Para esto, se sembraron colonias obtenidas de la cruce o conjugación, proceso descrito en la sección 5.11, en BG-Km a 30°C y se incubaron durante 48 horas. Se realizó PCR de colonia con los oligos upBAC-F y downBAC-R para analizar el genotipo de las candidatas que hubieran integrado el plásmido pk18phaC. Asimismo, se hizo este mismo procedimiento, con los oligos scr-X y scrX-F para analizar el genotipo de las candidatas obtenidas de la cruce de *E. coli* con el plásmido pk18phaGPA y *A. vinelandii*. Se obtuvieron dos fragmentos amplificados en ambas cruzas, una que

corresponde al gen silvestre y la segunda al plásmido integrado en el cromosoma, como se esperaba.

5.13 Segundo evento de recombinación: selección de colonias en Burk sacarosa al 15%

En la sección anterior se describe el genotipo y fenotipo que se espera en el segundo evento de recombinación, el cual se seleccionó con sacarosa al 15%. Este procedimiento se realizó a partir de una candidata con el plásmido pk18phaC o pk18phaGPA cointegrado, la cual se sembró en una caja Petri con BG durante 48 horas. Al término del tiempo de cultivo, se recogieron las células en MgSO₄ (10mM), se lavaron dos veces con MgSO₄ (10mM) y se resuspendieron en 1 mL de MgSO₄ (10mM). De la anterior suspensión, se sembraron 100 µL en placas de Burk con sacarosa al 15%, para seleccionar aquellas en las que hubiera ocurrido el segundo evento de recombinación que permitiría la pérdida del plásmido pK18mobsaB, y se incubó a 30°C durante 48 h.

Al término de la incubación, se resembraron cien candidatas en BS-Km y BS-Nal; de las cuales, se seleccionaron las que crecieran en BS-Nal y fueran sensibles a Km, por la pérdida del plásmido pK18mobsacB. Se realizó PCR a las colonias sensibles a Km con los oligos upBAC-F y downBAC-R, para identificar las candidatas que contuvieran el gen *phaC1* en vez del operón biosintético *phbBAC*. A un aislado en el que se confirmó el genotipo esperado se le denominó OPphaC. Esta cepa tiene el gen *phaC1* bajo el promotor del operón *phbBAC*. Asimismo, se hizo este procedimiento, con los oligos scrX-F y scrX-R para candidatas que contuvieran los genes *phaG* y *PA3924* sustituyendo al gen *scrX*, estos genes están bajo el promotor de *scrX*. Una colonia que se confirmó tener el genotipo esperado se le denominó OPpAGMF. En ambas reacciones se esperaba obtener tanto la cepa recombinante como la cepa con su genotipo original restablecido.

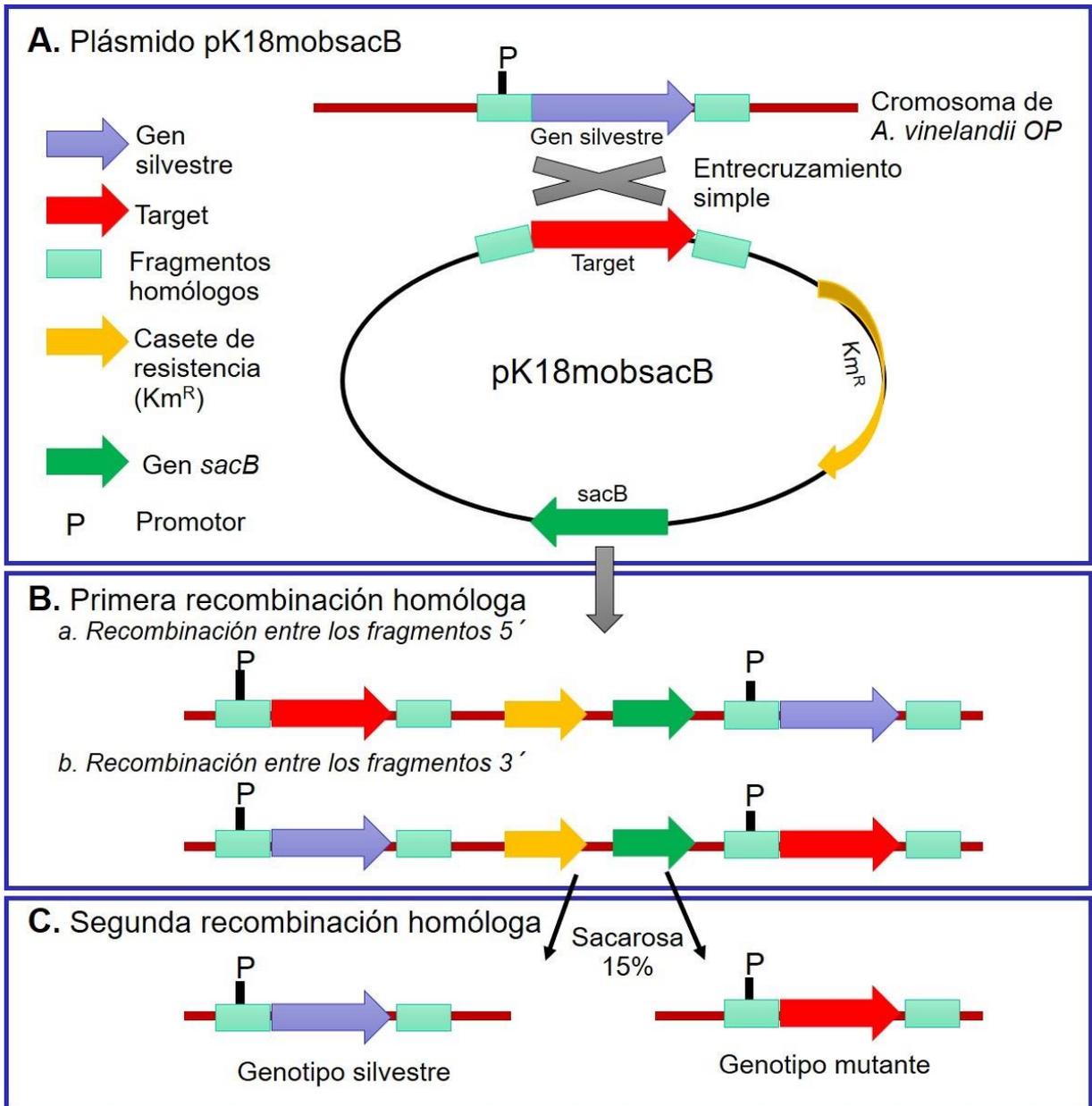


Figura 11. Esquema del uso del plásmido pK18mobsacB en *A. vinelandii* OP. **(A)** Plásmido con fragmentos homólogos que flanquean la región del gen heterólogo. **(B)** Primer evento de recombinación por la integración en el cromosoma por recombinación homóloga. **(C)** El segundo evento de recombinación por selección de sacarosa (15%).

5.14 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

El crecimiento de las bacterias en los cultivos se cuantificó midiendo proteína por el método de Lowry. Se tomó un mL de cultivo problema y se centrifugó hasta obtener un paquete celular. Se lavaron las células con MgSO_4 10Mm y se resuspendieron en un mL o en un volumen adecuado de la misma solución. Se realizó una dilución 1:10 de la muestra en un volumen final de 200 μL de agua milli Q, se añadió un mL de la solución reactiva (Tabla 7) y se dejó en reposo durante 10 minutos. Al término del tiempo, se colocaron 100 μL de Folin, previamente diluido en 1:2 con agua milli Q, y se incubó durante 30 minutos. Se hizo la lectura en un espectrofotómetro a una absorbancia de 625nm. Se utilizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de albúmina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un blanco al que se le realizó el mismo tratamiento.

Tabla 7. Solución reactiva

| Reactivo | Volumen |
|---|---------|
| Solución A (Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N) | 49 mL |
| Solución B (Tartrato de Na y K 2%) | 0.5 mL |
| Solución C (CuSO_4 1 %) | 0.5mL |

5.15 Cuantificación de peso seco celular

Se tomó una muestra de 3-5 mL de cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante diez minutos en un tubo Falcon (15mL), el pellet se lavó con un mL de agua destilada y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL previamente pesado. Se dejó secando en un horno de 70°C durante 16-20 horas o hasta que el pellet tuviera un peso constante. Una vez seco el pellet, se dejó enfriar durante una hora en un desecador para que se estabilicen las muestras y permanezcan secas; al finalizar se pesó en una balanza analítica.

5.16 Cuantificación de transcritos mediante PCR en tiempo real (qPCR)

5.16.1 Extracción de RNA

Para la extracción se utilizaron matraces, los cuales después de su término de cultivo, se mantuvieron en hielo mientras se recuperaban las células del cultivo de *A. vinelandii* por centrifugación a 7000 rpm durante 10 min. Una vez que se obtuvo todo el paquete celular, se resuspendió con 500 μ L de dietilpirocarbono (DEPC) 0.1% v/v y se dividió en dos tubos Eppendorf y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min para obtener aproximadamente una pastilla de 200 μ L. Se almacenó a -20°C hasta su extracción.

La pastilla se resuspendió posteriormente en 90 μ L de DEPC 0.1% v/v, enseguida se adicionaron 10 μ L de DEPC 0.5 % v/v y 300 μ L de acetona helada; se mezcló manualmente y se centrifugó a 10000 rpm durante 2min. Se desechó el sobrenadante con cuidado, se resuspendió la pastilla en 100 μ L de DEPC 0.1 % v/v y se agregaron 20 μ L de Lisozima (10 mg/mL) preparada con DEPC 0.5% y se incubó a 37°C durante 10min. Se adicionaron 2 μ L de Proteinasa K (100 μ L/mL) y se incubó en hielo durante 10min.

Posteriormente, se realizaron dos lavados con 7 μ L de DEPC (0.5% V/V), 300 μ L de Fenol (precalentado a 70°C) y 200 μ L de cloroformo; se mezclaron manualmente, se adicionaron 200 μ L de DEPC 0.1% V/V y se centrifugó a 12000 rpm durante 5min. En cada lavado, se removió la fase acuosa y se adicionó 1 mL de etanol absoluto helado. Se dejó precipitando toda la noche. Al término del tiempo de la precipitación, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min y el pellet se resuspendió en 40 μ L de DEPC 0.1 porcentaje de volumen a volumen (%v/v) y se cuantificó en el nanodrop a una longitud de onda de 260/280. Posteriormente, se guardó a -20 °C.

El agua DEPC significa Dietilpirocarbonato y es una sustancia química que elimina ribonucleasas, enzimas capaces de degradar el RNA. Se preparó, adicionando la cantidad adecuada, %v/v, de este reactivo en agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente con agitación toda una noche para inactivar las RNAasas. Al día siguiente se esterilizó por autoclave, lo que permite la inactivación del DEPC.

5.16.2 Tratamiento de RNA con DNAsa

Se trataron 2µg de RNA total con DNAsa (*Thermo scientific*), según las instrucciones del fabricante, con una modificación en la inactivación de la enzima. Antes de inactivar la enzima, se corroboró que el RNA no tuviera DNA, para lo cual se realizó una PCR en punto final con los oligos rpoS-F y rpoS-R para amplificar el gen *rpoS* con un peso molecular de 500 pb. Una vez que se verificó que el RNA no tuviera DNA, se inactivó la enzima DNAsa con 1µL de EDTA y se dejó incubando a temperatura ambiente durante diez minutos. Se cuantificó el RNA después del tratamiento con DNAsa y se almacenó a -20°C.

5.16.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de DNA complementario (cDNA) fue específica, es decir, se sintetizó cDNA del RNA total tratado con DNAsa para los genes de interés (*phaG* y *PA3924* o *phaC*) y el gen de referencia (*gyrA*). Se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (*Thermo scientific*) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para los siguientes genes: *gyrA* (*gyrAqPCR-F/gyrAqPCR-R*), *phaG* (*phaGqPCR-F/ phaGqPCR-R*), *PA3924* (*PA3924qPCR-F/ PA3924qPCR-R*) y *phaC* (*phaCqPCR-F/ phaCqPCR-R*).

Para verificar el cDNA se realizó una PCR punto final, para los genes de interés y el gen *gyrA*, se obtuvo un producto de 100 pb en cada uno de ellos.

5.16.4 qPCR

La cuantificación de la expresión de los genes de interés (*phaG* y *PA3924* o *phaC*) y el gen de referencia (*gyrA*) en la cepa OPphaC o OPpAGMF se llevó a cabo por PCR en tiempo real (qPCR). Para ello, se realizó una dilución 1:10 de cada cDNA sintetizado para obtener una concentración final de 5 ng/µL, la cual se utilizó en la mezcla de reacción para qPCR descrita en la tabla 8. Cada muestra o cDNA sintetizado se realizó por triplicado.

Se utilizaron las siguientes condiciones para la qPCR: 95°C durante 10 min y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundo y a 60°C durante un minuto.

Tabla 8. Mezcla de reacción para qPCR.

| | |
|---|-------------|
| SybrGreen (Applied Biosystem) | 10 μ L |
| DNA complementario (5ng/ μ L) | 1 μ L |
| Oligonucleótido forward (2.5 pmol/ μ L) | 1 μ L |
| Oligonucleótido reverse (2.5 pmol/ μ L) | 1 μ L |
| Agua estéril | 7 μ L |
| Volumen final | 20. μ L |

5.17 Identificación y cuantificación de PHAs por cromatografía de gases (GC) con detector de flama de ionización (FID)

La cuantificación y determinación de la composición monomérica de los PHAs se realizó mediante cromatografía de gases. Los PHAs fueron convertidos a productos estables y volátiles a las temperaturas de la columna del cromatógrafo de gases. Esto se consigue por la conversión del PHA en los metil ésteres correspondientes de los hidroxiacidos constituyentes del polímero (Figura 12).

Los metil-ésteres interactúan específicamente con la fase sólida de la cromatografía de gases, lo que permite la separación de los diferentes metil-ésteres de los hidroxialcanoatos. La medición del tiempo de retención y el área bajo la curva resultante de las señales del detector en el cromatograma, permiten su identificación y cuantificación.

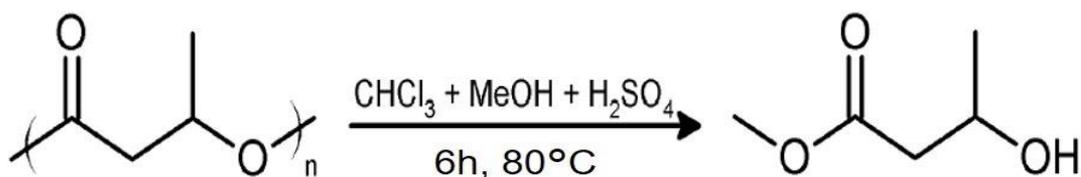


Figura 12. Metanólisis ácida de PHA.

5.17.1 Estándares para la cromatografía de gases

Para la identificación de los componentes de los PHAs producidos (PHB, PHHx y PHO), se utilizó como estándar: Ácido (R)- 3-hidroxi-butírico, ácido (R)-3-hidroxi-hexanoato y ácido (R)-3-hidroxi-octanoato del proveedor *Sigma-Aldrich*, respectivamente. Se utilizó benzoato de metilo como estándar interno (*Methyl benzoate, Sigma-Aldrich*) en todas las muestras. En la figura 13 se muestran los cromatogramas de los estándares.

Se generó una gráfica de calibración de PHB (Figura 14) para la cuantificación del contenido celular de PHAs. Se utilizó polihidroxi-butirato del proveedor *Sigma-Aldrich* para la curva: 1 miligramo (mg), 2 mg, 4 mg, 6 mg y 8 mg. Se realizó el proceso de derivatización de PHA y se inyectó la muestra en el cromatógrafo de gases, como se describe en las secciones 5.18.2 y 5.18.3, tanto para conocer el tiempo de retención de los estándares, como para la obtención de la curva de calibración.

