



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del papel de las proteínas Avin34710 y Avin34720 en el metabolismo de polihidroxibutirato (PHB) en la bacteria *Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**Jessica Ruiz Escobedo**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Daniel Genaro Segura González  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán  
Instituto de Biotecnología

Dr. Alejandro García de los Santos  
Centro de Ciencias Genómicas

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Daniel Genaro Segura González. El trabajo fue financiado por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto 255158) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de Innovación Tecnológica (PAPIIT - IT200415 e IG200219) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM. Así mismo, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a congresos nacionales donde se presentó este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde hace 14 años me ha brindado las herramientas necesarias para crecer intelectual y profesionalmente.

A CONACyT por el apoyo económico.

Al Dr. Daniel Genaro Segura González por la paciencia, el apoyo tanto económico como laboral, los consejos, el tiempo y la disposición que tuvo hacia mí. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

A las Dras. Guadalupe Espín y Cinthia Nuñez por los comentarios en el laboratorio y durante los seminarios de grupo que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi comité tutorial, integrado por los Drs. Víctor Humberto Bustamante Santillán y Alejandro García de los Santos, por sus excelentes comentarios y sugerencias que mejoraron en gran medida este proyecto.

Al comité revisor por tomarse el tiempo de leer y hacer comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Paul Gaytán Colín y demás miembros de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN por sintetizar los oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

Al Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán por amablemente proporcionarnos el plásmido pMPMT6 que fue de gran ayuda para los experimentos de este trabajo.

A la Biol. Soledad Moreno León por todos los consejos y ayuda brindada durante los experimentos realizados en este trabajo. Muchas gracias por siempre tener esa gran disponibilidad de enseñar y ayudar.

A la M. en C. Josefina Guzmán Aparicio por la asesoría, supervisión y ayuda brindada desde el comienzo de mis estudios de posgrado. Por proporcionarme los plásmidos pJG34710km y pMPMT6 / phbBAC, que fueron cruciales para la realización de este proyecto.

Al M. en C. Carlos Leonel Ahumada Manuel por ayudarme a construir la mutante OP-34710; además, por siempre estar disponible para enseñarme y ayudarme en cualquier duda que se me presentara.

Al Dr. Holjes Salgado Lugo por toda la ayuda brindada en la expresión y purificación de las proteínas. Gracias por compartir conmigo todos tus conocimientos sobre proteínas, fue indispensable para este proyecto.

A la Dra. Elva Yadira Quiroz Rocha por enseñarme a realizar geles de poliacrilamida, y por estar siempre dispuesta a resolverme dudas y a ayudarme.

A la M. en C. Arisbeth Guadalupe Almeida Juárez por enseñarme la técnica de purificación de proteínas en columna de níquel.

Al BQD César Alberto González Guzmán por el gran apoyo en la redacción de este escrito y por impulsarme cada día a crecer profesionalmente.

A las chicas Espín: Citlalli, Chanti, Thali, Gaby, Andreita, Karen y Marianita, por todas esas tardes de grandes pláticas y comidas en casa de Jose. Gracias por traerme mucha diversión en épocas de presión y siempre brindarme su apoyo. ¡Las quiero!

A los demás miembros del grupo Espín: Víctor, Leo, Fer, Doña Jose, Alan, Doña Sol, Cristian, Pablito y Ricardo, por hacer un ambiente agradable y amistoso en el laboratorio, y compartir conmigo tantas risas y momentos inolvidables. Fui muy afortunada de pertenecer al laboratorio 6.

A mis suegros por todo el apoyo que nos han dado, tanto económico como personal. Algún día espero devolverles aunque sea un poco de lo mucho que han hecho por nosotros. Los quiero.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres por brindarme su apoyo en todo momento, por sus grandes consejos y por darme su amor incondicional. Todo lo que soy es por ustedes, por sus enseñanzas y su crianza. Los amo.

A César, por impulsarme a crecer profesionalmente cada día, sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. Este logro también te pertenece. Gracias por todo el amor que me das. Mejor compañero de vida no pude encontrar. Te amo.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
2.1 GENERALIDADES DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i> .....	5
2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) .....	5
2.2.1 Polihidroxibutirato (PHB).....	6
2.2.1.1 Estados físicos del PHB.....	7
2.3 BIOSÍNTESIS DE PHB EN <i>A. VINELANDII</i> .....	8
2.3.1 Regulación de la biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	8
2.4 DEGRADACIÓN DE PHB.....	9
2.4.1 Clasificación y estructura de las PHA depolimerasas.....	10
2.4.2 PHA depolimerasas en algunos microorganismos productores de PHB.....	11
2.4.3 PHB depolimerasas en <i>A. vinelandii</i> .....	12
2.5 PHASINAS.....	13
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>15</b>
<b>7. MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
7.1 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	17
7.2 CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS .....	17
LAS CEPAS Y LOS PLÁSMIDOS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO SE ENLISTAN EN LA TABLA 1.....	17
LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO SE MUESTRAN EN LA TABLA 2.....	19
7.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	20
7.3.1 Extracción de ADN cromosomal de <i>A. vinelandii</i> .....	20
7.3.2 Extracción de ADN plasmídico.....	20
7.3.3 Preparación de células competentes.....	21
7.3.4 Transformación .....	21
7.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. ....	21
7.5 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PHB .....	22
7.6 CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE OP-34710.....	22
7.7 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PHB DE LA CEPA SILVESTRE OP Y LA MUTANTE OP-34710.....	23
7.8 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS DE EXPRESIÓN BLPET, BL10E, BL20E, BL10-20E, ARPETY AR10E.....	23
7.9 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE LAS CEPAS DE EXPRESIÓN BLPET, BL10E, BL20E, BL10-20E, ARPETY Y AR10E.....	24
7.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE, SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROFORESIS) .....	25
7.11 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE NÍQUEL.....	26
7.12 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE POR CURVA DE LISOZIMA .....	26
7.13 RENATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR DIÁLISIS .....	26
7.14 PURIFICACIÓN DE GRÁNULOS NATIVOS DE PHB DE <i>E. COLI</i> .....	27
7.15 GENERACIÓN DE GRÁNULOS ARTIFICIALES.....	27
7.16 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE PHB <i>IN VITRO</i> .....	28
7.17 ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE PHB <i>IN VIVO</i> EN <i>E. COLI</i> .....	28
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
8.1 CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE OP-34710.....	31

8.2 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AVIN34710 Y AVIN34720 PARA LOS ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DE PHB <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	33
8.3 ENSAYO DE DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> CON LA PROTEÍNA AVIN34710.....	37
8.3 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS AVIN34710 Y AVIN34720 EN LA PRODUCCIÓN DE PHB <i>IN VIVO</i> EN <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) .....	39
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>42</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

El polihidroxiбутирато (PHB) es un poliéster natural sintetizado por *Azotobacter vinelandii* como reserva de carbono y energía. El PHB se acumula intracelularmente como gránulos de polímero cuando hay abundancia de la fuente de carbono, y se degrada cuando la fuente de carbono se agota. Esta degradación de PHB se lleva a cabo por las enzimas intracelulares llamadas PHB depolimerasas que están asociadas a los gránulos. Otras proteínas asociadas a los gránulos de PHB, llamadas phasinas, constituyen el componente proteico mayoritario de los gránulos, y aunque no tienen actividad catalítica, desempeñan otras funciones relacionadas con el metabolismo del polímero como modular la síntesis o degradación del PHB.

En el genoma de *A. vinelandii* se han identificado siete genes que podrían codificar para PHB depolimerasas. Entre ellos, el producto del gen *avin\_34710* tiene una identidad del 33 % con PHB depolimerasas ya caracterizadas en otros organismos. Adicionalmente, un análisis por espectrometría de masas de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB de *A. vinelandii*, reveló la presencia de una nueva proteína, Avin34720, que no tiene similitud con ninguna otra proteína conocida, y cuyo gen (*avin\_34720*) se encuentra a 30 pares de bases río abajo del gen de la posible PHB depolimerasa *avin\_34710*.

El objetivo del trabajo fue caracterizar estas dos proteínas, Avin34710 y Avin34720, y determinar si participan en la síntesis o degradación de PHB. Para la proteína Avin34710 se analizó su actividad de PHB depolimerasa *in vitro* e *in vivo*; mientras que para la proteína Avin34720, se estudió su papel en el metabolismo de PHB *in vivo*, ya que estudios previos muestran que algunas phasinas pueden actuar modulando la actividad de las PHB sintasas o las PHB depolimerasas. La caracterización bioquímica *in vivo* se realizó mediante la expresión heteróloga de *avin\_34710* y *avin\_34720* en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) recombinante capaz de producir PHB, y mediante la construcción y análisis de una mutante de *A. vinelandii* que carece del gen *avin\_34710*.

Al caracterizar la actividad de estas proteínas expresadas en *E. coli* BL21 (DE3), se observó que la proteína Avin34710 degradó el PHB producido, mientras que la proteína Avin34720 causó una mayor acumulación de PHB y no presentó un efecto evidente sobre su movilización. Adicionalmente, la proteína Avin34710 mostró actividad PHB depolimerasa *in vitro*, y la mutante correspondiente de *A. vinelandii* (OP-34710) produjo 72 % más PHB que la cepa silvestre a las 72 horas (en condiciones de exceso de fuente de carbono), lo que se reflejó en un fenotipo más blanquecino. En condiciones de limitación de fuente de carbono la producción de PHB de la cepa mutante OP-34710 fue 5.9 veces la de la cepa silvestre a las 60 y 72 horas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la proteína Avin34710 es una PHB depolimerasa que participa en la degradación de PHB en *A. vinelandii*, y sugieren que la proteína Avin34720 podría estar activando la síntesis de PHB.



## ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a natural polyester synthesized by *Azotobacter vinelandii* as a carbon and energy reserve. PHB accumulates intracellularly as polymer granules when there is abundance of the carbon source, and it is degraded when the carbon source is depleted. This degraded PHB is carried out by intracellular enzymes, called PHB depolymerases, which are bound to the PHB granules. Other proteins associated with the PHB granules called phasins, constitute the main protein component of the granules, although they have no catalytic role in the synthesis or degradation of PHB.

In the genome of *A. vinelandii* we have identified seven genes putatively coding for PHB depolymerases. Among them, the product of gene *avin\_34710* has 33% identity with PHB depolymerases already characterized from other organisms. In addition, an analysis of the proteins associated with the PHB granules of *A. vinelandii* by mass spectrometry revealed the presence of a new protein, which has no similarity with any other known protein, and whose gene (*avin\_34720*) is located immediately downstream (30 base pair) from the putative PHB depolymerase gene *avin\_34710*.

The objective of the work was to characterize these two proteins, Avin34710 and Avin34720, and to investigate if they participate in the synthesis or degradation of PHB. For the Avin34710 protein its PHB depolymerase activity *in vitro* and *in vivo*; while for Avin34720, its role in the metabolism of PHB *in vivo*, because previous studies reported that some phasins can act by modulating activity of PHB synthases or PHB depolymerases. Biochemical characterization *in vivo* was performed by heterologous expression of *avin\_34710* and *avin\_34720* in an *E. coli* BL21 (DE3) recombinant strain able to produce PHB and by the construction and analysis of an *A. vinelandii* mutant lacking the *avin\_34710* gene.

By characterizing the activity of these proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3), it was observed that Avin34710 protein degraded the produced PHB, while Avin34720 protein caused a higher accumulation of PHB and did not affect PHB mobilization. Additionally, the Avin34710 protein showed PHB depolymerizing activity *in vitro*, and the corresponding *A. vinelandii* mutant (OP-34710) produced 72% more PHB than the wild strain at 72 hours (under conditions of excess carbon source), which was reflected in a whitish phenotype. Under conditions of carbon source limitation, the PHB production of the mutant strain OP-34710 was 5.9 times higher than that of the wild strain at 60 and 72 hours. The results obtained in this work show that Avin34710 is a PHB depolymerase that participates in the degradation of PHB in *A. vinelandii* and suggest that Avin34720 could be activating the synthesis of PHB.

## 1. INTRODUCCIÓN

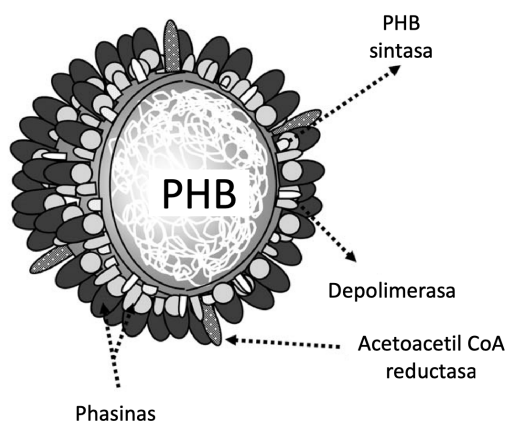
Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres naturales producidos por diversas bacterias que se pueden usar para fabricar plásticos biodegradables, sustituyendo así a los plásticos derivados del petróleo, lo que representa una alternativa contra la contaminación por estos productos (Chen, 2009; Khanna & Srivastava, 2005; Lee, 1996; Philip *et al.*, 2007; Zinn *et al.*, 2001). Los PHAs difieren de los polímeros producidos quimiosintéticamente, como el polietileno o el polipropileno, porque se sintetizan a partir de recursos renovables y por su fácil biodegradabilidad, produciendo agua y dióxido de carbono (Brandi *et al.*, 1995; Jendrossek & Handrick, 2002; Khanna & Srivastava, 2005; Lee, 1996; Mergaert *et al.*, 1992; Philip *et al.*, 2007). Además, los PHAs tienen amplias aplicaciones potenciales debido a propiedades tales como su excelente procesabilidad, hidrofobicidad, biocompatibilidad, resorbabilidad, piezoelectricidad y diversas propiedades mecánicas (Anis *et al.*, 2018), que hacen de los PHAs una excelente alternativa en la industria de los plásticos.

Los PHAs están conformados por unidades monoméricas de hidroxiacilos unidos en forma lineal por enlaces tipo éster. Se han identificado aproximadamente 150 unidades de hidroxiacilos (HA) diferentes como constituyentes de estos poliésteres microbianos (Lee, 1996; Sagong *et al.*, 2018; Steinbüchel & Valentin, 1995; Steinbüchel, 1991). El PHA más común es el poli(3-hidroxi butirato) (PHB), que junto con el copolímero poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato (P3HB-co-3HV) fueron los primeros PHAs producidos industrialmente en una escala de unos cientos de toneladas por año (Gebauer & Jendrossek, 2006).

El PHB y otros PHAs son sintetizados por numerosas especies de bacterias y arqueas como una reserva intracelular de energía y carbono. La síntesis de estos polímeros se favorece cuando existe un exceso de fuente de carbono y un déficit de nutrientes como el nitrógeno, oxígeno, fósforo, entre otros (Kessler & Witholt, 2001). Algunas bacterias sobreproductoras de PHB son: *Cupriavidus necator* (antes *Ralstonia eutropha*), *Azotobacter vinelandii*, diversas especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y también cepas recombinantes de *Escherichia coli* que portan los genes biosintéticos de PHB de *C. necator* y *A. vinelandii* (Centeno-Leija *et al.*, 2014; Tyo *et al.*, 2010; van Wegen *et al.*, 2001; Wang & Lee, 1997). Estas bacterias almacenan intracelularmente el PHB en forma de gránulos (carbonosomas), y pueden representar hasta el 80 % del peso celular seco (González *et al.*, 2013).

Los gránulos de PHB están rodeados por proteínas involucradas ya sea en la síntesis (acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintasa), o la degradación (movilización) de PHB (PHB depolimerasas) (Adaya *et al.*, 2018; Sudesh *et al.*, 2000). Existen otras proteínas asociadas a gránulos de PHB llamadas phasinas (gen *phbP*), que aparentemente no presentan actividad catalítica, pero que constituyen el componente proteico mayoritario de los gránulos (Figura 1). Algunas phasinas tienen como función actuar como barrera entre el polímero y el citoplasma

(Steinbüchel *et al.*, 1995), determinar la relación superficie/volumen de los gránulos en la célula, prevenir el aglutinamiento de los gránulos (Galán *et al.*, 2011), así como determinar la localización subcelular y distribuir homogéneamente los gránulos entre las células hijas durante la división celular (Pfeiffer *et al.*, 2011). También se ha demostrado que las phasinas pueden actuar sobre el metabolismo de PHB, ya sea como activadores o inhibidores de la PHB sintasa o PHB depolimerasa (Almeida *et al.*, 2007; Handrick *et al.*, 2004; Kuchta *et al.*, 2007; Pfeiffer & Jendrosseck, 2014; Qi *et al.*, 2000; Wieczorek *et al.*, 1995). En algunas especies, los genes que codifican a las phasinas se han encontrado en el mismo locus de los genes relacionados con el metabolismo de PHB (Liebergesell *et al.*, 1992; Valentin *et al.*, 1998), incluyendo a *A. vinelandii* (Peralta-Gil *et al.*, 2002).



*Figura 1. Componentes del gránulo de PHB. El PHB amorfo se encuentra dentro de un gránulo de PHB que está envuelto en una cubierta de proteínas involucradas en el metabolismo del polímero (PHB sintasa, acetoacetil CoA reductasa, depolimerasas, etc.) y proteínas estructurales (phasinas) (modificado de Galán *et al.*, 2011).*

*A. vinelandii* es una excelente productora nativa de PHB que vive en suelos y en aguas continentales. En esta bacteria se ha estudiado ampliamente, tanto la bioquímica, como la genética de su biosíntesis (Castañeda *et al.*, 2000; Hernández-Eligio *et al.*, 2011, 2012; Manzo *et al.*, 2011; Noguez *et al.*, 2008; Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura & Espín, 2004; Segura & Espín, 1998). El mecanismo de degradación intracelular de PHB en *A. vinelandii* se conoce a nivel bioquímico, pero ha sido poco estudiado a nivel genético.

