



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

Estudio del papel de la proteína Avin03910 en el metabolismo del poliéster
polihidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. LIBERTAD ALEJANDRA ADAYA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ
INSTITUTO DE BIOTECNLOGÍA

COMITÉ TUTORAL:

Dr. GUILLERMO GOSSET LAGARDA
INSTITUTO DE BIOTECNLOGÍA
Dr. ALEJANDRO GARCÍA DE LOS SANTOS
CENTRO DE CIENCIAS GENOMICAS

Cuernavaca, México, septiembre de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Tesis Doctoral:

Estudio del papel de la depolimerasa Avin03910 en el metabolismo del poliéster polihidroxitirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*.
que para obtener el grado de Doctora en Ciencias presenta:

Biól. Exp. Libertad Alejandra Adaya García

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 6, del departamento de Microbiología Molecular en el Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la dirección del Dr. Daniel Genaro Segura González.

El comité tutorial que evaluó el avance del proyecto de investigación se integró por los Dres. Guillermo Gosset Lagarda y Alejandro García de los Santos.

LAAG recibió una beca para estudios de doctorado otorgada por CONACyT (291241). El trabajo experimental fue financiado por donativos del CONACyT (255158) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de Innovación Tecnológica (PAPIIT IT200415) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Clasificación de los PHAs	7
Poli- β -hidroxibutirato y su metabolismo	8
Aplicaciones de los PHAs	10
Gránulos de PHAs	11
Proteínas involucradas en el metabolismo de los PHAs	13
PHA sintasas	13
Phasinas	14
PHA y PHB Depolimerasas	17
Depolimerasas extracelulares	19
Depolimerasas intracelulares	20
Regulación de la degradación de PHAs	23
<i>Azotobacter vinelandii</i> , una bacteria productora de PHB	25
Antecedentes	30
Hipótesis	35
Objetivo General	35
Objetivos específicos	35
Metodología	36
Cepas Bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	36
Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas	38

Construcción de mutantes y complementación	38
Expresión de PhbZ1 y PhbP2	41
Western Blot	42
Cuantificación de PHB	42
Aislamiento de gránulos nativos de PHB	43
Producción de gránulos artificiales de PHB	43
Determinación de la actividad hidrolítica PHB endógena de nPHB gránulos	44
Determinación de la actividad tiolítica de PHB	44
Determinación de la actividad de PHB sintasa	45
Condiciones de cultivo en biorreactores bajo condiciones limitantes de oxígeno	45
Análisis del peso molecular del PHB producido	46
Ensayos de doble híbrido	46
RT-PCR (qRT-PCR)	47
Fusiones Transcripcionales	48
Resultados	49
La proteína Avin03910 expresada en <i>E. coli</i> presenta actividad hidrolítica sobre gránulos de PHB amorfo.	49
La inactivación del gen <i>phbZ1</i> afecta negativamente la actividad hidrolítica de PHB presente en los gránulos nPHB de <i>A. vinelandii</i> .	51
PhbZ1 participa también en la degradación de nPHB por tiólisis en presencia de CoA libre.	53
La proteína PhbZ1 no tiene actividad significativa de PHB sintasa.	55
La mutante PhbZ1 no tiene fenotipo en cultivos en matraces.	58
Efectos de la inactivación de <i>phbZ1</i> sobre la cantidad de PHB producido en biorreactores y su peso molecular.	61
PhbF es un regulador transcripcional negativo de PhbZ1.	66

PhbP2 interacciona con la phasina PhbP1	67
Discusión	70
Conclusiones	78
Perspectivas	79
Referencias	80
Anexo	89

Adaya L., Millán M, Peña C, Jendrossek D, Espin G., Tinoco-Valencia R, Guzman J, Pfeiffer D, Segura D. 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* (2018) 102:2693–2707 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y>

RESUMEN

A. vinelandii es una bacteria capaz de producir el poliéster poli- β -hidroxibutirato (PHB) como reserva de carbono y energía, este polímero es utilizado como plástico biodegradable y las enzimas capaces de degradarlo se denominan PHB depolimerasas. En este trabajo se identificó una nueva proteína de esta bacteria con actividad PHB depolimerasa. Esta enzima (PhbZ1), se encontró asociada a los gránulos de PHB y mostró actividad de depolimerización *in vitro* (hidrólisis) al utilizar como sustrato gránulos de PHB nativos o artificiales (PHB amorfo), pero no sobre gránulos de PHB cristalino. Los gránulos nativos de PHB (nPHB) aislados de la mutante PhbZ1⁻ (cepa PhbZ1) presentaron una hidrólisis endógena disminuida del poliéster *in vitro*, en comparación con los de la cepa silvestre. Adicionalmente, se probó la degradación *in vitro* en presencia de coenzima A (CoA) y se encontró degradación tiolítica del polímero en los gránulos de nPHB de la cepa silvestre, resultando la formación de β -hidroxibutiril-CoA, pero ésta no se detectó en los gránulos de la cepa mutante, demostrando que PhbZ1 es responsable de la tiólisis de PHB. Estudios previos de producción de PHB en biorreactor, mostraron que en la fase estacionaria de crecimiento se presenta una disminución en el peso molecular promedio (Mw) del PHB acumulado, con la aparición concomitante de una fracción de polímeros de menor peso molecular. Esta disminución correlacionó con un aumento en la actividad de depolimerización de PHB. En este trabajo mostramos que la inactivación de PhbZ1 elimina la disminución en el Mw y la aparición de los polímeros de bajo peso molecular, permitiendo además una mayor

acumulación de PHB. Estos resultados sugieren que PhbZ1 tiene un papel en la degradación de PHB en cultivos en biorreactores y su inactivación permite la producción de un polímero de alto peso molecular uniforme.

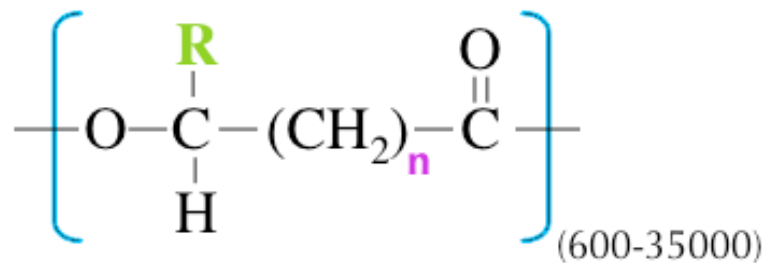
ABSTRACT

A. vinelandii is a Gram-negative bacterium that produces poly- β -hydroxybutyrate (PHB) as a carbon and energy reserve, this polymer can be used as a biodegradable plastic and the enzyme capable to degrade it are called PHB depolymerases. In this study, a novel poly-3-hydroxybutyrate depolymerase was identified from this bacterium. This enzyme (PhbZ1) is associated to the PHB granules and when expressed in *Escherichia coli*, it showed *in vitro* PHB depolymerizing activity on native or artificial PHB granules (amorphous PHB), but not on crystalline PHB. Native PHB (nPHB) granules isolated from a *phbZ1* mutant had a diminished endogenous *in vitro* hydrolysis of the polyester, when compared to the granules of the wild-type strain. This *in vitro* degradation was also tested in the presence of free coenzyme A (CoA). Thiolytic degradation of the polymer was observed in the nPHB granules of the wild type, resulting in the formation of 3-hydroxybutyryl-CoA, but was absent in the granules of the mutant. It was previously reported that cultures of *A. vinelandii* OP grown in a bioreactor showed a decrease in the weight average molecular weight (Mw) of the PHB after 20 h of culture, with an increase in the fraction of polymers of lower molecular weight (Mw). This decrease was correlated with an increase in the PHB depolymerase activity during the culture. Here we show that in the *phbZ1* mutant, neither the decrease in the Mw nor the appearance of a low molecular weight polymers occurred. In addition, a higher PHB accumulation was observed in the cultures of the *phbZ1* mutant. These results suggest that PhbZ1 has a role in the degradation of PHB in cultures in bioreactors and its inactivation allows the production of a polymer of a uniform high molecular weight.

INTRODUCCIÓN

Polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos, también conocidos como PHAs, son poliésteres alifáticos que constan de cadenas de carbono, hidrógeno y oxígeno. Están conformados por unidades monoméricas de diferentes hidroxiacilos polimerizados de forma lineal (Figura 1). Son sintetizados por una gran variedad de bacterias aerobias, anaerobias, heterótrofas o fotosintéticas como reserva de carbono y energía [1], se almacenan en el citoplasma de las células en forma de gránulos intracelulares, sin afectar la presión osmótica [2].



$n = 1$	$R =$ hidrógeno	poli-(3-hidroxiopropionato)
	$R =$ metilo	poli-(3-hidroxiбутirato)
	$R =$ etilo	poli-(3-hidroxiуalerato)
	$R =$ propilo	poli-(3-hidroxihexanoato)
	$R =$ pentilo	poli-(3-hidroxiocetanoato)
	$R =$ nonilo	poli-(3-hidroxiуodecanoato)
$n = 2$	$R =$ hidrógeno	poli-(4-hidroxiбутirato)
$n = 3$	$R =$ hidrógeno	poli-(5-hidroxiуalerato)

Figura 1. Estructura química de monómeros de PHAs [3]

Se conocen alrededor de 150 diferentes PHAs, con más de 90 géneros bacterianos que los producen a partir de diferentes sustratos, como carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, alcanos, alquenos, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos, aunque también pueden ser producidos a partir de fuentes de carbono alternativas, como melaza, licor de maíz y salvado de arroz [4].

Desde el punto de vista biotecnológico los PHAs son muy importantes, ya que pueden usarse como materiales con propiedades muy semejantes a las de los plásticos derivados del petróleo, por lo que se emplean para producir plásticos biodegradables y biocompatibles [5]. A partir de la década de 1980 muchas empresas han intentado producir diversos PHAs a escala piloto o industrial (Tabla 1), basados en la expectativa de que los precios del petróleo suban y aunado a las nuevas tecnologías en biología molecular.

Tabla 1. Empresas productoras de PHAs en el mundo [6].

Compañía	Tipo de PHA	Producción a escala	Periodo	Aplicaciones
ICI, UK	PHBV	300	1980s -1990s	Embalaje
Chemic Linz, Austria	PHB	20-100	1980s	Embalaje, transporte de medicamentos
btF, Austria	PHB	20-100	1990s	Embalaje, transporte de medicamentos
Biomers, Alemania	PHB	Desconocido	1990s al presente	Embalaje, transporte de medicamentos
BASF, Alemania	PHB, PHBV	Escala Piloto	1980 al 2005	Mezclado con ecoflex
Metabolix, Estados Unidos	Varios PHAs	Desconocido	1980s al presente	Embalaje
Tepha, Estados Unidos	Varios PHAs	PHA implantes médicos	1990s al presente	Bio-implantes médicos
ADM, Estados Unidos	Varios PHAs	50000	2005 al presente	Materias primas
P&G, Estados Unidos	Varios PHAs	Fabricante por contrato	1980s al 2005	Embalaje
Monsanto, Estados Unidos	PHB, PHBV	Producción en planta de PHA	1990s	Materias primas
Meridian Estados Unidos	Varios PHAs	10000	2007 al presente	Materias primas
Kaneka, Japon (con P&G)	Varios PHAs	Desconocido	1990 al presente	Embalaje
Mitsubishi, Japon	PHB	10	1990s	Embalaje
Biocycles, Brasil	PHB	100	1990 al presente	Materias primas
Bio-On , Italia	PHA (no definido)	10000	2008 al presente	Materias primas
Zhejuang Tian An, China	PHBV	2000	1990s al presente	Materias primas
Jiangmen Biotech Ctr., China	PHBHHx	Desconocido	1990s	Materias primas
Yikeman, Shandong, China	PHA (no definido)	3000	2008 al presente	Materias primas
Tianjin Nother Food, China	PHB	Escala Piloto	1990s	Materias primas

Shantou Lianyi Biotech, China	Varios PHAs	Escala Piloto	1990s al 2005	Embalaje y medicas
Jian Su Nan Tian, China	PHB	Escala piloto	1990s al presente	Materias primas
Shenzhen O Bioer, China	Varios PHAs	Desconocido	2004 al presente	Desconocido
Tiajin Green Bio-Science (+DSM)	P3HB4HB	10000	2004 al presente	Materias primas y embalaje
Shadong Lukang, China	Varios PHA	Escala Piloto	2005 al presente	Materias primas y medicas

Clasificación de los PHAs

Los PHAs contienen monómeros de hidroxiacidos formados por 3 a 15 carbonos y generalmente consisten en cadenas de 1000-10000 monómeros [4]. Los monómeros pueden presentar grupos alifáticos y en algún caso aromáticos, con cadenas saturadas o insaturadas. Puesto que el tipo de monómeros presentes determina sus propiedades fisicoquímicas como materiales, los PHAs se clasifican en dos grupos con base en el número de carbonos de sus monómeros: 1) PHAs de cadena corta (PHA_{SCL}) que tienen residuos de 3 a 5 átomos de carbono, y 2) PHAs de cadena media (PHA_{MCL}), con residuos de 6 a 15 átomos de carbono [4]. Los PHA_{SCL} como materiales son rígidos y quebradizos con un alto grado de cristalinidad (60-80%), mientras que los PHA_{MCL} son más flexibles con baja cristalinidad (25%), baja resistencia a la tracción, alta elongación al rompimiento, baja temperatura de fusión y temperatura de transición vítrea por debajo de la temperatura del ambiente [2]. El tipo de monómeros que se incorporan depende de la naturaleza química de la fuente de carbono utilizada en los cultivos, las vías metabólicas presentes en la bacteria y del tipo de enzima polimerizante (PHA sintasa) que tenga la bacteria [4].

Poli- β -hidroxibutirato y su metabolismo

El poli- β -hidroxibutirato (PHB) es el PHA más común y mejor conocido, está constituido por monómeros de β -hidroxibutirato unidos por medio de enlaces éster que se forman entre el grupo carboxilo y el hidroxilo de los monómeros [7]. Este polímero fue el primer PHA descubierto, en *Bacillus megaterium*, por el microbiólogo Maurice Lemoigne del Instituto Pasteur en 1926 [8]. La ruta de biosíntesis de PHB en distintas bacterias consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotilasa para generar acetoacetil-CoA, que es reducido por la acetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo β -hidroxibutiril-CoA, que se polimeriza por la actividad de la PHB sintasa para producir PHB [9]. A diferencia de la biosíntesis, se conoce poco sobre la degradación del PHB, ésta se da en condiciones de limitación de carbono y el primer paso está a cargo de una enzima de tipo esterasa denominada PHB depolimerasa, codificada por el gen *phaZ* [10]. Esta enzima convierte el PHB en β -hidroxibutirato, posteriormente el β -hidroxibutirato es oxidado por una β -hidroxibutirato reductasa a acetoacetato, que es activado a acetoacetil-CoA por una CoA transferasa. La enzima biosintética β -cetotilasa en reversa convierte el acetoacetil-CoA en dos moléculas de acetil-CoA y funciona como entrada y salida del ciclo de síntesis-degradación de PHB [11] (Figura 2).

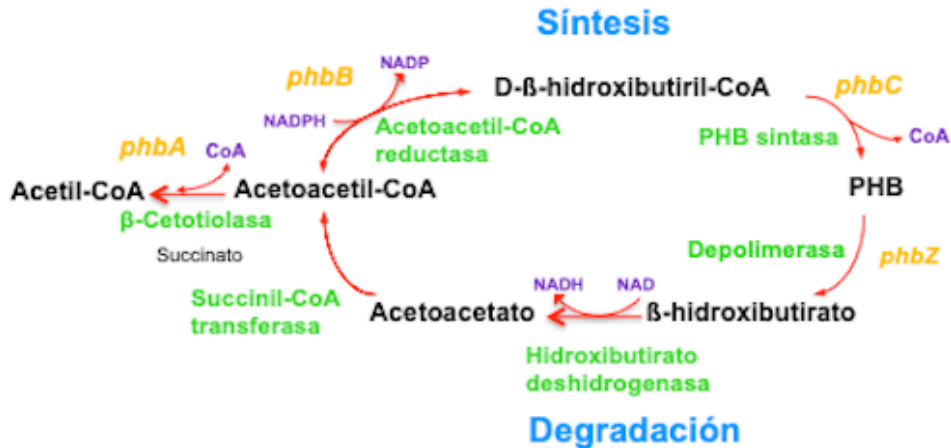


Figura 2. Ciclo de síntesis y degradación del Poli-β-hidroxibutirato (PHB). Modificado [12].

El PHB es un polímero frágil con poca elasticidad, alto grado de cristalinidad (50 - 70%) y temperatura de fusión de alrededor de 180 °C, presenta un módulo de elasticidad longitudinal de 3 gigapascales (GPa) y resistencia a la rotura de 25 megapascales (MPa) [13]. Sin embargo, a pesar de estas características, el PHB tiene algunas desventajas, tales como alta fragilidad por su baja elongación por tracción (3-5%) y baja estabilidad térmica por encima de su punto de fusión. Aunque las propiedades de este polímero están determinadas principalmente por su composición homopolimérica, el comportamiento elástico, la resistencia mecánica y el grado de cristalinidad del material también se ven afectados por el peso molecular del PHB [12]. Esto se debe a la forma cristalina α o β que adopta el material cuando es procesado, favoreciéndose la forma β en biopolímeros con elevado peso molecular que presentan una mayor elongación y resistencia a la tracción. Las fibras de PHB con peso molecular de 300 kDa presentan una resistencia a la tracción de 190 MPa y una elongación al rompimiento del 5 %, mientras que, cuando el peso

molecular es de 5,300 kDa, las fibras aumentan su resistencia a la tracción a 1,320 MPa y su elongación al rompimiento a un 58 % [13]. Además, el PHB con peso molecular menor a 1,000 kDa es un material frágil y presenta temperaturas de degradación térmica cercanas a su temperatura de fusión [14]. También la velocidad de degradación del material está determinada por el tamaño de las moléculas del biopolímero, observándose que cuando el peso molecular promedio (PMP) del polímero es mayor, la velocidad de degradación disminuye [15,16].