5.17.2 Derivatización de PHA

El procedimiento se basó en el trabajo de Juengert et al., (2018) con algunas modificaciones. Se tomó 3-5 mL de un cultivo y se recuperó la biomasa de cada muestra problema por centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos en un tubo Falcon de 15mL, se lavó el pellet con MgSO₄ y se volvió a centrifugar. Se almacenó a -20°C hasta liofilizar la muestra, para esto se resuspendió la muestra en 3mL de agua. se congeló con hielo seco y se liofilizó. Se homogenizó la muestra usando una espátula y se pesaron entre 3-10 mg de células liofilizadas y se colocaron en tubos de cultivo con tapón de rosca resistente a cloroformo con resistencia a cloroformo (PTFE). Nota: es importante determinar la masa celular exacta para cálculos posteriores.

Se añadió 1 mL de cloroformo a PTFEs con la muestra, se agitó en el vórtex y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20-30 min para permitir la extracción del polímero de la masa bacteriana seca. Después, se añadió 1 mL de ácido sulfúrico al 15% con metanol (150 µL H₂SO₄ + 850 µL de metanol por muestra) para la metanólisis de las células. Los tubos cerrados se agitaron en el vórtex durante tres segundos y se abrió ligeramente la tapa del tubo para liberar la presión. Se incubó a 80°C durante seis horas en un horno. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante

cinco minutos y enseguida se adicionó 1 mL de agua destilada y 1 mL de cloroformo con 0.2% (v/v) de benzoato de metilo, 2 µL de benzoato de metilo más 998 µL de cloroformo por muestra.

5.17.3 Condiciones del cromatógrafo

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de flama de ionización (FID) (Agilent Technologies, U.S.A); con la columna capilar HP-INNOWAX- (Agilent Technologies, 30m x 0.25mm x 0.25µm). La temperatura del inyector fue de 250°C, se utilizó helio como gas acarreador, con una proporción de Split 10:1 e hidrógeno (H₂) para encender el detector. La temperatura del detector fue de 270°C, con el flujo de H₂ 40 mL/min, flujo de aire 450 mL/min y flujo de helio de 0.7 mL/min. El volumen de inyección fue de 1µL. El programa de gradiente de temperatura para la separación de los ésteres metilos, se muestra a continuación (Tabla 9).

Tabla 9. Gradiente de temperatura para la separación de los esteres metilos.

| | Tasa (°C/min) | Valor (°C) | Tiempo de espera (min) | Tiempo de corrida (min) |
|--------------------|---------------|------------|------------------------|-------------------------|
| Inicial | | 70 | 2 | 2 |
| Rampa 1 | 8.0 | 205 | 11.0 | 29.88 |
| Postcorrida | | 70 | 1.0 | 30.88 |

Antes de iniciar la cuantificación o detección de las muestras, se corrieron uno o dos blancos, solo con cloroformo para observar que la columna estaba limpia.

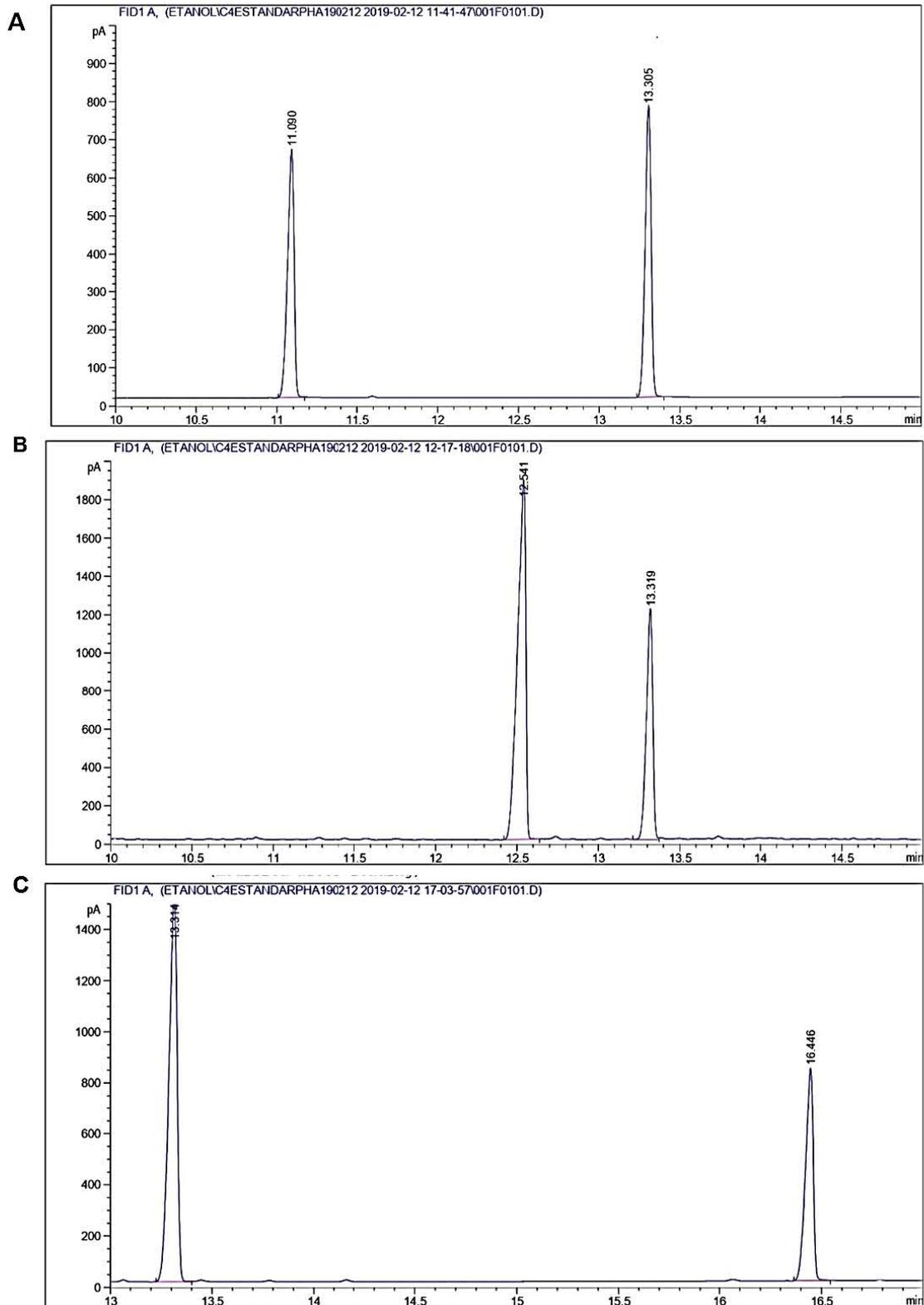


Figura 13. Cromatogramas de los estándares. **(A)** Ácido 3-hidroxi-butírico, con tiempo de retención de 11.06 min, **(B)** ácido 3-hidroxi-hexanoato, con tiempo de retención de 12.54min y **(C)** ácido 3-hidroxi-octanoato, con tiempo de retención de 16.44 min. Se utilizó benzoato de metilo como estándar interno, con tiempo de retención de 13.3 min.

5.17.4 Determinación de PHA

La cuantificación de PHAs se basó en el trabajo de Juengert *et al.*, (2018). Se utilizó el programa Agilent ChemStation (Agilent Technologies) para el análisis de los cromatogramas. El metil éster 3-hidroxibutirato (3HBME) tiene un tiempo de retención alrededor de 11.06-11.1 min. Si un copolímero de 3HB y 3-HHx es acumulado en las células, el tiempo de retención de metil éster 3-hidroxihexanoato (3HHxME) es de alrededor de 12.45-12.54 min, o si el copolímero es de 3HHx y 3HO, el tiempo de retención de metil éster 3-hidroxi octanoato (3HOME) es de alrededor de 16.44 min. El estándar interno (benzoato de metilo) debe eluir en 13.3-13.7 min.

Con el cromatograma se realizó una integración del pico de interés y del estándar interno para obtener el área bajo la curva, el cual se encuentra en una tabla debajo del cromatograma. Se utilizaron los valores del área bajo del pico de 3HBME, 3HHxME o del 3HOME, dependiendo de la muestra a analizar, y del pico del benzoato de metilo a una tabla de Excel para ser analizadas posteriormente.

Se calculó el área normalizada para el estándar de referencia (fórmula 1), para las muestras problemas que producen el copolímero de PHBHHx usando la fórmula 2 y un copolímero de PHHxHO con la fórmula (3).

Fórmula 1:

$$\text{Área normalizada del estándar} = \frac{(\text{área del estándar de referencia})}{\text{Área del estándar interno}}$$

Fórmula 2:

$$\text{Área normalizada de la muestra} = \frac{(\text{área de 3HBME} + \text{área de 3HHxME})}{\text{Área del estándar interno}}$$

Fórmula 3:

$$\text{Área normalizada de la muestra} = \frac{(\text{área de 3HHxME} + \text{área de 3HOME})}{\text{Área del estándar interno}}$$

Se graficaron las áreas normalizadas de las muestras estándar de PHB en el eje “y”, contra las cantidades de peso de PHB en el eje “x” y se determinó la ecuación de la función ($y=a*x+b$) de la curva estándar (Figura 14).

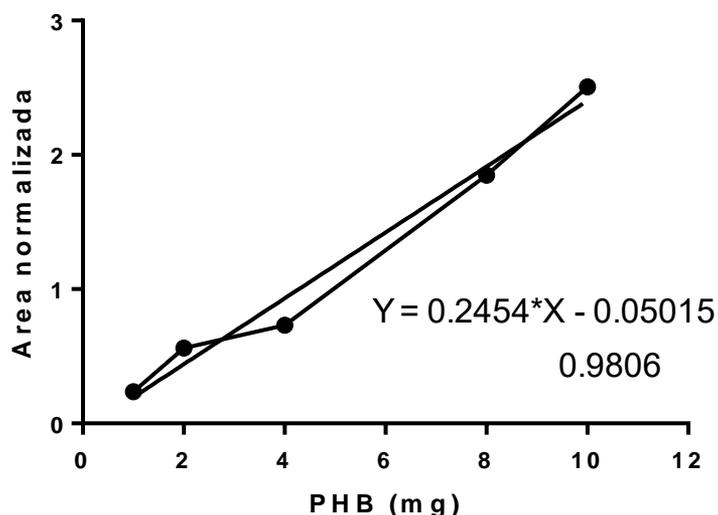


Figura 14. Curva estándar para la determinación de peso seco de PHA. La línea recta conecta los datos obtenidos para generar la ecuación de la recta.

Se calculó el peso de PHA de la muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de PHA en la muestra} = \frac{\text{área normalizada de la muestra} + b}{a}$$

Posteriormente, se calculó el porcentaje de PHA por peso seco celular utilizando la fórmula:

$$\text{Contenido de PHA (en \%de peso seco celular)} = \text{Peso de PHA en la muestra} * \frac{100}{\text{Biomasa pesada}}$$

Finalmente, se representó el contenido de PHA en una gráfica.

5.18 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism (versión 6.01). La significancia estadística fue determinada con la prueba test-t de Student usando dos colas, desapareada y un valor de $p \leq 0.10$ fue considerado significativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 La cepa OPpAGMF con el operón *scrGPA* puede polimerizar el copolímero PHBHHx

6.1.1 Generación de la cepa OPpAGMF con el operón *scrGPA* bajo el promotor de *scrX*, inducible por sacarosa

Como se mencionó anteriormente, los genes *phaG* y *PA3924* codifican las proteínas 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa y a una 3-hidroxiacil-CoA ligasa, respectivamente. Estas enzimas permiten convertir intermediarios 3-hidroxiacil-ACPs de la ruta metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos en los monómeros 3HA-CoAs para la síntesis de mcl-PHAs. Para lograr la síntesis de este tipo de polímeros en *A. vinelandii*, estos dos genes se integraron en el cromosoma de esta bacteria mediante recombinación homóloga en el gen *scrX*, en el cual, su promotor es inducible por sacarosa. Esta cepa se le denominó OPpAGMF, la cual podría sintetizar scl-PHAs y mcl-PHAs a partir de sacarosa como se observa en la ruta propuesta de la figura 15.

Los genes, *phaG* y *PA3924* se integraron en el cromosoma reemplazando el gen *scrX* (Avin_51780) y se encuentran bajo el promotor de este gen, con la finalidad de regular su expresión mediante la adición de sacarosa. A este conjunto de genes, *phaG* y *PA3924*, se les denominó operón *scrGPA*. El clúster de genes *scr*, que contiene a *scrX*, y además a los genes *scrR*, *scrB*, *scrY* y *scrP* están involucrados en el catabolismo de sacarosa. El gen *scrR* codifica una proteína represora que tiene una secuencia similar al producto del gen *lacI*. Los genes *scrB* y *scrY* codifican proteínas con similitud con la sacarasa y con la proteína LacY de *E. coli*, respectivamente. El gen *scrP* codifica una posible porina específica de carbohidratos. El gen *scrX*, localizado aproximadamente 500 pb río abajo de *scrY*, codifica una proteína con secuencia homóloga a una alfa glucosidasa (Figura 16). Este grupo de genes es regulado de manera negativa por el represor ScrR, y esta represión se libera en presencia de sacarosa. Además, se ha reportado que la pérdida de *scrX* o su reemplazo, no afecta la capacidad de crecimiento de *A. vinelandii* en un medio con sacarosa como única fuente de carbono, es decir, el producto del gen *scrX* no es esencial para el catabolismo de la sacarosa. (Johnson *et al.*, 2006).

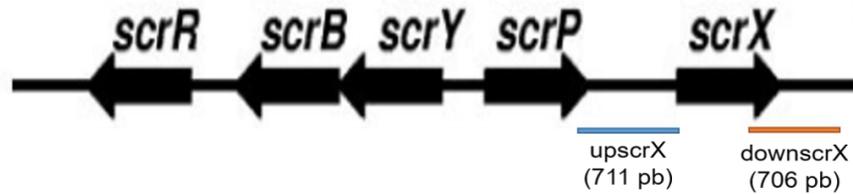


Figura 16. Clúster de genes *scr*, involucrados en el catabolismo de la sacarosa (Johnson *et al.*, 2006). En azul se muestra la región que pertenece a upscrX y en naranja el fragmento downscrX.

Se utilizó el vector de clonación pUC19 (plásmido suicida en *A. vinelandii*) para la construcción phaGPA y se denominó a este plásmido P19phaGPA. La construcción comienza con la región upscrX, seguido de *phaG*, PA3924 y por último la región downscrX, con un peso molecular final de 6634 pb, en el plásmido pUC19 (Figura 17A). Se realizó una digestión con *Bam*HI y *Xba*I para corroborar la construcción y se obtuvieron tres fragmentos: la primera banda (4.2kb) corresponde al vector puc19, la región upscrX y al gen *phaG*, la segunda a PA3924 (1.7 kb) y la última a downscrX (706 pb) (Figura 17C). Cada uno de los fragmentos amplificados y clonados fueron secuenciados para verificar que no existieran mutaciones.

Posteriormente, se subclonó la construcción phaGPA en el plásmido pK18mobsaB cortando en los sitios de restricción *Eco*RI y *Xba*I (Figura 17B y D). A este nuevo plásmido se denominó pk18phaGPA. La movilización del plásmido pk18phaGPA a *A. vinlenadii* fue mediante conjugación; siendo un método con mayor eficiencia, para transferir plásmidos grandes desde *E. coli* a un rango amplio de bacterias Gram negativas, que los procedimientos de transformación y electroporación (Schäfer *et al.*, 1994).