En el presente trabajo se caracterizó la PHB depolimerasa hipotética Avin34710 y la phasina Avin34720, y se analizó el papel de cada una en el metabolismo del PHB en *A. vinelandii*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* del subgrupo de las  $\gamma$ -proteobacterias. Vive en suelos y en aguas continentales. Sus células son generalmente ovoides, de entre 1.5 y 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, variando su morfología desde bacilos hasta cocos, dependiendo de su estado fisiológico y las condiciones de crecimiento. *A. vinelandii* posee un metabolismo aeróbico obligatorio, es diazótrofa (capaz de fijar el nitrógeno atmosférico), produce sideróforos en condiciones limitadas de hierro y es competente natural. Se ha reportado que es poliploide y puede tener hasta 80 copias de su cromosoma dependiendo del medio, las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento (Chowdhury-Paul *et al.*, 2018; Espín, 2001; Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

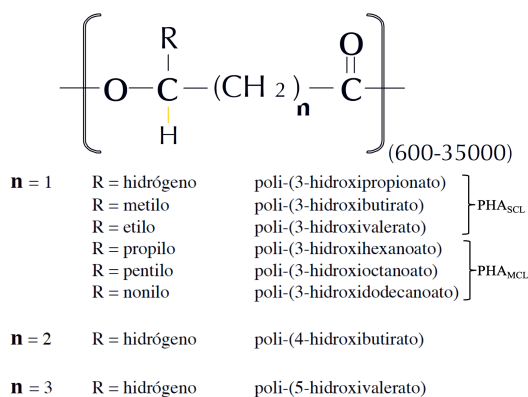
Durante muchos años *A. vinelandii* ha sido objeto de estudio debido a que tiene diversas características interesantes: a) fija nitrógeno en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasas (Chisnell *et al.*, 1988; Hales *et al.*, 1986; Joerger *et al.*, 1989; Luque & Pau, 1991; Pau *et al.*, 1989; Premakumar *et al.*, 1984), b) posee mecanismos de protección de la nitrogenasa (Bertsova *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1973; Noar & Bruno-Bárcena, 2018; Poole & Hill, 1997), c) tiene una capacidad respiratoria muy alta en condiciones diazotróficas (Bertsova *et al.*, 2001; Noar & Bruno-Bárcena, 2018), d) lleva a cabo un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación (Chowdhury-Paul *et al.*, 2018) y e) produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato (PHB) (Beale & Foster, 1996; Espín, 2001; Fialho *et al.*, 1990; Forsyth *et al.*, 1958; Lewis, 1937).

*A. vinelandii* puede acumular hasta un 90 % de PHB de su peso celular seco con un muy elevado peso molecular (4800 kDa) (Millán *et al.*, 2016). Sin embargo, tanto la producción de PHB como el peso molecular de éste, pueden verse afectados por la composición del medio de cultivo, las condiciones de aireación, la cepa utilizada, la fase de crecimiento del cultivo e incluso el contenido de PHB del inóculo (Adaya *et al.*, 2018; García *et al.*, 2014; Millán *et al.*, 2016, 2017; Peña *et al.*, 2014).

### 2.2 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Los PHAs se clasifican en dos grupos, considerando el tamaño de los monómeros hidroxiacilos que contienen (número de átomos de carbono presentes en los monómeros que los componen; Figura 2). Los PHAs de cadena corta (PHA<sub>SCL</sub>), tienen monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, mientras que los PHAs de cadena media (PHA<sub>MCL</sub>) tienen hidroxiacilos de 6 o más átomos de carbono (Doi & Steinbüchel, 2002). En muchas bacterias, los PHAs están compuestos por más de un tipo de monómero (copolímeros) (Sudesh *et al.*, 2000), y generalmente estos

monómeros son de cadena corta o de cadena media solamente; es poco habitual observar copolímeros que contengan una combinación de los dos tipos de monómeros. Además, los PHAs pueden variar en el tamaño o longitud de las cadenas poliméricas (número de monómeros o peso molecular). Estas combinaciones en la composición monomérica y el número de monómeros de los PHAs resultan en una enorme gama de poliésteres con propiedades físicas y químicas diferentes y únicas (Jendrossek & Handrick, 2002; Madison & Huisman, 1999; Witholt & Kessler, 1999; Zinn *et al.*, 2001).

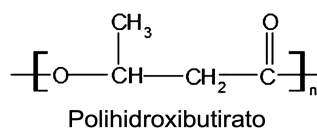


**Figura 2. Estructura general de los PHAs.** Los PHAs son poliésteres de hidroxiácidos (HAs) que se nombran según la longitud (n) y posición de la cadena lateral (R) de sus monómeros. Algunos PHAs pueden llegar a tener de 600 a 35000 monómeros (modificado de Lee, 1996).

A pesar de la gran posibilidad de combinaciones diferentes de PHAs, solo el PHB y los copolímeros P3HB-co-3HV y poli-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato (P3HB-co-3HHx) han sido comercializados (Chanprateep, 2010; Chen *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Polihidroxiacetato (PHB)

El PHB es el homopolímero más común de la familia de los PHAs. Está formado por monómeros de 3-hidroxiacetato (Figura 3) en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino. El peso molecular del PHB puede variar de 200 hasta 20000 kDa (Peña *et al.*, 2014).



**Figura 3. Monómero de polihidroxiacetato (PHB).** Los monómeros de PHB cuentan con cuatro carbonos en su estructura. En el tercer carbono se localiza una cadena lateral de un metilo. Los monómeros se unen por un enlace éster. Las propiedades fisicoquímicas del PHB dependen del número de monómero que componga la cadena (modificado de Peña *et al.*, 2014).

Además de ser una alternativa a los plásticos derivados del petróleo, el PHB – por ser biocompatible– tiene diversas aplicaciones en el área biomédica, entre las que destacan: material para suturas y soporte de tejidos, válvulas cardíacas, andamios óseos, andamios para miotubos esqueléticos y de tejido nervioso, nano y

micro perlas para la administración controlada de fármacos y en la liberación blanco-específico de medicamentos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la tuberculosis (Chen & Wu, 2005; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

### 2.2.1.1 Estados físicos del PHB

El PHB tiene dos conformaciones estructurales que dependen de su localización intra o extracelular, y son un reflejo del grado de ordenamiento de sus moléculas (Figura 4):

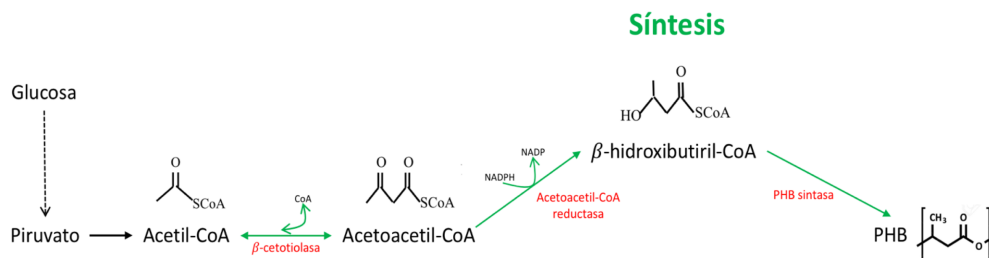
- a) **Amorfo (nPHB).** El PHB intracelular (que está en los gránulos nativos de PHB) se encuentra en estado amorfo y sus moléculas son móviles, con una configuración desordenada (Amor *et al.*, 2002; de Koning & Lemstra, 1992). Los gránulos nativos de PHB están rodeados por una capa de proteínas que están relacionadas a la síntesis o degradación del PHB (Adaya *et al.*, 2018; Sudesh *et al.*, 2000). Es posible generar gránulos artificiales de PHB de configuración amorfa en el laboratorio. Esta conformación amorfa se obtiene disolviendo el PHB cristalino en un solvente (cloroformo) y emulsificando con una solución surfactante, como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Horowitz & Sanders, 1994).
- b) **Cristalino (dPHB).** El PHB que es liberado al ambiente tras la lisis celular de organismos productores, adquiere una conformación cristalina al secarse y adopta una estructura helicoidal ordenada (de Koning & Lemstra, 1992). Este polímero extracelular está caracterizado por una cristalización polimórfica, es decir, que es capaz de cristalizar en dos formas,  $\alpha$  y  $\beta$  (Pan & Inoue, 2009).



*Figura 4. Estados físicos de los PHAs. En la parte de arriba de la figura se muestra a R. eutropha, que es una bacteria que acumula PHB. A la izquierda se observa el esquema de un gránulo nativo de PHB que está rodeado por proteínas que constituyen la capa superficial. En el centro se esquematiza el PHB aislado parcialmente cristalino. A la derecha se muestra el esquema de un gránulo artificial de PHB con moléculas tensoactivas en la superficie (modificado de Jendrosseck & Handrick, 2002).*

## 2.3 Biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*

La ruta de síntesis del PHB en *A. vinelandii* se conoce bien (Figura 5), tanto bioquímica como genéticamente. La síntesis del PHB comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por una  $\beta$ -cetotiolasa (*phbA*), dando acetoacetil-CoA, que luego es reducido por la acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*) que utiliza NADPH para dar  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, y por último, el intermediario es incorporado al polímero por la acción de la PHB sintasa (*phbC*) (Manchak & Page, 1994).



**Figura 5. Biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.** Se observa la síntesis a partir de carbohidratos. Los genes de la biosíntesis de PHB se localizan en el operón *phbBAC*: *phbA*,  $\beta$ -cetotiolasa; *phbB*, acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH; *phbC*, PHB sintasa.

### 2.3.1 Regulación de la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*

Los genes que codifican para las tres enzimas que participan en la síntesis de PHB (*phbA*, *phbB* y *phbC*) ya se encuentran caracterizados, así como los reguladores que controlan su expresión. Algunos de los reguladores que participan en el control de la síntesis de PHB en *A. vinelandii* son (Figura 6):

1. PhbR: activador transcripcional del operón biosintético *phbBAC*, perteneciente a la familia AraC (Hernández-Eligio *et al.*, 2011; Peralta-Gil *et al.*, 2002).
2. Sistema de fosfotransferasa de azúcares relacionado a nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>): sistema de regulación global que controla la expresión del gen regulador *phbR* y el operón *phbBAC* (Noguez *et al.*, 2008; Segura & Espín, 1998), el mecanismo exacto aún se desconoce.
3. RsmA/RsmZ<sub>1-7</sub>: sistema de regulación postranscripcional, donde RsmA reprime la traducción del RNA mensajero de *phbR* y *phbBAC*, al unirse a un sitio cercano al sitio de unión a ribosoma. El sistema está conformado también por los RNA pequeños RsmZ<sub>1-7</sub>, que titulan a RsmA, impidiendo su efecto negativo en la traducción de los genes blanco (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).
4. GacS/GacA: sistema de regulación de dos componentes que activa la transcripción de los RNAs RsmZ<sub>1-7</sub>, por lo que es un regulador con un efecto positivo en la síntesis de PHB (Castañeda *et al.*, 2000; Manzo *et al.*, 2011).
5. RNAs ArrF: regulador postranscripcional positivo de la expresión de *phbR* en respuesta a la concentración de hierro (Muriel-Millán *et al.*, 2014).

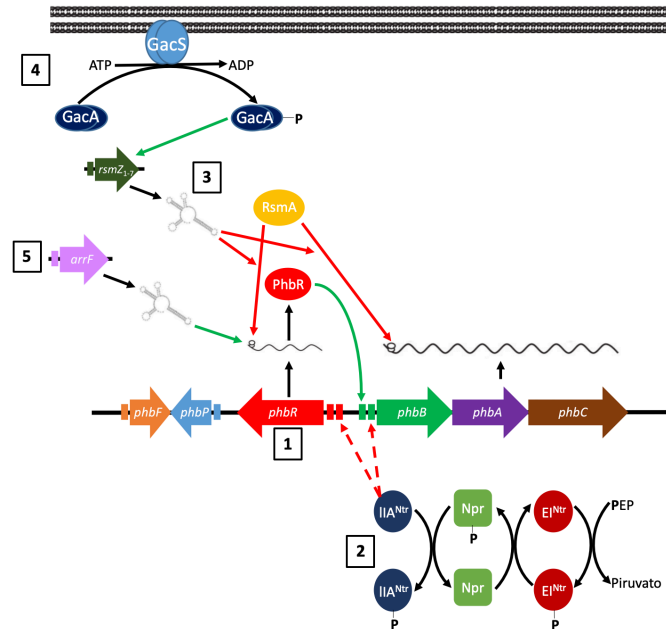


Figura 6. Modelo de la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*. 1) *phbR*. 2) Sistema de fosfotransferasa de azúcares relacionado a nitrógeno (PTS/Ntr). 3) *RsmA/RsmZ*. 4) *GacS/GacA*. 5) RNAs *ArrF*. La regulación positiva se indica con flechas verdes y la negativa con flechas rojas. Las flechas rojas punteadas indican que el mecanismo aún es desconocido.

## 2.4 Degradación de PHB

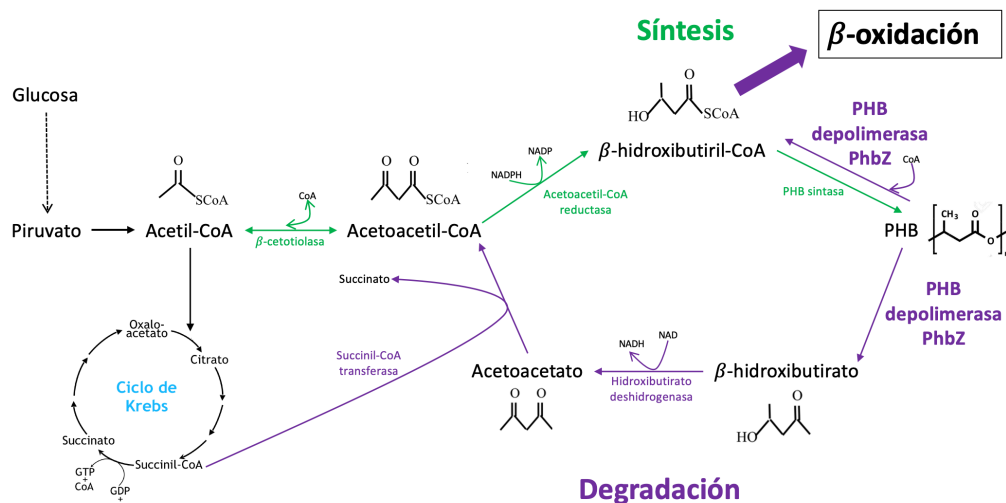
Existen dos tipos de degradación de PHB: extracelular e intracelular.

La degradación extracelular consiste en la depolimerización del PHB exógeno realizada por organismos no necesariamente productores. Este tipo de degradación se lleva a cabo mediante la acción de enzimas llamadas PHB depolimerasas extracelulares (e-PHB depolimerasas). La fuente de PHB exógeno son los gránulos de polímero liberados al medio extracelular durante la lisis de bacterias productoras de PHB, el cual tiene una conformación cristalina, por lo que las e-PHB depolimerasas son activas sobre esta conformación de PHB (González *et al.*, 2013). Se han descrito y caracterizado diversas e-PHB depolimerasas capaces de degradar a los plásticos fabricados a partir de PHB (Jendrosseck & Handrick, 2002; Mergaert *et al.*, 1992; Mergaert & Swings, 1996).

La degradación intracelular, también llamada movilización de PHB (Figura 7), consiste en utilizar las reservas de PHB endógeno que tienen almacenados los organismos productores, el cual tiene una conformación amorfa (González *et al.*, 2013). Esta reacción de degradación es llevada a cabo por las enzimas PHB depolimerasas intracelulares (i-PHB depolimerasas, gen *phbZ*) y tienen como producto al 3-hidroxi butirato o sus oligómeros (Merrick & Doudoroff, 1964). El 3-hidroxi butirato posteriormente es oxidado a acetoacetato por la 3-hidroxi butirato deshidrogenasa dependiente de NAD, lo que genera poder reductor para la síntesis de ATP en cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. El acetoacetato resultante es activado a acetoacetyl-CoA por la succinil-CoA transferasa y, por último, por la



acción de la  $\beta$ -cetotiolasa sobre el acetoacetyl-CoA se generan dos moléculas de acetyl-CoA usando CoA libre para esta tiólisis (Jendrossek & Handrick, 2002; Manchak & Page, 1994). Este acetyl-CoA puede ser utilizado para biosíntesis o puede oxidarse en el ciclo de Krebs para producir energía.



**Figura 7. Metabolismo de PHB.** La síntesis de PHB está representada con flechas verdes y la degradación con flechas moradas. La enzima  $\beta$ -cetotiolasa se comparte tanto para la síntesis como para la degradación de PHB. La degradación consta de cuatro pasos que comienza con la hidrólisis de la cadena de PHB por acción de la PHB depolimerasa (PhbZ) y culmina con la formación de acetyl-CoA, que puede dirigirse hacia ciclo de Krebs para producir energía. En presencia de CoA libre, la PhbZ puede romper el PHB por tiólisis para formar  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, que puede dirigirse hacia  $\beta$ -oxidación y posteriormente producir energía.

#### 2.4.1 Clasificación y estructura de las PHA depolimerasas

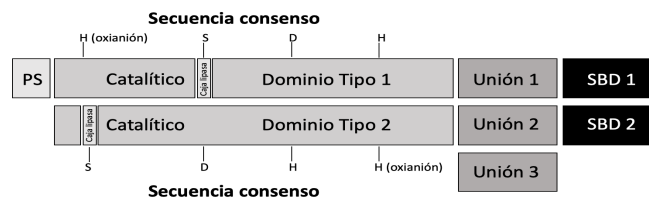
Dependiendo de su sustrato y su estado físico, las PHA depolimerasas se agrupan generalmente en cuatro familias: PHA depolimerasas que degradan los gránulos intracelulares nativos (i-PHA<sub>MCL</sub> depolimerasas y i-PHA<sub>SCL</sub> depolimerasas) y las PHA depolimerasas que degradan el polímero desnaturalizado extracelular (e-PHA<sub>MCL</sub> depolimerasas y e-PHA<sub>SCL</sub> depolimerasas) (Jendrossek & Handrick, 2002). Una excepción a esta clasificación es una e-PHA<sub>SCL</sub> depolimerasa de *Paucimonas lemoignei*, activa solo contra gránulos de PHA nativos (Handrick *et al.*, 2001). En *Rhodospirillum rubrum* existe una PHA depolimerasa periplasmática con función fisiológica desconocida hasta el momento (Handrick *et al.*, 2004).