Aplicaciones de los PHAs

Los PHAs se comenzaron a utilizar para la fabricación de artículos de uso diario como botellas de champú, bolsas de compras, contenedores y revestimientos de papel, rastrillos, pañales, productos de higiene femenina, envases cosméticos, entre otros [17]. En las últimas dos décadas los PHAs se han convertido materiales útiles en el campo médico debido a sus propiedades únicas, como su baja acidez y bioactividad (biocompatibilidad), lo que les confiere un menor riesgo para la salud en comparación con otros plásticos actualmente utilizados [18]. Son utilizados como soporte de crecimiento celular y adhesión sin efectos carcinogénicos. Esto ha permitido que sean usados en suturas, barreras de adhesión, parches vasculares, andamios de reparación del cartílago, sustitutos óseos y guías nerviosas. Otras características importantes de los PHAs es su composición monomérica única que se logra a través de ingeniería celular, pues se ha establecido que la composición de monómeros de PHA y las modificaciones de su superficie influyen en las respuestas celulares [18]. Se ha explorado el uso de los PHAs como matrices para la administración oral de medicamentos [19], ejemplo de esto es el uso de

macropartículas de PHB para la liberación de sulfametizol donde se observó que el aumento de la masa molecular del polímero incrementó la velocidad de liberación del producto [20]. Utilizando este mismo sistema también se ha probado la liberación de agentes anticarcinogénicos y se determinó que, en comparación con otras matrices de liberación, con PHB el proceso es más rápido [21].

Wang y colaboradores desarrollaron en el 2008 [22,23] un sistema de administración de medicamentos dirigido a células específicas mediado por un receptor, utilizando la phasina de unión al gránulo PhaP. En este sistema, las partículas de PHA fueron utilizadas para el empaquetamiento de drogas hidrofóbicas y PhaP fue fusionada a proteínas-ligando lo que permitió su adhesión a las partículas de PHAs cargadas, logrando que los ligandos transportaran las nanopartículas de PhaP-ligando-PHA al interior de las células seleccionadas que contenían los receptores. Se identificó que este sistema (ligando-PhaP-PHA) es eficiente en macrófagos, células de carcinoma hepatocelular BEL7402 *in vitro*, y células de carcinoma hepatocelular *in vivo* [23]. Finalmente, otro de los posibles usos de los PHAs es la producción de biocombustibles. Recientemente Zhang y colaboradores (2009) [24] demostraron que el β -hidroxibutirato metil éster (β HBME) y el metil 3-hidroxialcanoato metil éster (β HAME), obtenidos de la esterificación de PHB y metil PHA, podrían usarse como biocombustibles.

Gránulos de PHAs

Como se mencionó previamente, los PHAs se encuentran contenidos en estructuras subcelulares organizadas y complejas denominadas gránulos o carbonosomas, localizados en el citoplasma de la célula [25]. En el gránulo (Figura 3), el polímero

se encuentra recubierto por proteínas que participan en su metabolismo (biosintéticas y catabólicas), estructurales e incluso reguladoras [26]. Dentro de las proteínas de síntesis asociadas al gránulo se encuentran las enzimas β -cetotilasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHA sintasa. También están asociadas proteínas de degradación como las PHA depolimerasas, las phasinas (que son proteínas estructurales y con otras funciones) y una proteína reguladora conocida como PhaR [27]; sin embargo, es difícil determinar cuántas proteínas diferentes se localizan en la superficie de los gránulos de PHA *in vivo*. Esto se debe principalmente a que muchas proteínas hidrofóbicas pueden unirse a la superficie del gránulo de PHA durante el aislamiento experimental del gránulo, sin ser componentes verdaderos *in vivo* [24]. Steinbüchel y colaboradores fueron los primeros en investigar el proteoma de gránulos de PHB aislados y observaron que, además de las proteínas relacionadas al metabolismo de PHB, proteínas de membrana y otras proteínas pueden unirse a los gránulos; un ejemplo de una proteína con una fuerte afinidad a los gránulos de PHB es la lisozima la cual se adiciona para una mejor lisis de las células durante la purificación de los gránulos [28]. Se sabe que proteínas de choque térmico, como DnaK y GroEL, se unen al gránulo, pero su relación con el metabolismo del PHB es desconocida [25].

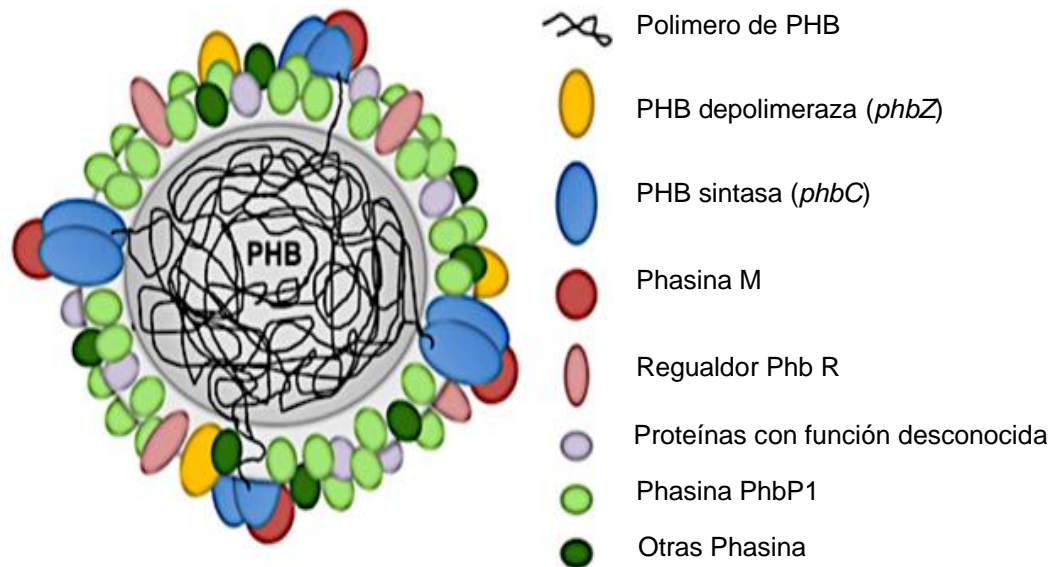


Figura 3. Estructura del gránulo de PHB (Modificado de [26])

Proteínas involucradas en el metabolismo de los PHAs

PHA sintasas

Las PHAs sintasas son enzimas clave en la síntesis del polímero, pues catalizan la polimerización de los β -hidroxiacil-CoAs para producir el PHA y coenzima A libre. Estas enzimas se encuentran unidas a los gránulos nacientes en condiciones de acumulación de PHAs en la célula [25]. Las PHA sintasas se han clasificado en cuatro clases principales, con base en sus secuencias primarias, especificidad de sustrato y composición de subunidades [29,12]. La clase I comprende enzimas que consisten en un solo tipo de subunidad, llamada PhaC, que forma un homodímero, mientras que la clase II contiene dos tipos de subunidades homólogas PhaC1 y PhaC2. Las sintasas de Clase III y IV forman heterodímeros, que comprenden PhaC-PhaE y PhaC-PhaR, respectivamente. Las PHA sintasas de clase I, III y IV

tienden a polimerizar monómeros de longitud de cadena corta (PHA_{sCL}), que comprenden monómeros con longitudes de cadena de carbonos C3-C5. Un típico ejemplo de un monómero C4 (sCL) activado, es β -hidroxibutiril-CoA, (3HB-CoA), al cual PhaC lo polimeriza, quedando los residuos β -hidroxiacilos de β -hidroxibutirato (β HB) en el producto de alto peso molecular PHB poli- β -hidroxibutirato (PHB). Las PHA sintasas de clase II polimerizan monómeros de longitud de cadena media (PHA_{MCL}) [30].

Todas las PHAs sintasas presentan un residuo de cisteína conservado (Cys₃₁₉ en la PHA sintasa de *Ralstonia eutropha* H16) que forma parte de la triada catalítica compuesta por Cys-319, Asp-480 y His-508, similar a la de las esterasas [31]. También se sabe que el Trp-425 es un aminoácido importante, ya que participa en la interacción de las subunidades para su dimerización [29].

Phasinas

Las phasinas son proteínas asociadas al gránulo de PHA con un peso molecular de 10 a 24 kDa. Presentan un dominio hidrofóbico que permite que se asocien a la superficie del gránulo, y un dominio hidrófilo que se encuentra expuesto al citoplasma. Son las proteínas más abundantes en los gránulos, ya que representan el 97.5 % de las proteínas asociadas a él [25]. Distintas phasinas han sido identificadas en bacterias productoras de PHB, como son *R. eutropha* H16 [32], *Bacillus megaterium* [33] *Rodococcus ruber* [34], *Paracoccus denitrificans* [35] *Pseudomonas putida* [36] *Azotobacter vinelandii* [37] y *Synechocistis* sp. PCC 6803 [38] así como en algunas arqueas [39]. Se ha reportado que la presencia de las phasinas en la célula depende de la síntesis de PHA, ya que mutantes que no producen el polímero tampoco producen niveles detectables de estas proteínas [40].

Las phasinas pueden llevar a cabo múltiples funciones relacionadas con la acumulación y degradación de PHA lo cual se ha revisado ampliamente en dos publicaciones previas: [41,42]. Su labor principal es actuar como una barrera entre el polímero hidrófobo y el ambiente citoplasmático, además de que estabilizan los gránulos y previenen su aglutinamiento dentro de la célula [43]. *R. eutropha* es el organismo modelo para el estudio de estas proteínas, donde se conocen 8 phasinas PhaP1-PhaP7 y PhaM. PhaP1 es la proteína más abundante de todas las phasinas en *R. eutropha* se estima que puede cubrir entre 27 y 54 % de la superficie del granulo [44], y representa alrededor del 5% de la fracción de proteína celular total [45]. Las células recombinantes que sobre-expresan PhbP1, presentan una mayor cantidad de gránulos, aunque de un tamaño más pequeño, por lo que se demostró que esta proteína determina la relación superficie-volumen de los gránulos dentro de la célula [40]. Una mutante nula en PhbP1 provoca la generación de un solo gránulo de PHB, además de una disminución en la cantidad del polímero acumulado con respecto a la cepa silvestre [45]. Esta mutación indica que PhbP1 es importante, pero no crucial, para la síntesis de PHB, y sugiere que otras phasinas pueden contribuir a su acumulación [12], ejemplo de ello es el incremento de la expresión de PhbP3 en una mutante en PhbP1 [12]. Sin embargo, en presencia de PhbP1 la importancia de las otras phasinas es menor, ya que la mutación individual de cada una de ellas no genera fenotipos en la formación del granulo ni en el metabolismo del PHB [32]. Se propone que PhbP1 de *R. eutropha* juega un papel en la degradación del PHB, pues al estar ausente la phasina PhbP1 las enzimas encargadas de la degradación del polímero (depolimerasas) tienen un acceso más

rápido al PHB, promoviendo la movilización, aunque se sabe que la PhbP1 no tiene efecto sobre el peso molecular del polímero [46].

La expresión de la phasina PhaP1 en *R. eutropha* está modulada por la proteína PhaR, que es un regulador transcripcional negativo. Bajo condiciones en las que no se sintetiza PHB, PhaR se encuentra unido a la región reguladora del gen *phbP1*, reprimiendo su transcripción de la phasina. Cuando inicia la síntesis de PHB, PhaR se une a los gránulos que se están formando mediante un dominio de la proteína que es hidrofóbico, permitiendo así que *phbP1* pueda transcribirse y de esta manera PhbP1 comience a recubrir el gránulo. Una vez que el gránulo es recubierto por la phasina principal PhbP1, PhaR es desplazado del gránulo, reprimiendo nuevamente la transcripción de *phbP1*. Una mutante en este regulador genera un gran número de gránulos pequeños en la célula, fenotipo similar al de sobreproducción de PhbP1, lo que confirma su función [27]. En *Bacillus megaterium* se ha propuesto que PhaQ actúa de manera similar a PhaR de *R. eutropha*, ya que se une a los gránulos de PHB y regula su transcripción [47]. Este mecanismo es análogo al propuesto para la regulación de la biosíntesis de PHAs en *Pseudomonas oleovorans* por PhbF [36], y *Paracoccus denitrificans* [48].

PhbM en *R. eutropha* es una phasina que también determina el número de gránulos y su relación superficie / volumen en la célula como PhbP1 [49]. Adicionalmente esta proteína forma parte del complejo de iniciación para la formación de los gránulos de PHB y mantiene en su forma activa la sintasa de PHB a través de una interacción proteína-proteína [50].

En *Pseudomonas putida* se han descrito funciones adicionales para su phasina mayoritaria PhaF, la cual ha sido descrita como una histone-H1 like protein con dos

dominios; uno de ellos que corresponde al C-terminal capaz de unirse al DNA y el N-terminal que se une al PHA. Esta proteína presenta un zíper de leucina responsable de su homo y hetero oligomerización con otras phasinas presentes en *Pseudomonas*, como Phal [51]. PhaF además de tener un papel estructural en la formación de los gránulos se ha demostrado es responsable de distribuir y segregar los gránulos a las células hijas durante la división celular [52]. Además, PhaF tiene un papel regulador en el metabolismo del PHA ya que reprime la expresión de la sintasa phaC1, de la phasina Phal y reprime su propia expresión [36]. Recientemente se identificó que la phasina Pha F es capaz de interaccionar con el regulador transcripcional PhaD de la familia TetR, esta proteína activa la transcripción de los genes que participan en el metabolismo de PHAs. A través de ensayos de doble híbrido se identificó que la phasina PhaF interacciona con el regulador PhaD modulando la actividad de este último para ejercer su función [51], es decir, es el único ejemplo en donde una phasina participa en la regulación indirecta la biosíntesis de PHAs.

Finalmente, una de las funciones más notables que se han descrito para las phasinas es como activador de las enzimas encargadas de la movilización de PHB. En *Rhodospirillum rubrum* la phasina ApdA es necesaria para la hidrólisis in vitro de gránulos nativos, en conjunto con la depolimerasa principal en este organismo PhaZ1 [53].

PHA o PHB Depolimerasas

Las PHA depolimerasas son enzimas de tipo esterasa que permiten la degradación de los PHAs bajo condiciones de limitación de carbono y catalizan la hidrólisis del PHA en β -hidroxialcanoatos, en el caso del PHB en β -hidroxibutirato. Estas enzimas están codificadas por el gen *phaZ* [54].

Las PHA depolimerasas pueden generar cortes en el polímero de tipo *endo* o *exo*, lo que permite generar monómeros u oligómeros de los PHAs con configuración R, mediante la ruptura del enlace éster por hidrólisis [55]. La mayoría de estas enzimas presentan una firma característica compuesta por tres aminoácidos Histidina-Aspartato-Serina, este último residuo forma parte de un conjunto de aminoácidos denominado caja lipasa (Gly-X1-Ser-X2-Gly), que está presente en diversas enzimas de tipo lipasa [56]. El mecanismo de acción de las depolimerasas consiste en la desprotonación del grupo hidroxilo de la serina que realiza un ataque nucleofílico en el átomo de carbono del enlace éster del polímero, mientras que la histidina y el aspartato estabilizan el estado desprotonado de la cadena lateral de la serina [57].

Las PHA depolimerasas son específicas en cuanto al estado físico del polímero (cristalino o amorfo), así como a la longitud de las unidades estructurales que lo conforman [58]. Además, estas enzimas se clasifican en depolimerasas intracelulares y extracelulares, dependiendo de si hidrolizan el PHA amorfo de los gránulos intracelulares nativos en las bacterias productoras de estos polímeros, o bien el PHA liberado al medio extracelular tras la lisis de una bacteria productora, el PHA extracelular adquiere un estado cristalino.

Depolimerasas extracelulares

Las depolimerasas extracelulares son proteínas de alrededor de 70 kDa que contienen un péptido señal que permite que estas proteínas pueda ser exportadas hacia el medio para degradar y utilizar PHA exógeno como fuente de carbono. Las enzimas de este tipo utilizan PHAs en estado desnaturalizado o cristalino. El PHA en estado cristalino se obtiene tras la lisis celular de los organismos productores; bajo estas condiciones, el polímero adquiere una estructura helicoidal ordenada y desarrolla una fase cristalina, además los gránulos carecen de la capa de fosfolípidos y proteínas [59].

La habilidad para degradar PHA extracelular está ampliamente distribuida en gran cantidad de bacterias y hongos que han sido aislados de distintos ecosistemas, como suelo, composta, lodos activados, agua dulce y marina, sedimentos y aire [60]. Las depolimerasas extracelulares son las responsables de la degradación de los objetos producidos con PHAs y posibilitan que estos materiales plásticos sean biodegradables.

Estas enzimas son estables a amplios rangos de pH y temperatura y su actividad se ve afectada por inhibidores de las serina hidrolasas y por agentes reductores [61]. Las depolimerasas de tipo extracelular también difieren en el tipo de poliéster que pueden degradar, ya que algunas de ellas son específicas para degradar PHA_{SCL} o PHA_{MCL}. Las depolimerasas extracelulares que degradan PHA_{SCL} presentan una tríada catalítica Ser-Asp-His, la serina forma parte de una caja lipasa con configuración G- L-S-A/S-G que se localiza en el centro del dominio catalítico [59] en el extremo N terminal. Ejemplo de estas proteínas se encuentran presentes en bacterias como *P. legmoinei*; *R. pickettii*, *P. Stutzeri*, *Delftia acidovorans* [62],

Schlegelella sp. KB1a [63] *Streptomyces exfoliatus* [64] y *P. funiculosum* [65]. Por su parte, las depolimerasas extracelulares de dPHA_{MCL} son específicas para PHAs con monómeros de cadena media con más de seis carbonos en estado desnaturalizado (cristalino). En contraste con las depolimerasas de cadena corta, la triada catalítica Ser-Asp-His se encuentra en el C-terminal y se piensa que la región N-terminal de la proteína porta el sitio de unión a sustrato [66], *P. alcaligenes* y *P. fluorescens* presentan este tipo de enzimas.