El plásmido pK18mobsacB está basado en el replicón pMB1 y está restringido a *E. coli* como hospedero (es suicida en bacterias como *A. vinelandii*); asimismo, acarrea el gen de kanamicina que es un excelente marcador de selección para muchas bacterias. En adición, tiene el gen *sacB* que confiere sensibilidad a sacarosa a especies Gram negativas y algunas Gram positivas. El gen *sacB* codifica la enzima levansacarasa, que cataliza la hidrólisis de sacarosa y su polimerización para la síntesis de levanos, que son polímeros de fructosa de alto peso molecular, que resultan letales para muchas bacterias Gram negativas. El plásmido pK18mobsacB es una herramienta que permite integrar el plásmido por recombinación sencilla,

seleccionando en glucosa y kanamicina, para posteriormente forzar y detectar eventos de recombinación en los que se escinde parcialmente el plásmido, dejando los genes integrados y eliminando la resistencia a kanamicina y el gen *sacB* (Figura 11) (Schäfer *et al.*, 1994; Pelicic *et al.*, 1996). La escisión del plásmido puede ser seleccionada por el crecimiento de las células en un medio que contiene un porcentaje mayor a 10% de sacarosa (Wang *et al.*, 2015) y por la adquisición de sensibilidad a Km.

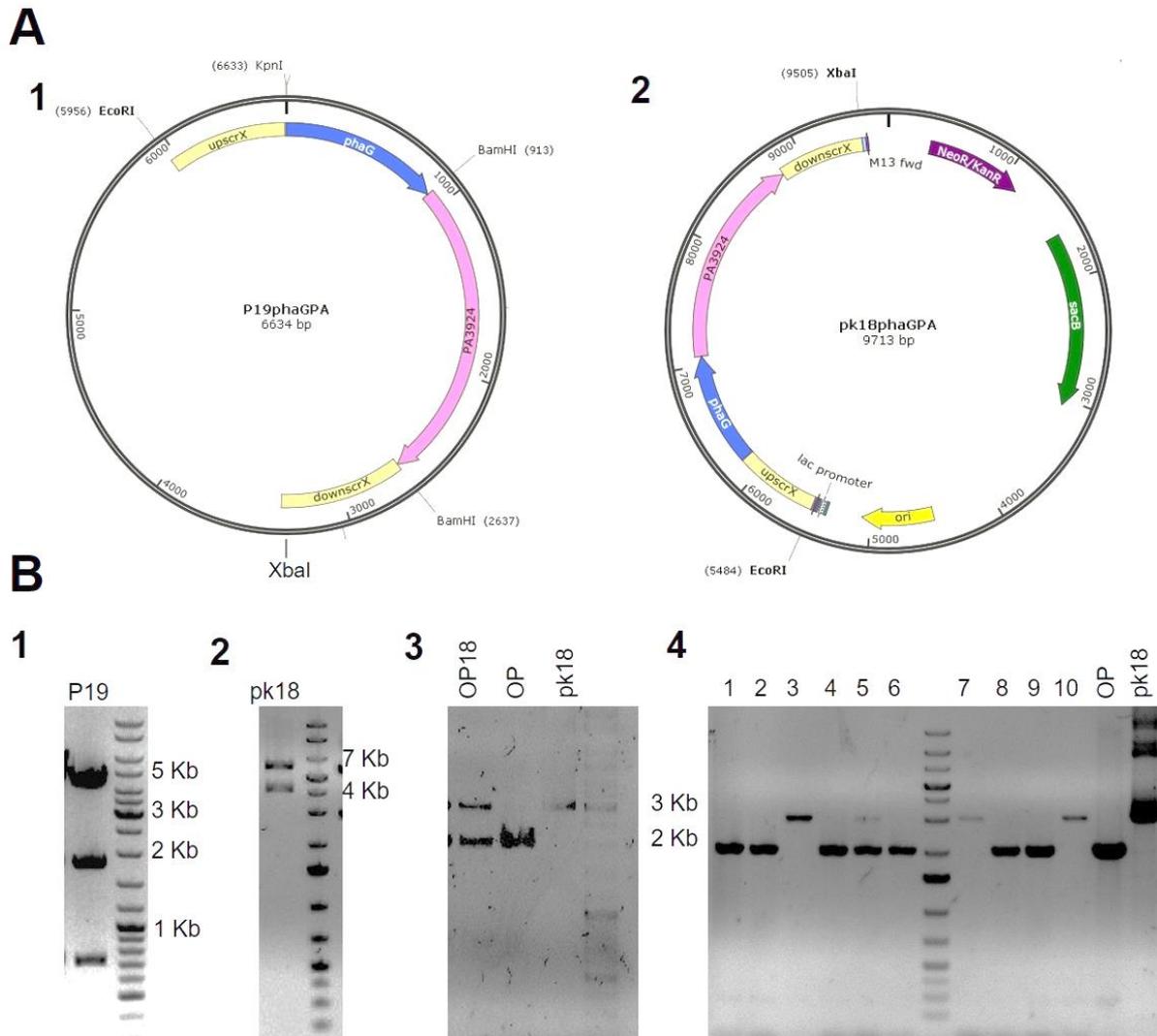


Figura 17. Construcción de la cepa OPpAGMF con el operón *scrGPA*, que tiene los genes *phaG* y *PA3924* que codifican la 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa y la 3-hidroxiacil-CoA ligasa, respectivamente, bajo el promotor *scrX*. **(A.1)** Esquema del plásmido P19phaGPA. **(A.2)** pk18phaGPA. El gen *phaG* de 911 pb se muestra en azul y el gen *PA3924* de 1.7 kb en rosa. **(B.1)** Electroforesis de DNA en gel de agarosa del plásmido P19phaGPA digerido con *Bam*HI y *Xba*I. La doble digestión genera tres fragmentos el primero corresponde al vector puc19, a la región *upscrX* y al gen *phaG*, (4.2 kb); el segundo incluye el gen *PA3924* (1.7 kb) y el tercero tiene la región *downscrX* (706 pb). **(B.2)** Electroforesis de DNA del plásmido pk18phaGPA digerido con *Eco*RI y *Xba*I, se obtuvo dos fragmentos, el primero pertenece al peso del vector pK18mobsacB (5.7kb) y el segundo, a la construcción (4kb).

(B.3) Electroforesis del producto de PCR con los oligos scrX-F y scrX-R en gel de agarosa de una candidata con la integración del plásmido pk18phaGPA en el cromosoma de *A. vinelandii*. **(B.4)** Candidatas de *A. vinelandii* con un segundo evento de recombinación. Se observa que hay tres candidatas (3,7 y 10) para la sustitución del gel scrX por operón con los genes *phaG* y *PA3924*. P19: plásmido pUC19 con la construcción con los genes *phaG* y *PA3924*, y con el promotor de *scrX*; pk18: plásmido pk18mobsacB con la construcción con los genes *phaG*, *PA3924* y con el promotor de *scrX*. OP18: primera recombinación homóloga; 1-10: segunda recombinación homóloga; OP: *A. vinelandii* OP.

6.1.2 El crecimiento celular y la acumulación de PHA son similares en la cepa recombinante OPpAGMF y en la cepa OP en medio PY

Una vez confirmado el genotipo de la cepa OPpAGMF, se procedió a caracterizarla. Primero se probó su crecimiento. El fenotipo de la cepa OPpAGMF en cajas Petri fue similar al de la cepa original OP en medio PY con sacarosa o con glucosa al 2% (Figura 18A). Para determinar el efecto de la inducción de la expresión de los genes *phaG* y *PA3924* sobre el crecimiento de *A. vinelandii* y la acumulación de PHAs, la cepa recombinante OPpAGMF fue comparada con la cepa silvestre, ambas crecidas en medio PY con glucosa al 2% durante 36h y a este tiempo se adicionaron 10gL⁻¹ de sacarosa.

La cinética se realizó en medio PY y con limitación de oxígeno. El medio PY es un medio complejo, basado en fuentes nitrogenadas (peptona y extracto de levadura) que favorecen el crecimiento celular y la acumulación de PHB en cepas de *A. vinelandii* (García, 2013). Por otro lado, el volumen de llenado fue de 100 mL en un matraz de 250 mL, lo que genera una condición de oxígeno limitado (Maier & Büchs, 2001; Gómez-Pazarín, 2015). Estas condiciones favorecen la acumulación de PHB en *A. vinelandii*, ya que menor cantidad de oxígeno y exceso de carbono provocan un incremento en el nivel de NAD(P)H, y mayor disponibilidad de acetil-CoA (Senior *et al.*, 1972; Senior & Dawes, 1973).

Se cuantificó la proteína celular de cada cepa durante la cinética de crecimiento y no hubo diferencias entre las dos cepas (Figura 18B). Asimismo, en la cepa OP y OPpAGMF se obtuvieron 3.5±0.2 gL⁻¹ y 2.9±0.1 gL⁻¹ de peso seco celular, respectivamente (48h, Figura C); aunque menor crecimiento en la cepa OPpAGMF con un nivel de significancia del 5% entre las cepas en este punto de la cinética (48h, Figura 18C) no afectó en la producción de PHA. La máxima acumulación de PHA, se encontró

en la fase estacionaria (48h, Figura 18D), y fue similar para ambas cepas. La cepa OP silvestre produjo $81.1 \pm 2.2\%$, mientras que la cepa OPpAGMF acumuló $72.3 \pm 6.9\%$ de contenido de PHA por porcentaje de peso seco (%cdw). No se observó diferencia en el contenido máximo del polímero.

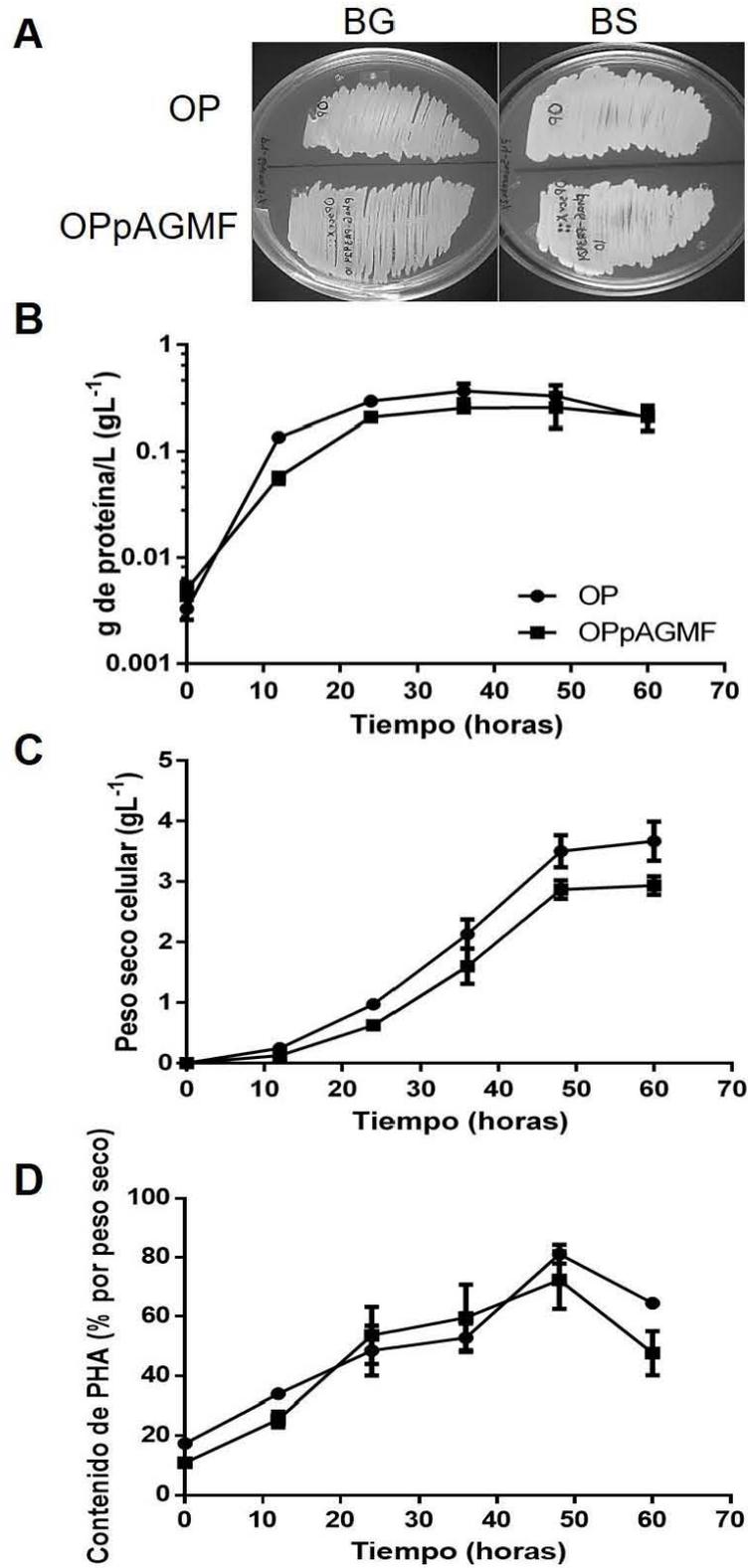


Figura 18. Determinación del efecto de la inserción de los genes *phaG* y *PA3924* en *A. vinelandii*. (A) Fenotipo de la mutante OPpAGMF y de *A. vinelandii* OP silvestre en medio sólido de PY con sacarosa al 2% y PY glucosa con al 2%. Cinética de crecimiento de OPpAGMF con comparado con el de la cepa

OP: (B) medido como proteína y (C) medido como peso seco. (D) Contenido de PHA en medio de PY-glucosa al 2% con adición de sacarosa (10gL^{-1}) a las 36 horas.

6.1.3 La expresión de *phaG* y *PA3924* se encuentran bajo el control del promotor de *scrX* y es inducible por sacarosa

Dado que la cepa OPpAGMF contiene el operón *scrGPA*, el cual tiene los genes *phaG* y *PA3924* bajo el promotor de *scrX* de *A. vinelandii* (Figura 18A) y este promotor está regulado por la disponibilidad de sacarosa, el siguiente objetivo fue conocer si el nivel de expresión de *phaG* y *PA3924* podría regularse por la concentración de sacarosa e influir en el porcentaje molar de mcl-3HAs presentes en el polímero. Por esta razón se decidió, cuantificar la expresión relativa de los genes, *phaG* y *PA3924*, mediante RT-qPCR después de inducir con sacarosa (10gL^{-1}) a las 36 horas, un cultivo crecido en glucosa.

Los niveles de expresión de *phaG* y *PA3924* en la cepa OPpAGMF medidos 12 horas después de la inducción con sacarosa 10gL^{-1} (tiempo 48 h), fueron 41 ± 6.9 y 18 ± 2.8 veces mayores respectivamente, que a las 36h de cultivo con solo glucosa (Figura 19B). A las 24 horas de la inducción hubo una disminución en el nivel de expresión del operón *scrGPA*. Se obtuvieron niveles de expresión 9 ± 0.7 y 6 ± 0.4 veces mayores de *phaG* y *PA3924*, respectivamente (tiempo 60h de cultivo, Figura 19 B) que en la condición sin inductor. Por último, 36 horas después la inducción (72h de cultivo, Figura 19 B), la expresión de *phaG* y *PA3924* fue 7 ± 1.8 y 6 ± 0.7 veces mayor, respectivamente que en la condición sin inductor. No hubo diferencias significativas de los niveles de expresión entre los tiempos 24 h y 36 h después de la inducción (60h y 72 h de cultivo; Figura 19B). Este resultado, nos indica que la sacarosa (10gL^{-1}) induce la expresión la expresión del operón *scrGPA* y ésta disminuye conforme se consume la sacarosa.