Las e-PHA<sub>SCL</sub> depolimerasas cuentan con 4 regiones características (Jendrossek & Handrick, 2002) (Figura 8):

1. Péptido señal: secuencia de 22 a 58 aminoácidos necesaria para la secreción del polipéptido a través de la membrana citoplásmica.
2. Dominio catalítico en el N-terminal: tres aminoácidos conservados (serina, aspartato e histidina) que constituyen el centro activo del dominio catalítico. La serina es parte de un pentapéptido de la caja lipasa (Gly-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Xaa<sub>2</sub>-Gly), presente en casi todas las serinas hidrolasas conocidas, como las lipasas,

esterasas y serina proteasas (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger *et al.*, 1999). Hay una segunda histidina conservada en las e-PHB depolimerasas, la región alrededor de esta histidina se parece al aminoácido oxianión conocido de las lipasas (Jaeger *et al.*, 1994). Éste estabiliza el estado transitorio de la reacción de hidrólisis permitiendo la formación de un puente de hidrógeno.

3. Región enlace: este dominio vincula al dominio catalítico con el dominio C-terminal.
4. Dominio C-terminal SBD de unión a dPHA: secuencia de 40 a 60 aminoácidos que tiene la capacidad de unirse específicamente al dPHA.



*Figura 8. Dominios de las e-PHA depolimerasas. Dependiendo del microorganismo de origen, la depolimerasa consiste en un péptido señal (PS), uno de los dos posibles tipos de dominios catalíticos (tipo 1 y 2), uno de los tres posibles tipos de dominio de unión y uno o dos de los dos tipos de dominio SBD (SBD 1 y 2) (modificado de Jendrossek & Handrick, 2002).*

Al contrario de las e-PHB depolimerasas, las i-PHB depolimerasas han sido menos estudiadas, se conocen aspectos bioquímicos de algunas de ellas, y se sabe que se encuentran asociadas a los gránulos de PHB y que presentan en común algunas características: bajo peso molecular (<100 kDa), formadas por una sola cadena polipeptídica, pH óptimo de 7.5-9.8, entre otras (González *et al.*, 2013).

#### 2.4.2 PHA depolimerasas en algunos microorganismos productores de PHB

El primer reporte que se tuvo de un sistema intracelular de PHB depolimerasa es el de la bacteria *R. rubrum*, cuya actividad se estudió sobre gránulos nativos de PHB provenientes de *Bacillus megaterium*. Este sistema consiste en un activador termoestable (que en ciertas condiciones podía ser reemplazado por tripsina), una depolimerasa termolábil y una esterasa. El activador termoestable lisa los gránulos nativos de PHB liberándolo al citoplasma para que sean hidrolizados por la depolimerasa. Su principal producto fue el  $\beta$ -hidroxibutirato, sin embargo, también libera pequeñas cantidades de oligómeros, que posteriormente son hidrolizados por la esterasa (Merrick & Doudoroff, 1964).

Gracias a los análisis a nivel genético de diversos microorganismos, se ha descubierto que la mayoría de los degradadores de PHB contienen únicamente una PHB depolimerasa; sin embargo, se han encontrado bacterias que presentan varias. Un ejemplo se encuentra en *Paucimonas lemoignei* que presenta siete depolimerasas (Braaz *et al.*, 2002; Briese *et al.*, 1994; Handrick *et al.*, 2001; Jendrossek *et al.*, 1995; Jendrossek *et al.*, 1993; Schober *et al.*, 2000).

En *C. necator*, bacteria reconocida como modelo para el estudio de la síntesis y degradación de PHB, existen hasta nueve posibles depolimerasas u oligómero hidrolasas codificadas en el genoma. Estas enzimas se han agrupado en 4 categorías con base en su similitud de secuencia (*phaZa1* a *phaZa5*, *phaZb*, *phaZc* y *phaZd1* (*phaZ6*) / *phaZd2* (*phaZ7*); (Pohlmann *et al.*, 2006)). A lo largo de los años, se han realizado diversos trabajos para demostrar el rol de estas proteínas en el metabolismo de PHB. PhaZa1 es la depolimerasa mejor caracterizada y la principal encargada de la movilización del polímero. Se ha demostrado su actividad PHB depolimerasa tanto *in vitro* como *in vivo*, carece de caja lipasa y es la primera depolimerasa en la que se demostró la degradación tiolítica de PHB en presencia de CoA libre (Eggers & Steinbuchel, 2013; Handrick *et al.*, 2000; Saegusa *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2007, 2008). Se identificaron en *C. necator* dos genes candidatos a PHB depolimerasas (*phaZa2* y *phaZa3*) que tienen un 30 % de identidad con *phaZa1* (York *et al.*, 2003). De estas, solo PhaZa2 tiene actividad de PHA depolimerasa intracelular. El papel de PhaZ3 queda por establecerse. Se ha demostrado que PhaZ6 y PhaZ7 tienen una alta actividad PHB depolimerasa; sin embargo, no se ha podido demostrar que estén involucradas en la movilización de PHB *in vivo* (Sznajder & Jendrossek, 2014). No obstante, la inactivación de PhaZ6 permitió producir un PHB de peso molecular ultra alto (PHBHHx) —hasta el doble del peso producido por la cepa WT (Arikawa *et al.*, 2016).

#### 2.4.3 PHB depolimerasas en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* se han encontrado siete genes cuyos productos presentan homología con PHB depolimerasas caracterizadas de diversos microorganismos. Los genes *avin\_27080*, *avin\_44010*, *avin\_03910* (*phbZ1*) y *avin\_46290* presentan similitud con la depolimerasa PhaZa1 de *C. necator* (Saegusa *et al.*, 2001); mientras que *avin\_33500*, *avin\_34810* y *avin\_34710* presentan similitud con las depolimerasas de *Schlegelella* sp. (Romen *et al.*, 2004), *Comamonas testosteroni* (Shinomiya *et al.*, 1997) y *Penicillium funiculosum* (Hisano *et al.*, 2006), respectivamente. La cantidad de genes de depolimerasas hipotéticas, junto con la evidencia de la existencia de varias depolimerasas en organismos como *C. necator*, podría sugerir que en la degradación de PHB de *A. vinelandii* están involucradas varias enzimas.

En nuestro laboratorio ya se han estudiado varios genes de posibles PHB depolimerasas de *A. vinelandii*. En el caso de la PHB depolimerasa Avin03910, llamada PhbZ1 (Adaya *et al.*, 2018), se determinó que participa en el metabolismo de PHB. Los gránulos nativos purificados de la cepa mutante *phbZ1*<sup>-</sup> disminuyeron su actividad de autohidrólisis *in vitro*, en comparación con los gránulos nativos de la cepa silvestre. La expresión de PhbZ1 en *E. coli* BL21 (DE3) mostró actividad PHB depolimerasa *in vitro* sobre gránulos nativos y artificiales (PHB amorfo), pero no en PHB cristalino. Se examinó la degradación *in vitro* del nPHB en presencia de coenzima A libre (Adaya *et al.*, 2018), y se observó una degradación tiolítica del PHB en la cepa silvestre, y no en la mutante *phbZ1*<sup>-</sup>, siendo la segunda PHB

depolimerasa en la que se demostró degradación tiolítica del PHB en presencia de coenzima A.

La cepa de *A. vinelandii* OP cultivada en fermentadores para la producción de PHB presenta una disminución del peso molecular promedio del PHB en la fase estacionaria de crecimiento (después de 48 horas), con un aumento correspondiente en la fracción de polímeros de menor peso molecular; este fenómeno se correlacionó con un aumento en la actividad PHB depolimerasa durante el cultivo (Millán *et al.*, 2016). Adaya y colaboradores (2018) observaron que en una cepa mutante en el gen *phbZ1*, en cultivos de fermentador, no disminuye el peso molecular promedio del PHB, ni aparece polímero de bajo peso molecular pero existe un ligero aumento en la concentración de PHB; con lo que se demuestra la importancia de *phbZ1* en la degradación del PHB en condiciones de fermentador.

Otras posibles depolimerasas que han sido estudiadas en nuestro laboratorio son Avin27080 y Avin34810, de las cuales solamente Avin34810 está involucrada en el metabolismo del PHB –aunque la mutante presenta un fenotipo inesperado de menor acumulación del polímero (Yanajara, 2012). Recientemente, se caracterizó el gen *avin\_33500*, que tiene más del 40 % de identidad con la PHA depolimerasa periplásmica de *R. rubrum* (PhaZ1<sub>Rru</sub>). Avin33500 es capaz de degradar PHB amorfo y está involucrada en la movilización *in vivo* de PHB en *A. vinelandii* (Moyao, 2018).

## 2.5 Phasinas

El PHB se acumula como gránulos insolubles intracelulares, rodeados por una capa organizada de proteínas relacionadas con el metabolismo de PHB (Adaya *et al.*, 2018; Sudesh *et al.*, 2000). Entre las proteínas asociadas con los gránulos de PHB se encuentran las phasinas, que son pequeñas proteínas con un peso molecular entre 10 y 24 kDa, y están compuestas por un dominio hidrofóbico asociado a la superficie de los gránulos de PHB, y un dominio hidrofílico expuesto al citoplasma (Mezzina & Pettinari, 2016). Estos polipéptidos se adhieren con firmeza tanto a los gránulos nativos de PHB, como a los generados artificialmente o al PHB cristalino (Pötter & Steinbüchel, 2005).

La primera phasina fue identificada por Pieper-Fürst y Steinbüchel (1994) cuando encontraron una proteína de 14.2 kDa (GA14) asociada con los gránulos de PHA en *Rhodococcus ruber*. GA14 fue la proteína predominante presente en los gránulos, formando una capa en su superficie. Debido a estas propiedades, se propuso el nombre phasina (PhaP), denotando la similitud funcional con las proteínas asociadas a las vesículas lipídicas almacenadas en plantas (oleosinas) (Pieper-Fürst *et al.*, 1994).

Se han distinguido varias familias de phasinas basándose en su similitud de secuencia. La base de datos Pfam incluye cuatro familias de phasinas: PF09361, es la familia más grande a la cual pertenece la phasina más estudiada, PhaP1 de

*C. necator*, PF09602, en la que se encuentran las phasinas de varias especies de *Bacillus*; PF09650, incluye proteínas no caracterizadas que pertenecen a diversas *Proteobacteria*; y PF05597, contiene proteínas de diferentes *Proteobacteria* y todas las phasinas caracterizadas pertenecientes a *Pseudomonas* que acumulan PHA<sub>MCL</sub>, como PhaF y Phal de *P. putida* (Mezzina & Pettinari, 2016).

Las phasinas tienen como funciones principales: actuar como barrera entre el polímero y el citoplasma (Steinbüchel *et al.*, 1995), determinar la relación superficie/volumen de los gránulos en la célula, prevenir el aglutinamiento de los gránulos (Galán *et al.*, 2011), determinar la localización subcelular y distribuir los gránulos homogéneamente entre las células hijas durante la división celular (Pfeiffer *et al.*, 2011). Las phasinas también pueden participar indirectamente en el metabolismo de los PHAs, interactuando con otras proteínas que están directamente asociadas a la síntesis o degradación de los PHAs. Por ejemplo, en *C. necator*, la phasina PhaP1 afecta la degradación de PHB en este organismo, posiblemente por la modulación de PhaZ1 (Kuchta *et al.*, 2007), y aumenta la actividad *in vitro* de las PHA sintasas de clase II (PhaC1 y PhaC2) de *P. aeruginosa* (Qi *et al.*, 2000); la phasina PhaM funge como activador fisiológico de la PHB sintasa (Pfeiffer & Jendrossek, 2014) y se ha demostrado que las phasinas pueden interactuar con proteínas como el regulador PhaR y la PHB depolimerasa PhaZ1 (Pfeiffer & Jendrossek, 2011).

La importancia de las phasinas en el metabolismo de PHB se ha estudiado en otros organismos como *R. rubrum*, donde se demostró la presencia de una phasina denominada ApdA (activator of polymer degradation), que aumenta significativamente la actividad catalítica *in vitro* de la PHB depolimerasa PhaZ (Handrick *et al.*, 2004). En *Magnetospirillum gryphiswaldense* se describió, por primera vez, una proteína asociada con los magnetosomas que se unía a los gránulos de PHB *in vivo* y activaba la PHB depolimerasa PhaZ1<sub>Ru</sub> de *R. rubrum in vitro*. Dicha proteína fue denominada Mms16 (*Magnetospirillum* especie ApdA) (Schultheiss *et al.*, 2005).

En *A. vinelandii* se identificaron por espectrometría de masas varias proteínas asociadas a los gránulos nativos de PHB, como las enzimas biosintéticas (acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa) y la phasina PhbP1, que es el componente mayoritario de la cubierta de los gránulos. Junto con estas proteínas, se localizaron asociadas a los gránulos la depolimerasa Avin03910 y la proteína Avin34720, esta última de función desconocida y cuyo gen está ubicado adyacente al gen de la PHB depolimerasa hipotética Avin34710 (Adaya *et al.*, 2018). Debido a que se encontró a Avin34720 en el gránulo y a la ubicación adyacente de su gen al de una posible PHB depolimerasa, se propuso que ambas proteínas participan en el metabolismo de PHB.

### 3. HIPÓTESIS

Las proteínas Avin34710 y Avin34720 de *Azotobacter vinelandii* participan en la degradación del PHB: Avin34710 como una PHB depolimerasa y Avin34720 como su modulador proteico.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la función de las proteínas Avin34710 y Avin34720 de *Azotobacter vinelandii* en el metabolismo del PHB, mediante la generación y estudio de sus mutantes y la caracterización bioquímica de las proteínas *in vivo* e *in vitro*.

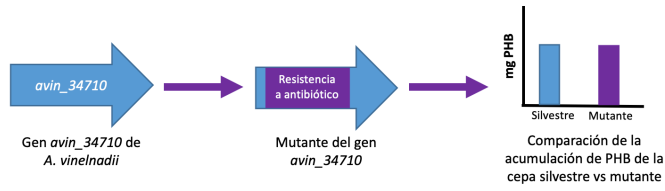
### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la participación de la proteína Avin34710 en la degradación del PHB mediante la generación de mutante por inactivación y su caracterización.
2. Comprobar la actividad de PHB depolimerasa de la proteína Avin34710 *in vivo* e *in vitro*.
3. Establecer el papel de la proteína Avin34720 en el metabolismo de PHB *in vivo*.

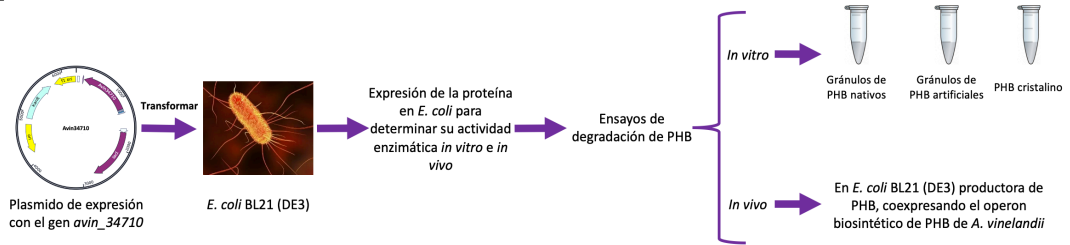
### 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Generar una mutante del gen *avin\_34710* en la cepa de *Azotobacter vinelandii* OP por interrupción con casete de resistencia a antibiótico. Analizar y comparar la capacidad de acumulación y movilización de PHB (degradación *in vivo*) de la mutante de *A. vinelandii* en el gen *avin\_34710*.
2. Construir una cepa de *E. coli* BL21(DE3) que exprese el gen *avin\_34710* de *A. vinelandii* en el vector pET24a(+). Probar la capacidad de la proteína Avin34710 recombinante para degradar gránulos de PHB nativos, artificiales y PHB cristalino, mediante un ensayo de degradación de PHB *in vitro*. Coexpresar Avin34710 con el operon biosintético de PHB de *A. vinelandii* en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y probar la capacidad de Avin34710 para degradar el PHB producido por *E. coli in vivo*.
3. Sobreexpresar el gen *avin\_34720* de *A. vinelandii* en una cepa de *E. coli* BL21(DE3) productora de PHB, utilizando el vector pET24(+). Probar el efecto de la expresión de la proteína Avin34720 en *E. coli* BL21 (DE3) recombinante productora de PHB en la acumulación del polímero mediante un ensayo de degradación de PHB *in vivo*.

Objetivo 1



Objetivo 2



Objetivo 3

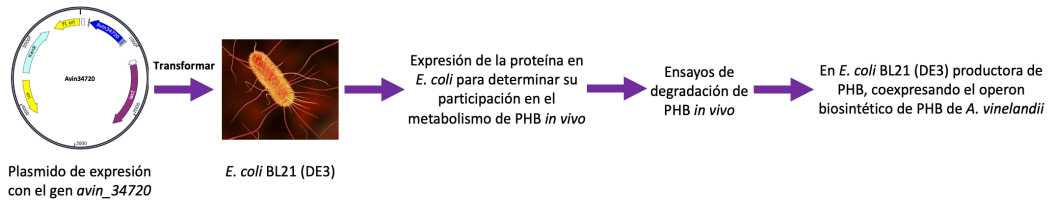


Figura 9. Esquema del diseño experimental para determinar el papel de las proteínas Avin34710 y Avin34720 en el metabolismo de PHB de *A. vinelandii*.