Depolimerasas intracelulares

A diferencia de las PHA depolimerasas extracelulares, las depolimerasas de tipo intracelular son capaces de degradar los PHAs endógenos, es decir, el polímero que se encuentra en los gránulos del organismo productor en que se encuentra en conformación amorfa; a este tipo de degradación también se le conoce como “movilización”. También pueden degradar gránulos artificiales de PHAs producidos con surfactantes, que contienen polímero amorfo. Este tipo de enzimas son exclusivas de bacterias que producen PHAs, se localizan en el citoplasma y forman parte de la cubierta de los gránulos. La mayoría de las PHA depolimerasas intracelulares tienen baja similitud a nivel de secuencia primaria, con las depolimerasas de tipo extracelular y no presentan un dominio de unión al sustrato como aquellas enzimas [67].

En las depolimerasas de bacterias como *R. eutropha* y *Rhodobacter sphaeroides*, la triada catalítica de estas enzimas cambia y se sustituye la serina por una cisteína (cisteína-aspartato-histidina), la cual se encuentra también presente en las PHAs sintetas. Estas PHA depolimerasas presentan además cierta similitud de secuencia

con PHA sintasas de la clase III, como la de *Chromatium vinosum* [68]. Se ha documentado que al cambiar por mutación el residuo cisteína la enzima pierde su actividad, lo que demostró la importancia de este aminoácido. Estas enzimas también carecen de la caja lipasa presente en otras depolimerasas, aunque en bacterias como *Bacillus thuringiensis* esta firma se encuentra presente [69].

El organismo modelo para el estudio del metabolismo de PHB es *R. eutropha* H16, bacteria en la que se han descrito nueve depolimerasas, de las cuales la principal es PhaZa1. Esta enzima es capaz de degradar gránulos nativos *in vivo* y permite la liberación del monómero de 3HB [70]; además, es la única PHB depolimerasa de esta bacteria cuya inactivación presenta fenotipo, ya que la eliminación de su gen reduce, pero no inhibe completamente, la movilización del PHB [71]. De acuerdo con lo reportado por Uchino y colaboradores (2008), esta enzima degrada por hidrólisis el PHB hasta monómeros de β -hidroxibutirato, pero presenta una actividad adicional de tiólisis, ya que puede llevar a cabo la reacción reversa de la PHB sintasa en presencia de CoA libre produciendo β -hidroxibutiril-CoA, quizás dependiendo del estado metabólico de la célula (Figura 2). El β -hidroxibutiril-CoA se convierte posteriormente a crotonil-CoA que se propone es utilizado en beta oxidación [72], esta actividad de tiólisis está determinada por la ausencia de caja lipasa y la presencia de una cisteína en su triada catalítica, como en el caso de las enzimas sintasas [54].

En *R. eutropha*, de las nueve depolimerasas intracelulares (PhaZ1 a PhaZ7 y dos oligómeros hidrolasas PhaZb, PhaZc o PhaYs), sólo se ha determinado que PhaZa1 y las dos oligómeros hidrolasas se encuentran unidas a los gránulos de PHB [73]. Adicionalmente, se ha demostrado que este conjunto de enzimas cuando son

expresadas bajo el promotor de PhaC son altamente activas *in vivo*; sin embargo, bajo su propio promotor la expresión de estas hidrolasas no es significativa [73]. Recientemente se encontraron dos depolimerasas unidas al granulo, PhaZe1 y PhaZe2, que se sugiere deben ser clasificadas en otro grupo de enzimas ya que son depolimerasas de alto peso molecular y presumiblemente con actividad tiolítica, debido su secuencia de aminoácidos. Mutantes en los genes *phaZe1* y *phaZe2* presentan una tasa de movilización ligeramente disminuida [73]. La inactivación del resto de las PHA depolimerasas no presenta un efecto notable en la movilización de PHB, por lo que su función en el metabolismo del poliéster es poco clara, aunque a través de análisis transcriptómico se determinó que *phaZa2*, *phaZa4*, *phaZa5* y *phaZad2* se transcriben, y quizás no se traducen, sugiriendo una regulación post-traducciona [71].

Además de *R. eutropha*, se han caracterizado otras PHA depolimerasas en distintas bacterias, como son *B. thuringiensis* subsp *israelensis* ATCC 35646, en donde se identificó una depolimerasa intracelular capaz de degradar gránulos nativos activados con tripsina y con capacidad de liberar el monómero de β -hidroxibutirato como producto hidrolítico. Una mutante en el gen *phaZ* mostró un contenido ligeramente mayor de PHB en la fase estacionaria, comparada con la cepa silvestre, por lo que se concluyó que este gen codifica una depolimerasa intracelular [69]. Adicionalmente, se han reportado PHA depolimerasas intracelulares con la capacidad de degradar PHA_{MCL} en *Pseudomonas oleovorans* y *P. putida* KT2442. A través de la medición de la auto-hidrólisis de los gránulos de PHAs y utilizando radioactividad se logró detectar una baja actividad de estas enzimas [57]. Además, se determinó que estas enzimas poseen actividad de endo- y exo-hidrolasas, por lo

que pueden degradar oligómeros grandes o pequeños, cuyos productos hidrolíticos consisten en dímeros y monómeros [57]. Estas depolimerasas presentan un arreglo común característico en su vecindario genético: dos genes de PHA sintasas (*phaC₁* y *phaC₂*) flanquean al gen que codifica para una PHA depolimerasa, que se transcriben en la misma dirección [57]. Adicionalmente, se ha reportado que estas enzimas requieren de la presencia de iones como Na⁺, K⁺ y Mg⁺⁺, mientras que la presencia de Ca⁺⁺ inhibe su actividad catalítica. Cabe mencionar que los inhibidores de la serina esterasa, como el SDS y el fluoruro de metiletil sulfonilo, también inhiben la actividad de estas enzimas [56].

Finalmente, se ha reportado una depolimerasa intracelular en *Rodospirillum rubrum* que presenta una localización inusual en el periplasma. Esta enzima *in vivo* es específica para PHB nativo y oligómeros de tres unidades de β-hidroxibutirato en adelante. Sin embargo, su secuencia de aminoácidos es muy similar a depolimerasas extracelulares, con una caja lipasa y un péptido señal de 23 residuos para su transporte al periplasma. Para su actividad catalítica *in vitro* se requiere de la presencia de una proteína activadora termoestable, ApdA, que es considerada una phasina, o bien, de un pretratamiento del PHB con tripsina [51].

Regulación de la degradación de PHAs

A diferencia de la biosíntesis de PHB, la regulación de la degradación ha sido poco estudiada y no se ha identificado el mecanismo específico que dispare el catabolismo del PHB; sin embargo, se ha demostrado que el proceso de síntesis y degradación ocurren simultáneamente creando un ciclo fútil que siempre se encuentra activo [74]. Aunque deben existir mecanismos que alteren el balance,

ocasionando la acumulación del polímero, o su movilización, lo que hace compleja la regulación de la degradación. Una posibilidad para la regulación del metabolismo del PHB puede ser a través del control alostérico de enzimas clave como la sintasa y PHB depolimerasa, otra alternativa adicional es a través de moléculas señal. Una molécula señal clave es la alarmona (p)ppGpp la cual al estar presente en altas concentraciones es capaz de inducir la respuesta estricta (“stringent response”) en *E. coli* y muchas otras especies de bacterias [75]. Esta respuesta permite modular cambios en los nutrientes y reprograma la transcripción de cientos de genes; además, se sabe que juega un papel esencial en el mecanismo de respuesta a antibióticos y al estrés [76]. Como se mencionó anteriormente, la respuesta estricta está mediada por los nucleótidos tetrafosfato de guanosina (ppGpp) y guanosina pentafosfato (pppGpp), los niveles de dichas moléculas son controlados por las enzimas RelA (ppGpp sintetasa), y Spot (ppGpp sintetasa/hidrolasa). En *R. eutropha*, se ha estudiado el papel de la respuesta estricta mediante la remoción dobles o triples de los genes que codifican las enzimas en (p)ppGpp sintetasa/hidrolasa (*spoT1*), (p)ppGpp sintetasa (*spoT2*) o la PHA depolimerasa *phaZa1*. La doble mutante en $\Delta spoT1$ y $\Delta spoT2$ fue incapaz de sintetizar (p)ppGpp y se observó una menor concentración de PHB, en contraste, cuando se sobre expresó la (p)ppGpp sintetasa (*SpoT2*) y se removió la (p)ppGpp hidrolasa se cuantificaron altos niveles de PHB. Finalmente, una triple mutante $\Delta spoT1$, $\Delta spoT2$ y $\Delta phaZ1$ también fue capaz de producir una menor cantidad de PHB sin embargo, el proceso de degradación fue mucho más lento que en la cepa silvestre, lo que sugiere que (p)ppGpp inhibe directa o indirectamente la movilización de PHB [76].

Las mutaciones covalentes de las proteínas como la fosforilación de residuos específicos, es una herramienta celular bien conocida para cambiar la actividad enzimática [76]. En *R. eutropha* se estudió la fosforilación de la PHA sintasa y la PHA depolimerasa. Las mutaciones fosfomiméticas combinadas de los residuos T737, T30, T94 y T109 en la PHA sintasa mostraron que están involucrados en la regulación negativa de esta proteína, pues al estar fosforilados estos residuos la actividad de síntesis se ve disminuida considerablemente respecto a la cepa silvestre. En la depolimerasa PhaZ1 también se demostró que la fosforilación de los residuos S35, T26, T28 inhibe de manera parcial la movilización del PHB. Estos datos sugieren que la actividad de ambas enzimas puede estar regulada por fosforilación. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar si la fosforilación de dichas proteínas se lleva a cabo *in vivo*, además aún no es claro si estas fosforilaciones son parte de una cascada de señalización [77].

Existe un reporte donde se propone que PhaR de *Rhodobacter sepharoides*, un homólogo de PhaR de *R. eutropha*, regula de manera negativa la expresión del gen la depolimerasa principal PhaZ en esta bacteria, ya que se identificó *in silico* un sitio de unión en la región promotora que comparte con el gen *phaC* el cual se encuentra localizado de manera divergente, aunque el mecanismo es poco claro [78].

***Azotobacter vinelandii*, una bacteria productora de PHB**

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa que se reproduce por fisión binaria, vive en suelos y se mueve por flagelos peritricos. Son células ovoides grandes de 2 a 5 μm de diámetro cuya morfología varía desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se le puede observar cómo células individuales, en pares o

formando agregados irregulares. *A. vinelandii* es una bacteria aerobia estricta, pero puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno [79]. Es fijadora de nitrógeno y poliploide, es decir, posee varias copias de su cromosoma. El número de copias depende del medio y las condiciones de cultivo, así como de la fase de crecimiento [79]. *A. vinelandii* puede crecer usando azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como fuente de carbono y produce los polímeros alginato y poli- β -hidroxibutirato (PHB), además de producir los lípidos fenólicos alquilresorcinoles (AR's) [80].

A. vinelandii es uno de los principales modelos de estudio para la producción de PHB debido a que puede utilizar una gran variedad de sustratos, como algunos desechos agroindustriales los cuales incluyen melazas de caña, de remolacha, peptona de pescado y desechos de la crianza de cerdos [81]. Además, acumula una gran cantidad de este polímero (hasta un 90 % de su peso seco) con un muy elevado peso molecular (4,000 kDa), lo que mejora considerablemente las características del poliéster como material plástico [82]. Las cepas silvestres de *A. vinelandii* sintetizan comúnmente el homopolímero PHB, aunque dependiendo de la fuente de carbono suministrada, también pueden producir el co-polímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV) [11]. El PHB en *A. vinelandii* permite incrementar su supervivencia en ambientes estresantes como se ha descrito en otras bacterias productoras [79]. Otra de las funciones biológicas que desarrolla este polímero es la de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares, ya que cuando la célula presenta bajas concentraciones de oxígeno y existe una alta concentración de carbono, se favorece la acumulación de NADH y NADPH, los cuales inhiben varias enzimas del catabolismo de la glucosa y el ciclo de Krebs. Bajo estas condiciones se induce la síntesis de PHB, favoreciendo así la conversión

de NADPH a NADH, manteniendo el balance redox y previniendo la generación de alta concentración de poder reductor y permitiendo el funcionamiento de las vías metabólicas oxidativas [83].

La biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* es similar a la que ha sido descrita en otras bacterias y requiere la participación de las enzimas β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa. Estas tres enzimas están codificadas en un operón denominado *phbBAC* [8]. La regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii* ha sido ampliamente investigada y se ha determinado que se da en tres niveles (Figura 4). El primero de ellos implica el control alostérico de la enzima β -cetotiolasa que es inhibida por Coenzima A (CoA) libre y activada por acetyl-CoA [83]. El segundo nivel de regulación es transcripcional donde intervienen varios sistemas y reguladores; uno de estos reguladores es la proteína PhbR que pertenece a la familia tipo AraC, la cual activa de manera directa la transcripción del operón *phbBAC* [84]. Además, el factor sigma alternativo RpoS activa la transcripción tanto del operón *phbBAC* como del regulador PhbR [84]. CydR (Fnr) es una proteína relacionada con la regulación del citocromo bd en la cadena de transporte de electrones y se ha reportado que también controla la transcripción del operón biosintético de PHB [85]. Un regulador adicional es ArrF, un pequeño ARN que responde a la concentración de hierro y el cual también es capaz de controlar la expresión de *phbR* a nivel post-transcripcional [86].

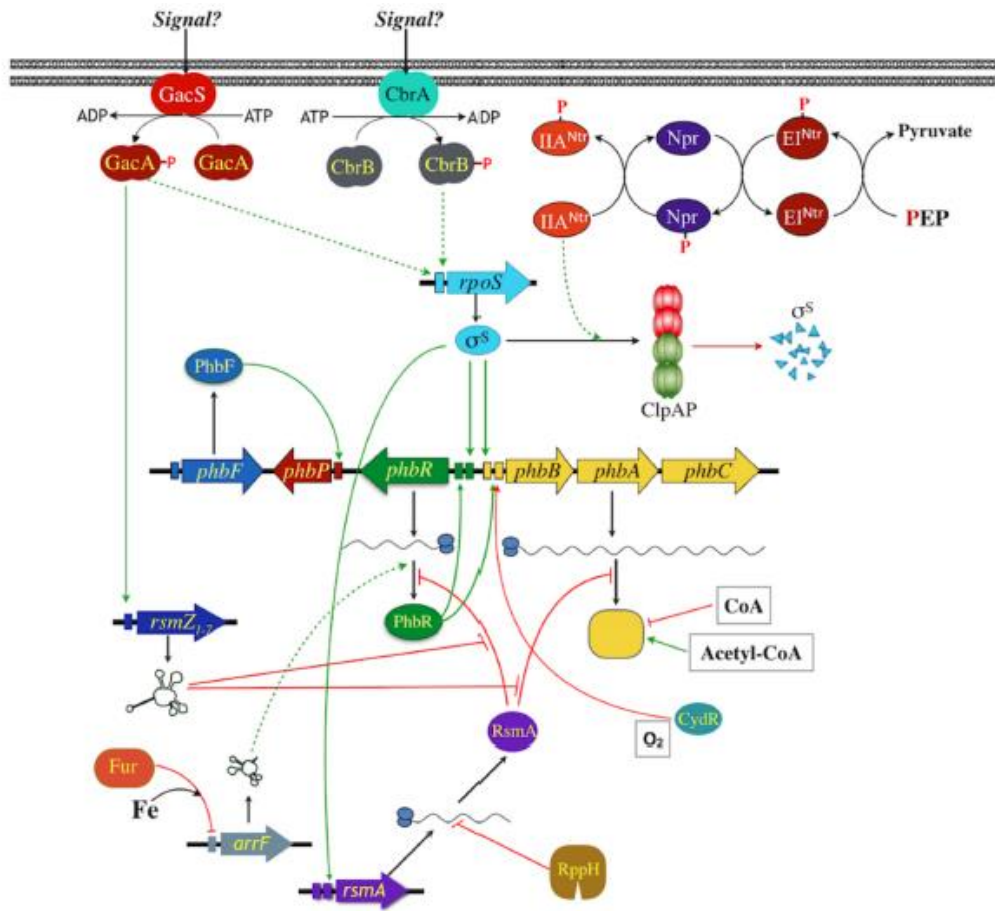


Figura 4. Modelo para la regulación de la expresión del operon *phbBAC* en *A. vinelandii*. Los promotores se indican como rectángulos de colores. La regulación positiva se indica con líneas verdes; las líneas rojas indican regulación negativa; las líneas discontinuas indican intermediarios o mecanismos desconocidos [87].

El sistema PTS^{Ntr} , análogo del sistema PTS de transporte de carbohidratos, en *A. vinelandii* está conformado por tres proteínas que se transfieren un grupo fosfato, donde el aceptor final es la proteína $EIIA^{Ntr}$ (Figura 4). Inicialmente se identificó que $EIIA^{Ntr}$ en su forma no fosforilada regula de manera negativa la transcripción de los genes *phbR* y *phbBAC*; sin embargo, $EIIA^{Ntr}$ no presenta algún dominio de unión a DNA [88]. Posteriormente se identificó que el factor sigma $RpoS$ es degradado por

el complejo proteolítico ClpAp cuando la proteína EIIA^{Ntr} se encuentra en su forma no fosforilada [89], lo que indica que la regulación del sistema PTS sobre la síntesis de PHB es de manera indirecta al controlar los niveles del factor sigma alternativo RpoS.

Un tercer nivel de regulación se da a nivel traduccional por la proteína RsmA la cual regula negativamente la traducción de *phbR* y del operón *phbBAC*. Los RNAs no codificante RsmZ1-7 que también son parte de este sistema, antagonizan al regulador negativo RsmA al titularlo [90]. De esta manera, la regulación sobre RsmA impacta en la expresión de los genes para la producción de PHB. Recientemente se han descrito otros reguladores como el sistema CbrA/CbrB, un sistema de dos componentes que participa en la represión catabólica de carbono y que activa a nivel transcripcional a *rsmA*, probablemente a través del control de la expresión de RpoS [91], [92]. RsmA también está sometido a un sistema de regulación postranscripcional, pues sus transcritos son el sustrato de una vía de degradación de RNAm de la pirofosfohidrolasa RppH presente en *A. vinelandii* [93].