A continuación, se analizó la composición de los PHAs en los distintos tiempos (12h, 24h y 36h de cultivo) después de inducir con sacarosa en la cepa OPpAGMF mediante cromatografía de gases. La composición fue de 6.2 ± 2 % molar de 3HHx y 93.8 ± 2 % molar de 3HB después de 24h de la adición del inductor, la sacarosa (Figura 19B). Este resultado indica que, la inserción del operón *scrGPA* en *A. vinelandii* permitió la

incorporación de monómeros 3HAs de mcl (3HHx) a partir de una fuente no relacionada.

Asimismo, se observó un incremento en el porcentaje de 3HHx en el lapso de 12h a 24h después de la inducción (de $1.1\pm$ a 6.2 ± 2 % molar) con un nivel de significación de 0.10 como se puede observar en la figura 19 B. Además, en los cromatogramas se observó un pico de mayor área a las 24h que a las 12 después de la inducción (Figura 19C). Los resultados anteriores indican que, aunque la mayor expresión relativa de los genes del operón *scrGPA* se presentó 12h horas después de la inducción, la incorporación de monómeros 3HHx llega a su máximo hasta 24h después (Figura 19B).

Como se mencionó, la incorporación de 3HHx máxima en la cepa OPpAGMF fue de 6.2 ± 2 % molar, con una acumulación de 72.3 ± 6.9 % de PHA por peso seco (48h, Figura 19B y C) a partir de sacarosa como inductor y como fuente de carbono. Este porcentaje molar del monómero 3HHx de la cepa OPpAGMF es similar al que se reportó en una cepa recombinante de *E. coli* con la expresión de los genes *phaG* y *PA3924*, que fue de 6.2-7% molar de unidades de mcl-3HA de C₈ y C₁₀; pero con un contenido menor de PHA (5.3-7.2 % de PHA por %cdw) (Hokamura *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado una incorporación de unidades de mcl-3HA similar en *Aeromonas hydrophila*, que puede acumular desde 2.5 a 9.5 % molar de 3HHx, pero a partir de ácidos grasos como fuente de carbono (Asrar *et al.*, 2002).

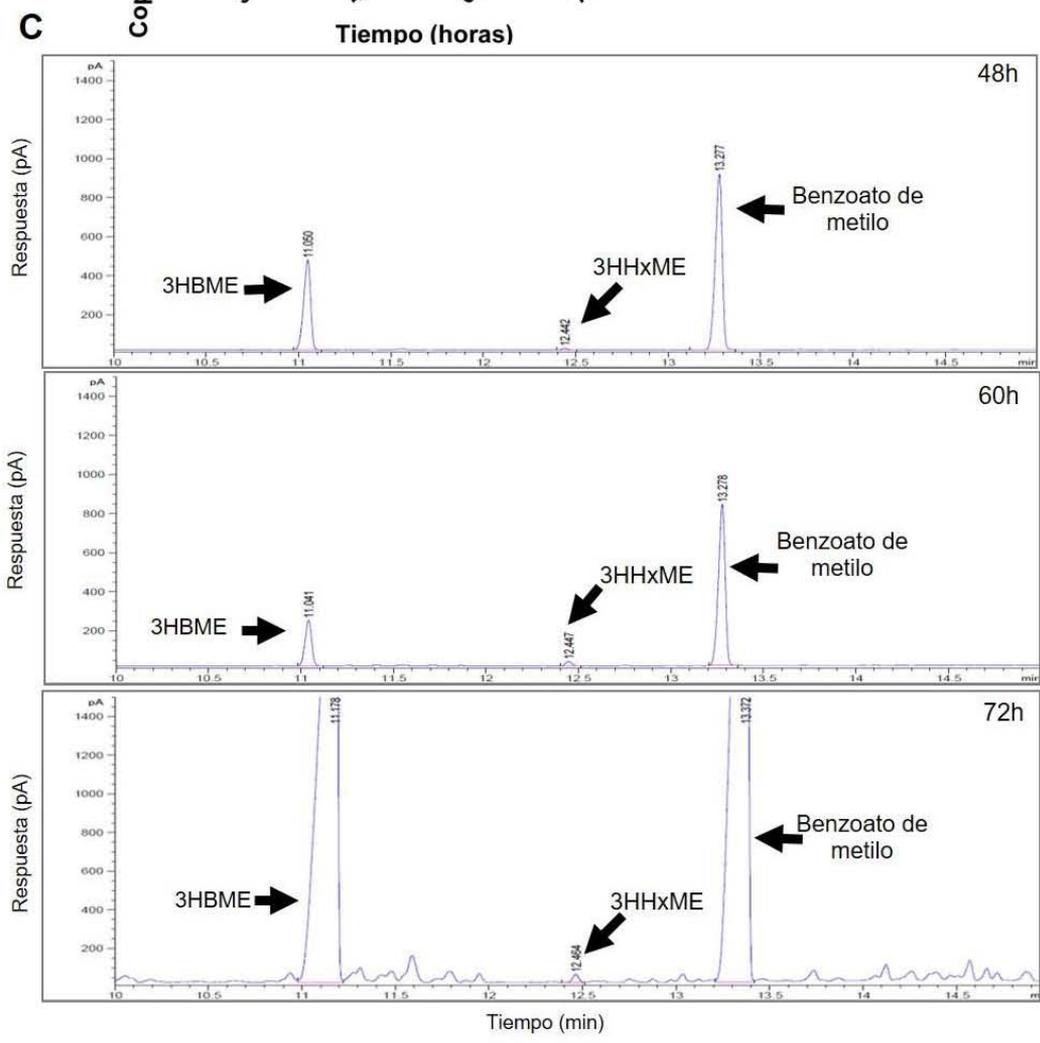
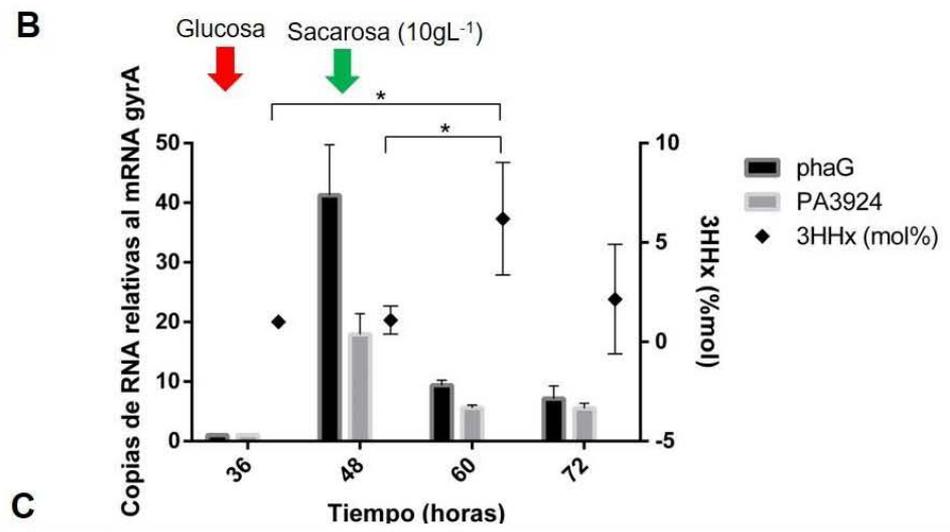
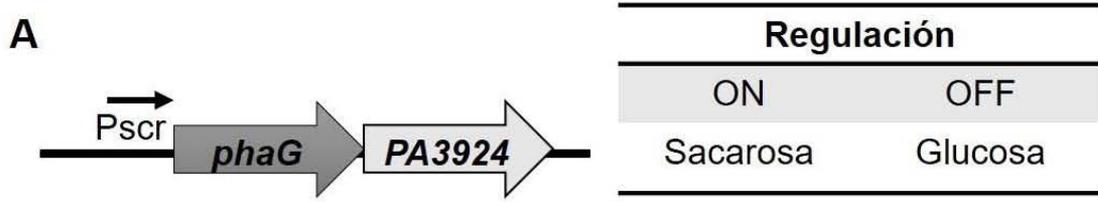


Figura 19. Expresión de *phaG* y *PA3924* bajo el control del promotor de *scrX*. **(A)** Esquema que ilustra el arreglo del operón *scrGPA* bajo el promotor inducible *Pscr* localizado "arriba" de los genes *phaG* y *PA3924*. **(B)** Cuantificación de los transcritos antes y después de la adición de sacarosa. **(C)** Cromatogramas de los PHAs extraídos después de la inducción con sacarosa, al tiempo 12 h (48h de cultivo), 24 h (60 h de cultivo) y 36 h (72 h de cultivo). 3HBME: metil éster 3-hidroxibutirato; 3HHxME: metil éster 3-hidroxihexanoato; Benzoato de metilo como estándar interno. Las diferencias fueron analizadas mediante t-test (* $p < 0.10$).

En consecuencia, la incorporación de monómeros de 3HHx en el polímero producido por la cepa OPpAGMF alcanzó niveles que de acuerdo con lo reportado pueden afectar favorablemente propiedades térmicas en el polímero. En este trabajo no se realizaron análisis termomecánicos; sin embargo, se han reportado organismos capaces de producir PHAs con porcentajes similares de incorporación de monómeros de 3HHx, como en *Pseudomonas* sp. 61-3, *A. hydrophila* y en *E. coli* recombinante que sintetizan de 2.5 a 9.5 %molar de 3HHx en el copoliéster PHBHHx, lo que permite tener un biopolímero con una temperatura de fusión baja (161°C), alta elongación de rotura (163-680%) y con Mw altos (233×10^3) (Matsusaki *et al.*, 2000; Asrar *et al.*, 2002; Hokamura *et al.*, 2015). Estos antecedentes sugieren que la copolimerización de unidades monoméricas de 3HB con mcl-3HAs de 6 carbonos (HHx) lograda con la cepa de *A. vinelandii* construida, podría ser efectiva para disminuir la fragilidad y ampliar los usos del polímero que produce *A. vinelandii*.

6.1.4 *La concentración del inductor no afecta el nivel de expresión ni el contenido de mcl-3HA en el copolímero*

Posteriormente, se investigó si la concentración utilizada del inductor (sacarosa) podría afectar o controlar el nivel de expresión del operón *scrGPA* y, como consecuencia, el porcentaje de incorporación molar de monómeros de 3HHx. Para esto, se probaron cinco concentraciones diferentes del inductor sacarosa: 0 gL⁻¹, 5 gL⁻¹, 10 gL⁻¹, 15 gL⁻¹ y 20 gL⁻¹ adicionadas desde el tiempo cero de cultivo en PY glucosa, y se cuantificaron los niveles del mRNA del operón *scrGPA* a las 12h de cultivo mediante RT-qPCR y el porcentaje molar de los monómeros 3HHx al tiempo 48 h, ya que es donde se presentó mayor porcentaje de acumulación de PHA.

Se indujeron altos niveles de expresión del operón *scrGPA* en la cepa OPpAGMF en las diferentes concentraciones de sacarosa de 5 gL⁻¹, 10 gL⁻¹, 15 gL⁻¹ y 20 gL⁻¹, con

diferencias significativas respecto a una condición sin inductor (Figura 20A), Asimismo no se observó diferencia en la expresión relativa del operón *scrGPA* entre las diferentes concentraciones del inductor, lo indica que el aumentar la cantidad del inductor no afecta o no es necesario para obtener un incremento en la expresión relativa del operón *scrGPA*. Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre el % molar de 3HHx en ninguna concentración del inductor con respecto a una condición sin inductor, con un nivel de significación de 0.05 o 0.10. Sin embargo, en los cromatogramas se observó un pico de mayor tamaño en una concentración de 15 gL⁻¹ que en la concentración de 0 gL⁻¹ pero no fue estadísticamente significativo (Figura 20B). Asimismo, se identificó un porcentaje pequeño de incorporación de % molar de 3HHx en la concentración 0 gL⁻¹, el cual podría deberse a una fuga de expresión del operón *scrGPA*. Estos resultados indican que las concentraciones 5 gL⁻¹, 10 gL⁻¹, 15 gL⁻¹ y 20 gL⁻¹ no afectan la expresión del operón *scrGPA* ni tampoco el contenido de 3HHx en la cepa OPpAGMF.

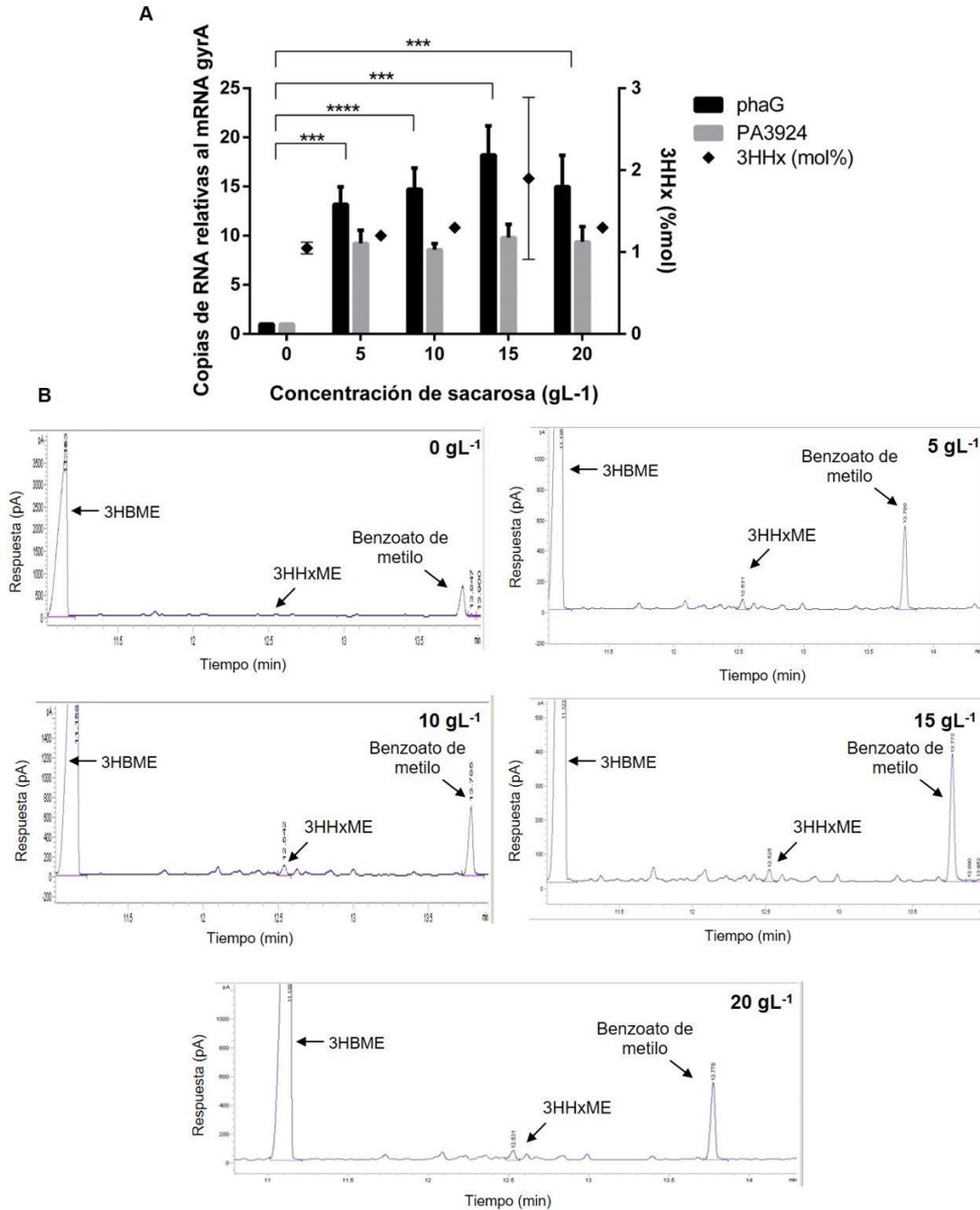


Figura 20. Determinación de la composición del copolímero PHBHHx sintetizado en diferentes concentraciones del inductor sacarosa. **(A)** Cuantificación de los transcritos en diferentes concentraciones de sacarosa. **(B)** Cromatogramas que corresponden a diferentes concentraciones de sacarosa. 3HBME: metil éster 3-hidroxibutirato; 3HHxME: metil éster 3-hidroxihexanoato; Benzoato de metilo como estándar interno. Las diferencias fueron analizadas mediante t-test. La diferencia significativa se encuentra indicada (** $p < 0.001$ o **** $p < 0.0001$).