## 7. MÉTODOS

### 7.1 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *A. vinelandii* fueron crecidas en medio Burk-Sacarosa (BS) que contiene (g / L): MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 0.16; NaMO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.0002; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.005; CaCL<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.073; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.183; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 y sacarosa, 20. Para los experimentos de transformación de *A. vinelandii* no fueron agregados NaMO<sub>4</sub> ni FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O al medio de cultivo (Competence Media, CM) ya que la captación de ADN es mejor cuando el organismo es cultivado en un medio con bajo contenido de metales (Dos Santos, 2019; Page & Tigerstrom, 1982). Para la cinética de producción de PHB, el medio Burk fue suplementado con glucosa 5.4 g / L en lugar de sacarosa. También se utilizó el medio Peptone-Yeast (PY), el cual contiene (g / L): peptona, 5 y levadura, 3. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de 125 mL con 25 mL de medio o de 250 mL con 50 mL de medio en incubadora a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 18 horas (para preinóculos) o 96 horas (para la cinética). Las concentraciones de antibióticos que se utilizaron para *A. vinelandii* fueron: ácido nalidíxico 30 µg / mL (Nal30) y kanamicina 3 µg / mL (Km3).

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Lysogeny Broth (también conocido como Luria Bertani o LB), que contiene (g / L): triptona, 10; extracto de levadura, 5 y cloruro de sodio, 10. El medio LB fue suplementado con glucosa 2 g / L cuando se realizó la cinética de producción de PHB. Los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C (para preinóculos) o 30 °C (para la cinética) a 200 rpm por 12-24 horas. Las concentraciones de antibióticos utilizadas para *E. coli* fueron: tetraciclina 15 µg / mL (Tc15) y kanamicina 30 µg / mL (Km30).

### 7.2 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y los plásmidos utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Genotipo/características	Referencia
Cepas		
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
OP	Cepa silvestre, Nal30	ATCC® 13705™ (Bush & Wilson, 1959)
OP-34710	Derivada de la OP, porta una inserción del casete de Km en el gen <i>avin_34710</i> en dirección opuesta al sentido de la transcripción, Km3	Este trabajo

*E. coli*



DH5 $\alpha$	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> . Utilizada como reservorio de plásmidos	Invitrogene
BL21-DE3	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131</i> (DE3). Utilizada para la expresión de proteínas	Invitrogene
ArcticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tetr gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]</i> , Gm20. Utilizada para la expresión de proteínas con problemas de plegamiento	Agilent
BLpET	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta el plásmido pET24a(+) vacío, Km30. Utilizada como control de expresión	Este trabajo
BL10E	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta el plásmido pET34710E, Km30. Utilizada para la expresión de Avin34710	
BL20E	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta el plásmido pET34720E, Km30. Utilizada para la expresión de Avin34720	Este trabajo
BL10-20E	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta el plásmido pET10-20E, Km30. Utilizada para la expresión de Avin34710 y Avin34720	Este trabajo
ArpET	Derivada de la cepa ArcticExpress (DE3); porta el plásmido pET24a(+) vacío, Gm20Km30. Utilizada como control de expresión	Este trabajo
Ar10E	Derivada de la cepa ArcticExpress (DE3); porta el plásmido pET34710E, Gm20Km30. Utilizada para la expresión de Avin34710	Este trabajo
BL21/phbBAC	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta el plásmido pMPMT6/phbBAC, Tc15. Utilizada para la producción de PHB	Este trabajo
BACpET	Derivada de la cepa BL21 (DE3); porta los plásmidos pMPMT6/phbBAC y pET24a(+) vacío, Tc15Km30. Utilizada como control para el ensayo de degradación de PHB <i>in vivo</i>	Este trabajo
BAC10	Derivada de la cepa BL21-DE3; porta los plásmidos pMPMT6/phbBAC y pET34710E, Tc15Km30. Utilizada para la expresión de Avin34710 en el ensayo de degradación de PHB <i>in vivo</i>	Este trabajo
BAC20	Derivada de la cepa BL21-DE3; porta los plásmidos pMPMT6/phbBAC y pET34720E, Tc15Km30. Utilizada para la expresión de Avin34720 en el ensayo de degradación de PHB <i>in vivo</i>	Este trabajo
BAC1020	Derivada de la cepa BL21-DE3; porta los plásmidos pMPMT6/phbBAC y pET10-20E, Tc15Km30. Utilizada para la expresión de Avin34710 y Avin34720 en el ensayo de degradación de PHB <i>in vivo</i>	Este trabajo

---

Plásmidos

---

pJET1.2/blunt	Vector de clonación; Ap <sup>r</sup>	Thermo Fisher Scientific
pET24a(+)	Vector de expresión; Km <sup>r</sup> , etiqueta de histidinas para el C-terminal, promotor inducible con IPTG	Novagen
pMPM-T6Ω	Vector de expresión; Tc <sup>r</sup> , promotor inducible con arabinosa	(Mayer, 1995)
pBSL99-Km	Plásmido usado para obtener el casete de Km <sup>r</sup>	(Alexeyev et al., 1995)
pJG34710	Vector pJET1.2/blunt que contiene el gen <i>avin_34710</i>	Este trabajo
pJG34710km	Derivado de pJG34710, porta la mutación <i>avin_34710::Km<sup>r</sup></i> no polar	Este trabajo
pJET34710E	Vector pJET1.2/blunt que contiene el gen <i>avin_34710</i> amplificado con los oligonucleótidos EAv34710F y EAv34710R	Este trabajo
pJET34720E	Vector pJET1.2/blunt que contiene el gen <i>avin_34720</i> amplificado con los oligonucleótidos EAv34720F y EAv34720R	Este trabajo
pET34710E	Vector pET24a(+) que contiene el gen <i>avin_34710</i> proveniente de pJET34710E, para expresar en <i>E. coli</i> la proteína Avin34710	Este trabajo
pET34720E	Vector pET24a(+) que contiene el gen <i>avin_34720</i> proveniente de pJET34720E, para expresar en <i>E. coli</i> la proteína Avin34720	Este trabajo
pET10-20E	Vector pET24a(+) que contiene los genes <i>avin_34710</i> y <i>avin_34720</i> provenientes de pET34710E y pET34720E, para expresar en <i>E. coli</i> las proteínas Avin34710 y Avin34720	Este trabajo
pMPMT6/phbBAC	Vector pMPM-T6Ω que contiene el operón biosintético de PHB de <i>A. vinelandii</i>	Este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

Oligos	Secuencia	Sitio de restricción	Función
Av34710F	5'-ATG CTG CTC AGC GTC GCC AGC GCC GAA GCC-3'	Ninguno	Amplificación del gen <i>avin_34710</i>
Av34710R	5'-TCA GGA TCG GGG CTC GGC AAG GCG GGC GAT-3'	Ninguno	para generación de mutante
EAv34710F	5'-ACG <u>CAT ATG</u> CTG CTC AGC GTC GCC AG- 3'	NdeI	Amplificación del gen <i>avin_34710</i>

EAv34710R	5'-ATT <u>CGC GGC CGC</u> GGA TCG GGG CTC GGC AAG-3'	NotI	para expresión heteróloga en <i>E. coli</i>
EAv34720F	5'-TCG <u>CAT ATG</u> GAT GCC GAC ACC GCG-3'	NdeI	Amplificación del gen <i>avin_34720</i> para expresión heteróloga en <i>E. coli</i>
EAv34720R	5'-TTG <u>CTC GAG</u> AGC GCC GCT GTC CTT CCC-3'	XhoI	Amplificación del operón biosintético de PHB para expresión heteróloga en <i>E. coli</i>
phbB_EcoRI_FW	5'-GAC <u>GAA TTC</u> ATG AGC ATT CAA CGA A-3'	EcoRI	Amplificación del operón biosintético de PHB para expresión heteróloga en <i>E. coli</i>
phbC_HindIII_RV	5'-ACA <u>AGC TTT</u> TTA ACA GCC TCT AGT G-3'	HindIII	Amplificación del operón biosintético de PHB para expresión heteróloga en <i>E. coli</i>

### 7.3 Técnicas de biología molecular

#### 7.3.1 Extracción de ADN cromosomal de *A. vinelandii*

Para amplificar los genes *phbBAC* (para su expresión y producción de PHB en *E. coli* BL21 (DE3)), *avin\_34710* y *avin\_34720* (para su expresión en *E. coli* BL21 (DE3), ArcticExpress (DE3) y construcción de mutante), primero se extrajo el ADN cromosomal de la cepa *A. vinelandii* OP mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se colectaron células de la cepa OP crecidas en BS (30 °C / 200 rpm / 24 h), fueron lavadas con amortiguador TE 50 / 20 (50 mM de Tris-HCl, 20 mM de EDTA pH 8) y resuspendidas en 450 µL de este mismo amortiguador. Posteriormente, se agregaron 50 µL de lisozima (10 mg / mL) y se incubó a 37 °C por 30 minutos; en seguida se agregaron 50 µL de proteasa (10 mg / mL) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Después se agregaron 50 µL de SDS 10 % y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Luego, se agregaron 100 µL de NaCl 5M, se mezcló y se incubó a 65 °C por 10 minutos. Se añadieron 80 µL de solución caliente de CTAB 10 % (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) NaCl 0.7 M y fue incubada a 65 °C de 15 a 20 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizó la extracción con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, seguida de la extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1 volumen de fenol saturado más 1 volumen de cloroformo- isoamílico 24:1), y una última extracción con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Posteriormente se agregaron 600 µL de isopropanol y se centrifugó a 16060 g durante 15 minutos para recuperar las hebras de ADN, las cuales se lavaron 3 veces con 1 mL de etanol 70 %. Por último, se dejó secar la pastilla y se le agregaron 30 µL de RNAsa (20 µg / mL).

#### 7.3.2 Extracción de ADN plasmídico

La técnica del perclorato fue utilizada para la extracción de ADN plasmídico. Se partió de una pastilla celular de un cultivo saturado, se resuspendió con 175 µL de TES (sacarosa 15 %, TROS 50 mM pH 8.5 y EDTA 50 mM pH 8), se le agregaron 25 µL de lisozima (10 mg / mL) y se incubó en hielo por 20 minutos. Después se le

agregaron 400  $\mu\text{L}$  de agua helada y se incubó a 73  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 16060  $g$  por 15 minutos, se descartó la pastilla de restos celulares con un palillo, se le agregaron 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaClO}_4$  (perclorato de sodio) 5M y 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló y se centrifugó a 16060  $g$  por 15 minutos. Por último, se lavó la pastilla con etanol 70 %, se dejó secar y se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de RNAsa (20  $\mu\text{g}$  / mL).

### 7.3.3 Preparación de células competentes

Para las transformaciones de las cepas de *E. coli*, se prepararon células competentes mediante el método de  $\text{CaCl}_2$ . Se inocularon 5 mL de medio LB y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  de 16 a 20 horas. Con 1 mL de este cultivo se inocularon 100 mL de LB y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 3 horas, hasta llegar a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.4-0.5. Transcurrido este tiempo, se colectaron las células por centrifugación (2025  $g$  / 10 min), se resuspendieron en 30 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M frío y se incubaron en hielo por 15 minutos. Después se centrifugaron las células a 1523  $g$  por 10 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Por último, se resuspendió la pastilla celular con 2 mL de una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, 14 % de glicerol, por cada 50 mL de cultivo original.

Para la construcción de la mutante OP-34710 se prepararon células competentes de la cepa *A. vinelandii* OP. Se sembraron las células en medio CM sólido y se incubaron a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Después se resembraron nuevamente en medio CM sólido y se incubaron a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 15 horas. Se recolectaron y lavaron las células en 30 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Por último, se resuspendieron las células en 1 mL de medio CM  $\text{MgSO}_4$  32mM.

### 7.3.4 Transformación

Para la transformación de las cepas de *E. coli* se mezclaron 0.1  $\mu\text{g}$  de ADN con 100  $\mu\text{L}$  de células competentes, se incubaron en hielo por 30 minutos y después se les dio un choque de calor a 42  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos. Luego se le agregó 1 mL de LB sin antibiótico y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora con agitación. Por último, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla en LB sólido con el antibiótico correspondiente.

Para transformar células de *A. vinelandii* se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y se le agregaron 5  $\mu\text{g}$  de ADN. Se colocó esta mezcla en medio CM sólido y se incubó a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Por último, se recogieron las células en 1 mL de medio BS y se sembraron 100  $\mu\text{L}$  en medio BS sólido con el antibiótico correspondiente.

## 7.4 Cuantificación de la concentración de proteínas totales.

El crecimiento de las diferentes cepas se cuantificó mediante la determinación de proteínas totales por el método de Lowry y colaboradores (1951). Se centrifugó 1 mL del cultivo a 16060  $g$ , se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  10mM. Las células se resuspendieron en agua estéril, de este volumen se tomaron 200  $\mu\text{L}$  (este volumen varió de acuerdo con la concentración

de proteínas en la muestra). Posteriormente, se añadió 1 mL de solución reactiva (49 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % en NaOH 0.1 N, 0.5 mL tartrato de sodio y potasio 2 % y 0.5 mL CuSO<sub>4</sub> 1 %) y se dejó reposar por 10 minutos. Después, se agregó 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:2 de agua) y se dejó reposar por 30 minutos. Por último, se leyó la absorbancia a 625 nm (Lowry *et al.*, 1951). A la par, se realizó una curva de calibración de albúmina 1 mg / mL sometiéndola al mismo tratamiento de las muestras.

### 7.5 Cuantificación de la concentración de PHB

Para conocer el contenido de PHB de las células, se utilizó el método espectrofotométrico de Law y Splecky (1960), que se fundamenta en la conversión del biopolímero en ácido crotónico. Primero, se centrifugó 1 mL del cultivo a 16060 *g*, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM, se centrifugó a 16060 *g* / 5 min y se desechó el sobrenadante. Después se agregó 1mL de hipoclorito de sodio comercial diluido al 30 % (concentración final aproximada 2 %), se resuspendieron las células y se incubaron a 30 °C por 1 hora. Luego se centrifugaron las células y se decantó el sobrenadante, se lavaron con agua y se volvieron a centrifugar. Se le añadió 1 mL de etanol absoluto, se centrifugó y decantó el sobrenadante. Posteriormente, la pastilla se lavó con 1 mL de acetona y se centrifugó por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la muestra. Al PHB obtenido se le adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para disolverlo y se calentó a 95 °C / 10 min. Por último, se realizaron diluciones con ácido sulfúrico concentrado, según el contenido de PHB, para leer la muestra a 235 nm utilizando una celda de cuarzo y ácido sulfúrico concentrado como blanco. Los resultados de la cuantificación de PHB se obtuvieron con la ecuación de Lambert-Beer (Alonso *et al.*, 2009):

$$A = \sum C l$$

donde:

A = absorbancia

C = concentración (µg/mL)

Σ = coeficiente de extinción molar del ácido crotónico (15600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

l = longitud de la celda (1 cm)

### 7.6 Construcción de la mutante OP-34710

Para analizar la actividad de PHB depolimerasa de la proteína Avin34710, se realizó una mutante en la que se interrumpió el gen *avin\_34710* por medio de un casete de resistencia a kanamicina del plásmido pBSL99-Km (Alexeyev *et al.*, 1995) (Tabla 1). Se amplificó el gen *avin\_34710* a partir de la cepa *A. vinelandii* OP mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) con la enzima de Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Los oligonucleótidos utilizados

fueron Av34710F y Av34710R (Tabla 2). Posteriormente, se verificó el producto de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 % y se purificó el fragmento de ADN correspondiente al gen *avin\_34710* con el kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific, siguiendo la metodología dada por el proveedor. Después, el gen fue clonado en el vector pJET1.2 (Tabla 1) linealizado con la enzima EcoRV (Thermo Scientific). El plásmido fue digerido con BglII (Thermo Scientific) para comprobar que la clonación fue adecuada. El plásmido resultante (llamado pJG34710, Tabla 1) se mandó a secuenciar para verificar que el gen no tuviera mutaciones.

A continuación, se insertó un casete de resistencia a kanamicina del plásmido pBSL99-Km (Alexeyev *et al.*, 1995) (Tabla 1) a pJG34710 en el sitio *StuI* (que se encuentra dentro del gen *avin\_34710*); el plásmido resultante se llamó pJG34710Km (Tabla 1). pJG34710Km se linealizó digiriendo con *PmeI* y con él se transformaron células competentes de *A. vinelandii* OP. Por último, se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina 3 µg / mL y sus genotipos fueron verificados por PCR con los oligonucleótidos Av34710F y Av34710R. La cepa resultante fue llamada OP-34710 (Tabla 1).

### **7.7 Cinética de producción de PHB de la cepa silvestre OP y la mutante OP-34710**

Para caracterizar a la mutante OP-34710, se analizó su crecimiento y producción de PHB, tanto en medio líquido como en sólido. Primero, se sembró una caja de PY sacarosa al 2 % con la cepa mutante OP-34710 y la silvestre OP a 30 °C / 72 h. Se recolectaron las células en 2 mL de agua estéril y se homogenizaron (1 mL fue utilizado para la cuantificación de la concentración de PHB y el otro para la cuantificación de la concentración de proteínas totales).

Para la cinética en medio líquido, se inició con un preinóculo de las cepas OP y OP-34710 crecidas a 30 °C / 18 h en medio BS con sus antibióticos (ácido nalidíxico 30 µg / mL y kanamicina 3 µg / mL, respectivamente). Con este preinóculo, se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de Burk Glucosa 30mM hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.1. El cultivo se incubó a 30 °C / 96 h / 200 rpm. Se tomaron muestras a las 48, 60, 72 y 96 horas para la posterior cuantificación de la concentración de proteínas totales y PHB.