Finalmente, el sistema de dos componentes Gac, formado por una cinasa transmembranal denominada GacS y su regulador de respuesta GacA, activa la transcripción de los RNAs pequeños RsmZ1-7, actuando entonces como un elemento de regulación positiva de la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB [90].

ANTECEDENTES

Utilizando las secuencias de diferentes PHAs depolimerasas ya caracterizadas se realizó una búsqueda *in silico* en el genoma de *A. vinelandii* de genes que codificaran para posibles depolimerasas. Se identificaron siete genes cuyas proteínas mostraron una similitud significativa con estas enzimas. Para determinar la participación de estas proteínas en el metabolismo del PHB y debido a que las PHB depolimerasas son proteínas asociadas a gránulos [55], [71], se aislaron gránulos nativos de PHB de la cepa UW136 *A. vinelandii* crecida en medio rico PYS. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (Figura 5) y se identificaron las principales mediante espectrometría de masas (Tabla 1). Como se esperaba, se encontraron proteínas implicadas en la biosíntesis de PHB, como la acetoacetyl-CoA reductasa (WP_012700951; Avin_23650), la PHB sintasa (WP_012700949; Avin_23630) y la phasina mayoritaria denominada PhbP1 (WP_012700953; Avin_23670). También se encontraron unidas a los gránulos otras proteínas, principalmente de membrana, probablemente debido a artefactos del procedimiento de separación, algunas se han encontrado en gránulos de otras bacterias, como porinas y otras proteínas de membrana o hidrofóbicas, y se ha propuesto que estén allí como producto de contaminación durante el aislamiento de gránulos nPHB [94]. Interesantemente, se encontró una de las posibles depolimerasas de PHB identificadas en el genoma asociada al gránulo, migrando en el gel con una masa molecular de 100 kDa (Figura 5). De acuerdo con la secuencia de ADN de su gen, esta proteína (WP_012699077; Avin_03910), está formada por 914 aminoácidos, una masa molecular de 101,057.8 Da, y un pI teórico de 5,52. Cuando

(WP_012699077; Avin_03910) en adelante denominada como PhbZ1 se compara con las proteínas codificadas en el genoma de *R. eutropha* H16, la bacteria modelo para el metabolismo de PHB [95], muestra una identidad global del 48% con una proteína no caracterizada anotada como sintasa de PHA (H16_A0671) y una identidad del 44% con la supuesta despolimerasa de PHA no caracterizada H16_B1632. Sin embargo, la proteína PhaZ1 de *A. vinelandii* UW136 muestra una baja similitud con la principal despolimerasa PHB de *R. eutropha* H16, PhaZa1 (H16_A1150) [65], [68]. Además, la proteína PhaZ1 de *A. vinelandii* presenta una alta identidad con proteínas no caracterizadas presentes en varias proteobacterias anotadas como PHB sintasas o PHB depolimerasas. Es interesante mencionar que también muestra similitud en su extremo amino terminal con la subunidad PhaC (PHA) sintasa clase III. Además, el gen *phbZ1* se encuentra adyacente a *phbP2*, el cual codifica una proteína (WP_012699079; Avin_03930) parálogo de la principal phasina PhbP1 de *R. eutropha* H16. Debido a estas características, esta proteína se eligió para un análisis posterior con el objetivo de investigar su función en el metabolismo de PHB. Dentro de este contexto genético, a través de una búsqueda bioinformática se identificaron 2 posibles sitios de una unión de PhbF, un ortólogo de PhaR de *R. eutropha* H16 el primero de ellos localizado en la región promotora de *phbP1* y otro en la región intergenica *phbZ1* y *phbP2*; se sabe de PhbF en *A. vinelandii* también es un regulador transcripcional negativo de la expresión de PhbP1 como sucede en *R. eutropha* H16 (Datos no publicados). Sin embargo, se desconoce la función del segundo sitio de unión localizado en la región intergénica de *phbZ1* y *phbP2* (Figura 6).

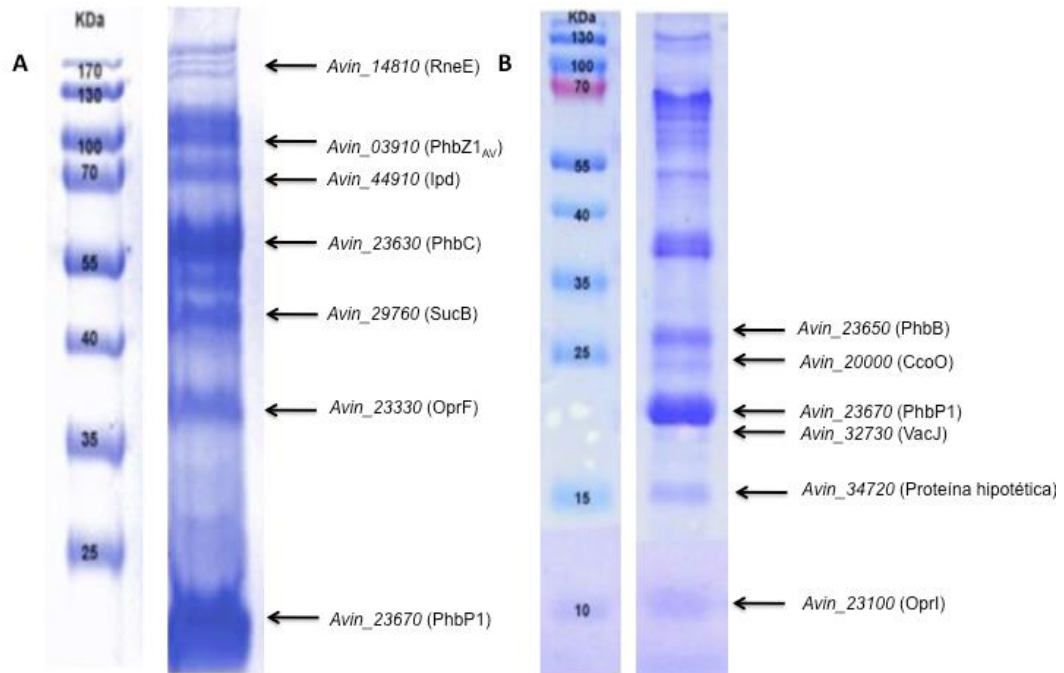


Fig. 5. Análisis de las proteínas asociadas a gránulos de *A. vinelandii* UW136 (WT) separadas por SDS-PAGE. Las células se crecieron en matraces Erlenmeyer con medio PYS y se cosecharon a las 48 h.

Tabla 2. Proteínas asociadas a los gránulos de *A. vinelandii* identificadas por ESI LC-MS

No.	Proteína (ID)	Gen	Nombre de la proteína	Nombre corto	Peso molecular teórico (MW)	Fragmentos	Cobertura (%)
1	WP_012700116	Avin_14810	Ribonucleasa E/G	RneE	128.96	18	17
2	WP_012699077.1	Avin_03910	PHB Depolimerasa	PhaZ1	101.06	16	20
3	CAA30987.1	Avin_44910	Componente dihidrolipoiltransacetilasa del piruvato deshidrogenasa	lpd	65.03	4	6
4	WP_01270049.1	Avin_23630	PHB sintasa	PhbC	64.40	8	14
5	WP_012701529.1	Avin_29760	Dihidrolipoamida succiniltransferasa componente del α -cetoglutarato deshidrogenasa	SucB	41.98	10	35
6	WP.012700919.1	Avin_23330	Porina de membrana externa	OprF	37.61	17	71
7	WP_012700953.1	Avin_23670	Phasina	PhbP	20.27	12	78
8	WP_012700951.1	Avin_23650	Acetoacetil-CoA reductasa	PhbB	26.71	3	20
9	WP_012700616.1	Avin_20000	Citocromo C oxidasa	CcO/FixO	22.62	1	9
10	WP_012701814.1	Avin_32730	Lipoproteína VacJ	-	25.97	7	57
11	WP_012702001.1	Avin_34720	Proteína hipotética	-	21.78	1	6
12	WP_012700896.1	Avin_23100	Lipoproteína de membrana externa	OprI	8.73	2	24

Avin03930 (1080) **Sitio PhbF (1181)**

GCC GTT CTG GAA CAC ATT CGA ATC AAA GCT GGA **CAT** GTCTCATCTCCCAAGGCACACACCGGTCCGGCCACACCCCGACCCGCGCAGACCGTCCGGCC**ATTATGACG**TTCCCGATGTCTCG**CCGCAT**ACG**TTTTTGGC****TTGCAA**AAAAAATTTGCTCCATC**GTGTACCC**
 CCG CAA GAC CTT GTG TAA GCT TAG TTT CGA CCT **GTA** CAGATTAGAGGGTTTCCGTTGCTGGCCACCGCTCTGCGCCGCTTGGCCGCTCTGGCAGCCGCG**TAATACTGC**CAAGGGCTACAGAC**GGCGTA**TGC**AAAAACGC****AACGTT**TTTTTCAACAGAGTAC**CACATGGG**
 I G N Q F V N S D F S S M

Avin03910 (1337)

TCCGCTATAGAAACCGGCCATTGTCCCGAGCCTCCATGACCCACCGATCCGATCCGCTGGCTTCTCCGAGGAGCCGACCGTTTGGCTTACTCCAGCCAGAGAGGGTGATC **ATG** AGC CAG CAG ACT TTT TTT GCG CAG CAG GAA GAC TGC TTC TCC TCT TTC CAC AAC TAC
 AGCCGATATTCTTTCCCGTAAACGGGGCTCGAGGACTACTGGGTGCTAGGCTTAGCCGACCCAGAGAGGCTCTCTCGCTGGCAGACCGGATGAGGTGCTCTTCCCACTAG **TAC** TCG GTC CTC TGA AAA AAA CGC GTC GTC CTT CTG ACG AAG AAG AGA AAG GTG TTG ATG
 M S Q E T F A Q Q E D C F S S F H N Y

Figura 6. Sitio de unión de PhbF predichos *in silico* en la región promotora de *avin03910* (*phbZ1*) y *avin3930* (*phbP2*) de *A. vinelandii*.

HIPOTESIS

El gen *avin03910* codifica para una PHB depolimerasa que participa en la degradación intracelular de poli- β -hidroxibutirato cuya expresión es controlada por el regulador PhbF.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la proteína codificada por el gen *avin03910* en el metabolismo de PHB y establecer cómo se lleva a cabo la regulación de su expresión.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar si el gen *avin03910* codifica una PHB depolimerasa y establecer su participación en el metabolismo del PHB.
2. Establecer cómo se regula la expresión del gen *avin03910*, determinando si el regulador PhbF tiene alguna participación.
3. Determinar si la inactivación del gen *avin03910* tiene un efecto sobre las características del PHB producido.

METODOLOGÍA

Cepas Bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en esta tesis se enumeran en la Tabla 1. Las cepas PhbZ1, PhbZ1-C, PhbZ1-OP y PhbZ1-PhbC de *A. vinelandii* se depositaron en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV) con los códigos CDBB-B- 2007, CDBB-B-2008, CDBB-B-2009 y CDBB-B- 2010, respectivamente. Los inóculos se realizaron en medio Burk [96], las células se lavaron con $MgSO_4$ 10 mM y se transfirieron al medio indicado. Para la producción de PHB en *A. vinelandii* se utilizó el medio peptona - extracto de levadura (PY) suplementado con sacarosa al 2% como fuente de carbono (PYS) [82]. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio, se incubaron a 250 rpm y 30 ° C. Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37 ° C en medio Luria-Bertani (LB) y medio M9 con glucosa 10 g/l. La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo como se describe en Bali (1992) [97]. Se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones ($\mu\text{g/ml}$): para el caso de *A. vinelandii* rifampicina 10; ácido nalidíxico 30; kanamicina 2; tetraciclina 30 y gentamicina 0.25, para *E. coli* se utilizó ampicilina 100; kanamicina 30; y espectinomicina 100.

Tabla 3. Cepas y plásmidos.

Cepa o Plásmido	Descripción	Referencia
<i>A. vinelandii</i> UW136	Cepa silvestre	[88]
<i>A. vinelandii</i> OP	Cepa silvestre	[98]
PhbZ1	UW136 con la mutación <i>avin03910::Gm</i>	Este trabajo
PhbZ1-C	PhbZ con el plásmido pJG03910	Este trabajo
PhbZ1-OP	OP con la mutación <i>avin03910::Gm</i>	[99]
PhbP2	UW136 con la mutación <i>avin03930::Tc</i>	Este trabajo
PhbF	UW136 con la mutación <i>PhbF::Gm</i>	[101]
<i>E. coli</i> BL21DE3	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogene
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogene
MG1655	Cepa MG1655 derivada de la cepa K-12 (F-, λ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>)	[101]
pJG03910	Cepa BL21DE3 con el plásmido pJG03910	Este trabajo
pJG03930	Cepa BL21DE3 con el plásmido pJG03930	Este trabajo
PhbF	Cepa BL21 con el plásmido pPhbF	Este trabajo
pPHB _{AV}	Plásmido inducible con IPTG con el operon <i>phbBAC</i> de <i>A. vinelandii</i> .	[102]
pJET1.2/blunt		Thermo Fisher Scientific
pET24a+	Plásmido de expresión con una secuencia T7 * Tag N-terminal más secuencia C-terminal His * Tag	Novagen

Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas

La manipulación de DNA fue realizada de acuerdo con los protocolos descritos por Sambrook and Russell 2001 [103]. Se utilizaron enzimas de restricción Thermo Scientific de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las secuencias de DNA fueron determinadas por el método de Sanger *et al.* 1977 [104], usando un secuenciador Perkin-Elmer/Applied Biosystems DNA sequencer. Los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Para la clonación de fragmentos de DNA se realizó la amplificación del material genético usando la Taq polimerasa Phusion Flash High-Fidelity PCR (Thermo Scientific). El protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo de desnaturalización inicial de 98 °C por 30 segundos, y 30 ciclos de desnaturalización de 98 °C durante 10 segundos, la temperatura de alineamiento se modificó de acuerdo con cada oligo utilizado durante 30 segundos y finalmente un ciclo de extensión de 72 °C con un tiempo determinado por el tamaño del fragmento de DNA que se amplificaba. Los productos de PCR fueron purificados con el Kit de purificación Roche.

Construcción de mutantes y complementación

A partir de DNA cromosomal de *A. vinelandii* cepa UW136 se amplificó el gen *avin03910* con oligonucleótidos específicos PhbZ1fw/PhbZ1rv diseñados con base a la secuencia reportada para la cepa *A. vinelandii* DJ de referencia. Este fragmento se clonó en el vector comercial pJET1.2blunt (Thermo Scientific) y se realizó una inserción de un casete de gentamicina (Gm) en los sitios *SalI*. El vector se transformó en *A. vinelandii* UW136 para una doble recombinación y se

seleccionaron las cepas resistentes a gentamicina, esta misma mutación se realizó en el fondo genético de la cepa *A. vinelandi* OP donde se transformó el mismo plásmido con el gen interrumpido por el casete de gentamicina. En el caso de la mutación en la phasina PhbP2, se amplificó el gen silvestre *phbP2* utilizando DNA cromosomal de la cepa UW 136 con los oligos fw3930PB/rv3930MPB. Una vez amplificado el fragmento, se clonó en el vector comercial pJET1.2/blunt y se realizaron digestiones parciales con la enzima *EagI*, se purificó un fragmento de 4000 pb donde se encontraba el inserto intacto, se rellenó con la enzima Klenow Fragment (Thermo Scientific) y se ligó con un casete de tetraciclina (2000 pb), previamente digerido con la enzima *SmaI*. Posteriormente, el gen interrumpido se transformó usando la cepa hospedera DH5 α . Se verificó la inserción del casete linearizando el plásmido con la enzima *XhoI*. Una vez verificada la interrupción del gen, este se transformó en células competentes de *A. vinelandii* cepa UW136 y se seleccionaron las cepas resistentes a tetraciclina.

Para la complementación de la cepa PHBZ1 se utilizó el plásmido pJG03910 Km^R (Tabla 3). Este plásmido se incorporó al genoma a través de una recombinación sencilla (cointegración del plásmido). Se verificó la incorporación del gen completo en el genoma a través de una reacción de PCR y se verificó la recuperación del fenotipo a través de la cuantificación del crecimiento y acumulación de PHB.