6.1.5 La PHA sintasa de clase I de *A. vinelandii* puede incorporar monómeros de 3HHx

Como se mencionó en apartados anteriores, *A. vinelandii* presenta una PHA sintasa de clase tipo I, la cual tiene la capacidad de polimerizar scl-3HAs; sin embargo, se han reportado algunas PHA sintasas de este tipo que son capaces de incorporar mcl-3HAs. Por lo que se quiso conocer si la limitación para incorporar monómeros de más de C6 o mcl-3HAs se debe al tipo de PHA sintasa que tiene *A. vinelandii*. Para esto se utilizaron los resultados previamente descritos en los apartados 6.1.2 – 6.1.4 de la cepa OPpAGMF.

Cabe mencionar que, la cepa OPpAGMF contiene los genes *phaG* y *PA3924*, los cuales proveen los precursores mcl-3HA-CoAs a partir de la ruta de la biosíntesis ácidos grasos *de novo* para la síntesis de mcl-PHAs. Se demostró que esta cepa puede incorporar hasta 6.2 ± 2 % molar de 3HHx (60h, Figura 19B); este resultado indica que la PHA sintasa tipo I de *A. vinelandii* puede incorporar mcl-3HA-CoAs (C₆) provenientes de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos *de novo*.

En estudios previos, se había reportado que la PHA sintasa de *A. vinelandii* solo puede tener sustratos de scl-3HA-CoA, C₄ y C₅, provenientes de la ruta de la biosíntesis de scl-PHA y de la ruta de la β -oxidación, respectivamente (Page, 1992), lo que indica que la incorporación de 3HHx en *A. vinelandii* se debió a la incorporación de los genes *phaG* y *PA3924* ya que estos genes pueden canalizar mcl-3HA-CoAs de C₆, C₈, C₁₀ y C₁₂ (Hoffmann *et al.*, 2000; Hokamura *et al.*, 2015), por lo que no era probable que hubiera limitación de este punto en la cepa. También, se ha reportado que los mcl-PHAs sintetizados a partir de la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos *de novo*, hay mayor proporción de monómeros de C₈ y C₁₀ que C₆ en la composición del mcl-PHA (Hoffmann *et al.*, 2000), lo que indicaría que los precursores de mcl-3HA-CoAs se encuentran en mayor cantidad de C₈ y de C₁₀ que de C₆; y se tendría una limitación en la incorporación de estos en la PHB sintasa de *A. vinelandii*, ya que esta es de tipo I.

Asimismo, en otras PHA sintasas de tipo I como la de *Aeromonas caviae* tiene actividad con sustratos (3HA-CoAs) de C₄, C₅ y C₆ provenientes de la ruta de la β -oxidación al crecer en ácidos alcanoicos, con una incorporación de 11 a 20 % molar

de monómeros 3HHx (Doi *et al.*, 1995). Se observó que la incorporación de 3HHx-CoA fue menor en la PHA sintasa de *A. vinelandii* (60h, Figura 19 B) que lo reportado en la PHA sintasa de *Aeromonas caviae*. Estos resultados sugieren, que la PHA sintasa de *A. vinelandii* tiene mayor afinidad por 3HB-CoA que por 3HHx-CoA, el cual proviene de la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos *de novo*.

6.2 El remplazo de la PHB sintasa clase I por una clase II permite producir mcl-PHAs en *A. vinelandii*

6.2.1 Generación de la cepa OPphaC, sustitución del operón *phbBAC* de *A. vinelandii* por una PHA sintasa de *P. aeruginosa* (*PhaC1*)

Para determinar si *A. vinelandii* OP podría producir otros mcl-PHAs utilizando una PHA sintasa tipo II y a partir de ácidos grasos, se procedió a construir una cepa recombinante de *A. vinelandii* donde se reemplazó el operón biosintético *phbBAC* de *A. vinelandii* por una PHA sintasa (*phaC1*) proveniente de *P. aeruginosa* (Figura 21). A esta cepa se denominó OPphaC.

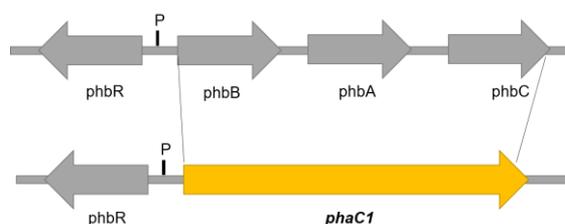


Figura 21. Sustitución del gen *phaC1* por el operón biosintético *phbBAC* de *A. vinelandii*.

La construcción de la cepa OPphaC se describe en la sección 5.9. En breve, se realizó una construcción con regiones homólogas de *A. vinelandii* y con la región codificante del gen *phaC1* de *P. aeruginosa*. La primera región homóloga incluye 509 pb río arriba del gen *phbB* (su región promotora) y el sitio de unión a ribosoma del operón *phbBAC*, la cual se denominó upBAC y la segunda está constituida a partir del codón de término de *phbC* y la región intergénica debajo de este gen. El objetivo es sustituir el operón de *phbBAC* por el gen *phaC1* de *P. aeruginosa* mediante recombinación homóloga (Figura 21). A esta construcción se le denominó phb-phaC y se insertó en el plásmido pUC19, el plásmido resultante se denominó P19phaC (Figura 22 A.1); y después esta construcción se subclonó en el plásmido pK18mobsacB y se denominó pk18phaC (Figura 22 A.2)

En las figuras 22B.1 y 22B.2 se observan los patrones de restricción generados al digerir el plásmido P19phaC y pk18phaC con *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. En ambos plásmidos se esperan dos bandas, la primera que corresponde a la construcción phb-phaC (2.9 kb), la segunda al plásmido puc19 (2.6 kb) o al plásmido pK18mobsacB (5.7 kb). Para comprobar la integración del plásmido pk18phaC en el genoma de *A. vinelandii* se realizó una PCR con los oligonucleótidos upBAC-F y downBAC-R, los cuales amplifican un fragmento de 2.9 kb que corresponde a la construcción phb-phaC y al operón biosintético *phbBAC* de 5.2 kb (figura 22B.3). Una vez, que se tuvo una candidata con el plásmido pk18phaC integrado, se llevó la selección de la cepa OPphaC mediante sacarosa al 15%. Las colonias que hubieran sustituido el operón *phbBAC* por el gen de la *phaC1* o regresaran a su genotipo silvestre, crecerían en sacarosa (se describe en la figura 11C). Se realizó PCR con los oligonucleótidos upBAC-F y downBAC-R y se obtuvieron dos clonas con el genotipo esperado; es decir, con la inserción del gen *phaC1* en el cromosoma de *A. vinelandii* (número 7 y 8 de la figura 22B.4).

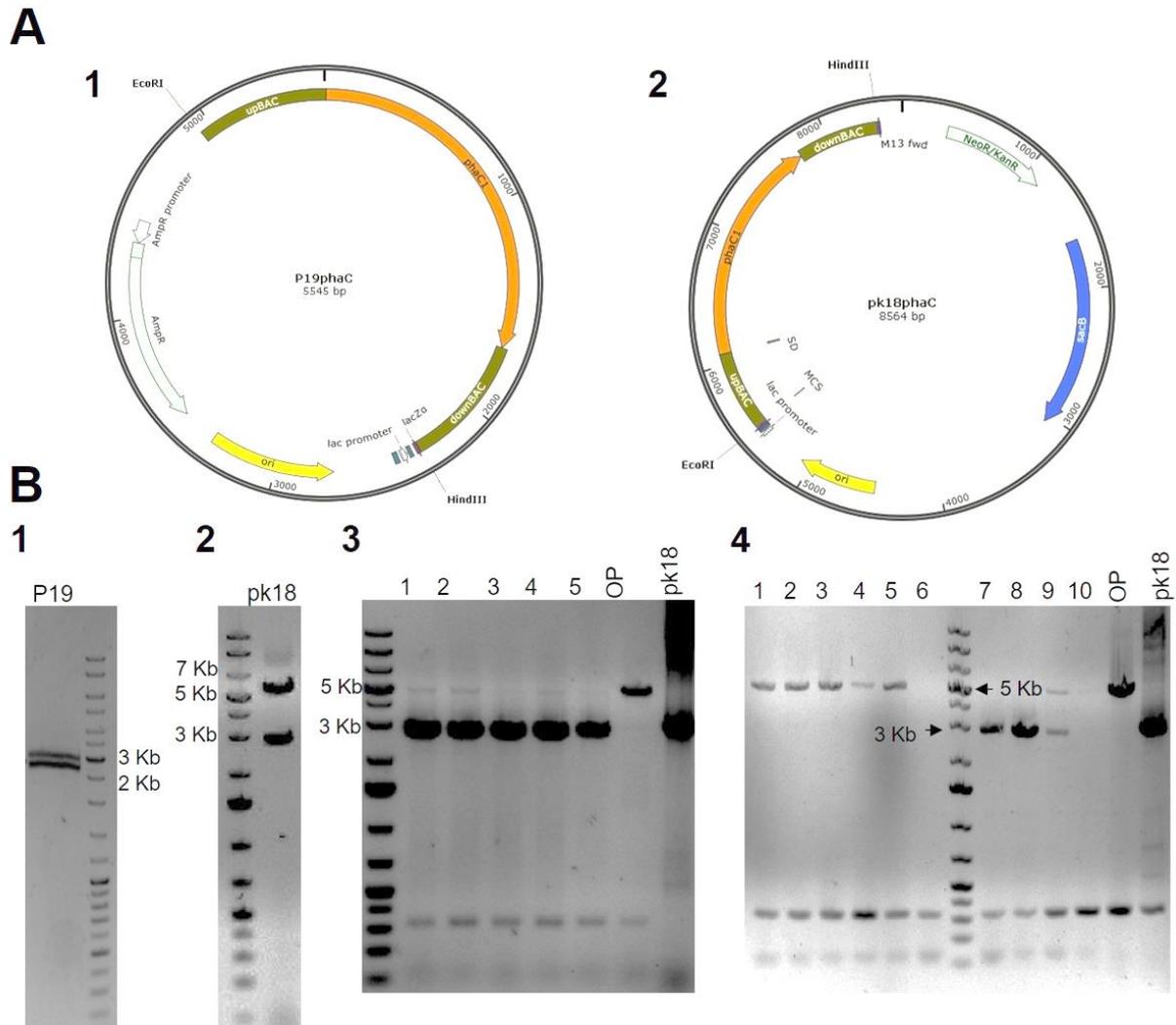


Figura 22. Construcción de la cepa OPphaC, que tiene una PHA sintasa tipo II (PhaC1). **(A.1)** Esquema del plásmido P19phaC con los sitios de corte *EcoRI*/*HindIII* utilizadas para la subclonación en el plásmido pK18mobsacB. El gen *phaC1* se muestra en color naranja. La resistencia a ampicilina se indica en color verde claro. **(A.2)** Esquema del plásmido pk18phaC, se muestra en color azul el gen *sacB* y en verde la resistencia a ampicilina. **(B.1)** Electroforesis de DNA en gel de agarosa del plásmido P19phaC digerido con *EcoRI* y *HindIII*, se obtuvo dos fragmentos que corresponde a la construcción que contiene el gen *phaC1* (2.9kb) y el segundo al plásmido pUC19 (2.6 kb). **(B.2)** Electroforesis de DNA en el gel de agarosa del plásmido pk18phaC digerido con *EcoRI* y *HindIII*. El corte de las enzimas genera dos fragmentos de 2.9 kb y 5.7 kb que corresponde a la construcción *phb-phaC* y al vector pK18mobsacB, respectivamente. **(B.3)** Electroforesis de PCR de candidatas de *A. vinelandii* con la integración del plásmido pk18phaC y el operón biosintético *phbBAC* con un peso molecular de 2.9 kb y 5.2 kb, respectivamente. **(B.4)** Electroforesis de productos de PCR de diez candidatas de OPphaC empleando los oligos upBAC-F y downBAC-R. El número 7 y 8 tienen el genotipo de la cepa OPphaC y las restantes el genotipo silvestre (operón *phbBAC*) con un peso molecular de 5.2 kb. Los números del 1 a 5 o del 1 a 10 representan una candidata; OP: cepa silvestre de *A. vinelandii* OP; P19: plásmido P19phaC y pk18: plásmido pk18phaC.

6.2.2 *En la cepa OPphaC no se observan gránulos de PHA a partir de ácidos grasos*

El fenotipo de la cepa OPphaC fue caracterizado en medio sólido de PY sacarosa al 2 % (Figura 23B). La cepa OPphaC es más tenue que la silvestre y no se observaron gránulos. Esto se debe a que la cepa OPphaC no presenta la ruta de síntesis scl-PHA; y, por lo tanto, no puede sintetizar scl-PHAs a partir de carbohidratos.

Asimismo, no se observaron gránulos de PHA cuando la cepa OPphaC creció en BS con hexanoato de sodio, BS con octanoato de sodio y BS con decanoato de sodio; mientras que en la cepa OP se observan gránulos en todas las fuentes de carbono (Figura 23C). Este resultado indica que *A. vinelandii* OP crece y puede producir polímero a partir de fuentes de carbono relacionadas; sin embargo, no se observó gránulos de mcl-PHA en la cepa OPphaC.

6.2.3 *La cepa OPphaC sintetiza mcl-PHAs a partir de dos fuentes de carbono relacionadas: octanoico de sodio y decanoico de sodio*

En la cepa OPphaC no se observaron gránulos de PHA, por lo que se propuso conocer si el gen *phaC1* se estaba expresando. Para esto, en el trabajo de López (2018) se cuantificó el nivel de expresión del gen *phaC1* mediante RT-qPCR en diferentes fuentes de carbono: ácido heptanoico, octanoato de sodio y decanoato de sodio. Todas las condiciones tienen BS. La cepa OPphaC y OP tienen mayor biomasa cuando se crece en un medio con ácido octanoico y decanoico que en un ácido heptanoico (dato no mostrado). Asimismo, el nivel de expresión en octanoato de sodio y decanoato de sodio fue 2.3 y 2.2 veces mayor que el control en BS, respectivamente (Figura 24). El nivel de expresión de *phaC1* en ácido heptanoico no tuvo una diferencia significancia del 5%. Por lo tanto, podemos concluir que hay transcripción del gen *phaC1* en la cepa OPphaC, a pesar de no observar síntesis de PHA.