### **7.8 Construcción de las cepas de expresión BLpET, BL10E, BL20E, BL10-20E, ArpETy Ar10E**

Para el estudio del efecto de las proteínas Avin34710 y Avin34720 en la degradación de PHB *in vitro*, se construyeron las cepas de expresión BLpET, BL10E, BL20E, BL10-20E, ArpET y Ar10E. Se amplificaron los genes *avin\_34710* y *avin\_34720* usando los oligonucleótidos EAv34710F y EAv34710R, EAv34720F y EAv34720R, que contaban con los sitios de restricción *NdeI*, *NotI*, *NdeI* y *XhoI*, respectivamente (Tabla 2), y se clonaron en el plásmido pJET2.1 linealizado con la

enzima EcoRV; con esto se obtuvieron los plásmidos pJET34710E y pJET34720E (Tabla 1). Posteriormente, los plásmidos pJET34710E y pJET34720E se digirieron con las enzimas NdeI / NotI y NdeI / XhoI, respectivamente. Las digestiones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se purificaron los fragmentos correspondientes a los genes *avin\_34710* y *avin\_34720* a partir del gel de agarosa, utilizando el kit de extracción de gel (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit). Los fragmentos resultantes se ligaron al vector de expresión pET24a (Tabla 1), utilizando la enzima T4 ADN ligasa de Thermo Scientific. Luego, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con las mezclas de ligaciones; con esto se obtuvieron los plásmidos pET34710E y pET34720E (Tabla 1), los cuales fueron digeridos con las enzimas NdeI / NotI y NdeI / XhoI, respectivamente, y se verificaron las digestiones por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Por último, los plásmidos que dieron el patrón de bandeado adecuado fueron secuenciados para verificar que los genes no tuvieran mutaciones.

Para tener una cepa que expresara tanto la proteína Avin34710 como la Avin34720, se construyó el plásmido pET10-20E (Tabla 1). Para ello, se digirieron los plásmidos pET34710E y pET34720E con las enzimas XbaI / StyI y XbaI, respectivamente, y las digestiones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Después, los extremos de los fragmentos se rellenaron con la enzima Klenow (Thermo Scientific), se ligaron los fragmentos con la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific) y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con la mezcla de ligación. Por último, se seleccionaron las colonias candidatas que crecieran en LB kanamicina 30  $\mu$ g / mL y se verificaron por patrones de digestión enzimática con NdeI.

Una vez obtenidos los plásmidos pET24a, pET34710E, pET34720E y pET10-20E, se transformaron en las cepas de expresión *E. coli* BL21-DE3 y *E. coli* ArcticExpress (DE3) (Tabla 1), para la posterior purificación de Avin34710 y Avin34720, y utilización en el ensayo de degradación de PHB *in vitro*. Para esto, células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET24a, pET34710E, pET34720E y pET10-20E. Las cepas resultantes fueron llamadas BLpET (pET24a), BL10E (pET34710E), BL20E (pET34720E) y BL10-20E (pET10-20E) (Tabla 1). Por otra parte, células competentes de *E. coli* ArcticExpress (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET24a y pET34710E. Las cepas resultantes fueron llamadas ArpET (pET24a) y Ar10E (pET34710E) (Tabla 1).

### **7.9 Obtención de extractos proteicos totales de las cepas de expresión BLpET, BL10E, BL20E, BL10-20E, ArpET y Ar10E**

Para el estudio de degradación de PHB *in vitro* se indujo la expresión de las proteínas recombinantes Avin34710 y Avin34720 a partir de los plásmidos de expresión. Con cada cepa se inocularon 6 mL de medio LB con sus respectivos antibióticos y se cultivaron a 37 °C / ON / 250 rpm. Se tomó 1 mL de estos cultivos para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB con sus respectivos

antibióticos y se incubaron a 37 °C / 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.4-0.7 (aproximadamente 1 h 45 min). A partir de este paso, se utilizaron diferentes estrategias en las distintas cepas de expresión para poder obtener las proteínas solubles.

Cuando los cultivos de las cepas BLpET, BL10E, BL20E, BL10-20E alcanzaron una DO<sub>600nm</sub> de entre 0.4-0.7 se añadió IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.25 mM y se incubaron a 30 °C / 5 h / 200 rpm. Posteriormente, se obtuvieron las pastillas celulares de los cultivos inducidos, se resuspendieron en 2 mL de amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, sarcosil 1 %, pH8) y 160 µL de inhibidor de proteasas (cOmplet, Roche). Las células se lisaron con el sonicador Virsonic 60 dando tres pulsos de 15 segundos cada uno, dejando reposar 1 minuto entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 16060 g / 15 min / 4 °C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) de la pastilla celular (fracción insoluble).

Otra estrategia de expresión llevada a cabo para las cepas ArpET y BL20E fue añadir IPTG a una concentración final de 0.4 mM e incubar a 30 °C (18 °C para el caso de las cepas ArpET) / 4 h / 200 rpm. Se obtuvieron las pastillas celulares centrifugando a 6201 g durante 7 minutos y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 150 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM y EDTA 1mM, pH 6.5) por cada gramo de pastilla celular. Las células se lisaron durante 10 segundos a una potencia de entre 8 y 12 watts, dejando descansar 10 segundos por 6 minutos. Después, se centrifugó a 16060 g / 15 min / 4 °C y se separó el sobrenadante de los restos celulares.

Para la cepa Ar10E se siguió otra estrategia de expresión, dadas las condiciones de crecimiento que tiene la cepa ArcticExpress (DE3). La expresión de la proteína recombinante se indujo con 0.25 mM de IPTG (concentración final) y el cultivo se creció a 18 °C / 16 h / 200 rpm. Se obtuvo la pastilla celular y se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos 100 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM y PMSF 2mM, pH 6) por cada gramo de pastilla celular. Finalmente, se sonicó y se separó el sobrenadante de la pastilla celular como se explico en el párrafo anterior.

### **7.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis)**

Como método de comprobación de la expresión y purificación de proteínas se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Primero, se agregó tampón de carga (Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8, SDS, glicerol, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol) a las muestras, se calentaron a 95 °C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 % (1.6 mL de agua, 2 mL de poliacrilamida al 30 %, 1.3 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 50 µL de SDS 10 %, 50 µL de persulfato de amonio 10 % y 2 µL de TEMED). Una vez cargadas las muestras en el gel, se realizó una electroforesis a 100 volts durante 1 hora 30 minutos en



amortiguador 1X de Tris Base, glicina, SDS 10 % y agua. Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó por 20 minutos con una mezcla de azul de Coomassie R-250, glicina, SDS 10 % y agua. Por último, se destiñó el gel con una mezcla de metanol, ácido acético y agua.

### **7.11 Purificación de proteínas por columna de níquel**

Para el estudio de degradación de PHB *in vitro* se purificaron las proteínas Avin34710 y Avin34720 a partir de los sobrenadantes recolectados después de sonicar. Primero, se agregaron 2 mL de resina a una columna de purificación de níquel, lavada con 10 volúmenes de agua y equilibrada con 4 volúmenes de amortiguador de lisis (el amortiguador de lisis cambió dependiendo de la proteína). Se colocó la fracción soluble de las muestras en la columna y se incubó a 4 °C / 30 min. Posteriormente, se realizaron una serie de eluciones con amortiguador de lisis aumentando las concentraciones de imidazol en un rango de 10 a 500 mM. Cada elución fue colectada en tubos Falcon de 15 mL. Finalmente, las fracciones se resolvieron en un SDS-PAGE y se cuantificó la concentración de proteínas mediante una curva de lisozima en SDS-PAGE.

### **7.12 Cuantificación de proteínas en SDS-PAGE por curva de lisozima**

Para saber la concentración de la proteína Avin34710 en una mezcla de proteínas, se realizó una cuantificación en SDS-PAGE con una curva de lisozima. Primero, se preparó un SDS-PAGE al 15 % (1.1 mL de agua, 2.5 mL de poliacrilamida al 30 %, 1.3 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 50 µL de SDS 10 %, 50 µL de persulfato de amonio 10 % y 2 µL de TEMED) y se prepararon stocks de lisozima de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 10 µg / µL. Se tomaron 10 µL de cada stock y se le agregaron 5 µL de amortiguador de carga (Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8, SDS, glicerol, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol). Por otra parte, se tomaron 30 µL de muestra, se le agregó 10 µL de agua y 10 µL de amortiguador de carga. En el gel se cargó la curva de lisozima y 25 µL de la mezcla de la muestra, y se realizó una electroforesis a 100 volts. Después, se tiñó el gel con una mezcla de azul de Coomassie R-250, glicina, SDS 10 % y agua, y se destiñó con agua caliente. Posteriormente, se escaneó el gel y con el programa Image Studio Lite se obtuvo la ecuación de la recta correlacionando los pixeles con la concentración de lisozima, y se determinó la concentración de la proteína deseada.

### **7.13 Renaturalización de proteínas por diálisis**

Para obtener una mayor cantidad de la proteína Avin34710 pura y soluble para el estudio de degradación de PHB *in vitro*, se renaturalizó la proteína mediante una diálisis. La pastilla celular con la proteína ya inducida se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos 100 mM, NaCl 50 mM y urea 8 M, pH 6) por cada gramo de pastilla, se sonicó y se separó el sobrenadante de los restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se paso por una columna de níquel para purificar la proteína y la elución fue colocada en una membrana de

celulosa. Después, la membrana se colocó en una probeta con amortiguador de lisis a 4 °C en agitación con una mosca magnética y se le fue adicionando cada hora un volumen de amortiguador # 2 (amortiguador de fosfatos 100 mM y NaCl 50 mM, pH 6) requerido para que la concentración de urea fuera disminuyendo de 0.5 en 0.5 M. Una vez que la concentración de urea llegó a 0.5 M, se agregó un volumen de amortiguador # 2 requerido para que la concentración disminuyera de 0.1 en 0.1 M, hasta llegar a una concentración de urea de 0.1 M. Luego, se desechó el amortiguador de la probeta para sustituirlo por el amortiguador # 3 (amortiguador de fosfatos 100 mM, NaCl 50 mM y DTT 1 mM, pH 6) y se dejó en agitación por 1 h y se colectó la muestra de la membrana de diálisis (con una concentración de urea de 0.0023 M).

#### **7.14 Purificación de gránulos nativos de PHB de *E. coli***

Para realizar el estudio de degradación de PHB *in vitro* se purificaron gránulos nativos de PHB. Los gránulos fueron obtenidos de la cepa de *E. coli* BL21/phbBAC (Tabla 1), que porta un plásmido que contiene el operón biosintético de PHB de *A. vinelandii*, y con un promotor inducible por arabinosa.

Se partió de un preinóculo de la cepa BL21/phbBAC crecido durante la noche en medio LB suplementado con 2 % de glucosa y tetraciclina 15 µg / mL. Con este preinóculo, se preparó un cultivo en medio LB glucosa 2 %, con una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.1, y se cultivó a 37 °C / 24 h / 200 rpm. El cultivo se centrifugó para obtener la pastilla celular, y fue resuspendida en 3 mL de TRIS-HCl 50mM pH7.5. Las células fueron lisadas utilizando la prensa French a una presión de 900 psi en tres ocasiones. El extracto celular fue colocado en un gradiente discontinuo con 87 % y 50 % de glicerol en amortiguador y se centrifugó utilizando una ultracentrífuga Ultra-Clear (Beckman) a 68589 g / 4 °C / 40 min. Los gránulos se recuperaron de la interfaz; se colocaron en otro gradiente con 87, 80, 60 y 40 % de glicerol y se centrifugaron bajo las mismas condiciones. Por último, se recuperaron los gránulos y se almacenaron a 4 °C (Handrick *et al.*, 2000).

#### **7.15 Generación de gránulos artificiales**

También para el estudio *in vitro* de la actividad de degradación de PHB, se prepararon gránulos artificiales de PHB. Se disolvió en cloroformo el PHB cristalino comercial y el PHB cristalino extraído de la cepa *A. vinelandii* OP, en una relación 150 mg de PHB por cada mililitro de cloroformo. La mezcla se calentó a 65 °C hasta que el PHB estuviera disuelto. Se agregaron 20 volúmenes de una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 50 mM como agente surfactante y se sonicó durante 10 segundos a una potencia de entre 8 y 12 watts, dejando descansar 10 segundos, por un tiempo total de 3 minutos. Se dejó reposar hasta que se formaron dos fases, se traspasó la fase superior a otro tubo y se calentó a 75 °C para evaporar el cloroformo (Horowitz & Sanders, 1994). Finalmente, los gránulos artificiales fueron almacenados a temperatura ambiente.

### **7.16 Estudio de degradación de PHB *in vitro***

Para medir la actividad *in vitro* de la proteína Avin34710 expresada en *E. coli*, se realizó un ensayo turbidimétrico de degradación de PHB amorfo y cristalino a DO<sub>600nm</sub>. En una placa de 96 pozos se colocó la mezcla de reacción del ensayo que contenía 20 µg de proteína, 70 µg de sustrato (gránulos artificiales, gránulos provenientes de *E. coli* y PHB cristalino) y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5, en un volumen total de 300 µL. Se tomó lectura a 600 nm cada 5 minutos durante 150 minutos en el lector de placas Synergy H1.

### **7.17 Estudio de la producción de PHB *in vivo* en *E. coli***

Para medir la actividad *in vivo* de las proteínas Avin34710 y Avin34720, se generaron diversas cepas de *E. coli* que produjeran PHB y además expresaran las proteínas Avin34710, Avin34720 y ambas. Se obtuvieron células competentes de la cepa productora de PHB, BL21/phbBAC (Tabla 1), que tiene el plásmido pMPMT6/phbBAC que contienen los genes para la síntesis de PHB. Posteriormente, estas células fueron transformadas con los plásmidos pET24a, pET34710E, pET34720E y pET10-20E y se seleccionaron colonias resistentes a tetraciclina 15 µg / mL y kanamicina 30 µg / mL. Las cepas resultantes fueron llamadas BACpET, BAC10, BAC20 y BAC1020 (Tabla 1).

Para iniciar el estudio de producción de PHB en *E. coli*, se crecieron las cepas BACpET, BAC10, BAC20 y BAC1020 en 6 mL de medio LB con tetraciclina 15 µg / mL y kanamicina 30 µg / mL a 37 °C / ON / 200 rpm. De este cultivo se tomaron 2 mL para inocular matraces de 250 mL con 50 mL de LB 2 % de glucosa, y fueron incubadas a 30° C / 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.5-0.7 (aproximadamente 4 horas). Después, se añadió arabinosa (para la inducción de los genes *phbBAC* para sintetizar PHB) a una concentración final de 10 mg / mL y se continuó incubando a 30 °C / 8 h / 200 rpm. A continuación, se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM para inducir la expresión de los genes *avin\_34710* y *avin\_34720* y se siguió incubando a 30 °C / 200 rpm hasta las 25 horas. Se tomaron 2 mL de muestra a lo largo del ensayo para cuantificar proteína y PHB.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de PHB y su regulación en *A. vinelandii* es muy conocida (Castañeda *et al.*, 2000; Hernández-Eligio *et al.*, 2011, 2012; Manzo *et al.*, 2011; Noguez *et al.*, 2008; Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura & Espín, 2004; Segura & Espín, 1998); no obstante, sobre la degradación y su control se conoce poco. En nuestro grupo de investigación se identificaron siete genes de PHB depolimerasas hipotéticas. Uno de estos genes, *avin\_34710*, se encuentra entre los genes de una aminoacil-ARNt hidrolasa y *avin\_34720*, que codifica para una proteína hipotética (Figura 10) y se localiza en el gránulo de PHB de *A. vinelandii* (Yanjara, 2012).



Figura 10. Contexto genético de *avin\_34710* en *A. vinelandii*. El gen *avin\_34710* mide 1017 pb. Río arriba de *avin\_34710* se localiza el gen que codifica para una aminoacil-ARNt hidrolasa y río abajo esta el gen *avin\_34720* que codifica para una proteína hipotética. El espacio entre *avin\_34710* y *avin\_34720* es de 30 pb, lo que sugiere que se expresan en operón.

Cabe mencionar que el espacio entre ambos genes es pequeño (30 pares de bases), por lo que es probable que *avin\_34710* y *avin\_34720* se expresen en operón. Se realizó un análisis *in silico* de la región intergénica de los genes *avin\_34710* y *avin\_34720* para buscar posibles promotores ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)). Los resultados mostraron que no hay un promotor en esa región (aunque el programa predijo un posible promotor dentro del gen *avin\_34710*). Además, un análisis usando la herramienta del sitio web de RSAT Prokaryotes ([https://embnet.ccg.unam.mx/rsat/infer-operons\\_form.cgi](https://embnet.ccg.unam.mx/rsat/infer-operons_form.cgi)), predijo un posible operón con los dos genes. No obstante, no se tiene evidencia experimental que apoye los resultados *in silico*, como una RT-PCR.

*Avin34710* tiene similitud de secuencia con depolimerasas ya caracterizadas. El análisis comparativo de las secuencias proteicas mostró una identidad aproximada del 33 % con la depolimerasa intracelular *PhaZ1<sub>Rru</sub>* de *R. rubrum*, y dos depolimerasas extracelulares, *PhaZ* de *Schlegelella* sp. KB1a y *PhaZ<sub>Pfu</sub>* de *P. funiculosum* (Figura 11). *PhaZ1<sub>Rru</sub>* es una PHB depolimerasa periplásmica específica para PHA amorfo de cadena corta, como el PHB nativo, PHB artificial y ésteres oligoméricos de R3HB con 3 o más unidades de 3HB (Handrick *et al.*, 2004). Las PHAs depolimerasas *PhaZ* de *Schlegelella* sp. KB1a y *PhaZ<sub>Pfu</sub>* son extracelulares, específicas para PHA cristalino de cadena corta (Hisano *et al.*, 2006; Kasuya *et al.*, 2007; Romen *et al.*, 2004). Además, estas PHA depolimerasas tienen una secuencia típica de péptido señal en el extremo N del polipéptido, característica que no tiene *Avin34710*. La depolimerasa *Avin34710* tiene, al igual que las otras PHA depolimerasas, un dominio catalítico de tipo II (Jendrosseck & Handrick, 2002). En el análisis de la secuencia proteica de *Avin34710* usando la herramienta

bioinformática Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se encontraron dominios conservados de la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasas, que abarca, entre otras familias, a la familia de las PHB depolimerasas, y se caracterizan por tener una triada catalítica que contiene a los aminoácidos serina (S), glutamato o aspartato (D o E), e histidina (H) (Jendrossek & Handrick, 2002) (Figura 12). En la secuencia de aminoácidos de Avin34710 se identificaron a los aminoácidos de la triada catalítica (serina, glutamato e histidina) y una histidina que podría ser el oxianión, así como una caja lipasa, que es una secuencia de aminoácidos (Gly-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Xaa<sub>2</sub>-Gly) que forma parte de la triada catalítica, presente en muchas PHB depolimerasas (Jendrossek & Handrick, 2002).