Tabla 4. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia ^{a,b,c}
PhbZ1fw	TCCTCCCTCTGCTTCTGTTG
PhbZ1rv	CGGCAGGTAGACCTTGACTG
Fw3930PB	ATACCGTCC TGC AGG TTG TC
Rv3930MPB	GTT AGG AGCTCC TGG CTG GTG GAG GAT TTC
3910F	TAGGTACATATGAGCCAGACTTTTTTTG
3910R	CTGTCAAAGCTTAGTATTGTCGCTAGGCTGAG
fw3930C	CTG CTC ATA TGT CCA GCT TTG ATT CG
rv3930C	GCT AGA ATT CTC CCT GGG TTC GAG CGC
THZ1fw	GATCG GAT CCC AGC CAG GAG ACT TTT TTT GC
THZ1rv	CTT AGG TAC CCG AGT ATT GTC GCT AGG CTG AG
THP1fw	GATCG GAT CCC ATG TCT TTT TTT GAT CTG G
THP1rv	CTT AGG TAC CCG GGC AGT CTT CTT GCC AGC GG
THP2fw	GATCGGATCCCATGTCCAGCTTTGATTCGAA
THP2rv	CTTAGGTACCCGCTCCCTGGGTTGAGCGC
THCfw	GCTCTAGACATGGATCAAGCCCCCTTTTACAAG
THCrv	CGGAATTCTCAGCCTTTCACGTAACGGCCTGG
ZL391	GCAGGAATTCTTCTCCGACA
ZD391	AAC CAG CCG TAG AGC GTA TG
FtranscripFW39	CGT ATC TAG AGT CTC AAT CTC CCA AAG GCA AC
FtranscripRV39	TCAGGAATTCGATCACCTCTTCG TGC TGG
FtranscripFWP2	TGC ATC TAG AGA TCA CCC TCT TCG TGC TGG
FtranscripRVP2	TCA GGA ATT CGT CTC AAT CTC CCA AAG GCA AC

Expresión de PhbZ1 y PhbP2

Para la expresión heteróloga de la depolimerasa PhbZ1 de *A. vinelandii* en *E. coli* se amplificó un fragmento de 2.7 Kb correspondiente al gen *phbZ1* (*avin03910*). Se diseñaron oligonucleótidos que carecen del primero y último codón (3910F/3910R). El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *NdeI* y *HindIII* y se clonó en el plásmido pET24a (Invitrogen). El plásmido generado se denominó pJG03910. El fragmento de ADN se secuenció para confirmar la presencia de un gen *phbZ1* intacto y el plásmido se transformó en *E. coli* BL21DE3. En el caso de la phasina PhbP2, se amplificó el gen *avin03930* utilizando DNA cromosomal de la cepa silvestre UW136 de *A. vinelandii* con los oligonucleótidos fw3930C/rv3930C, se obtuvo un fragmento de 0.5 Kb, correspondiente al tamaño del gen que se clonó en el vector pET24a (Invitrogen). Este vector se digirió con las enzimas *NdeI*/*EcoR1* y se verificó la inserción con un análisis de restricción. Se liberaron dos fragmentos, uno de 5.3 Kb correspondiente al vector y otro de 0.5 Kb, correspondiente al gen de interés. Una vez verificada la clonación, se secuenció el plásmido para verificar que el gen no presentara mutaciones y se nombró a este plásmido pJG03930.

Los plásmidos pJG03910 y pJG03930 se usaron para transformar la cepa BL21DE3 de *E. coli* (Invitrogen). La expresión de las proteínas PhbZ1-HIS₆ y PhbP2-HIS₆ fue inducida con IPTG a una concentración de 0.5 mM. La inducción se realizó durante 8 h a 27 ° C. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en el buffer Tris-HCl pH 8 y se lisaron mediante sonicación a 8 kHz a 4 °C en una Celda Vibra (Sonics), en presencia de una mezcla de inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail, Roche). El extracto de las cepas que expresó cada una de las

proteínas se concentró utilizando filtros centrífugos Microcon YM-50 (Amicon) y se almacenó a 4 ° C. Las concentraciones de proteína se determinaron por el método de Lowry *et al.*, (1951) [105] usando BSA para la curva estándar. La expresión de las proteínas fue verificada a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 para el caso de la proteína PhbP2 y 12% para PhbZ1 lo cual reveló la presencia de dos bandas de 19 kDa y de 100 kDa respectivamente.

Western Blot

Se utilizaron 5 µg de extractos crudos de las cepas pJG03910 y pJG03930 para la electroforesis en geles de poliacrilamida, los geles fueron transferidos usando una cámara de transferencia semiseca (Thermo Fisher Scientific) a una membrana de nitrocelulosa (General Electric). Una vez transferidas las proteínas a la membrana esta fue bloqueada con 1 % de albúmina y 0.1 % de tween 20 durante toda la noche. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-His (Qiagen) a una dilución de 1:10000 y con el reactivo Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer).

Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó utilizando el método espectrofotométrico reportado por Law y Slepecky (1961) [106]. Las células fueron cultivadas en medio PYS. Se utilizó 0.5 ml de cultivo celular el cual fue lavado con MgSO₄ y se recuperó el paquete celular al cual se le añadió un mililitro de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial 6%) diluido al 30% en agua y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Una vez incubadas las células fueron lavadas con 1 ml de agua y se centrifugaron durante 10 minutos a 13700 g, este proceso se repitió con acetona y

etanol, por último las muestras se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió a las muestras 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calentaron durante 10 minutos a 90 °C, se diluyeron en ácido sulfúrico según su concentración de PHB, y se midió el crotonato resultante en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda a 235 nm.

Aislamiento de gránulos nativos de PHB

Los gránulos nativos de PHB (nPHB) se purificaron como se describió previamente [65]. Las células de *A. vinelandii* se cultivaron durante 48 horas en medio PYS y se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm a 4 °C durante 20 minutos, se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y se adicionó DTT 1 mM. Las células se rompieron usando una prensa French bajo las siguientes condiciones: 900 psi por 3 pases. Los gránulos de nPHB se separaron usando dos gradientes de glicerol (primer gradiente, 87 y 50%, segundo gradiente 87, 80, 60 y 40%) en buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. Los gránulos purificados se dializaron con el buffer de reacción correspondiente. En el caso de los gránulos nPHB de la cepa MG1655 de *E. coli*, que expresa el operón biosintético PHB de *A. vinelandii* localizado en el plásmido pPHBAv [102], se purificaron de la misma manera, excepto que las células se cultivaron durante 24 h en medio M9.

Producción de gránulos artificiales de PHB

Para la generación de gránulos artificiales (aPHB) se utilizó PHB comercial (Sigma Aldrich). Se disolvieron en cloroformo 150 miligramos de PHB por mililitro, la mezcla se calentó a 65 °C durante 10 min y se añadieron 20 volúmenes de CTAB 50 mM en agua como agente tenso activo. La mezcla se sonicó tres veces durante

15 s en un sonicador Virsonic 60 y se calentó a 75 °C para evaporar el cloroformo [107].

Determinación de la actividad hidrolítica PHB endógena de nPHB gránulos

Para medir la contribución de la depolimerasa PhbZ1 a la actividad hidrolítica endógena de los gránulos de nPHB de *A. vinelandii*, se utilizaron 5 mg de gránulos de nPHB por reacción (1 ml) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La reacción se incubó a 37 °C durante 72 h, con agitación constante a 600 rpm y se tomaron muestras de 100 µl cada 24 horas para la cuantificación de PHB por el método anteriormente descrito [105].

Determinación de la actividad tiolítica de PHB

La actividad tiolítica de la proteína PhbZ1 se midió usando gránulos de nPHB, como se describió previamente [54]. Las reacciones se realizaron en volumen de 1 ml usando 1 mg de nPHB, 50 mM de DTT, 1 mM de CoA y buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7. Se tomaron 100 µl cada 30 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 13700 g antes del análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación de HPLC de β -hidroxibutiril-CoA y CoA se realizó esencialmente como lo describen Uchino *et al.* (2007) [54]. Se inyectaron muestras de 20 µl de los productos de la reacción enzimática en una columna Waters Xterra MS C18 y se eluyeron con un gradiente (0-40% A: B) de agua acidificada con ácido tricloroacético al 1% (solución A) y metanol puro (solución B), a un flujo de 0.8 ml / min, 1200 psi, a 30 °C con un detector de UV / vis a $\lambda = 260$ nm. Se utilizaron estándares de β -hidroxibutiril-CoA y CoA de sigma.

Determinación de la actividad de PHB sintasa

Para la determinación de la actividad de PHB sintasa se utilizaron extractos crudos de *E. coli* pPHBA, *E. coli* JG03910 y *E. coli* PET24a+. Los cultivos fueron crecidos a una densidad óptica (DO) de 0.4-06 y fueron inducidos con 0.5 mM de IPTG. Después de 3 horas las células se lavaron dos veces con buffer fosfatos 25 mM, pH 7 y se lisaron por sonicación, se centrifugaron a 9660 g durante 15 minutos a 4 °C. La proteína de los extractos celulares se cuantificó por el método de Lowry [96]. La determinación de la actividad de PHB sintasa se evaluó por métodos espectrofotométricos como los describe Millán *et al.*, (2016) [99]. La reacción se llevó a cabo en 1 ml de volumen final, se utilizó buffer fosfatos 25 mM, pH 7, 0.1 mM de DTNB, 55 μ M β - hidroxibutiril-CoA y 1 mg de extracto de proteína y se midió a 412 nm la liberación de CoA libre.

Condiciones de cultivo en biorreactores bajo condiciones limitantes de oxígeno

Para la realización de los cultivos en lote se usaron las cepas *A. vinelandii* OP y la mutante PhbZ1-OP. El inóculo se cultivó previamente en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de medio y se incubó en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific Co., modelo G25) durante 20-22 horas a 29 ° C y 200 rpm. Se utilizó en un biorreactor (Applikon Biotechnology, Holland) con un volumen de trabajo de 2 L equipado con dos turbinas Rushton de 4,5 cm de diámetro y operadas a 200 rpm [99]. El biorreactor se cargó inicialmente con 1,8 L de medio PYS, la temperatura se controló a $29 \pm 0,5$ ° C y el pH del medio se ajustó a $7,2 \pm 0,09$ mediante la adición automática de soluciones de NaOH o HCl 2 N utilizando una

bomba peristáltica. La tensión de oxígeno disuelto (DOT) se midió con una sonda polarográfica de Ingold (AppliSens, Applikon, Holland) que se controló automáticamente mediante mezcla de gases, variando las proporciones de oxígeno y nitrógeno a través de dos flujos de masa controlada (Brook Instruments BV modelo 5850F, Países Bajos). Ambas cepas se cultivaron en condiciones limitantes de oxígeno con una DOT = $1,0 \pm 0,2\%$ [98].

Análisis del peso molecular del PHB producido

Para el análisis del peso molecular de PHB, el polímero se recuperó usando disolventes orgánicos, como se describió previamente [99]. Las muestras de PHB recuperadas se disolvieron en cloroformo a una concentración de 2-3 mg ml⁻¹ y se filtraron a través de una membrana de GHP de 0,45 μm (PALL Acrodisc, número de catálogo 21854606). Luego, las muestras se inyectaron en la HPLC (Waters Alliance 2695, EE. UU.) utilizando dos columnas para cromatografía de permeación en gel (GPC) (Styragel HR5E y HR6, Waters) conectadas en serie y acopladas con un detector de índice de refracción (Waters 2414, EUA). Se utilizó una fase móvil de cloroformo a 30 °C a un flujo de 0,7 ml min⁻¹. Se utilizó una curva de calibración con estándares de poliestireno en el rango de $2,94 \times 10^3$ a $5,97 \times 10^6$ g mol⁻¹ y los datos se procesaron con el software Empower.

Ensayos de doble híbrido

Se realizó un ensayo de doble híbrido con el sistema comercial BACTH System Kit (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit) de Euromedex, basado en la reconstrucción de la actividad de la enzima adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* a través de la interacción de los dos fragmentos de la proteína.

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos para amplificar los genes *phbZ1*, *phbP2*, *phbP1*, *phbC*: *THZ1fw/THZ1rv*, *THP1fw/THP1rv*, *THP2fw/THP2rv*, *THCfw/THCrv*. Los genes de estas proteínas se ligaron y clonaron en los plásmidos pKT25 y pUT18C en los sitios *Bam*H1 y *Kpn*I para *phbZ1*, *phbP2*, *phbP1* y *Xba*-*Eco*R1 para *phbC*. Se verificó la inserción de los genes en el plásmido pKT25 (correspondiente a los primeros 224 aminoácidos de la adenilato ciclasa) en el extremo C terminal y pUT18C (aminoácido 225 al 399 de la enzima) en el extremo amino terminal, por patrón de restricción de los plásmidos y por PCR. Los plásmidos fueron usados para transformar la cepa de *E.coli* BTH101 que presenta una mutación en el gen que codifica para la adenilato ciclasa. Se seleccionaron tres clonas de cada una de las cepas y se probaron en dos medios que permiten ver las interacciones (detección de producción de AMP cíclico), agar MacConkey adicionado con IPTG y medio M63 adicionado con maltosa y Xgal de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

La expresión de *phbZ1* fue medida por qRT-PCR como previamente fue reportado [107]. Se utilizaron las cepa PhbF::GM [100] y la cepa silvestre UW 136. Para la extracción de RNA, los cultivos fueron crecidos en medio BS, las células fueron colectadas a las 12 h, 30 h y 72 h y se utilizaron los oligos ZL91/ZD391 para medir la expresión de *phbZ1* y *fw-gyrA/rev-gyrA* para la expresión de *gyrA*. El tamaño de los fragmentos fue de 100 pb y la expresión de *gyrA* fue usada como control interno para normalizar los resultados. Todos los ensayos fueron realizados

por triplicado. Los datos son presentados como cambio en los niveles de RNAm (media \pm SD) de la cepa mutante comparada con la silvestre.

Fusiones Transcripcionales

Para realizar las fusiones transcripcionales se utilizó el plásmido pUMA Tc 5'>3' [108] que tiene el gen reportero *gusA* y que contiene fragmentos flanqueantes del gen *melA*, que codifica para una enzima alfa galactosidasa, lo que permite la inserción en ese lugar del cromosoma de forma divergente al promotor de *melA*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la región promotora de los genes *Avin03910* y *phbP2* *FtranscripFW391/FtranscripRV391* y *FtranscripFWP2/FtranscripRVP2*, (Tabla 2). Los fragmentos se secuenciaron para que verificar que no hubiera deleciones o mutaciones. Los fragmentos se digirieron con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* al mismo tiempo que se purificaron los plásmidos y se digirieron con las mismas enzimas. Se ligaron y se transformaron en la cepa DH5 α . Finalmente mediante patrón de restricción y PCR se verificó que los plásmidos presentaran el inserto.

RESULTADOS

Este trabajo se enfocó en estudiar una de las 7 posibles PHB depolimerasas codificadas en el genoma de *A. vinelandii*. El producto del gen *avin03910* se identificó asociado a los gránulos nativos de *A. vinelandii*. Además, en el contexto genético donde se localizó este gen se encontraron dos características interesantes; la primera de ellas fue la localización de manera divergente del gen *avin03930* una posible phasina, la segunda, es la identificación *in silico* de dos posibles sitios de unión para el regulador transcripcional PhbF en las regiones promotoras de ambos genes (*avin03910*- *avin03930*). Para comenzar esta investigación, se probó que el gen *avin03910* codificara para una proteína con actividad PHB depolimerasa, para ello se clonó este gen en un vector para expresarlo en *E. coli*, un organismo no productor de PHB y que, por lo tanto, carece de actividad de hidrólisis de PHB.

La proteína Avin03910 expresada en *E. coli* presenta actividad hidrolítica sobre gránulos de PHB amorfo.

Con el fin de determinar si la proteína Avin03910 tiene actividad de PHB depolimerasa, se cuantificó su actividad de hidrólisis. Se clonó el gen *avin03910* y se expresó en el plásmido de expresión pET24a, dando como resultado el plásmido pJG03910. La expresión de la proteína se indujo en células de *E. coli* transformadas con este plásmido. El análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas presentes en los extractos celulares mostró que la mayor parte de la proteína Avin03910 permaneció insoluble; sin embargo, mediante la modificación del protocolo de inducción se obtuvo una cantidad suficiente de ésta en la fracción soluble que se detectó por Western blot Figura 7.

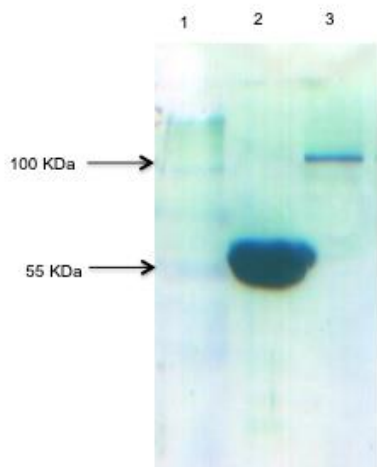


Figura 7. Western Blot de la proteína PhbZ1 expresada en *E. coli* detectada con un anticuerpo monoclonal anti-histidinas. Carriles: 1) Marcador de peso molecular 2) proteína Hsp20 con anti-His (control positivo) 3) Extracto de células de *E. coli* que expresa PhbZ1 con el plásmido pJG03910.

Se realizaron distintos intentos para purificar la proteína sin éxito, ya que la mayor parte se precipitó durante la purificación; por lo tanto, se midió la actividad hidrolítica de PHB usando la fracción soluble de los extractos de células de *E. coli* que contenían la proteína. El ensayo enzimático se realizó usando tres sustratos diferentes: gránulos nativos de PHB (nPHB) purificados a partir de *E. coli* recombinante que expresa el operón biosintético de PHB (*phbBAC*) de *A. vinelandii*, gránulos artificiales de PHB (aPHB) y gránulos de PHB purificado cristalino (cPHB). La enzima presentó actividad sobre nPHB ($93.0 \pm 1.4 \mu\text{g de PHB h}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$) y aPHB ($66.1 \pm 3.6 \mu\text{g de PHB h}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$) (Figura 8); sin embargo, no se detectó actividad hidrolítica en cPHB. Adicionalmente, no hubo actividad cuando

se usaron extractos de *E. coli* que contenía el plásmido vacío (datos no mostrados), indicando que la actividad de hidrólisis detectada es atribuible a la proteína Avin03910. Tras la detección de esta actividad de hidrólisis de PHB, la proteína se denominó PhbZ1.

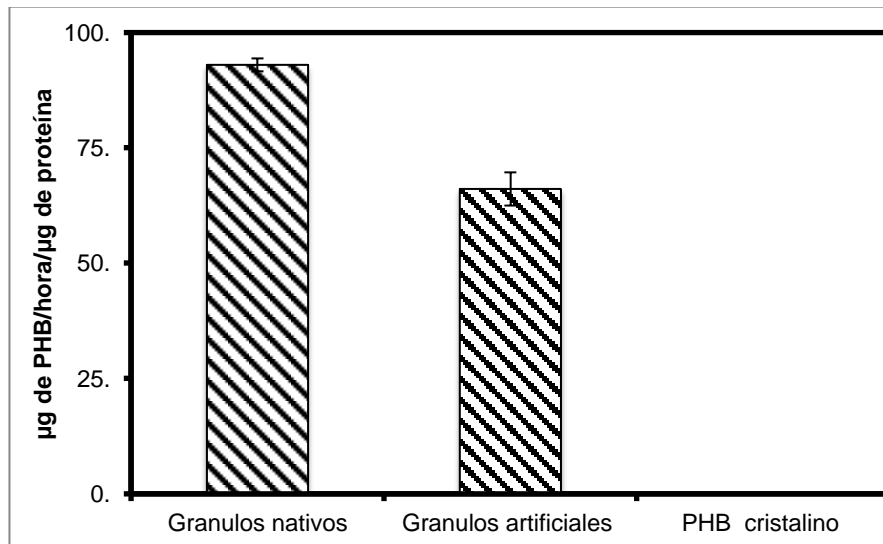


Figura 8. Actividad hidrolítica de la proteína PhbZ1 expresada en *E. coli*, utilizando tres sustratos: gránulos nativos producidos en *E. coli*, gránulos artificiales y PHB cristalino

La inactivación del gen *phbZ1* afecta negativamente la actividad hidrolítica de PHB presente en los gránulos nPHB de *A. vinelandii*.