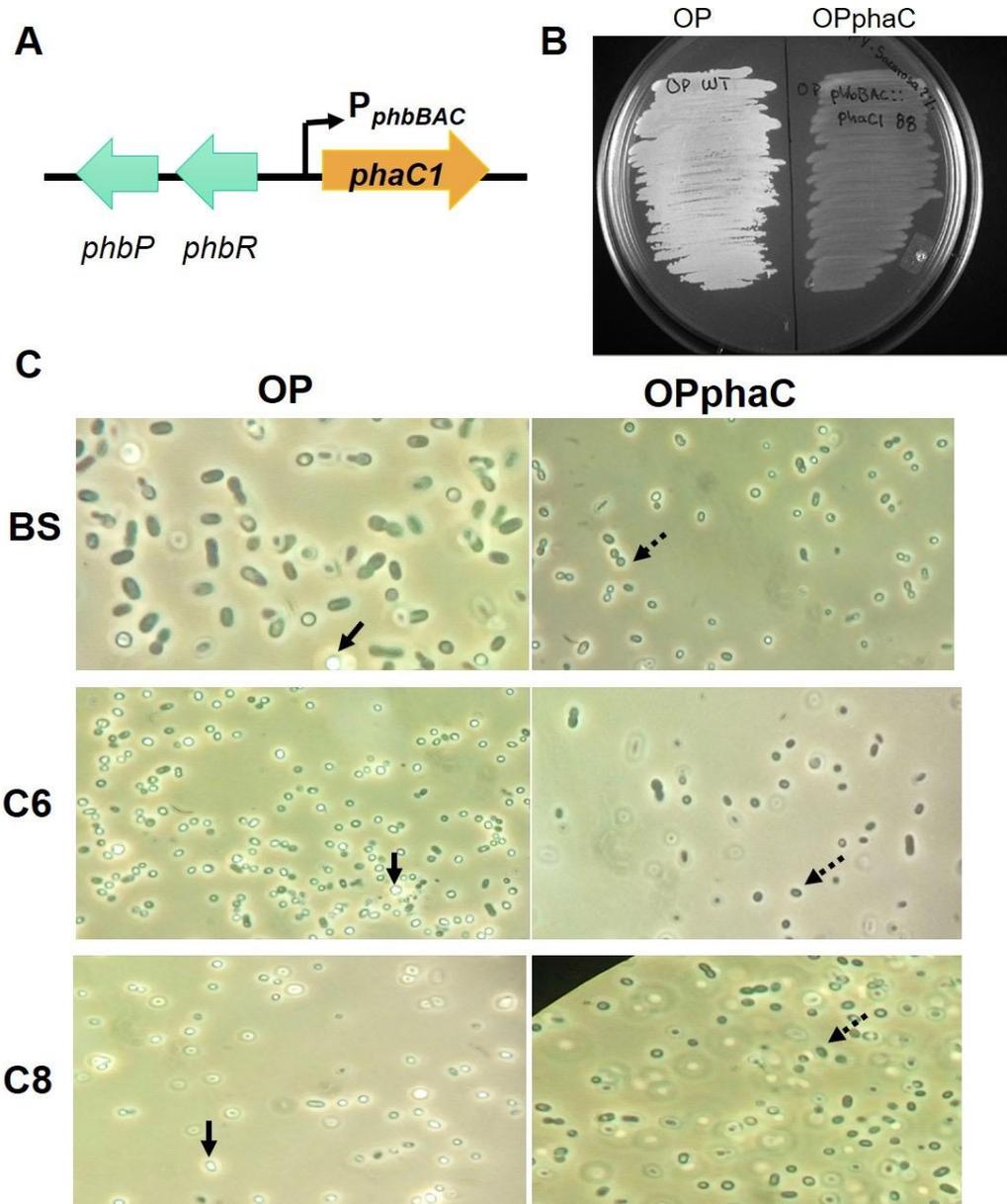


Figura 23. Fenotipo de la cepa OPphaC. **(A)** Contexto genómico de la cepa OPphaC. **(B)** Fenotipo de la cepa OPphaC1 y de la cepa OP silvestre en medio sólido de PY sacarosa al 2%. **(C)** Fenotipo y presencia de gránulos de la cepa OP y OPphaC en diferentes medios. Se utilizó un aumento de 100X para observar los gránulos. Las flechas gruesas señalan los gránulos de la cepa OP y las flechas punteadas señalan células de la cepa OPphaC1, sin la observación de gránulos en el citoplasma. BS: Burk sacarosa; C6: hexanoato de sodio y C8: octanoato de sodio.

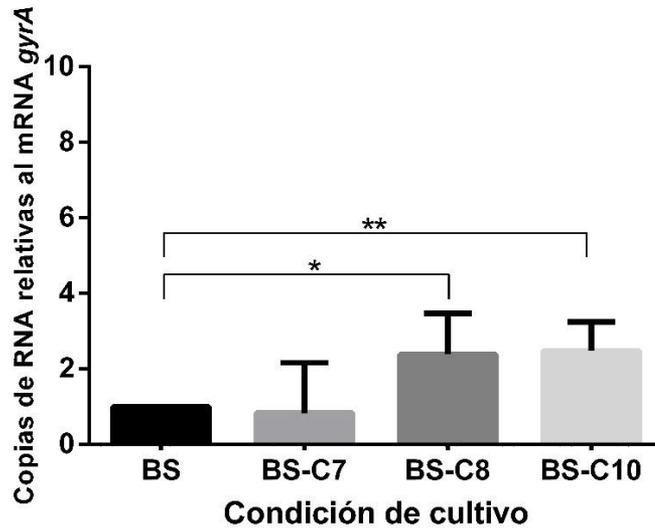


Figura 24. Nivel de expresión de transcritos de *phaC1* en la cepa OPphaC en diferentes fuentes de carbono relacionadas, utilizando como control el medio BS (López, 2018). La diferencia significativa fue analizada mediante t-test. La diferencia significativa se encuentra indicada (* $p < 0.1$ o ** $p < 0.05$).

Por lo que se prosiguió a identificar mcl-PHAs sintetizados por la cepa OPphaC mediante GC. Se identificó copolímeros de PHHxHO a partir de dos diferentes ácidos grasos o fuentes de carbono relacionadas: octanoato de sodio (Figura 25A) y decanoato de sodio (Figura 25B).

La cepa OPphaC acumuló PHA alrededor del 11.2 y 26.5% de peso seco a partir octanoato de sodio y decanoato de sodio, respectivamente. En la primera fuente de carbono, octanoato de sodio, la composición fue de 8.7% molar de 3HHx y 91.3% molar de 3HO y en la segunda fuente, decanoato de sodio se obtuvo 62.1% molar de 3HHx y 37.9% molar de 3HO (Tabla 10).

El contenido de PHA que se obtuvo de la cepa OPphaC es menor que el reportado en la cepa *A. vinelandii* OP silvestre ($79.6 \pm 6.1\%$ de cdw; Adaya *et al.*, 2018), esta baja síntesis de PHA en la cepa OPphaC podría deberse al cambio genético realizado. López (2018) observó una diferencia en la biomasa de la cepa OPphaC (1 gL^{-1}) con respecto a la cepa silvestre OP (2.5 gL^{-1}) en un medio con sacarosa y una fuente de carbono relacionada. Asimismo, *A. vinelandii* crece poco en fuentes de carbono relacionadas sin alguna disposición de nitrógeno en el medio (menor a 0.33 gL^{-1}) a comparación que en una fuente de carbono no relacionada (3.48 gL^{-1}) (López, 2018).

Por otra parte, la producción de mcl-PHA en la cepa OPphaC es cercana a lo reportado en otros sistemas heterólogos cuando se expresa PhaC1 como en *E. coli*, *P. putida* y *P. oleovorans*; los cuales tienen una producción del 21-53.1 % de PHA por cdw a partir de octanoato y decanoato (Timm & Steinbüchel, 1992; Langenbach *et al.*, 1997). Se ha reportado que la producción de PHA se afecta por un cambio genético; por ejemplo, en *P. putida* la producción de PHA disminuyó de 62.5 a 40.9 % al incorporar el gen *phaC1* (Timm & Steinbüchel, 1992). Por lo tanto, una alteración en las rutas metabólicas podría generar consecuencias en el sistema biológico de la bacteria como la disminución de un metabolito y/o la biomasa.

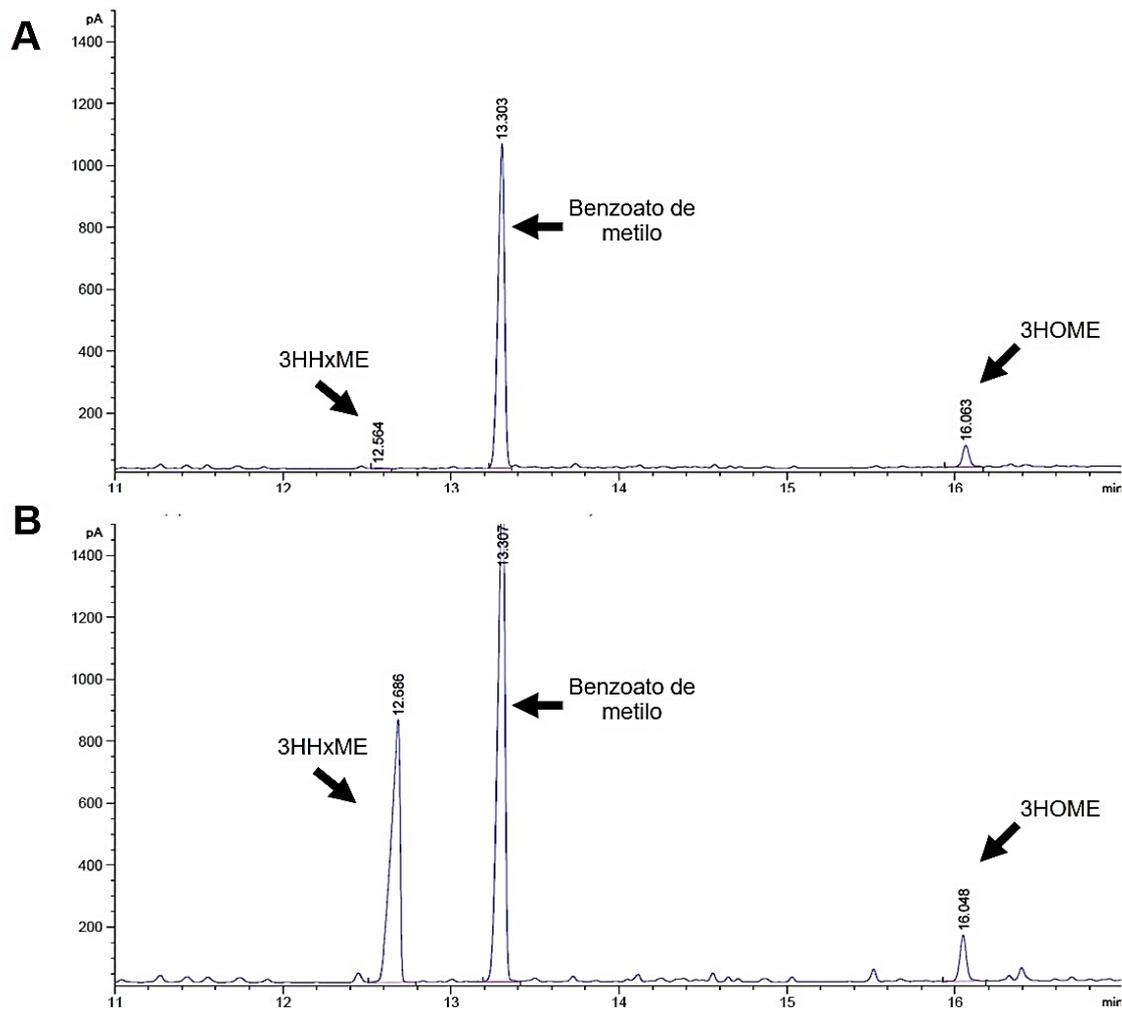


Figura 25. La cepa OPphaC produce mcl-PHA a partir de fuentes de carbono relacionadas. (A) Cromatograma de OPphaC en octanoato de sodio se observa un pico que corresponde a 3-hidroxiocetanoato y otro de menor área que corresponde a 3-hidroxihexanoato. (B) Cromatograma de OPphaC en decanoato de sodio; en el cual se observa un pico que corresponde a 3-hidroxiocetanoato y uno de mayor área que corresponde a 3-hidroxihexanoato. 3HOME: metil éster 3-hidroxiocetanoato; 3HHxME: metil éster 3-hidroxihexanoato; Benzoato de metilo como estándar interno.

6.2.4 *PhaJ* tiene afinidad a 2-enoil-CoA de C6 y C8.

Se sabe poco de la enzima *PhaJ* de *A. vinelandii*, por lo que se planteó identificar la especificidad del sustrato, 2-enoil-CoA, mediante la identificación de la composición monomérica del PHA sintetizado en la cepa OPphaC. En la cepa OPphaC, la enzima *PhaJ* es la encargada de proveer el sustrato a la PHA sintasa a partir de la ruta de β -oxidación para la síntesis de PHA. Como se mencionó anteriormente, se creció OPphaC en diferentes fuentes de carbono no relacionadas: octanoato de sodio y decanoato de sodio.

Se obtuvieron copolímeros con unidades monoméricas de 3HHx y de ácido 3-hidroxiocetanoico (3HO); en diferentes proporciones en las dos fuentes de carbono. En octanoato de sodio con sacarosa hubo mayor incorporación de monómeros de 3HO que de 3HHx, y a partir de decanoato de sodio con sacarosa hubo mayor incorporación de monómeros de 3HHx que de 3HO (Tabla 10). Se puede inferir que la enzima *PhaJ* de *A. vinelandii* puede catalizar la hidratación de enoil-CoAs de longitud de C6 y C8. La *PhaJ* de *A. vinelandii* tiene similitud del 69% con *PhaJ*_{1Pa}, una de las varias enzimas de *P. aeruginosa* (Figura 6C). *PhaJ*_{1Pa} tiene mayor especificidad hacia 2-hexanoil-CoA en comparación con el sustrato 2-octanoil-CoA, lo que permite la síntesis de monómeros de 3HHx (78%mol) y 3HO (7%mol) en un sistema heterólogo (Tsuge *et al.*, 1999); este resultado está correlacionado con la composición del copolímero PHHxHO que se obtiene a partir de octanoato y decanoato de sodio (Tabla 10). Sin embargo, la cepa OPphaC puede incorporar mayor porcentaje de monómeros de 3HO que un sistema heterólogo utilizando la *PhaJ* de *P. aeruginosa* (*PhaJ*_{1Pa}). Además, la fuente de carbono influye en la composición monomérica del copolímero PHHxHO en la cepa OPphaC.

Tabla 10. Acumulación de PHA por cepa OPphaC a partir de fuentes de carbono relacionadas. 3HO: 3-hidroxi octanoato; 3HHx: 3-hidroxi hexanoato.

| Fuente de carbono | Peso seco celular (g/L) | Contenido de PHA (wt%) | Composición de PHA (%mol) | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| | | | 3HHx (C6) | 3HO (C8) |
| BS-C8 | 0.7 | 11.2 | 8.7 | 91.3 |
| BS-C10 | 0.3 | 26.5 | 62.1 | 37.9 |

6.3 Construcción de la cepa OPpMCL para la expresión de 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa, 3-hidroxiacil-CoA ligasa y la PHA sintasa tipo II para la síntesis de mclPHAs a partir de carbohidratos

Finalmente, se construyó una cepa recombinante de *A. vinelandii* que contuviera los tres genes heterólogos estudiados hasta ahora (*phaG*, *PA3924* y *phaC1*) con la finalidad de sintetizar PHA de cadena media con monómeros de mayor longitud a partir de carbohidratos, ya que este organismo puede acumular hasta el 80% de su peso seco de PHB y de alto peso molecular (6.6 MDa) (Castillo *et al.*, 2017). Por lo tanto, se incorporaron los genes intermediarios entre la biosíntesis de ácidos grasos, el operón *scrGPA*, y la (Figura 15) y la PHA sintasa de tipo II (Figura 21). Para esto, se integró el plásmido *pk18phaC* en la cepa OPpAGMF y se seleccionaron candidatas con sacarosa 15%, el proceso se muestra en la figura 11.

En la figura 26 A, se muestra el plásmido *pk18phaC* digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Para saber si el plásmido *pk18phaC* está integrado en el cromosoma de la cepa OPpAGMF se realizó PCR de colonia con los oligonucleótidos *upBAC-F* y *downBAC-R*. En la figura 26B, se observan dos bandas, una de 5.2kb y otra de 2.9 kb, las cuales corresponden al operón biosintético *phbBAC* y a la construcción *phb-phaC*, respectivamente.