<i>A. vinelandii</i> Avin34710	-----MLLSVASAEAQTVKLPACGAIEIRKTSVSGISGAFMNTSOLYVAFSE	46
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	-MR--AFCRFVGAALLLVGLAGPAWADSLPKLAIDADHVTVSGISGAYMANQFHVHSA	57
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	-MRSIRLKRLLIAAVALGGAAAATQAASPLRLNVDKTQISVSGISAGGFMANQLGYAYSG	59
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	MFDSVKIAWL---VAL---GAAQVAATALPAFNVNPNPNSVSVSGISGGYMAAQLGVAYSD	54
	* :. : ** : :***:*.:.*: * : *.*	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	IM-VGAGIVAGGPYLCAKSWAGNSLLVNAAT---TTCMHPLTAGSGPNTPLLARYAATLA	101
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	RV-DGAGLVAGGLYGCASVTVVNDKVMATASRALAHCMRQSAFL--ESADRFVGIARQLE	114
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	TF-MGVGIFAGGPYMCAGHSNYT-----SCMYNATITSSMRSAMQA--SDNDW	104
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	VFNVGFGVFAGGPYDCARNQYYT-----SCMYNGYPSIT---TPTA--NMKSW	97
	. * * :.*** * * * . ** .	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	EYQIAPLNKLEDDRIYIFSGTDEIVTTTVVNTREFFKAVGVPEASIR----YDRSI	156
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	RAGRIDALAGLRGDRVYLFTEADTVVGVAKVVRTAAEALGTLGVTTLVSSSQGTGPGAGA	174
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	SGAHDPKAHVANQRVFLFVGNSTTVVGNPNMDAVHAQYQHNGVRRRTAR-----VRGRN	158
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	SGNQIASVANLGRKLYMWTGSSDTTVVGNPNMNLKAQLGNFDNSANVS-----YVTTT	151
	* : : : : * * * . :	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	AAGHAFSLTD--DDTDACALTRSPYINDCDFSQAGAILEQIYP-GLKSPARHRDSDLIAF	213
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	KAGHAFSLTP--DRGNAACSAEKSPFFNACRYDQAEAILKVLVYGPLAPPVLSGRLSRF	232
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	STAHVFPPTDFDATGNACNSTASPYIANCGYDGAKAVLSRIYGTLPQPRNDAPAGANYIEF	218
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	GAVHVFPTDFNGAGDNSCSLSTSPYISNCNYDGAGAALKWIYGLNARNRTGLTSGSVLSF	211
	: * . * * : : * * * * : * : . * * * . : *	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	DQEEFIDSP---YTSMDDTAYAYVPTACRSKG-SCPVHVVFHGCRCQSGHFIG--DQYYAR	267
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	DQSAYVRGGNAIKASLWDEGLVYVPADCAAGA-ACRLHIAFHGCKQSDQVLGSAEKFWDL	291
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	DQTAFTNNP----GMAS*GWVYVPANCAAGA-QCRLHVALHGCGQSTGHIG--DRFVKN	270
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	AQSGSYGAN----GMDTTGPLYVVPQSCASGATVCSLHVALHGCLQSYSSIG--SRFIQN	264
	* :. : * * * * * * * : * * : : * * * * . : *	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	TGYNRLAEANDLIMLYPQVRPSSA-----SPLNPDGCWDFWGYSSPDSPTPDYFTRN	319
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	AGYNGWADTNHIVVLYPQARAIGATEGFPL--TAINPEGCWNWGWGLDG----KFLGRE	345
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	TGYTRWADTNNIIVLFPQAKTDNTPRNTAASGMLPNPNACWDVWGWYGS----NFAQKT	325
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	TGYNKWADTNMIILYPQAIPTYTHAIWNGVLSNPNCGCWVWGWYGS----NADQIG	319
	: * * * * * : : * * * * * : * * * * * : *	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	APQLRAIHKMIARLAEPSS-----	338
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	GLQISAVNAMINALAGR-----	362
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	GTQAAAIAKAMVDHVASARPLRLPAPTGVQTSYGATSSSMVISWAAVQGAAGYNVYRDGTK	385
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	GVQMAAIVGQVKQIVSGFQG-----	339
	. * * : : . :	
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	-----	338
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	-----	362
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	VNATAVSGTSTYDNLSPGTTYQWTVRAVNAQGRPAVGPATGTTTGTAAVCFPTSSNYAH	445
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	-----	339
<i>A. vinelandii</i> Avin34710	-----	338
<i>R. rubrum</i> PhaZ1 <sub>Rru</sub>	-----	362
<i>Schlegelella</i> sp. KB1a PhbZ	VSAGRAYVSMGYTYANASHQNMLWNVVFVTTTLKQTPGPNYVIGTCP	492
<i>P. funiculosum</i> PhaZ <sub>Pfu</sub>	-----	339

Figura 11. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de Avin34710 con las PHA depolimerasas de *R. rubrum*, *Schlegelella* sp. KB1a y *P. funiculosum*. Avin34710 tiene una identidad de aproximada de 33 % con PhaZ1<sub>Rru</sub> de *R. rubrum*, PhbZ de *Schlegelella* sp. KB1a y PhaZ<sub>Pfu</sub> de *P. funiculosum*. Los residuos serina (S), aspartato (D) e histidina (H) de la triada catalítica se señalan con el recuadro rojo. El alineamiento se realizó con la herramienta Clustal Omega.

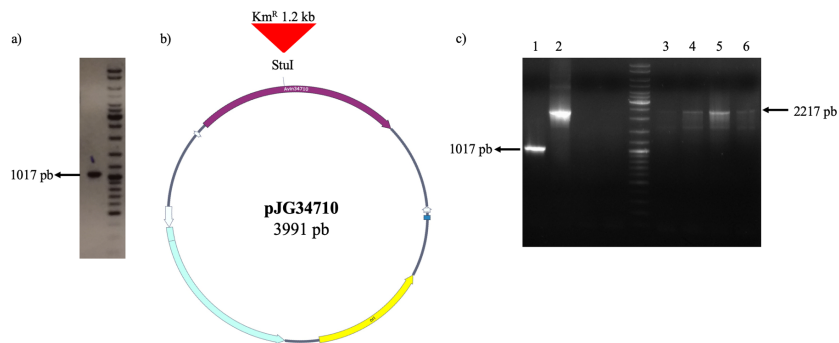


**Figura 12. Análisis de la estructura de aminoácidos de Avin34710.** La secuencia de aminoácidos de Avin34710 tiene tres dominios pertenecientes a la súper familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, de los cuales dos son característicos de PHB depolimerasas: *esterasa\_phb* y *LpqC*. Estos dominios se caracterizan por tener una triada catalítica: serina (S), glutamato (E) o aspartato (D) e histidina (H), señalados con letras rojas. En amarillo se señala la caja lipasa (GLSSG); y el residuo histidina (H) en verde signiere al aminoácido oxianión.

Por otra parte, el análisis de secuencia de la proteína Avin34720 no mostró similitud significativa con proteínas de otros microorganismos, a excepción de su ortólogo en especies del género *Azotobacter*.

### 8.1 Construcción y caracterización de la mutante OP-34710

Para determinar el papel de la proteína Avin34710 en el metabolismo del PHB en *A. vinelandii*, se generó una mutante en la que se inactivó el gen *avin\_34710*, interrumpiéndolo con un gen de resistencia a kanamicina y realizando un reemplazo alélico por doble recombinación. En la Figura 13 se puede observar la banda de 1017 pares de bases que corresponde a la amplificación por PCR del gen *avin\_34710* silvestre. También, se muestra la banda de 2217 pares de bases que corresponde al gen *avin\_34710* interrumpido por el casete de kanamicina (1200 pares de bases).



**Figura 13. Comprobación de la mutante OP-34710.** a) Producto de PCR del gen *avin\_34710* (1017 pb). b) Mapa del plásmido pJG34710 utilizado para realizar la mutante OP-34710. El gen *avin\_34710* (flecha guinda) se interrumpió con un casete de resistencia a Km (1.2 kb, triangulo rojo), insertado en el sitio de restricción *StuI*. c) Comprobación de la cepas mutantes candidatas mediante PCR: *avin\_34710*, 1017 pb; y *avin\_34710* con casete de resistencia a Km, 2217 pb. Carriles: 1. *avin\_34710*; 2. *avin\_34710* más casete de resistencia a Km; 3-6. cepas mutantes candidatas.

Para determinar los efectos de la interrupción del gen *avin34710* sobre el crecimiento y acumulación de PHB en *A. vinelandii* OP, se realizó una cinética en condiciones de exceso (favorable para la acumulación de PHB) y limitación de fuente de carbono (utilización del PHB acumulado). En condiciones de exceso de la fuente de carbono (medio PY-Sacarosa 2 %), la mutante OP-34710 presentó un fenotipo más blanquecino y opaco, comparado con el de la cepa silvestre OP, lo que sugiere un mayor contenido de PHB en la mutante que en la cepa silvestre (Figura 14a). Al cuantificar el PHB de ambas cepas se pudo observar que la mutante OP-34710 acumuló 1.74 veces que lo cuantificado en la cepa silvestre (0.534 mg PHB / mg proteína y 0.306 mg PHB / mg proteína, respectivamente) (Figura 14b). Estos datos dieron indicios que la mutante tiene alterado el metabolismo de PHB como correspondería en el caso de una menor degradación del polímero.

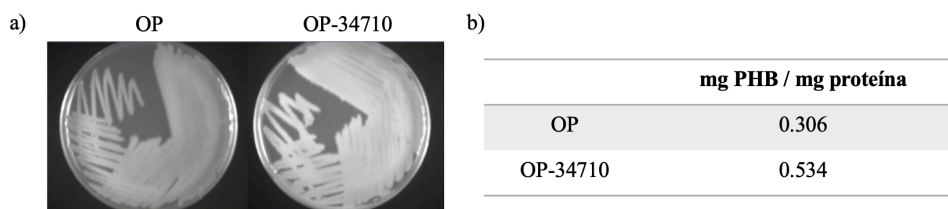


Figura 14. Comparación de la acumulación de PHB en cepas de *A. vinelandii* sobre placas de medio PY sacarosa al 2 % a las 72 horas. a) Fenotipo de las cepas OP y OP-34710. b) Acumulación específica de PHB en las cepas OP y OP-34710 bajo las mismas condiciones. Se realizó un único experimento representativo.

Posteriormente, se comparó la acumulación de PHB en la cepa silvestre OP y la mutante OP-34710 en condiciones de limitación de carbono (medio Burk-Glucosa 30mM) (Figura 15). La cepa OP-34710 tuvo un retraso en su crecimiento; sin embargo, a las 60 horas alcanzó el nivel de crecimiento de la cepa OP (Figura 15a). El PHB acumulado en la cepa OP-34710 a las 60 y 72 horas fue 5.9 veces mayor a lo acumulado en la cepa OP, lo que correspondería con una degradación de PHB disminuida en la cepa mutante por la interrupción del gen *avin\_34710* (Figura 15b), pues la acumulación total resulta de la diferencia entre la síntesis y la degradación de PHB. Estos resultados sugieren que *Avin34710* está involucrada en la degradación de PHB de *A. vinelandii*. Los resultados son similares a los reportados en otras bacterias, en donde se observa un aumento en la acumulación del PHB en las cepas carentes de PHA depolimerasa, comparadas con su contraparte silvestre (Abe *et al.*, 2005; Adaya *et al.*, 2018; Handrick *et al.*, 2000; Moyao, 2018; Saegusa *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2008; York *et al.*, 2003).

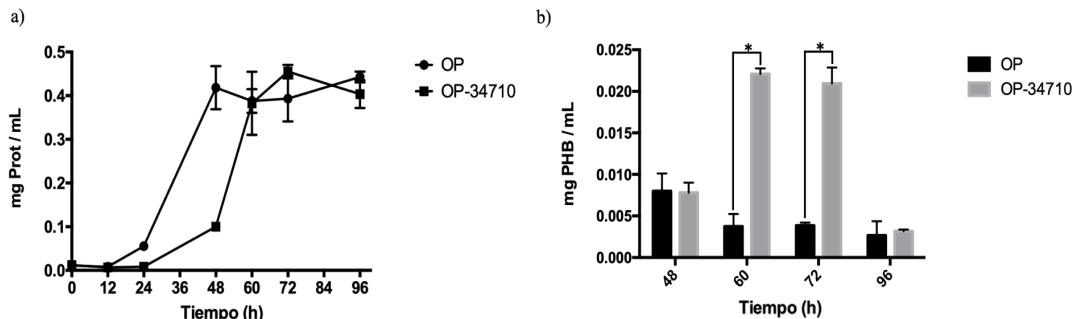


Figura 15. Comparación del crecimiento y la acumulación de PHB en cepas de *A. vinelandii* en medio Burk Glucosa 30mM. a) Curva de crecimiento de las cepas OP y OP-34710. b) Acumulación de PHB de las cepas OP y OP-34710. La diferencia significativa fue analizada mediante t-student ( $*p < 0.05$ ). El experimento se realizó por triplicado.

A las 96 horas, la concentración de PHB de la cepa mutante disminuyó hasta igualarse a la concentración de la cepa silvestre. Esta igualación en las concentraciones de PHB también se observó cuando la depolimerasa PhbZ1 fue inactivada en *A. vinelandii* (Adaya *et al.*, 2018). Es posible que alguna de las otras depolimerasas se expresen tardíamente en los cultivos y degraden el PHB después de las 72 horas, y así, se compense la ausencia de *avin\_34710*; sin embargo, no se tienen datos de los patrones de expresión temporal de las diferentes PHB depolimerasas, por lo que es necesario ahondar sobre estudios de regulación de genes en la cepa de *A. vinelandii* OP.

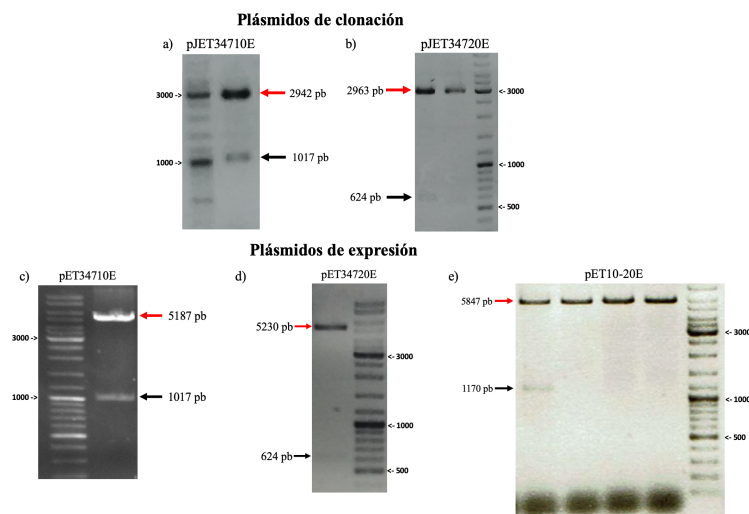
En el estudio de las proteínas asociadas al gránulo de PHB en *A. vinelandii*, solo se encontró la PHB depolimerasa PhbZ1 debido a que se analizaron únicamente algunas bandas separadas por electroforesis a las 48 horas del cultivo (fase estacionaria) (Adaya *et al.*, 2018). Es necesario un estudio más profundo de proteómica que permita definir si *Avin34710* u otras PHB depolimerasas están asociadas a los gránulos de PHB en *A. vinelandii*, ya que, como también se ha visto en *C. necator*, hay más de una PHB depolimerasa actuando en la degradación del polímero (Arikawa *et al.*, 2016; Eggers & Steinbuchel, 2013; Handrick *et al.*, 2000; Pohlmann *et al.*, 2006; Saegusa *et al.*, 2001; Sznajder & Jendrosseck, 2014; Uchino *et al.*, 2007, 2008; York *et al.*, 2003).

## 8.2 Expresión de las proteínas recombinantes *Avin34710* y *Avin34720* para los ensayos de degradación de PHB *in vitro* e *in vivo*

Para determinar si la proteína *Avin34710* presenta actividad enzimática de PHB depolimerasa *in vitro* e *in vivo*, y si la proteína *Avin34720* afecta dicha actividad *in vivo*, se construyeron y secuenciaron los plásmidos pJET34710E y pJET34720 que contienen a los genes *avin\_34710* y *avin\_34720*, respectivamente. Posteriormente, se transfirieron estos genes clonados al vector de pET24a(+) para expresar las proteínas *Avin34710* y *Avin34720*, resultando los plásmidos pET34710E y pET34720E. Por otra parte, se construyó un plásmido que contuviera ambos genes dispuestos en operón para su expresión simultánea (plásmido pET10-



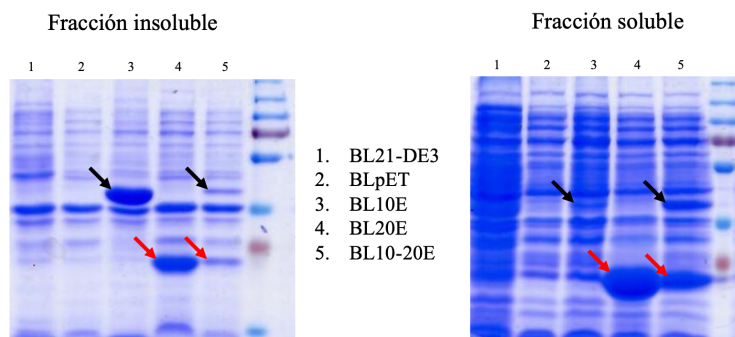
20E). La Figura 16 muestra los patrones de restricción que confirman la presencia de los genes de todos los plásmidos cuando fueron digeridos con las enzimas pertinentes.