Para investigar más a fondo la función de la enzima PhbZ1 (asociada a los gránulos) en el metabolismo de PHB, inactivamos el gen *phbZ1* mediante la inserción de un gen de resistencia a gentamicina, generando la cepa PhbZ1. Se purificaron gránulos de nPHB de la cepa silvestre UW136 y de la mutante PhbZ1 crecidas en medio PYS hasta la fase estacionaria (48 horas) y se comparó su capacidad de movilización de PHB intrínseca (endógena) *in vitro*. Como se muestra en la figura 9, los gránulos de PHB de la cepa silvestre fueron capaces de movilizar $37.0 \pm 2.5\%$ del polímero

después de 72 h de incubación, mientras que los gránulos de la mutante sólo degradó el $11.2 \pm 1.5\%$ del contenido inicial de PHB. Para confirmar que esta diferencia se debió a la inactivación del gen de la PHB depolimerasa PhbZ1, la mutante PhbZ1 se complementó con el alelo silvestre *phbZ1* por co-integración del plásmido pJG03910 en el cromosoma. La cepa complementada recuperó parcialmente la actividad de movilización de PHB, degradando el $24.5 \pm 5.5\%$ del PHB presente en los gránulos después de 72 h (Figura 9).

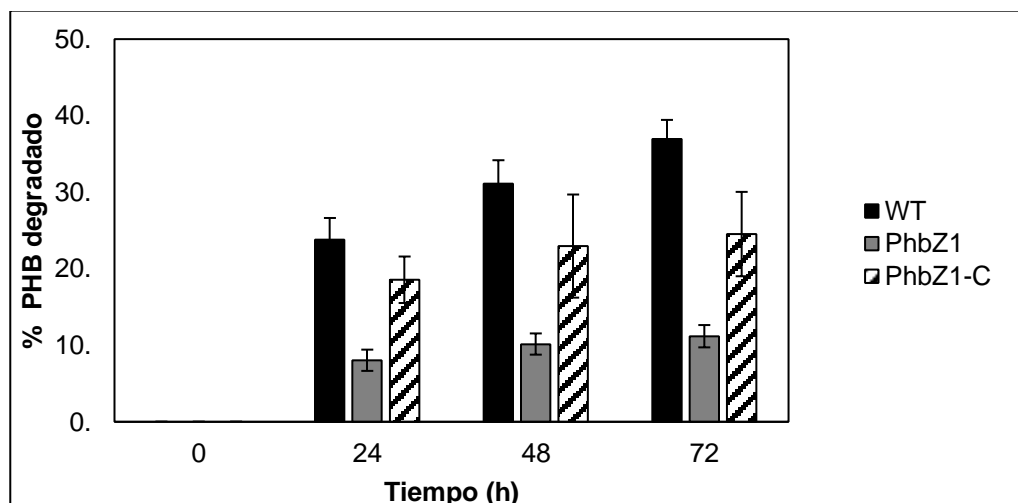


Figura 9. Actividad hidrolítica endógena de granulo nPHB de *A. vinelandii* UW136, de la mutante PhbZ1 y de la cepa complementada PhbZ1-C. Los gránulos (5mg de nPHB por 1 mL de reacción) fueron incubados en buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 a 37 °C. El contenido de PHB de los gránulos fue cuantificado a los tiempos de incubación mostrados y se graficó el porcentaje de PHB que se degradó. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

PhbZ1 participa también en la degradación de nPHB por tiólisis en presencia de CoA libre.

En *R. eutropha*, la bacteria modelo para el metabolismo de PHB, se demostró que la depolimerasa PhaZa1, además de la reacción hidrolítica, es capaz de movilizar el PHB mediante una reacción tiolítica utilizando CoA libre y produciendo β -hidroxibutiril-CoA [52], [70]. Esta actividad se atribuye al cambio de una serina por una cisteína en su triada catalítica lo que la hace muy similar a las PHAs sintasas como se explicó previamente. Debido a que la enzima PhbZ1 de *A. vinelandii* presenta este mismo cambio de aminoácido en el motivo catalítico [109], se analizó la actividad de tiólisis de PhbZ1. Este experimento se realizó midiendo la actividad presente en gránulos nPHB purificados de la cepa de silvestre UW136, de la mutante PhbZ1 y de la cepa complementada PhbZ1-C (Tabla 5), de manera similar al experimento de determinación de actividad hidrolítica endógena de los gránulos. En los gránulos de la cepa silvestre se observó la reacción tiolítica en presencia de CoA, formando β -hidroxibutiril-CoA. En contraste, los gránulos de nPHB de la cepa mutante mostraron una actividad reducida un 90%, mientras que la complementación de la mutación en la cepa PhbZ1-C restauró la actividad tiolítica de la cepa silvestre (Tabla 5 y Figura 10).

Tabla 5. Actividad tiolítica de gránulos de PHB nativos purificados a partir de diferentes cepas de *A. vinelandii* en presencia de la coenzima A

Cepa	Actividad específica (3HB-CoA $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)
WT	20.0 (\pm) 1.0
PhbZ1	1.80 (\pm) 0.5
PhbZ1-C	18.6 (\pm) 0.5

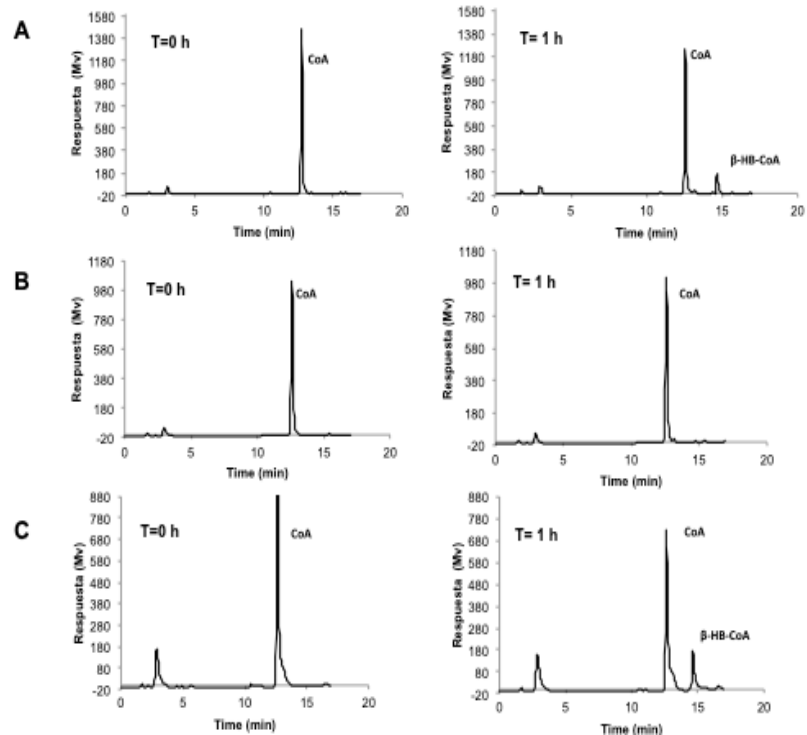


Figura 10. Análisis por HPLC de la formación de β -Hidroxitbutiril-CoA durante la tiólisis de nPHB de: a) *A. vinelandii* UW136 (WT), B) cepa mutante PhbZ1, C) cepa complementada PhbZ1-C, en presencia de CoA libre. Una muestra de 20 μl del sobrenadante obtenido por centrifugación fue analizada por HPLC en los tiempos indicados (0 y 1 h).

La proteína PhbZ1 no tiene actividad significativa de PHB sintasa.

Debido a la similitud de la mitad amino terminal de PhaZ1 con la subunidad PhaC de las PHA sintasas clase III, y a que la reacción inversa a la de polimerización que llevan a cabo estas enzimas (reacción de tiólisis) también se ha documentado que ocurre con la PHA sintasa PhbC de *R. eutropha* [31], se consideró que PhbZ1 fuera una PHB sintasa, para confirmar esto se analizó midiendo la actividad de polimerización de PhbZ1 expresada en *E. coli* a partir del plásmido pJG03910 y utilizando β -hidroxibutiril-CoA como sustrato (Tabla 6). Como controles se utilizaron extractos celulares de *E. coli* que expresan la PHB sintasa PhbC de *A. vinelandii* (WP_012700949) a partir del plásmido pPHBAv y extractos celulares de *E. coli* con el vector vacío pET24a. La presencia de PhbZ1 soluble en el extracto celular de *E. coli* que contiene el plásmido pJG03910 se confirmó mediante la detección de la proteína por un ensayo de Western Blot (Figura 11). La actividad de polimerización de PHB (Tabla 6), medida como la liberación de CoA libre, se detectó claramente en las células de *E. coli* que expresan la PHB sintasa PhbC de *A. vinelandii*, mientras que las células que expresan PhbZ1 no presentaron actividad significativa, pues el valor fue 20 veces menor que el control positivo y muy similar al control negativo. Aunque en este experimento no detectamos actividad significativa de PHB sintasa para la proteína PhbZ1 expresada en *E. coli*, esto podría deberse a la necesidad de algún factor adicional ausente en esta bacteria. Para analizar esta posibilidad, probamos el efecto de la inactivación de *phbZ* en la actividad de la PHB sintasa total en extractos celulares de *A. vinelandii*. Las actividades de la cepa silvestre, la mutante PhbZ1 y la cepa complementada PhbZ1-C se cuantificaron y se compararon con las actividades de la mutante en *phbC* llamada CS18 [81] y la doble

mutante *phbC-phbZ1*. Como se muestra en la tabla 7, las actividades de PHB sintasa de la cepa silvestre, la mutante PhbZ1 y la cepa complementada fueron similares, mientras que en las mutantes *phbC-PhbZ1* y *PhbC* mostraron una actividad considerablemente disminuida, lo que sugiere que PhbZ1 no presenta actividad de polimerización.

Tabla 6. Actividad de PHB sintasa de la proteína PhbZ1 expresada en *E. coli*

Cepa y plásmido	Actividad específica (nmol de β -hidroxibutiril-CoA /minuto/mg de proteína)
<i>E. coli</i> -pET24a	93.1 \pm 8.0
<i>E. coli</i> -pJG03910	80.0 \pm 11.0
<i>E. coli</i> -pPHB _{Av}	1848.0 \pm 97.0

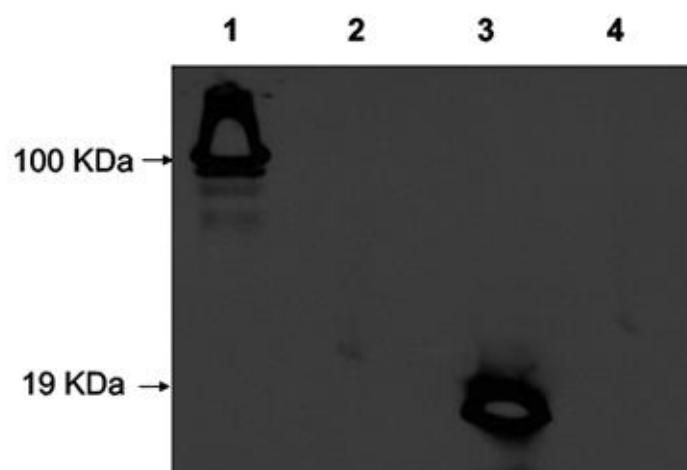


Figura 11. Western Blot de la proteína PhbZ1 expresada en *E. coli* detectada con un anticuerpo monoclonal anti-histidinas. Carriles: 1) Extracto de células de *E. coli* que expresa PhbZ1 con el plásmido pJG03910. 2) *E. coli* con el vector vacío pET24a (control negativo); 3) proteína PhbP2 con anti-His (control positivo); 4) marcador de peso molecular.

Tabla 7. Actividad de PHB sintasa en *A. vinelandii*.

Cepa	Actividad específica (μmol de β -hidroxibutiril-CoA /minuto/mg de proteína)
WT	6.98 ± 0.08
PhbZ1	6.71 ± 0.10
PhbZ1-C	$6.90.0 \pm 0.04$
PhbZ1-PhbC	0.17 ± 0.03
CS18	0.12 ± 0.01

La mutante PhbZ1 no tiene fenotipo en cultivos en matraces.

Para determinar el efecto de la inactivación de *phbZ1* sobre el metabolismo de PHB, se comparó la acumulación de PHB en la mutante PhbZ1 con la de la cepa silvestre UW136 en cultivos en matraces con medio PYS. La cinética de crecimiento de ambas cepas no mostró diferencias, pues presentaron el mismo desarrollo medido como proteína celular (Figura 12a). La acumulación máxima de PHB, alcanzada en la fase estacionaria (48 h, Figura 12b), fue muy similar para ambas cepas. La cepa silvestre UW136 produjo $1860 \pm 49 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que la mutante PhbZ1 acumuló $2029 \pm 41 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PHB por lo que no se observó diferencia significativa en el contenido máximo de polímero. Para investigar si la falta de fenotipo podría explicarse por el patrón de expresión del gen *phbZ1*, se construyó una cepa con una fusión transcripcional con el gen reportero *gusA* y se midió la actividad β -glucuronidasa a diferentes tiempos (Figura 12c). Se encontró que el gen *phbZ1* se expresa mayoritariamente durante la fase estacionaria, que es cuando la proteína PhbZ1 fue detectada unida a los gránulos de PHB (Figura 5). Con el fin de comparar si el fenotipo pudiera observarse bajo condiciones de movilización de PHB, analizamos los cambios en el contenido del polímero en ambas cepas después de que se alcanzó la acumulación máxima de PHB cuando las células no crecen ya por alguna limitación de nutrientes. Las cepas silvestre y mutante se cultivaron durante 48 hasta llegar a la fase estacionaria tardía y se incubaron durante 48 h adicionales, midiendo el contenido de polímero cada 8 h. No se observaron diferencias en la movilización de PHB entre las dos cepas (datos no mostrados). Adicionalmente, se probó transfiriendo las células después de la acumulación de PHB a diferentes medios y condiciones, para determinar si la mutación en este gen presentaba un

fenotipo en estas condiciones. Se probó transferir las células a un medio definido sin fuente de carbono y con diferentes concentraciones de sacarosa, fosfato, amonio y diferentes condiciones de aireación. La concentración de sacarosa en el medio PY también se modificó. Las cepas mutantes y silvestre mostraron una cantidad similar de PHB en todas las condiciones y tiempos analizados en matraces sin observar un fenotipo diferente (datos no mostrados).

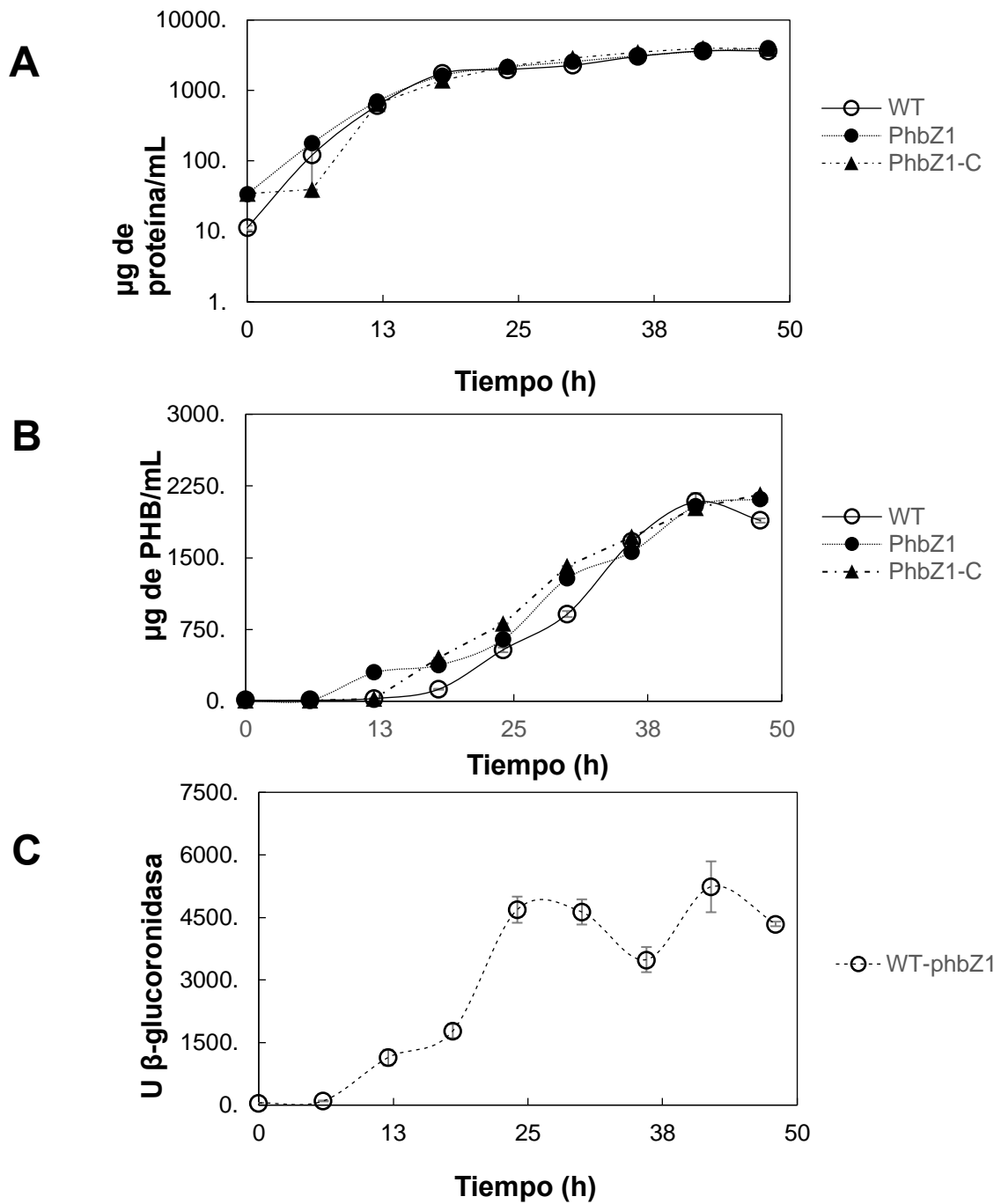


Fig. 12. Cinética de crecimiento de las cepas WT, PhbZ1 y PhbZ1-C en matraces Erlenmeyer. A) Crecimiento cuantificado como proteína. B) Acumulación de PHB. C) Expresión transcripcional del gen *phbZ1* utilizando el gen reportero β -glucuronidasa *gusA*.