Se realizó una PCR para identificar candidatas que presentaron el segundo evento de recombinación (Figura 11.C) con los oligonucleótidos *upBAC-F* y *downBAC-R*. Se obtuvo solo una clona que tiene al genotipo esperado; es decir, la sustitución del operón *phbBAC* por la construcción *phb-phaC* (clona 3, Figura 26C) en la cepa OPpAGMF, a esta cepa se denominó OPpMCL.

Se analizó el fenotipo de la cepa OPpMCL en medio sólido de PY-sacarosa (2%). Se observó que es menos opaca que la cepa OP y no se observaron gránulos de PHA en el microscopio, lo que nos indica que no está produciendo mcl-PHA. No se realizó el análisis GC para esta cepa, por lo que no se puede descartar la producción de mcl-PHA en bajas cantidades, como en la cepa OPphaC (Tabla 10); sin embargo, está claro que existe algún problema con esta cepa, puesto que, de acuerdo con las modificaciones genéticas realizadas, debería producir PHAs a partir de sacarosa.

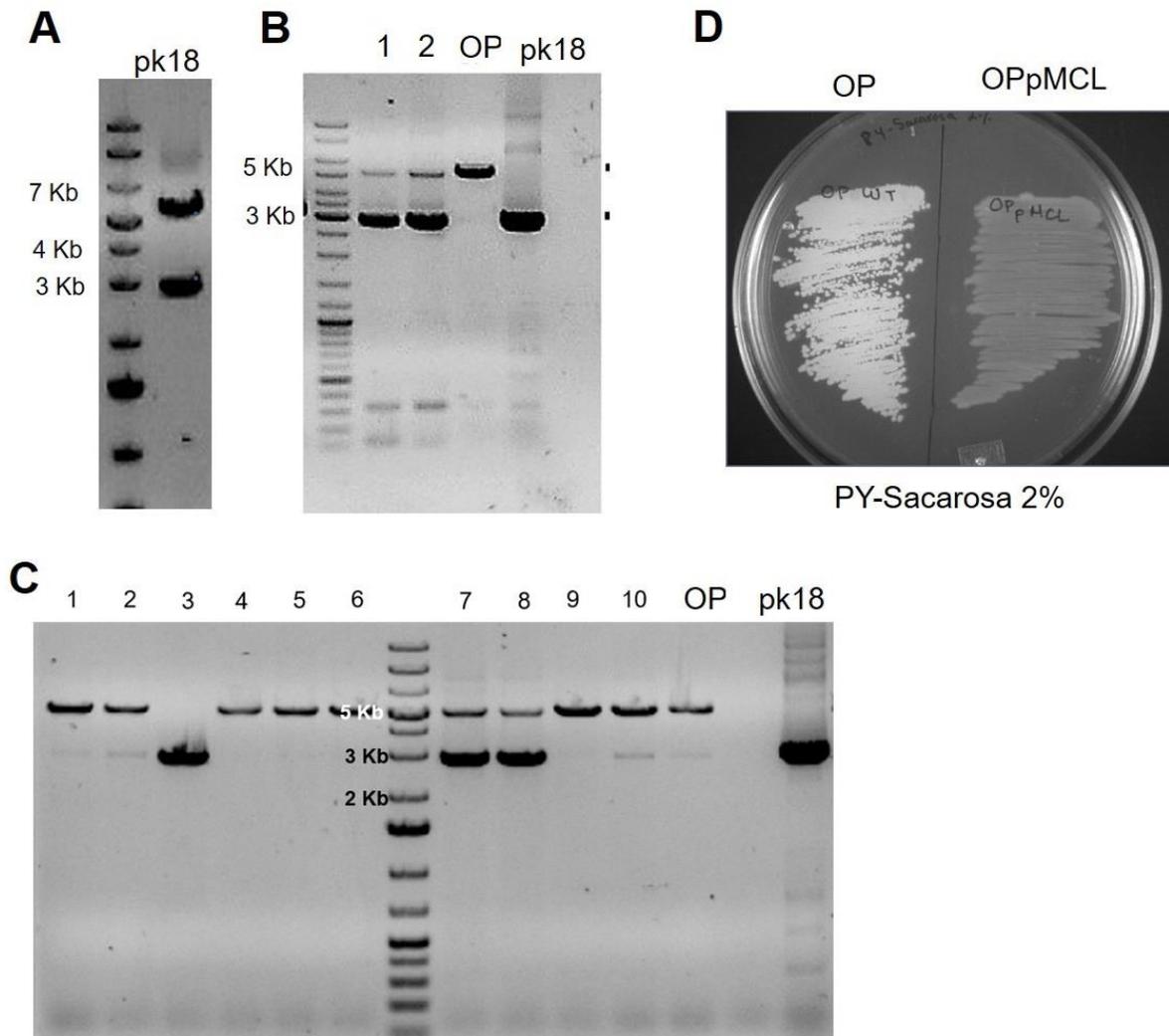


Figura 26. Construcción de la cepa OPpMCL. **(A)** Digestión del plásmido pk18phaC con *EcoRI* y *HindIII*. **(B)** Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los productos de PCR de dos candidatas con la integración del plásmido pk18phaC en la cepa OPpAGMF con los oligos upBAC-F y downsBAC-R. Se detectó una banda de 5.2 Kb que pertenece al tamaño del operón *phbBAC* (copia silvestre) y una banda de 2.9 kb que corresponde a la construcción *phb-phaC*, que incluye el gen *phaC1* con el promotor del *phbBAC*. **(C)** Electroforesis de los productos de PCR de diez candidatas de la cepa OPpMCL después de la selección con sacarosa al 15%. Se obtuvo una candidata (número 3) que sustituyó el operón *phbBAC* por el gen *phaC1*. **(D)** Fenotipo de la mutante OPpMCL y de *A. vinelandii* OP silvestre en medio

sólido de PY sacarosa al 2%. 1-10: representan una candidata; OP: cepa silvestre de *A. vinelandii* OP; y pk18: plásmido pk18phaC.

Aunque no se ha realizado la identificación de PHAs mediante GC en esta cepa y descartar la síntesis de PHA; cabe mencionar, que el diseño de rutas metabólicas o la expresión de un gen en microorganismos es un proceso complejo porque existe una gran variedad de elementos involucrados en el control de la expresión del gen ya sea a nivel transcripcional, traduccional o una modificación postraduccional. Además, el tipo de promotor, el sitio de unión a ribosoma, la eficiencia de la traducción, la elección del codón, la estructura del operón, el plegamiento de la proteína y/o interacciones de proteínas podrían ser factores importantes para optimizar la expresión de un gen (Goldstein & Doi, 1995; Anthony *et al.*, 2009).

7. CONCLUSIONES

- La inserción del operón *scrGPA* en *A. vinelandii* permite la incorporación de monómeros mcl-3HAs de seis carbonos (3HHx) provenientes de la ruta de síntesis de ácidos grasos *de novo*, a partir de una fuente carbono no relacionada como es la sacarosa.
- La PHB sintasa tiene especificidad por scl-3HA-CoA; sin embargo, puede polimerizar 3HHx-CoA.
- La cepa OPphaC que contiene una PHA sintasa clase II produce copolímeros de PHHxHO a partir de fuentes de carbono relacionadas como octanoato de sodio y decanoato de sodio.
- La enzima PhaJ de *A. vinelandii* tiene afinidad por enoil-CoA de C6 y C8; por lo tanto, solo se pueden obtener copolímeros de PHHxHO.
- En la cepa OPpMCL no se observó producción de PHA.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis termomecánicos como punto de fusión, grado de cristalinidad, fuerza de tensión y alta elongación de rotura en los polihidroxicanoatos producidos por la cepa OPpAGMF para determinar su aplicación biotecnológica.
- Sustituir la PHB sintasa en *Azotobacter vinelandii* por la PHB sintasa de *Aeromonas caviae*, la cual polimeriza copolímeros de PHBHHx.
- Deletar el gen (o genes) *fadB* y/o *fadA* que codifican a 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y a una tiolasa, respectivamente, en la cepa OPphaC para incrementar el contenido de mcl-PHA a partir de ácidos grasos.
- Sustituir la enzima PhaJ en la cepa *Azotobacter vinelandii* OPphaC por la PhaJ₄ de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima puede catalizar la hidratación de mcl-enoil-CoAs de longitud de C6 y C12 y permite proveer monómeros de mcl-3HA-CoA para la síntesis de mcl-PHAs.
- El uso de fuentes de carbono alternativas como la melaza de remolacha más un ácido graso para la producción de mcl-PHAs en la cepa OPphaC.
- Análisis de los extractos de la cepa OPpMCL mediante cromatografía de gases para descartar o afirmar su producción de PHAs a partir de sacarosa.

9. REFERENCIAS

- Adaya, L., Millán, M., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., Guzmán, J., Pfeiffer, D. & Segura, D. 2018. Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 2693-2707. doi:0.1007/s00253-018-8806-y
- Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y. & Tsuge, T. (2006). Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polym Degrad Stab.* 91: 1138-1146. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.07.006
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) and its copolymers: A review of recent advancements. *Intern J Biol Macromol*, 89, 161–174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Anthony, J.R., Anthony, L.C., Nowroozi, F., Kwon, G., Newman, J.D. & Keasling, J.D. (2009). Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpho-4,11-diene. *Metab Eng.* 11(1): 13-9. doi: 10.1016/j.ymben.2008.07.007
- Asrar, J., Valentin, H.E., Berger, P.A., Tran, M., Padgett, S.R. & Garbow, J.R. (2002). Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers. *Biomacromolecules.* 3: 1006-1012.
- Bagdadi, A. V., Safari, M., Dubey, P., Basnett, P., Sofokleous, P., Humphrey, E., ... & Roy, I. (2018). Poly(3-hydroxyoctanoate), a promising new material for cardiac tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 12(1), e495–e512. doi:10.1002/term.2318
- Bhubalan, K., Kam, Y.C., Yong, K.H. & Sudesh, K. (2010). Cloning and expression of the PHA synthase gene from a locally isolated *Chromobacterium* sp. USM2. *Malays J Microbio.* 6(1): 81-90. doi: 10.21161/mjm.21809
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. & Fuller, C.R. (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 41: 77-93. doi: 10.1007/BFb0010232
- Brandl, H. & Püchner, P. (1992). Biodegradation of plastic bottles made from 'Biopol' in an aquatic ecosystem under *in situ* conditions. *Biodegradation.* 2:237-243. doi: 10.1007/BF00114555
- Brigham, C.J., Zhila, N., Shishatskaya, E., Volova, T.G. & Sinskey, A.J. (2012).

- Manipulation of *Ralstonia eutropha* carbon storage pathways to produce useful bio-based products. *Subcell Biochem.* 64:343-66. doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_17.
- Castillo, T., Flores, C., Segura, D., Espín, G., Sanguino, J., Cabrera, E., Barreto, J., Díaz-Barrera, A. & Peña, C. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures. *J Chem Technol Biotechnol.* 92: 1809–1816. doi: 10.1002/jctb.5182
- Chek, M.F., Kim, S.Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M.R., Sudesh, K. & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports.* 7:1-10. doi: 10.1038/s41598-017-05509-4
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev.*, 38(8), 2434-46. doi :10.1039/b812677c
- Chen, G. Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., & Ye, J. (2015). Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol.* 33(10), 565–574. doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- Chen, Y.Jr., Tsai, P.Ch., Hsu, Ch-H. & Lee, Ch-Y. (2014). Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. *Enzyme Microb Technol.* 56: 60-66. doi: 10.1016/j.enzmtec.2014.01.005
- Chen, G.Q. & Zhang, J. (2018). Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 46(1):1-18. doi: 10.1080/21691401.2017.1371185
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. & Soga, K. (1988). Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 28(4-5):330-334. doi: 10.1007/BF00268190
- Doi, Y., Kitamura, S. & Abe, H. (1995). Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules.* 28(14): 4822-4828. doi: 10.1021/ma00118a007
- Doroski D.M., Brink K.S., Temenoff J.S., 2007. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials.* 28: 187-202. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.040
- García, A. (2013). Producción de poli-β-hidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. UNAM.
- García, A., Pérez, D., Castro, M., Urtuvia, V., Castillo, T., Díaz-Barrera, A., Espín, G. & Peña, C. (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) of

- ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. doi:10.1002/jctb.5959
- Geyer, R., Jambeck, J.R. & Law, K.L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Adv.* 3(7): e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782
- Goldstein, M.A. & Doi, R.H. (1995). Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev.* 1:105-28. doi: 10.1016/S1387-2656(08)70049-8.
- Gómez, P. (2015). Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia, *UNAM*.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8
- Heinrich, D., Raberg, M., Fricke, P., Kenny, S.T., Morales-Gamez, L., Babu, R.P., O'Connor, K.E., Steinbüchel, A. 2016. Synthesis gas (syngas)-derived medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthesis in engineered *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol.* 82(20): 6132-6140. doi:10.1128/AEM.01744-16.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L.F., Espín, G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* 159: 1953-1963. doi: 10.1099/mic.0.059329-0
- Hisano, T., Tsuge, T., Fukui, T., Iwata, T., Miki, K. & Doi, Y. (2003). Crystal Structure of the (R)-Specific Enoyl-CoA Hydratase from *Aeromonas caviae* Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis. *J Biol Chem.* 278(1): 617-624. doi: 10.1074/jbc.M205484200
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A., & Rehm, B. H. A. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* *phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol Lett.* 184(2), 253–259. doi:10.1016/S0378-1097(00)00047-1
- Hokamura, A., Wakida, I., Miyahara, Y., Tsuge, T., Shiratsuchi, H., Tanaka, K., & Matsusaki, H. (2015). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 120(3), 305–310. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.022
- Insomphun, C., Chuah, J.A., Kobayashi, S., Fujiki, T. & Numata, K. (2016). Influence of hydroxyl groups on the cell viability of polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds for tissue engineering. *ACS Biomaterials.* 3:3064-3075. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00279
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, Ch., Siegler, R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. & Law, K.L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science.* 347(6223): 768-771. doi: 10.1126/science.1260352

- Ji, Y., Li, X.T. & Chen, G.Q. (2008). Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes. *Biomaterials*. 29: 3807-3814. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.008
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V. & Radecka I. (2016). Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1-21. doi:10.3390/ijms17071157
- Johnson, D. C., Unciuleac, M. C., & Dean, D. R. (2006). Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*. 188(21), 7551–7561. doi:10.1128/JB.00596-06
- Juengert, J.R., Bresan, S. & Jendrossek, D. (2018). Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using Gas Chromatography and Nile Red staining. *Bio-protocol*. 8(5): 1-15. doi: 10.21769/BioProtoc.2748
- Kawashima, Y., Cheng, W., Mifune, J., Orita, I., Nakamura, S. & Fukui, T. (2011). Characterization and functional analyses of R-specific enoyl coenzima A hydratases in polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* *Appl Environ Microbiol*. 78(2), 493-502. doi: 10.1128/AEM.06937-11.
- Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B. & Eggink, G. (2001). Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. En: Babel W., Steinbüchel A. (eds) Biopolyesters. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 71: 159- 182. doi: 10.1007/3-540-40021-4_5
- Langenbach, S., Rehm, B.H.A, Steinbüchel. 1997. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 150:303-309. doi: 10.1111/j.1574-6968. 1997.tb10385.x
- Liang, Y.S., Zhao, W. & Chen, G.Q. 2008. Study on the biocompatibility of novel terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Biomed Mater Res A*. 87(2):441-9. doi: 10.1002/jbm.a.31801
- López-Aragón, F.S. (2018). Estudio de la expresión de una polihidroxicanoato sintasa heteróloga en *Azotobacter vinelandii* para la producción de nuevos plásticos biodegradables. Universidad Politécnica de Quintana Roo.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(1), 21–53.
- Maier, U. & Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Bioch Eng J*. 7 :99-106. doi: 10.1016/S1369-703X(00)00107-8

- Manchak, J., & Page W.J. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology*. 140: 953-963. doi: 10.1099/00221287-140-4-953
- Mathuriya, A. S., & Yakhmi, J. V. (2017). *Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics and Their Applications. Handbook of Ecomaterials, 1–29*.doi:10.1007/978-3-319-48281-1_84-1
- Matsumoto, K., Nakae, S., Taguchi, N., Matsusaki, H., Seki, M. & Doi, Y. 2001. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) Copolymer from Sugars by Recombinant *Ralstonia eutropha* Harboring the *phaC1_{Ps}* and the *phaG_{Ps}* Genes of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*. 2: 934-939. doi:10.1021/bm0155367
- Matsusaki, H., Abe, H. & Doi, Y., 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*. 1: 17-22. doi: 10.1021/bm9900040
- Mezzolla, V., D'Urso, O.F. & Poltronieri, P. (2018). Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers*. 10(8): piiE910. doi: 10.3390/polym10080910.
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem Lett Rev*. 8(3–4), 56–77. doi :10.1080/17518253.2015.1109715
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*. 4(12), 799–808. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x
- Noda, I., Lindsey, S.B. & Caraway, D. (2010). Nodax™ Class PHA Copolymers: Their Properties and Applications. En: Chen GQ. (eds) *Plastics from Bacteria. Microbiology Monographs*, vol 14. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-03287-5_10
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008). Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} Are Involved in Regulation of the Poly-Hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 15:244-254. doi:10.1159/000108658
- Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afr. J. of Biotechnol*. 3 (1): 18-24.
- Page, W.J. (1992). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol Rev*. 103: 149-158.