*Figura 16. Comprobación de los plásmidos de clonación y expresión mediante digestiones enzimáticas. Digestiones de los plásmido de clonación: a) pJET34710E con NdeI y NotI; y b) pJET34720E con NdeI y XhoI. Digestiones de los plásmido de expresión: c) pET34710E con NdeI y NotI; d) pET34720E con NdeI y XhoI; y e) pET10-20E con NdeI. Las flechas rojas señalan la fracción del vector y las flechas negras la fracción del inserto clonado conteniendo el gen correspondiente.*

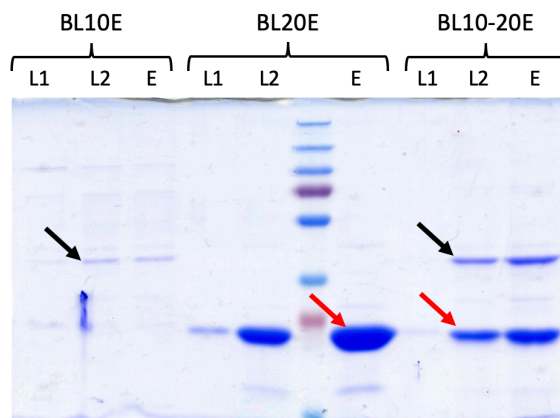
Para poder medir la actividad enzimática de la proteína Avin34710 y conocer el rol de la proteína Avin34720 en el metabolismo de PHB, es necesario contar con la proteína soluble. Para la obtención de las proteínas Avin34710 y Avin34720 solubles, se llevaron a cabo varias estrategias de cultivo de las cepas con los distintos plásmidos, para utilizarlas en los ensayos de degradación de PHB *in vitro* e *in vivo*. La primera aproximación consistió en intentar solubilizar a las proteínas con el detergente sarcosil. Primero, se realizaron cultivos con las cepas que expresan los genes de las proteínas Avin34710 y Avin34720, se determinó la concentración óptima de IPTG en 0.25 mM y se indujo el cultivo cuando alcanzó una  $DO_{600nm}$  de 0.4 - 0.6. Para el paso del rompimiento celular se utilizó amortiguador de lisis con 1 % de sarcosil ( $NaH_2PO_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH8). A pesar de que las proteínas Avin34710 y Avin34720 se encontraron en la fracción soluble, la mayor parte de ellas se halló en la fracción insoluble, por lo que se puede decir que el sarcosil al 1 % no fue capaz de solubilizar estas proteínas (Figura 17). Es posible que la forma insoluble se presentara porque estas proteínas tienen una región hidrofóbica (para su asociación con el gránulo de PHB), y al estar en contacto con el medio acuoso (en el paso de la sonicación), forma agregados proteicos que precipitan, aun habiendo utilizado sarcosil, que es un detergente que recubre las regiones hidrofóbicas (evitando la agregación proteica) (Burgess, 1996). En el presente estudio solamente se probó un tipo de detergente y una concentración, por lo que es posible que modificando estos parámetros mejore la solubilidad de las proteínas. Pese a la gran cantidad de proteína en la

fracción insoluble, la cantidad encontrada en la fracción soluble fue aceptable para intentar purificarlas en una columna de níquel, pues su clonación en el vector pET24a(+) añade una etiqueta de seis histidinas en la proteínas.



**Figura 17.** Sobreexpresión de las proteínas Avin34710 (36.7 kDa) y Avin34720 (21.78 kDa). Se analizaron en SDS-PAGE al 12% las diferentes fracciones obtenidas a partir de cultivos de las cepas que contienen los plásmidos de expresión, inducidos con 0.25 mM de IPTG. Con flechas negras se señalan las bandas correspondientes a Avin34710 y con flechas rojas las correspondientes a Avin34720.

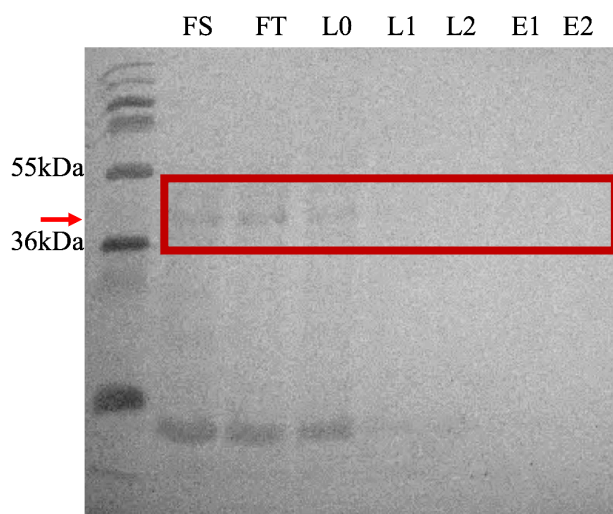
La Figura 18 muestra un SDS-PAGE de las proteínas Avin34710 y Avin34720 purificadas por columna de afinidad a níquel. Se obtuvo la proteína Avin34720 en una cantidad adecuada y soluble para realizar el ensayo de degradación de PHB *in vivo*. No obstante, la cantidad de la proteína Avin34710 obtenida a partir de la cepa BL10E fue insuficiente para los ensayos de degradación de PHB *in vivo*, por lo que se repitió el experimento con volúmenes de cultivo mayores; sin embargo, no se pudo purificar de esta forma. Es por ello que se intentó purificar Avin34710 a partir de la cepa BL10-20E; desafortunadamente, al realizar una cromatografía de exclusión molecular (para la separación de la proteína Avin34710 de Avin34720), no fue posible obtener la fracción que contenía a Avin34710.



**Figura 18.** Purificación de las proteínas Avin34710 (flecha negra) y Avin34720 (flecha roja) a partir de las cepas BL10E, BL20E y BL10-20E, visualizada en SDS-PAGE 12 %. L1, L2: lavados con amortiguador de lisis más 100 mM y 250 mM de imidazol, respectivamente; E: elución con amortiguador de lisis más 500 mM de imidazol.

Otra estrategia para obtener una mayor cantidad de la proteína Avin34710 soluble para los ensayos de actividad *in vitro*, fue usar la cepa de expresión

ArticExpress (DE3). Esta cepa está diseñada para expresar a bajas temperaturas (10-13 °C) proteínas con problemas de solubilidad, ya que coexpresa a las chaperonas adaptadas al frío Cpn10 y Cpn60 de la bacteria psicrófila *Oleispira antarctica* (Agilent Technologies, Inc. 2015). Para inducir la expresión de la proteína Avin34710 en la cepa Ar10E (Tabla 1) se estandarizó la concentración de IPTG, el tiempo de inducción y se probaron diferentes soluciones de lisis. Se determinó la concentración óptima de IPTG a 0.4 mM y se dejó induciendo por 16 h a 18 °C. Para el paso del rompimiento celular se utilizó un amortiguador de lisis que contiene: amortiguador de fosfatos 100 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM y PMSF 2mM, pH 6. En la Figura 19 se muestra en el primer carril (FS) que la proteína Avin34710 se expresó en la cepa Ar10E; sin embargo, al purificarla por columna de afinidad a níquel, la proteína se fue perdiendo conforme se realizaron los lavados (carriles L1, L2, E1 y E2), por lo que no se pudo obtener proteína pura.



*Figura 19. Purificación por columna de afinidad a níquel de la proteína Avin34710 visualizada en SDS-PAGE 12 %. Con la flecha roja se señala a Avin34710. FS: fracción soluble; FT: fracción soluble pasada por la columna; L0, L1, L2: lavados con amortiguador de lisis más 10 mM, 70 mM y 100 mM de imidazol, respectivamente; E1, E2: elución con amortiguador de lisis más 250 mM y 500 mM de imidazol, respectivamente.*

La siguiente estrategia que se probó fue desnaturalizar a la proteína Avin34710 con urea 8 M a partir de la cepa Ar10E, después se purificó por columna de afinidad a níquel y se renaturalizó por diálisis, que es una técnica utilizada para el replegamiento de proteínas ante condiciones desnaturalizantes (Tsumoto *et al.*, 2003; Yamaguchi & Miyazaki, 2014). Sin embargo, cuando la concentración de urea llegó a 2.03 M durante la diálisis anidada, la proteína se precipitó (Figura 20), impidiendo su recuperación en solución.

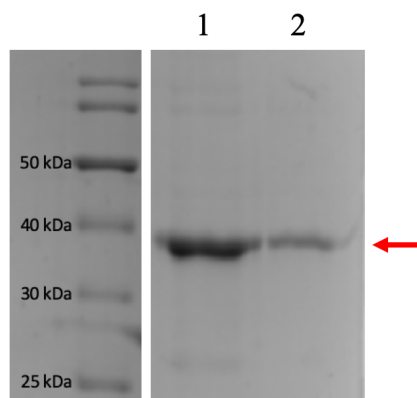


Figura 20. Renaturalización por diálisis de Avin34710 visualizada en SDS-PAGE 12 %. Con la flecha roja se señala a Avin34710. 1: Avin34710 purificada por columna de afinidad a níquel (desnaturalizada); 2: Avin34710 precipitada.

Ya que los intentos por purificar la proteína Avin34710 no tuvieron éxito y con la finalidad de determinar si la proteína Avin34710 tiene actividad de PHB depolimerasa, los ensayos de actividad enzimática *in vitro* se realizaron con la fracción soluble de los extractos de la cepa Ar10E, donde la proteína se encuentra soluble y en cantidad apreciable, y considerando que *E. coli* carece de actividad PHB depolimerasa. Para cuantificar la concentración de la proteína Avin34710 soluble presente en los extractos, se realizó una electroforesis en un SDS-PAGE para analizar el extracto total junto con una curva de lisozima (Figura 21). Con la ayuda del programa Image Studio Lite se determinó que la concentración de la proteína Avin34710 en el extracto total era 270 mg / mL. Es importante aclarar que otras proteínas de peso molecular similar podrían afectar la cuantificación en el gel; no obstante, la intensidad en las bandas de estas proteínas en los controles fue menor y por lo tanto la interferencia que pudieran causar fue despreciada.

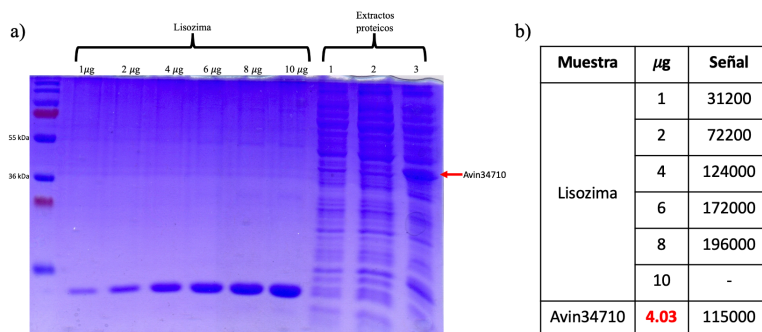
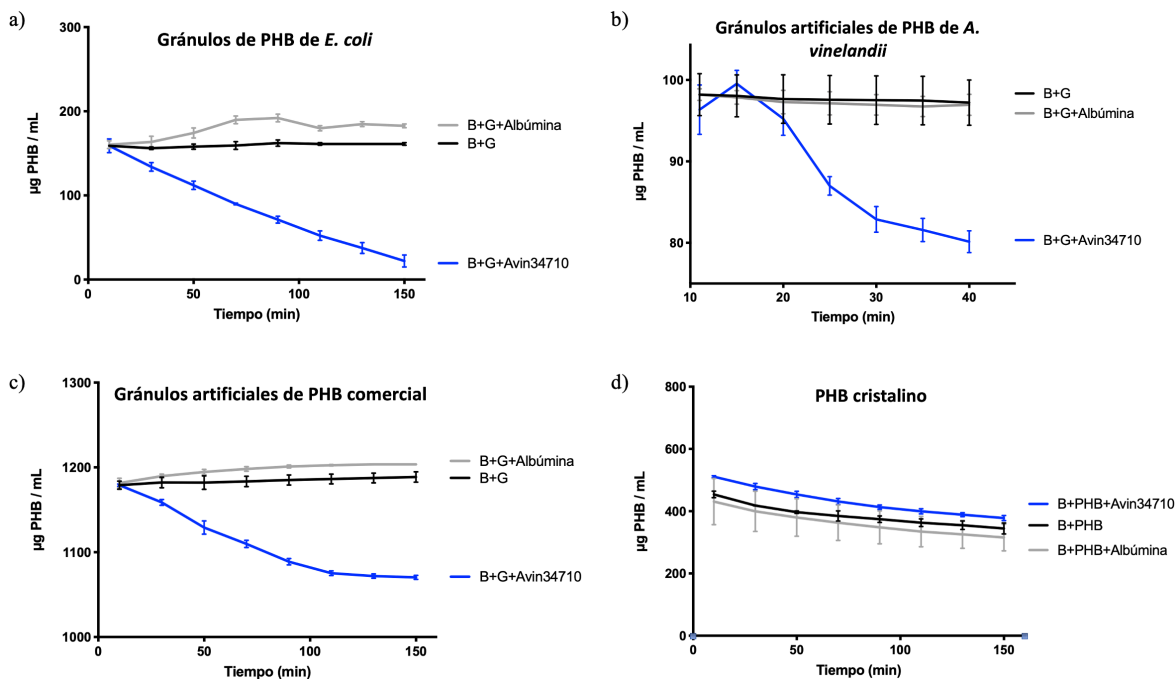


Figura 21. Cuantificación de Avin34710 con una curva de lisozima en SDS-PAGE 10 %. a) La curva de lisozima va de 1 a 10 µg. Extractos proteicos de las cepas: 1: Artixpress (DE3); 2: ArpET; y 3: Ar10E. b) Correlación entre µg de lisozima y señal detectada por el programa Imagen Studio Lite. En la concentración de 10 µg de lisozima, el programa no fue capaz de detectar señal.

### 8.3 Ensayo de degradación *in vitro* con la proteína Avin34710

El ensayo de degradación *in vitro* se realizó con el extracto proteico de la cepa Ar10E y cuatro distintos tipos de sustrato: gránulos de PHB nativos aislados de una cepa recombinante de *E. coli* que expresa el operón biosintético *phbBAC* de A.

*vinelandii*, gránulos artificiales de PHB producidos con el surfactante CTAB a partir de PHB cristalino extraído de *A. vinelandii*, gránulos artificiales de PHB comercial y PHB cristalino purificado de *A. vinelandii*. Los gránulos nativos de *A. vinelandii* no se utilizaron en este ensayo debido a que hay otras enzimas PHB depolimerasas presentes en esta bacteria. La degradación (depolimerización) de PHB se siguió en el tiempo y se cuantificó la actividad específica relativa de depolimerización de PHB dividiendo entre la proteína estimada añadida, esto con la finalidad de poder comparar la actividad entre los diferentes extractos. Para la determinación de estas actividades se utilizaron gránulos de PHB sin extracto proteico y albúmina como controles. La proteína Avin34710 tuvo actividad de PHB depolimerasa sobre los gránulos nativos de *E. coli* (20.3 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min) y sobre los gránulos artificiales preparados tanto de PHB de *A. vinelandii* (16.7 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min) como de PHB comercial (19.1 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min) (Figura 22). Por el contrario, la proteína Avin34710 no degradó el PHB cristalino. Estos resultados demuestran que la proteína Avin34710 es una PHB depolimerasa que degrada PHB amorfo, siendo esto una característica típica de las depolimerasas intracelulares (Abe *et al.*, 2005; Adaya *et al.*, 2018; Handrick *et al.*, 2000; Moyao, 2018; Saegusa *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2008; York *et al.*, 2003). Como se esperaba, no se detectó actividad en los controles correspondientes.



**Figura 22. Actividad enzimática de la proteína Avin34710 in vitro.** a) Actividad sobre gránulos de PHB de *E. coli*: 20.3 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min. b) Actividad sobre gránulos artificiales de PHB de *A. vinelandii*: 16.7 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min. c) Actividad sobre gránulos artificiales de PHB comercial: 19.1 ng PHB depolimerizado /  $\mu\text{g}$  proteína min. d) No tuvo actividad sobre PHB cristalino. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 8.3 Efecto de las proteínas Avin34710 y Avin34720 en la producción de PHB *in vivo* en *E. coli* BL21 (DE3)

Para confirmar la actividad de depolimerización de PHB de la proteína Avin34710 *in vivo* y estudiar el efecto de la proteína Avin34720 sobre el metabolismo de PHB, se analizó el efecto de la expresión heteróloga de estas proteínas en *E. coli* BL21 (DE3), solas y en conjunto, sobre la acumulación de PHB. Esto permitió eliminar el efecto que otras proteínas PHB depolimerasas o phasinas de *A. vinelandii* pudieran tener en los ensayos. Se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) productora de PHB con el plásmido pMPMT6/phbBAC, que expresa el operón biosintético de PHB de *A. vinelandii* y que es compatible con el plásmido pET24a(+) en el que se encuentran clonados los genes que codifican para las proteínas Avin34710 y/o Avin34720. Las cepas con los diferentes plásmidos fueron nombradas de la siguiente manera: BACpET (control pET24a(+) vacío), BAC10 (expresa a Avin34710), BAC20 (expresa a Avin34720) y BAC1020 (expresa a Avin34710 y Avin34720) (Tabla 1). En este experimento las células se crecieron en matraces con medio líquido y a las 3 horas de cultivo se indujo con arabinosa la expresión del operón biosintético para iniciar la producción de PHB. A las 10 horas se indujo con IPTG la expresión de las proteínas Avin34710 y/o Avin34720.