Efectos de la inactivación de *phbZ1* sobre la cantidad de PHB producido en biorreactores y su peso molecular

Anteriormente se reportó por Millán *et al.* 2016 [99], que en cultivos de *A. vinelandii* OP crecidos en un biorreactor de 3 L, el peso molecular promedio del PHB producido durante la fase de crecimiento exponencial alcanzó 4800-5500 kDa, pero disminuía a 3600 kDa después de 20 h de cultivo, en la fase estacionaria. Esta disminución se correlacionó con la aparición de una fracción de polímeros de bajo peso molecular (inferior a 1000 KDa) y también con un aumento en la actividad enzimática de la depolimerización de PHB durante la fase estacionaria del cultivo. Para determinar si la enzima PhbZ1 podría estar implicada en la degradación del PHB en el biorreactor, se inactivó el gen *phbZ1* en *A. vinelandii* OP, resultando la mutante PhbZ1-OP y se estudió su comportamiento en el biorreactor, en colaboración con Modesto Millán [98].

Ambas cepas mostraron un crecimiento similar en el biorreactor. La tasa de crecimiento específico (μ) en el caso de la cepa OP fue de $0.08 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, mientras que para la mutante PhbZ1, fue $(0.09 \pm 0.01 \text{ h}^{-1})$. Cuando el crecimiento se midió como proteína (Figura 13a), ambas cepas también mostraron valores similares, por lo que la inactivación del gen *phbZ1* no tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de crecimiento de la cepa. Sin embargo, cuando el crecimiento se midió como peso seco celular (CDW, Fig. 9b) si se observaron algunas diferencias. En el caso de la cepa OP, el CDW fue de $3.9 \pm 0.35 \text{ g l}^{-1}$ al final del cultivo, mientras que para PhbZ1-OP, fue de $5.2 \pm 0.23 \text{ g l}^{-1}$. La acumulación de PHB también mostró algunas diferencias interesantes como se muestra en la figura 13. Los cultivos de la cepa OP tuvieron una acumulación máxima de PHB de $79.6 \pm 6.1\%$ a las 42 hrs

este valor disminuyó a $70.7 \pm 5.9\%$ al final del cultivo. Para la mutante PhbZ1-OP, la acumulación de PHB alcanzó $90.0 \pm 1.0\%$ en la fase estacionaria, en un tiempo similar, y el contenido de polímero fue estable durante el resto del cultivo.

El análisis del PHB producido en diferentes tiempos de cultivo (Figura 13) mostró que el polímero acumulado en la cepa mutante PhbZ1-OP tenía un peso molecular promedio (Mw) (6100 kDa) mayor en comparación con el del polímero producido por la cepa silvestre OP (5200 kDa). Como se había reportado, el Mw del PHB producido por la cepa OP disminuyó durante la fase de crecimiento exponencial (de 5200 a 3600 kDa), permaneciendo en valores de 3500 kDa durante la fase estacionaria; sin embargo, en el caso de la mutante PhbZ1-OP, el Mw del polímero permaneció prácticamente constante en el rango de 5500 a 6200 kDa durante las 48 h de cultivo. La distribución del peso molecular (MWD) del polímero acumulado por ambas cepas también fue diferente (Figura. 14). En el caso del PHB producido por la cepa OP, el polímero estaba constituido por fracciones con pesos moleculares de 10 a 25.000 kDa en diferentes tiempos del cultivo (Figura 15a). Además, la fracción de moléculas de PHB con bajo peso molecular, en el rango de 10 a 350 kDa, aumentó con respecto al tiempo de cultivo, alcanzando aproximadamente el 28% de la muestra completa al final del cultivo (48 h) (Figura 15a). Por el contrario, para el polímero producido por la mutante PhbZ1-OP, la MWD mostró pesos moleculares de 350 a 25,000 kDa y esta distribución fue similar para todos los tiempos de cultivo analizados (Fig. 11b). La fracción de 10-350 kDa no se observó en las muestras obtenidas de la cepa PhbZ1-OP (Fig. 11c).

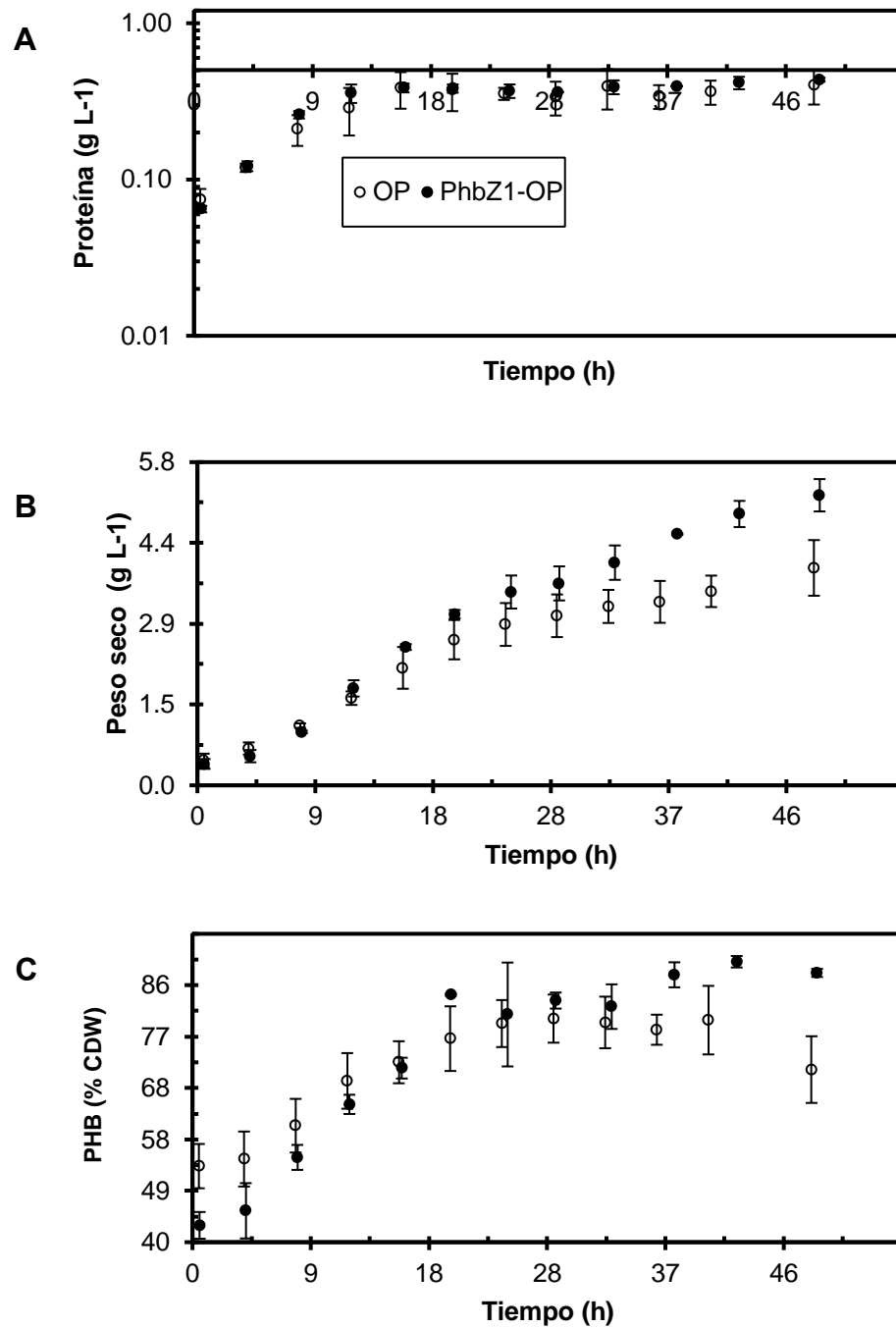


Figura 13. Cinéticas de crecimiento de las cepas *A. vinelandii* OP y *A. vinelandii* OP- PhbZ1. medidas como proteína (a) y peso de celulosa (b), y acumulación de PHB (c) de (círculos blancos) y su derivado mutante phbZ1 (cuadrados negros). Los cultivos se llevaron a cabo en un biorreactor de tanque agitado que contenía 2 l de medio PYS, como se indica en la sección materiales y métodos

de BM. Las cuantificaciones son el promedio de triplicados y se muestra la desviación estándar para cada punto.

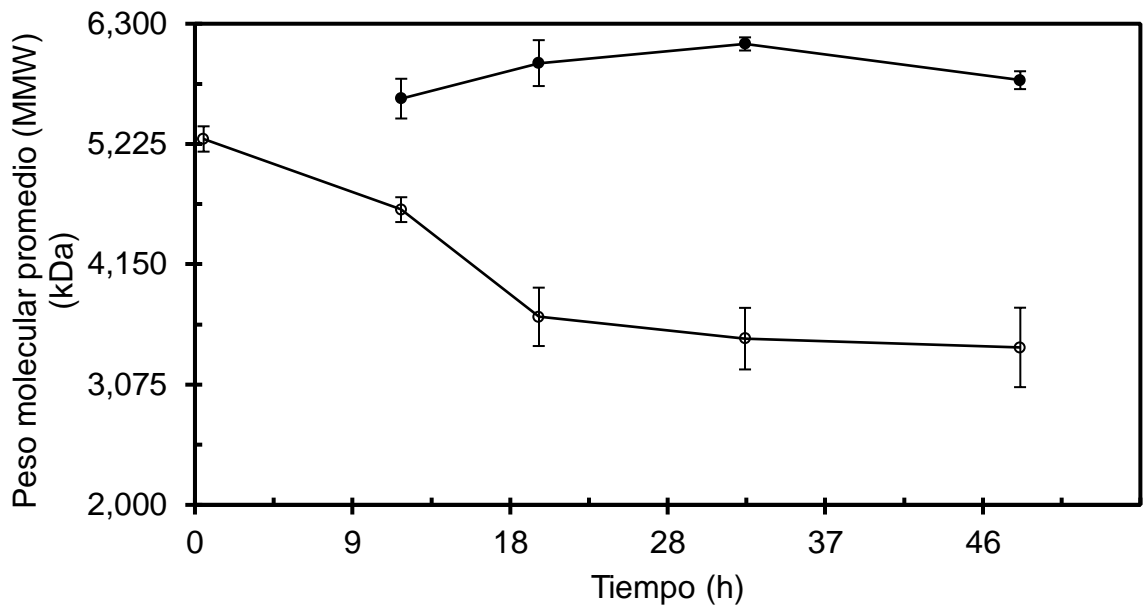


Figura 14. Peso molecular promedio (Mw) del PHB producido por la cepa OP de *A. vinelandii* (círculos blancos) y la mutante PhbZ1-OP (cuadrados negros) en diferentes tiempos de cultivo en un biorreactor en medio PYS.

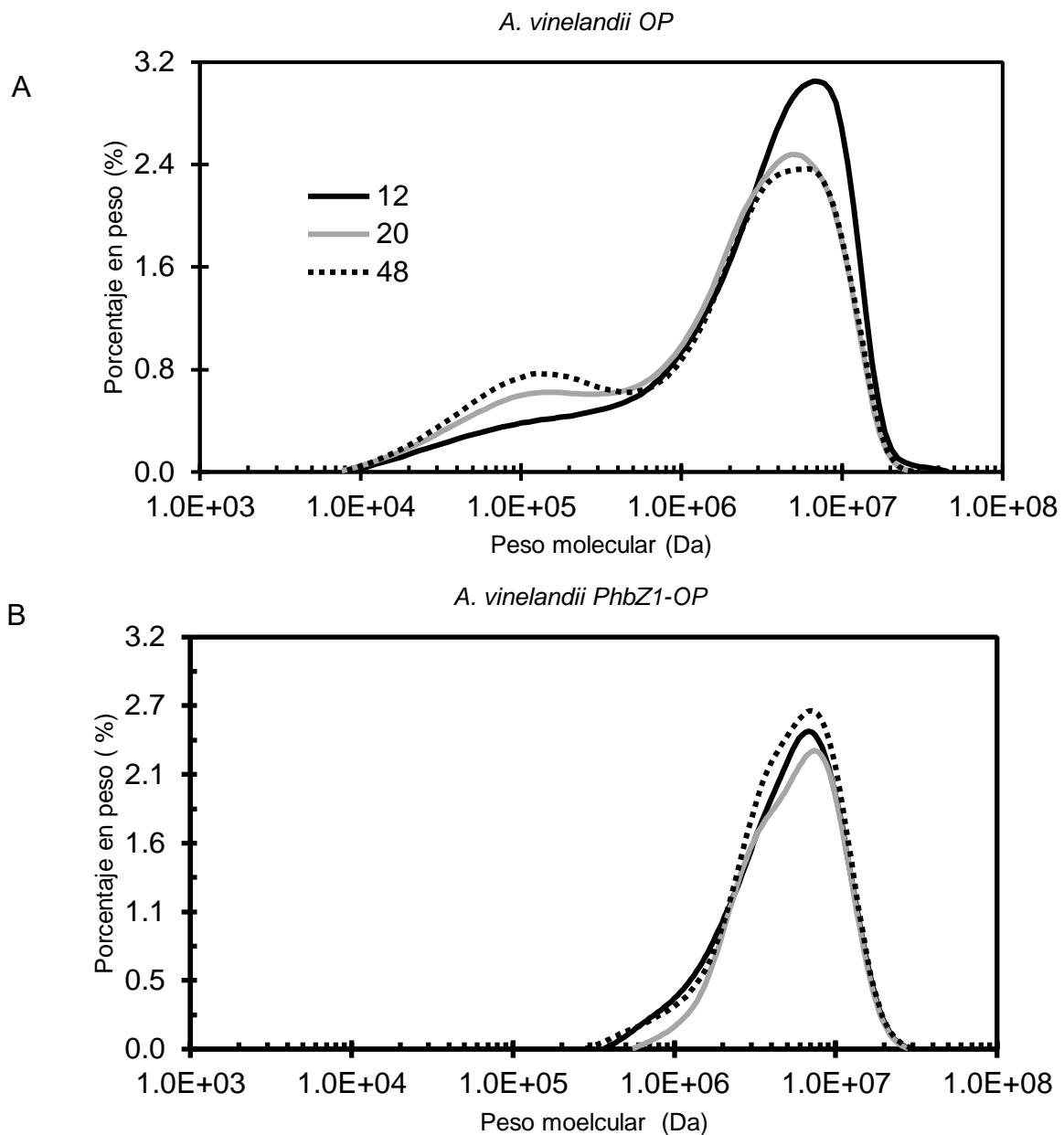


Figura 15. Distribución del peso molecular de PHB de las cepas: A) *A. vinelandii* OP, y la mutante de PhbZ1-OP mutante (B) cultivadas en un biorreactor de tanque agitado que en medio PYS, como se indica en la sección de materiales y métodos. La determinación del peso molecular se llevó a cabo mediante cromatografía de permeación en gel (GPC)

PhbF es un regulador transcripcional negativo de PhbZ1

Debido a que el gen *phbZ1* presentó posibles secuencias de unión para PhbF en la región promotora y con la finalidad de determinar la función de esta proteína en la regulación de la depolimerasa PhbZ1, se analizó la expresión de *phbZ1* utilizando RT-qPCR y fusiones transcripcionales. Se utilizó la cepa PhbF que presenta el gen *phbF* interrumpido con un casete de gentamicina y la cepa silvestre UW136. Para el RT-qPCR se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaban un fragmento 100 pb del gen *phbZ1*. Los resultados fueron normalizados utilizando el gen *gyrA*. Como se observa en la figura 16, la expresión relativa del gen *phbZ1* se incrementó al estar ausente *phbF*, respecto a la cepa silvestre, lo que mostró que esta proteína podría ser un regulador transcripcional negativo de la depolimerasa PhbZ1.

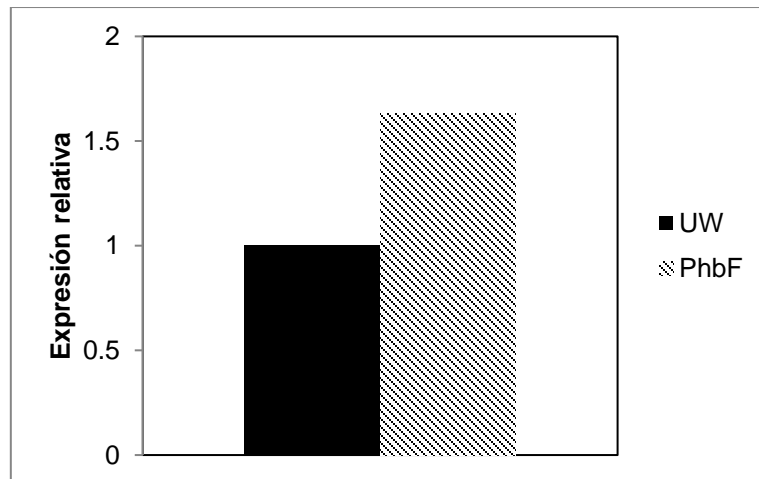


Figura 16. RT-qPCR. Expresión de *phbZ1* en la mutante *phbF*. La columna negra corresponde a la expresión relativa del gen *phbZ1* en la cepa UW136, la columna rayada corresponde a la expresión relativa del gen *phbZ1* en la cepa mutante *phbF*.