- Page, W., Manchak, J., & Rudy, B. (1992). Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl Environ Microbiol*, 58(9), 2866–2873.
- Page, W.J. & Manchak, J. (1995). The role of β -oxidation of short-chain alkanates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. Microbiol.* 41: 106-114.
- Pelacic, V., Reyrat, J. M., Gicquel, B., Pelacic, V., & Reyrat, J. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on Mycobacteria. *J Bacteriol.* 178(4), 1197–1199.
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microb Biotechnol.*, 7(4), 278–293. doi :10.1111/1751-7915.12129
- Peña-Malacara, C.F., García-Romero, A., Millán-Ponce, M., & Marenco, T.C. (2015). *Microbial Factories-Biodiversity, Biopolymers, Bioactive Molecules: Approaches for the synthesis of tailor-made polyhydroxyalkanoates.* 2:11-28. doi:10.1007/978-81-322-2595-9_2
- Pettinari, M., Vázquez, G., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A. & Méndez, B. (2001). Applied and Environmental Microbiology. 67(11): 5331-5334. doi: 10.1128/AEM.67.11.5331–5334.2001
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phb* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol.* 184(20): 5672–5677. doi: 10.1128/JB.184.20.5672-5677.2002
- Preusting, H., Nijenhuis, A., & Wiltholt, B. (1990). Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules.* 23(19): 4220-4224. doi: 10.1021/ma00221a007
- Qi, Q., Rehm, B.H.A. & Steinbüchel, A. 1997. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol Lett.* 157(1): 155-162. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12767.x
- Qin, Y.M., Haapalainen, A.M., Kilpelainen, S.H., Marttila, M.S, Koski, M.K., Glumoff, T., Novikov, D.K. & Hiltunen, J.K. (2000). *J Biol Chem.* 275:4965.
- Qu, X.H., Wu, Q., Zhang, K.Y. & Chen, G.Q. (2006). In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and

- tissue reactions. *Biomaterials*. 27(19): 3540-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.015
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A.R. & Roy, I. 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater Sci Eng. 72*: 29-47. doi: 10.1016/j.mser.2010.11.002
- Rathbone, S., Furrer, P., Lübben, J., Zinn, M., Cartmell, S. 2009. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *J Biomed Mater Res A*. 1: 1391-1403. doi: 10.1002/jbm.a.32641
- Raza, Z.A., Abid, S. & Banat, I.M. 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int Biodeter Biodegr*. 126: 45-56. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- Rehm, B. H. A., Krüger, N. & Steinbüchel, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J. Biol Chem*. 279 (37): 24044-51.
- Rodríguez-Pérez, S., Serrano, A., Panti6n, A.A. & Alonso-Fari6nas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J Environ Manage*. 205: 215-230. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.09.083
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., & Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*, *Process Biochemistry*. 36(5): 445-450. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00235-1)
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69–73. doi:10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003a). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol*. 179: 437-443. doi:10.1007/s00203-003-0553-4
- Segura, D., Guzmán, J., & Espín, G. (2003b). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiol Biotechnol*. 63(2), 159–163. doi:10.1007/s00253-003-1397-1
- Simon, R., Priefer, U.B. & Puhler, A. (1983). A broad host range system *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnol*. 1 (9):784-791. doi:10.1038/nbt1183-784
- Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F. & Dawes, E.A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous

- culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.* 128:1193-1201. doi: 10.1042/bj1281193
- Senior, P.J. & Dawes, E.A. (1973). The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.* 134(1):225-238. doi: 10.1042/bj1340225
- Sharma, P.K., Munir, R.I., Blunt, W., Dartailh, C., Cheng, J., Charles, T., & Levin, D. (2017). Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA synthase (PhaC₁₆) Enzyme. *Appl. Sci.*, 7(3), 242. doi:10.3390/app7030242
- Steinbüchel, A. & Valentin H.W. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett.* 128(3): 219-228. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. doi:10.1038/35023079
- Taniguchi, I., Kagotani, K. & Kimura, Y. (2003). Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils. *Green Chem.* 5: 545-548. doi: 10.1039/B304800B.
- Tsuge T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A. & Doi, Y. (1999). Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 184: 193-198. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09013.x
- Tsuge, T., Taguchi, K., Seiichi, T. & Doi, Y. (2003): Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. *Int J Biol Macromol.* 31(4-5):195-205. doi:10.1016/S0141-8130(02)00082-X
- Wang, Y. & Chen, G.Q. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Sustainability, Production, and Industrialization. En C. Tang & C.Y. Ryu. (Ed), *Sustainable polymers from biomass*. (pp. 11-33). Nueva Jersey, EUA: Wiley Online Library.
- Wang, Q., Tappel, C., Zhu, Ch. & Nomura, C.T. 2012. Development of a New Strategy for Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Appl Environ Microbiol.* 519-527. doi:10.1128/AEM.07020-11
- Wang, P., Yu, Z., Li, B., Cai, X., Zeng, Z., Chen, X., & Wang, X. (2015). Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*. *Microbiol Cell Factories*, 14(1), 11. doi:10.1186/s12934-015-0194-8

- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M., Peoples, O. P. 1999. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 25:111-121. doi: 10.1016/S0141-8130(99)00022-7
- Yang, X., Zhao K. & Chen G.Q. (2002). Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials.* 23 (5): 1391-1397. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00260-5
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1)103-119. doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9
- Zakaria, E. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57(1): 145-154. doi: 10.1590/S1516-89132014000100020
- Zhao, K., Deng, Y. & Chen, G.Q. (2003). Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochem Eng J.* 16:115-123. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00029-9
- Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev.* 53, 5-21. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6
- Zhou, J., Peng, S.W., Wang, Y.Y., Zheng, S.B., Wang, Y. & Chen, G.Q. 2010: The use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tarsal repair in eyelid reconstruction in the rat. *Biomaterials.* 31:7512e7518. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.044

10. APÉNDICE

Apéndice 1. Cepas de bacterias, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Cepa, plásmidos y oligonucleótidos | Descripción o secuencia | Referencia |
|------------------------------------|--|-----------------------------|
| Bacterias | | |
| <i>A. vinelandii</i> OP (OP) | Nal ^r . Cepa silvestre. | Colección del laboratorio |
| <i>A. vinelandii</i> OPpAGMF | Nal ^r . Cepa OP que tiene los genes <i>phaG</i> y <i>PA3924</i> reemplazando al gen <i>scrX</i> | Construido en este trabajo |
| <i>A. vinelandii</i> OPphaC | Nal ^r . Cepa OP que tiene el gen <i>phaC1</i> reemplazando al operón <i>phbBAC</i> | Construido en este trabajo |
| <i>A. vinelandii</i> OPpMCL | Nal ^r . Cepa OP que tiene los genes <i>phaC1</i> , <i>phaG</i> y <i>PA3924</i> | Construido en este trabajo |
| <i>E. coli</i> TOP10 | Sm ^r . Cepa para clonación | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> DH5 α | Nal ^r . Cepa para conjugación y transformación | Hanahan, 1983 |
| <i>E. coli</i> S17-1 | Sp ^r , Cepa para conjugación | Simon <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 | Cepa silvestre | Stover <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | Cepa silvestre | Nelson <i>et al.</i> , 2002 |
| Plásmidos | | |
| pJET1.2/Blunt | Ap ^r , vector de clonación | Thermo Fisher Scientific |

| | | |
|-------------|---|-------------------------------------|
| pK18mobsacB | Kmr, vector de clonación | Schäfer, A. <i>et al.</i> , 1994 |
| pUC19 | Ap ^r , Tc ^r ; vector de clonación | Yanisch, <i>et al.</i> , 1984 |

Plásmidos utilizados en la construcción de la cepa OPphaC

| | | |
|-----------|--|------------------------------|
| pK18phaC | Km ^r , porta la construcción de 2.9 kb contenida en el plásmido P19phaC en los sitios de corte de <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> en el plásmido pK18mobsacB | Construido en este trabajo |
| P19phaC | Ap ^r , construcción de 2.9 kb, porta los fragmentos contenidos en los plásmidos: pJupBAC (<i>EcoRI/KpnI</i>), pJphaC (<i>KpnI/BamHI</i>) y pJdownBAC (<i>BamHI/HindIII</i>) en el plásmido pUC19. | Construido en este trabajo |
| P19up | Ap ^r , con el fragmento de 595 pb, portador del promotor del gen <i>phbB</i> en los sitios de corte de <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i> en el plásmido puc19 | Construido en el laboratorio |
| P19upphaC | Ap ^r , con el gen <i>phaC1</i> de 1.6kb en los sitios de corte de <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> en el plásmido P19up | Construido en el laboratorio |
| pJdownBAC | Ap ^r , con el fragmento de 614 pb de la región río abajo del gen de <i>phbC</i> en el plásmido pJET1.2/Blunt | Construido en el laboratorio |
| pJphaC | Ap ^r , con el fragmento de 1.6 kb del gen <i>phaC1</i> completo en el plásmido pJET1.2/Blunt | Construido en el laboratorio |
| pJupBAC | Ap ^r , con el fragmento de 595 pb de la región promotora del gen <i>phbB</i> en el plásmido pJET1.2/Blunt | Construido en el laboratorio |

Plásmidos utilizados en la construcción de la cepa OPpAGMF

| | | |
|---------------------------|---|----------------------------|
| pK18phaGPA | Km ^r , porta la construcción de 4kb contenida en el plásmido P19phaGPA en los sitios de corte de <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> en el plásmido pK18mobsacB | Construido en este trabajo |
| P19phaGPA | Ap ^r , construcción de 4 kb, porta los fragmentos contenidos en los plásmidos: pJupscrX (<i>EcoRI/KpnI</i>), pJphaG (<i>KpnI/BamHI</i>), pJPA3924 (<i>BamHI/BamHI</i>) y pJdownscrX (<i>BamHI/XbaI</i>) en el plásmido pUC19 | Construido en este trabajo |
| P19ups | Ap ^r , con el fragmento de 711 pb, portador del promotor del gen <i>scrX</i> en los sitios de corte de <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i> en el plásmido pUC19 | Construido en este trabajo |
| P19upG | Ap ^r , con el gen <i>phaG</i> con un tamaño de 900 pb en los sitios de restricción de <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> en el plásmido P19ups | Construido en este trabajo |
| P19upGPA | Ap ^r , con el gen <i>PA3924</i> con un tamaño de 1.7kb en el sitio de restricción de <i>BamHI</i> en el plásmido P19upG | Construido en este trabajo |
| pJdownscrX | Ap ^r , con el fragmento de 706 pb que porta 422 pb del gen <i>scrX</i> y 278 pb de la región intergénica en el plásmido pJET 1.2/Blunt | Construido en este trabajo |
| pJPA3924 | Ap ^r , con el gen <i>PA3924</i> con un tamaño de fragmento de 1.7 kb en el plásmido pJET 1.2/Blunt | Construido en este trabajo |
| pJphaG | Ap ^r , con el gen <i>phaG</i> con un tamaño de 900pb en el plásmido pJET 1.2/Blunt | Construido en este trabajo |
| pJupscrX | Ap ^r , con el fragmento de 711 pb, portador del promotor del gen <i>scrX</i> en el plásmido pJET 1.2/Blunt | Construido en este trabajo |
| Oligonucleótidos (5'->3') | | |

| | |
|--------------|--|
| downBAC-F | ACT <u>GGG ATC</u> CAT CAA TCT CAG ACC ATC GTG AAG TCT G |
| downBAC-R | ACT <u>GAA GCT TGC</u> AAA TTC CCT TTG ATC AGG TAG TG G |
| downscrX-F | ACT <u>GGG ATC CAG</u> TTG GCA TTA TAT GTG ACC ATT TAC A |
| downscrX-R | ACT <u>GTC TAG</u> ACT GGT CTT GAG CGC CG TCA CCT GCC GA |
| gyrAqPCR-F | CTC TAT GCC CAG ACC CAA CT |
| gyrAqPCR-R | AAC ACC TCG AGC ATG TCC TT |
| PA3924-F | GCC <u>GGA TCC</u> GCT CCC AGG TGT ACG CCC CAT GCT |
| PA3924-R | CGC <u>GGA TCC</u> GTG TAG GAA AGC CCC GTC AGA CGG |
| PA3924qPCR-F | CGC TAC GAC TTC CCC GAT TT |
| PA3924qPCR-R | TTG CCG GTG GCT GAA ATA CA |
| phaC-F | ACT <u>GGG TAC CAT</u> GAG TCA GAA GAA CAA TAA CGA GCT T |
| phaC-R | ACT <u>GGG ATC CTC</u> ATC GTT CAT GCA CGT AGG TTC CGG |
| phaCqPCR-F | TCT GAA CGA CCA CAT CAC CC |
| phaCqPCR-R | TCT GGA TGT GAC CGC TGT TG |
| phaG-F | CTG <u>GGT ACC</u> CCA GGA GTC GAT GAC ATG AGG C |
| phaG-R | CTG <u>GGA TCC</u> AGC CGC TCA GAT GGC AAA T |
| phaGqPCR-F | TAC GCA CAG ATG CAC TTC CA |
| phaGqPCR-R | TTG ATG AAC AGC ACC GGG AT |
| rpoS-F | AGG ATG TCC TGG ACG ATG AG |
| rpoS-R | TCC AGC GCC CTA GTG TAG TC |
| scrX-F | TTT CGC TCT GCT CCA GAA G |

| | |
|----------|--|
| scrX-R | AGA TCC ACC GGC AAC ATT C |
| upBAC-F | ACT <u>GGAATT</u> CTT AAG TAG ACT TTC AAT TTC CAA ACC C |
| upBAC-R | ACT <u>GGG TAC CAG</u> ATT TCC CTT CCT TTT TTG TCG GAG A |
| upscrX-F | ACT <u>GGAATT</u> CCC GAA CTG CGC CTG TTC GCC ACC TAT A |
| upscrX-R | ACT <u>TGG TAC CTG</u> CTC TCC CAG GCA GGA ACT CA |