Como se puede observar en la Figura 23, la cepa BAC10 acumuló menos PHB a las 12 y 24 horas (0.0547 y 0.0529 mg PHB / mg proteína, respectivamente) en comparación con la cepa control, BACpET (0.0854 y 0.1054 mg PHB / mg proteína, respectivamente). La cepa BAC20 acumuló más del doble del polímero a las 12 y 24 horas (0.1548 y 0.2184 mg PHB / mg proteína, respectivamente) comparandola con BACpET. La cepa BAC1020 acumuló más PHB a las 12 y 24 horas (0.1363 y 0.1610 mg PHB / mg proteína) en comparación con la cepa BAC10, lo que indica que Avin34720 no esta modulando positivamente a Avin34710. Aunque no existe diferencia estadísticamente significativa entre las cepas BAC20 y BAC1020, se observó que BAC1020 produjo ligeramente menos PHB que BAC20 (el experimento se realizó en cinco ocasiones, todos con la misma tendencia), por lo que se piensa que Avin34720 tampoco modula negativamente a Avin34710 en estas condiciones.

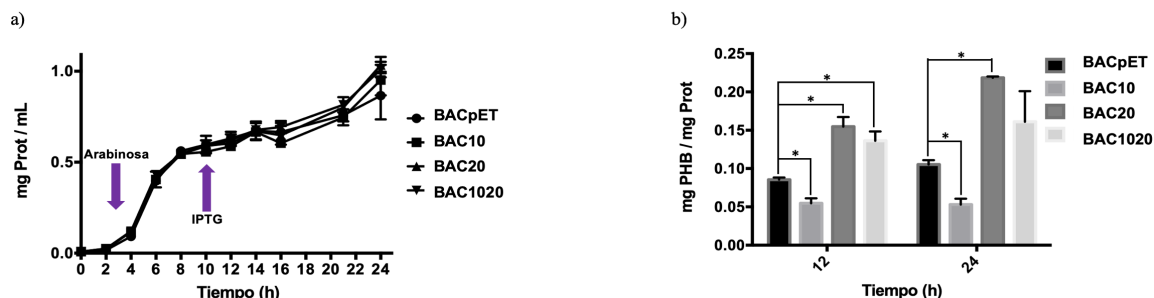


Figura 23. Actividad enzimática de las proteínas Avin34710 y Avin34720 *in vivo*. a) Cuantificación del crecimiento (proteína) de las cepas expresión. b) Comparación de la acumulación de PHB en las cepas de expresión. La expresión del operón biosintético de PHB se indujo con arabinosa 10 mg/mL a las 3 h de iniciado el cultivo. Las proteínas Avin34710 y Avin34720 se indujeron con IPTG 0.5 mM a las 10 h de iniciado el cultivo. La diferencia significativa fue analizada mediante t-student (\* $p < 0.05$ ). El ensayo se realizó por triplicado.

Con estos datos se puede concluir que Avin34710 degrada PHB amorfo y que la phasina Avin34720 afecta positivamente la síntesis de PHB *in vivo* en *E. coli* y no su depolimerización. Aunque no está del todo claro el mecanismo por el cual la phasina Avin34720 aumenta la acumulación de PHB, existen reportes en la literatura similares a esta observación en phasinas que no presentan similitud con Avin34720. Por ejemplo, Almeida y colaboradores (2007) descubrieron que al expresar la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en una cepa de *E. coli* K1016 productora de PHB, la cepa acumuló más PHB comparado con la cepa que no expresaba la PhaP (con glucosa y glicerol como fuente de carbono). Sin embargo, al igual que en este trabajo, se desconoce el mecanismo involucrado.

Este trabajo permitió la caracterización de la PHB depolimerasa Avin34710 que se suma a la lista de PHB depolimerasas ya caracterizadas en *A. vinelandii* (Adaya *et al.*, 2018; Moyao, 2018), lo que demuestra que esta bacteria posee un sistema complejo de depolimerización de PHB, como en el caso de *C. necator* (Arikawa *et al.*, 2016; Eggers & Steinbuchel, 2013; Handrick *et al.*, 2000; Pohlmann *et al.*, 2006; Saegusa *et al.*, 2001; Sznajder & Jendrossek, 2014; Uchino *et al.*, 2007, 2008; York *et al.*, 2003). Un aspecto de gran interés industrial que resta por averiguar radica en si la PHB depolimerasa Avin34710 afecta al peso molecular del PHB, como es el caso de PhbZ1 de *A. vinelandii*, cuya ausencia aumenta drásticamente el peso molecular promedio del PHB producido y evita su degradación en biorreactores de producción (Adaya *et al.*, 2018).

Si bien, la phasina Avin34720 participa de manera positiva en la síntesis de PHB en *E. coli*, se debe profundizar en el papel que juega esta proteína en la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, para tener un mejor panorama del complejo entramado de proteínas que están involucradas en la síntesis y degradación de PHB. Esto podría ayudar a tener mejores blancos para diseñar o modificar cepas sobreproductoras de PHB.

## 9. CONCLUSIONES

La proteína Avin34710 es una PHB depolimerasa y está involucrada en la degradación de PHB en *A. vinelandii*, pues presenta actividad hidrolítica *in vitro* sobre el PHB amorfo, moviliza PHB cuando se expresa en *E. coli* y la inactivación de su gen *avin\_34710* incrementa la cantidad de PHB acumulada en *A. vinelandii* con respecto a la cepa silvestre.

La phasina Avin34720 estimula la síntesis de PHB y podría ser un activador de la PHA sintasa, como demuestra el ensayo de acumulación de PHB *in vivo* en *E. coli*.



## 10. PERSPECTIVAS

- Investigar el efecto de la inactivación y la sobreexpresión del gen *avin\_34720* en la acumulación de PHB en *A. vinelandii* y evaluar su potencial para mejorar la producción de bioplásticos.
- Establecer el mecanismo por el cual Avin34720 afecta la síntesis de PHB, analizando sus interacciones con las enzimas biosintéticas de PHB y sus efectos sobre estas actividades *in vitro*.
- Determinar si Avin34720 afecta la actividad de la PHB depolimerasa Avin34710 *in vitro* usando las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* y también bajo condiciones fisiológicas con mutantes de *A. vinelandii* sencillas y dobles.
- Determinar si la inactivación de Avin34710 afecta el peso molecular del PHB en *A. vinelandii* y las propiedades termomecánicas del polímero resultante.

## 11. REFERENCIAS

- Abe, T., Kobayashi, T., & Saito, T. (2005). Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6982–6990.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2693–2707.
- Alexeyev, M., Shokolenko, I., & Croughan, T. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63–67.
- Almeida, A. de, Nickel, P., Giordano, A., & Pettinari, M. (2007). Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24), 7912–7916.
- Alonso, I., Ruiz, S., Quintanilla, D., & Zarcero, S. (2009). Analisis Instrumental. *Netbiblo*, 33–64.
- Amor, S., Rayment, T., & Sanders, J. (2002). Poly(hydroxybutyrate) *in vivo*: NMR and x-ray characterization of the elastomeric state. *Macromolecules*, 24(16), 4583–4588.
- Anis, S., Mohd Annuar, M., & Simarani, K. (2018). Microbial biosynthesis and *in vivo* depolymerization of intracellular medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates as potential route to platform chemicals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(6), 784–796.
- Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., & Matsumoto, K. (2016). A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology*, 227, 94–102.
- Beale, J., & Foster, J. (1996). Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry*, 35(14), 4492–4501.
- Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., & Skulachev, V. P. (1998). Two NADH: ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1363(2), 125–133.
- Bertsova, Y., Bogachev, A., & Skulachev, V. (2001). Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6869–6874.
- Braaz, R., Wong, S., & Jendrossek, D. (2002). Production of PHA depolymerase A (PhaZ5) from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 237–241.

- Brandi, H., Bachofen, R., Mayer, J., & Wintermantel, E. (1995). Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 143–153.
- Briese, B., Schmidt, B., & Jendrossek, D. (1994). *Pseudomonas lemoignei* has five poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) depolymerase genes: A comparative study of bacterial and eukaryotic PHA depolymerases. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 2(2), 75–87.
- Burgess, R. (1996). Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods in Enzymology*, 273, 145–149.
- Bush, J., & Wilson, P. (1959). A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature*, 184(4683), 381–381.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2624–2628.
- Centeno-Leija, S., Huerta-Beristain, G., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., Gosset, G., & Martínez, A. (2014). Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 687–696.
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.
- Chen, C., Don, T., & Yen, H. (2006). Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41(11), 2289–2296.
- Chen, G. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446.
- Chen, G., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565–6578.
- Chisnell, J., Premakumar, R., & Bishop, P. (1988). Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 170(1), 27–33.
- Chowdhury-Paul, S., Pando-Robles, V., Jiménez-Jacinto, V., Segura, D., Espín, G., & Núñez, C. (2018). Proteomic analysis revealed proteins induced upon *Azotobacter vinelandii* encystment. *Journal of Proteomics*, 181, 47–59.
- de Koning, G., & Lemstra, P. (1992). The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] *in vivo*. *Polymer*, 33(15), 3292–3294.
- Doi, Y., & Steinbüchel, A. (2002). Polyesters II: properties and chemical synthesis. 3<sup>o</sup> edition. *Wiley-Blackwell*.

- Dos Santos, P. (2019). Genomic manipulations of the diazotroph *Azotobacter vinelandii*. *Metalloproteins*, 1876, 91–109.
- Eggers, J., & Steinbuchel, A. (2013). Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3213–3223.
- Espín, G. (2001). *Biología de Azotobacter vinelandii*. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
- Fialho, A., Zielinski, N., Fett, W., Chakrabarty, A., & Berry, A. (1990). Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B procaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 436–443.
- Forsyth, W., Hayward, A., & Roberts, J. (1958). Occurrence of poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *Nature*, 182(4638), 800–801.
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L., Escapa, I., Sanz, J., García, J., & Prieto, M. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442: PhaF role in PHA granule location and segregation. *Molecular Microbiology*, 79(2), 402–418.
- García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123.
- Gebauer, B., & Jendrossek, D. (2006). Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6094–6100.
- González, Y., Meza, J., González, O., & Córdoba, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.
- Hales, B., Case, E., Morningstar, J., Dzeda, M., & Mauterer, L. (1986). Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 25(23), 7251–7255.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Kimmig, P., & Jendrossek, D. (2004). The «intracellular» poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7243–7253.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., & Jendrossek, D. (2001). A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36215–36224.
- Handrick, R., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2000). Mobilization of poly(3-

- hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5916–5918.
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology*, 157(11), 3014–3023.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158(8), 1953–1963.
- Hisano, T., Kasuya, K., Tezuka, Y., Ishii, N., Kobayashi, T., Shiraki, M., Oroudjev, E., Hansma, H., Iwata, T., Doi, Y., Saito, T., & Miki, K. (2006). The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters. *Journal of Molecular Biology*, 356(4), 993–1004.
- Horowitz, D., & Sanders, J. (1994). Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: Preparation, characterization, and biological implications. *Journal of the American Chemical Society*, 116(7), 2695–2702.
- Jaeger, K., Ransac, S., Dijkstra, B., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1), 29–63.
- Jaeger, K., Dijkstra, B., & Reetz, M. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 315–351.
- Jendrossek, D., Frisse, A., Behrends, A., Andermann, M., Kratzin, H., Stanislawski, T., & Schlegel, H. (1995). Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 596–607.
- Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 403–432.
- Jendrossek, D., Muller, B., & Schlegel, H. (1993). Cloning and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid)-depolymerase gene locus, *phaZ1*, of *Pseudomonas lemoignei* and its gene product. *European Journal of Biochemistry*, 218(2), 701–710.
- Joerger, R., Jacobson, M., Premakumar, R., Wolfinger, E., & Bishop, P. (1989). Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 1075–1086.
- Jones, C., Brice, J., Wright, V., & Ackrell, B. (1973). Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Letters*, 29(2), 77–81.
- Kasuya, K., Tezuka, Y., Ishii, N., Yamagata, Y., Shiraki, M., Saito, T., Hisano, T., Iwata, T., & Doi, Y. (2007). Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene from *Penicillium funiculosum*. *Macromolecular Symposia*, 249–

250(1), 540-544.

- Kessler, B., & Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 97–104.
- Khanna, S., & Srivastava, A. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619.
- Kuchta, K., Chi, L., Fuchs, H., Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2007). Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Biomacromolecules*, 8(2), 657–662.
- Law, J., & Slepecky, R. (1960). Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82, 33-36.
- Lee, S. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14.
- Lee, S. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 14(11), 431–438.
- Lewis, I. (1937). Cell inclusions and the life cycle of *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*, 34(2), 191–205.
- Liebergesell, M., Schmidt, B., & Steinbüchel, A. (1992). Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiology Letters*, 99(2-3), 227–232.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Luque, F., & Pau, R. N. (1991). Transcriptional regulation by metals of structural genes for *Azotobacter vinelandii* nitrogenases. *Molecular & General Genetics: MGG*, 227(3), 481–487.
- Madison, L., & Huisman, G. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53.
- Manchak, J., & Page, W. (1994). Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology*, 140(4), 953–963.
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G., & Castañeda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3-4), 147–159.
- Mayer, M. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene*, 163(1), 41–46.
- Mergaert, J., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., & Kersters, K. (1992). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(2–4), 317–321.

- Mergaert, J., & Swings, J. (1996). Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5), 463–469.
- Merrick, J., & Doudoroff, M. (1964). Depolymerization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 88(1), 60–71.
- Mezzina, M., & Pettinari, M. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060–5067.
- Millán, M., Salazar, M., Segura, D., Castillo, T., Díaz-Barrera, Á., & Peña, C. (2017). Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum. *Journal of Biotechnology*, 259, 50–55.
- Millán, M., Segura, D., Galindo, E., & Peña, C. (2016). Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension. *Process Biochemistry*, 51(8), 950–958.
- Moyao, A. (2018). Análisis del gen *avin33500* de *Azotobacter vinelandii* y su implicación en la degradación de PHB. Tesis de Licenciatura, Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Muriel-Millán, L., Castellanos, M., Hernández-Eligio, J., Moreno, S., & Espín, G. (2014). Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2173–2182.
- Noar, J., & Bruno-Bárcena, J. (2018). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, 164(4), 421–436.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme I<sup>NPr</sup>, NPr and IIA<sup>Ntr</sup> are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 244–254.
- Page, W., & Tigerstrom, M. (1982). Iron- and molybdenum-repressible outer membrane proteins in competent *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 237–242.
- Pan, P., & Inoue, Y. (2009). Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 605–640.
- Pau, R., Mitchenall, L., & Robson, R. (1989). Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 124–129.
- 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. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293.
- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo-Urbe, A., & Segura, D. (2014).

- Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64(1), 39–47.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servin-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5672–5677.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2011). Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 157(10), 2795–2807.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 555–563.
- Pfeiffer, D., Wahl, A., & Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *eutropha. Molecular Microbiology*, 82(4), 936–951.
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233–247.
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (1994). Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4328–4337.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–1262.
- Poole, R. K., & Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*—Roles of the terminal oxidases. *Bioscience Reports*, 17(3), 303–317.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 6(2), 552–560.
- Premakumar, R., Lemos, E., & Bishop, P. (1984). Evidence for two dinitrogenase reductases under regulatory control by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 797(1), 64–70.
- Qi, Q., Steinbüchel, A., & Rehm, B. (2000). *In vitro* synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): Purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), 37–43.



- Romen, F., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2004). Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of *Schlegelella* sp. KB1a. *Archives of Microbiology*, 182(2-3), 157–164.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C., & Saito, T. (2001). Cloning of an intracellular poly[D(X)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 94–100.
- Sagong, H., Son, H., Choi, S., Lee, S., & Kim, K. (2018). Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 790–805.
- Schober, U., Thiel, C., & Jendrossek, D. (2000). Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1385–1392.
- Schultheiss, D., Handrick, R., Jendrossek, D., Hanzlik, M., & Schüler, D. (2005). The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2416–2425.
- Segura, D., & Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 414–418.
- Segura, D., & Espín, G. (1998). Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-β-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4790–4798.
- Shinomiya, M., Iwata, T., Kasuya, K., & Doi, Y. (1997). Cloning of the gene for poly(3-hydroxybutyric acid) depolymerase of *Comamonas testosteroni* and functional analysis of its substrate-binding domain. *FEMS Microbiology Letters*, 154(1), 89–94.
- Steinbüchel, A., & Valentin, H. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), 219–228.
- Steinbüchel, A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. En D. Byrom (Ed.), *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources* (pp. 123–213). Palgrave Macmillan UK.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Liebergesell, M., Wieczorek, R., Babel, W., Föllner, C., Madkour, M. H., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A., & Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 94–105.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555.
- Sznajder, A., & Jendrossek, D. (2014). To be or not to be a poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, highly active PHB depolymerases with no detectable role in mobilization of accumulated

- PHB. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), 4936–4946.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8.
- Tyo, K., Fischer, C., Simeon, F., & Stephanopoulos, G. (2010). Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metabolic Engineering*, 12(3), 187–195.
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., & Jendrossek, D. (2007). Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8250–8256.
- Uchino, K., Saito, T., & Jendrossek, D. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1058–1063.
- Valentin, H., Stuart, E., Fuller, R., Lenz, R., & Dennis, D. (1998). Investigation of the function of proteins associated to polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas putida* BMO1. *Journal of Biotechnology*, 64(2-3), 145–157.
- van Wegen, R., Lee, S., & Middelberg, A. (2001). Metabolic and kinetic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(1), 70–81.
- Wang, F., & Lee, S. (1997). Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3703–3706.
- Wang, Y., Yin, J., & Chen, G. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 59–65.
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425–2435.
- Witholt, B., & Kessler, B. (1999). Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(3), 279–285.
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235–251.
- Yanajara, D. (2012). Estudio de la degradación intracelular del polihidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- York, G., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A., Stubbe, J., & Sinskey, A. (2003). *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D-(X)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3788–

3794.

- Zhang, J., Shishatskaya, E., Volova, T., da Silva, L., & Chen, G. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*, 86, 144–150.
- Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 5–21.