Para validar los datos obtenidos utilizando RT-qPCR se construyeron y se analizaron fusiones transcripcionales del gen *phbZ1* utilizando al reportero *gusA*. Los resultados mostraron que la expresión de *phbZ1* se incrementa cuando *phbF* no es funcional (Figura 17). Lo anterior, confirma que PhbF podría ser un regulador transcripcional negativo de la expresión de la PHB depolimerasa PhbZ1.

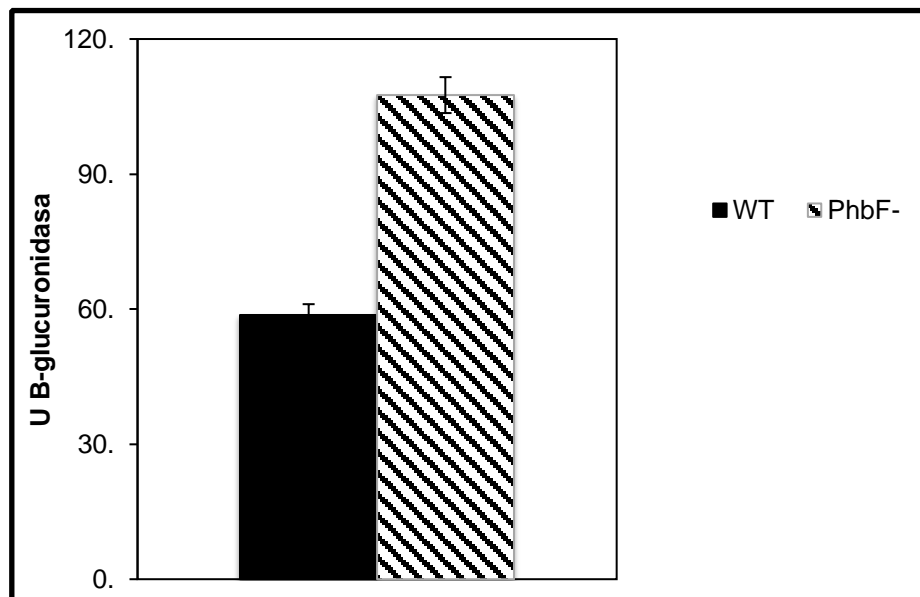


Figura 17. Expresión transcripcional del gen *phbZ1* utilizando el gen reportero *gusA* (β -glucuronidasa). La barra negra corresponde a los transcritos del gen *phbZ1* en la cepa silvestre UW136, la barra rayada corresponde a los transcritos del gen *phbZ1* en cepa mutante PhbF.

PhbP2 interacciona con la phasina PhbP1

Con el objetivo de determinar si la phasina PhbP2 participa en el proceso de depolimerización de *A. vinelandii*, se realizó un ensayo de doble híbrido en bacteria para probar si existe interacción *in vitro* entre esta PhbP2 y la PHB depolimerasa PhaZ1. Adicionalmente se probó la interacción con la phasina P1 y la PHB sintasa

de esta bacteria. Se utilizó el sistema comercial BACTH, basado en la interacción mediante la reconstrucción de la actividad de la enzima adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* en *E. coli*. Se clonaron los genes *phbZ1*, *phbP2*, *phbP1* y *phbC* en los plásmidos pUT18a y pKT25 que contienen los fragmentos de la adenilato ciclasa. En esta prueba se observó que no hubo interacción *in vitro* de la phasina PhbP2 y la depolimerasa PhbZ1, pues no hubo un cambio de color en el medio indicativo de la formación de AMP cíclico; sin embargo, se identificaron seis interacciones (Figura 18). Se observó que la phasinas P1 y P2 interaccionan consigo mismas, aunque la interacción más fuerte está presente en la phasina P1. Ambas phasinas también son capaces de interaccionar una con la otra, lo que sugiere que estas proteínas no sólo son capaces de formar homo-oligómeros, sino que también pueden asociarse entre ellas y pueden formar un hetero-oligómeros. Por su parte la PHB sintasa interacciona consigo misma, además de que presentó una interacción débil con la phasina P1. Estos resultados indican que la PHB sintasa de *A. vinelandii* tiene la capacidad de actuar como un dímero, como sucede con otras PHA sintasas.

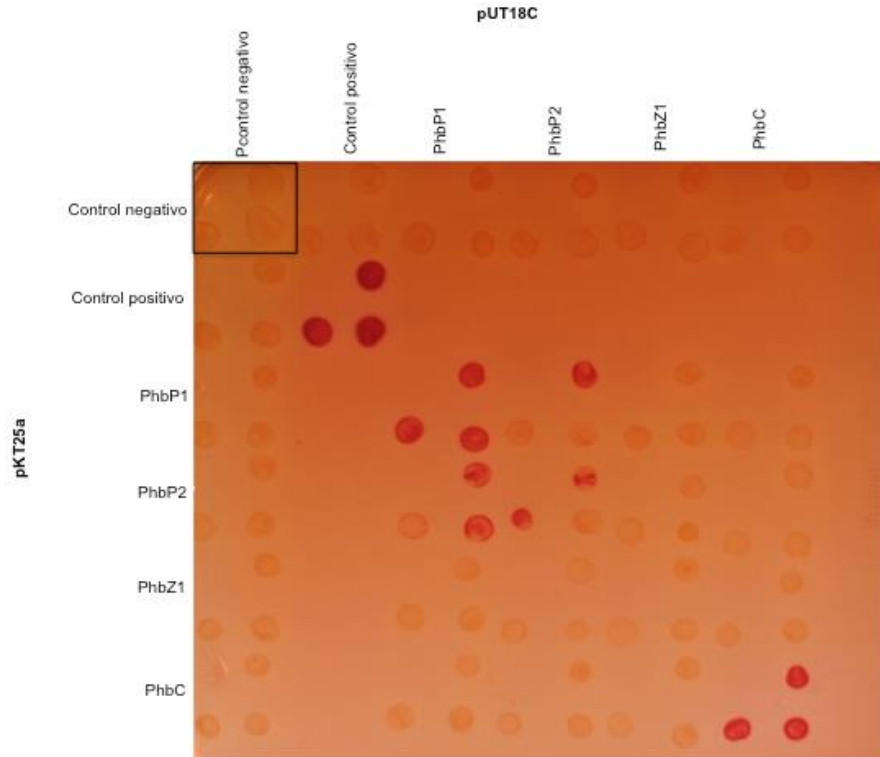


Figura 18. Ensayo de doble híbrido utilizando el sistema BACTH de *Bordetella pertussis* (euromedex). Eje X representa las proteínas PhbP1, PhbP2, PhbC y PhbZ1 clonadas en el fragmento T25 del adenilato ciclasa y el eje Y representa las mismas proteínas clonadas en el fragmento T18. Cada una de las interacciones muestra 3 clonas distintas.

DISCUSIÓN

El proceso biosintético de PHB y los elementos genéticos involucrados son bien conocidos en *A. vinelandii* [37, 85, 89, 90, 108, 111]; sin embargo, se sabe poco sobre la movilización de PHB. En el genoma de *A. vinelandii* existen al menos 7 genes cuyos productos presentan similitud con PHB depolimerasas. La localización en los gránulos de nPHB de una de las posibles PHB depolimerasas identificadas en el genoma (Avin03910; Figura 5), junto con otras proteínas implicadas en el metabolismo de PHB (Tabla 2), sugirió que esta proteína podría participar en la movilización del polímero. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se expresó esta proteína en *E. coli*, la fracción soluble de los extractos celulares mostró actividad hidrolítica *in vitro* sobre nPHB y aPHB, pero no en cPHB, como es característico en la depolimerasas de tipo intracelular [112,71]. Pese a que la cantidad de la proteína Avin03910 soluble en los extractos era muy baja, pues la mayor parte quedó insoluble en cuerpos de inclusión.

A pesar de las evidencias de que el gen *phbZ1* se expresa en la cepa silvestre en cultivos en matraces agitados, pues la proteína se encontró asociada a los gránulos bajo esta condición (Figuras 4) y se detectó expresión del mensajero en fusión con el reportero *gusA* (Fig. 17). La mutante PhbZ1 no mostró un fenotipo claro en la acumulación de PHB en esta condición; sin embargo, los gránulos de nPHB purificados a partir de la mutante PhbZ1 presentaron una actividad autohidrolítica *in vitro* claramente disminuida, en comparación con la cepa silvestre (Figura 8). Este efecto negativo de la falta de PhbZ1 sobre la movilización de PHB que se produce en los gránulos aislados, muestra la participación de esta enzima en la degradación

del polímero. Este resultado es similar al reportado para la mutante de PhaZa1, la principal PHB depolimerasa de *R. eutropha* [67, 70]. Tanto la falta de fenotipo de la mutante PhbZ1 en matraces como la degradación residual observada en sus gránulos (Figura 8), sugieren la presencia de enzimas degradadoras adicionales en esta condición. En el análisis de espectrometría de masas para identificación de las proteínas asociadas a los gránulos no identificamos otras PHB depolimerasas porque sólo analizamos las principales bandas obtenidas en la electroforesis de las proteínas de los gránulos. En el organismo modelo *R. eutropha*, la existencia de múltiples PHA depolimerasas está bien documentada; además, han identificado al menos siete PHB depolimerasas y dos oligomero hidrolasas [67, 68, 71, 110, 112], [113]. Es interesante mencionar que, aunque la actividad de depolimerización de PHB *in vitro* ha sido reportada para estas enzimas de *R. eutropha*, la inactivación de sus genes no tuvo efecto sobre la degradación de PHB, excepto para PhaZa1, que mostró un fenotipo parcial en la movilización de PHB [40, 67, 70], [112]. En el caso de la mutante PhbZ1 de *A. vinelandii*, tanto la falta de un fenotipo en matraces, como la actividad de auto hidrólisis residual detectada en sus gránulos (Figura 8) sugieren la existencia de un sistema complejo de movilización similar al de *R. eutropha*.

Los gránulos purificados a partir de la cepa silvestre UW136 mostraron actividad tiolítica en presencia de CoA libre, formando β -hidroxibutiril-CoA. El bajo nivel de esta actividad detectado en los gránulos de la mutante PhbZ1 y su restablecimiento por complementación con *phbZ1* (Tabla 5 y Figura 10) muestran que esta actividad se debe a PhbZ1. Esta capacidad sólo se había reportado para la depolimerasa intracelular PhaZa1 de *R. eutropha* H16 [54, 72], una enzima que carece de la

secuencia de caja de lipasa (Gly-X1-Ser-X2-Gly), presente en muchas depolimerasas de PHB, y que presenta una cisteína en lugar de serina. Esta cisteína forma parte de la tríada catalítica (cisteína, aspartato e histidina) [110], que se conserva y se coloca de manera similar a los aminoácidos catalíticos presentes en las PHA sintasas [114] que catalizan la reacción reversa. Es interesante observar que la enzima de *A. vinelandii* también carece de caja lipasa y muestra similitud en su mitad amino terminal con la subunidad PhaC de PHA sintetasas heterodiméricas clase III. Un alineamiento de PhbZ1 con PhaC de *Thiocystis violascens* y *Allochromatium vinosum*, permitió identificar que, aunque la identidad general con estas proteínas es baja (21%), los aminoácidos de la tríada catalítica (cisteína, aspartato e histidina) parecen estar conservados en PhbZ1 (posiciones 216, 371 y 410, respectivamente), como en PhaZa1. Sería interesante determinar si esta es una característica de otras depolimerasas de PHA capaces de realizar movilización tiolítica.

Debido a la similitud de la proteína PhbZ1 con las PHB sintasas de clase III, se planteó el posible papel de esta proteína como una enzima de polimerización de PHB (PHA sintasa) y no como verdadera depolimerasa, ya que se ha demostrado que la PHB sintasas también son capaces de realizar la reacción reversa a la de polimerización (tiólisis). La medición de la actividad PHB sintasa de esta proteína, comparada con la de la sintasa PhbC de *A. vinelandii*, ambas expresadas en *E. coli*, sugiere que PhbZ1 no es una enzima polimerizante de PHB, esto debido a que no detectamos ninguna actividad significativa para PhbZ1 (Tabla 6). La pequeña actividad (formación de CoA libre) obtenida en los extractos que contienen PhbZ1, fue muy similar a la del control negativo (plásmido vacío) y podría deberse a otras

actividades enzimáticas presentes en los extractos de *E. coli* (bacteria en la que se expresaron estas proteínas), como 3HB tioquinasa o CoA transferasa [31]. Los resultados demuestran que PhbZ1 expresada en *E. coli* no presenta actividad de polimerización de PHB; sin embargo, la falta de actividad PHB sintasa de la proteína PhbZ1 en este experimento también podría deberse a la necesidad de algún factor adicional ausente en *E. coli*. Cuando se compararon las actividades de PHB sintasa de los extractos de la cepa silvestre de *A. vinelandii*, de la mutante PhbZ1 y de la cepa complementada PhbZ-C (Tabla 7), no se observó ningún efecto de la inactivación del gen *phbZ1* sobre la actividad PHB sintasa total. También comparamos la actividad de la PHA sintasa en una mutante *phbC* y una doble mutante *phbC / phbZ1* de *A. vinelandii*, y en ambas cepas las actividades fueron diez veces menores, pero similares. Lo anterior demuestra que este fenotipo se debe a la falta de PhbC y confirma que, aunque la enzima PhbZ1 tiene similitud con las PHB sintasas de clase III, no tiene actividad de polimerización de PHB en las condiciones probadas. Las PHA sintasas de clase III y IV requieren un polipéptido adicional (PhaE y PhaR, respectivamente) que se asocia de manera no covalente con la subunidad catalítica para tener actividad funcional completa [29]. Los homólogos de dichos polipéptidos no se encontraron en el genoma de *A. vinelandii*. En varias bacterias, incluyendo *A. vinelandii* [115,116], se ha documentado que la síntesis y movilización de PHB se producen simultáneamente, por lo tanto, se podría esperar que la inactivación del sistema de movilización mejore la acumulación de PHB. Reportes anteriores han demostrado un aumento en el contenido de PHB en mutantes en el gen *phaZ*. Ejemplos de esto se encuentran en *Pseudomonas putida* cepa U [117] y *P. putida* KT2442 [118], aunque en otros casos no se ha observado

ningún efecto como en de *P. resinovorans* [119]. La presencia simultanea de PhbC y PhbZ1 en los gránulos purificados de *A. vinelandii* (Figura 5) es coherente con la síntesis y degradación concomitantes de PHB. En los cultivos en matraces, la inactivación del gen *phbZ1* no tuvo efectos en el crecimiento ni en la acumulación de PHB. Sin embargo, en los cultivos en bioreactor, la inactivación de *phbZ1* no afectó el crecimiento celular (medido como proteína, Figura 12a) pero tuvo un efecto positivo sobre el contenido de PHB como se esperaba (Figura 12c). La mutante *phbZ1* alcanzó un 13% más de PHB que la cepa silvestre.

Debido a que la resistencia mecánica del PHB como material se ha correlacionado positivamente con su tamaño molecular, se prefiere un polímero de alto peso molecular para aquellas aplicaciones en las que se requiere una mayor resistencia [120]. *A. vinelandii* es capaz de producir un PHB de muy alto peso molecular [9], [77, 121]. Sin embargo, ocurre una disminución en su peso molecular promedio durante la fase de crecimiento estacionario de los cultivos en biorreactores y esto es concomitante con la aparición de una fracción de polímeros de bajo peso molecular. Este comportamiento se correlacionó con un aumento en la actividad de degradación de PHB [96]. El presente estudio confirmó que esta disminución en el peso molecular (Figura 14) y la aparición correspondiente de moléculas de PHB de menor tamaño en la cepa OP de *A. vinelandii* (Figura 14), se deben a la degradación del polímero por la actividad de PhbZ1. En el caso de la cepa mutante, no se produjo un cambio en la distribución del peso molecular durante la fase estacionaria y el tamaño molecular permaneció alto y constante. Un trabajo reciente donde se eliminaron los genes de varias depolimerasas de PHA de *R. eutropha* mostró un resultado similar que permite la producción de PHA de alto peso molecular [122].

En resumen, los resultados presentados muestran que PhbZ1 participa en la movilización de PHB en *A. vinelandii* y puede hacerlo produciendo β -hidroxibutiril-CoA. En biorreactores, esta enzima es la principal depolimerasa de PHB activa durante la fase estacionaria y su inactivación permite la producción de un PHB de alto peso molecular uniforme.

Dentro del contexto genético en que se localiza la depolimerasa *phbZ1* de *A. vinelandii* se identificó *in silico* un posible sitio de unión para PhbF, un homólogo de PhaR de *R. eutropha*, que regula de manera negativa a la phasina P1 (datos no publicados). Este sitio de unión se sobrepone con la región promotora -35 predicha para *phbZ1* y se encuentra localizado muy cerca de la región promotora -35 para *phbP2*. Por lo anterior, se estudió la posible función de PhbF como un regulador de PhbZ1 y PhbP2. Los análisis realizados utilizando RT-qPCR mostraron que la expresión de PhbZ1 se incrementa al estar ausente el regulador PhbF. Estos resultados fueron confirmados con fusiones transcripcionales utilizando el gen reportero *lacZ*. Por lo tanto, PhbF regula de manera negativa la expresión de la depolimerasa intracelular *phbZ1* de *A. vinelandii*; este reporte es el segundo en donde se describe que PhbF participa en la regulación una depolimerasa; en el caso de *Rhodobacter sphaeroides FJ1* se sabe que PhaR se une a las regiones promotoras de *phaP*, *phaR*, *phaZ* y *phaC*, aunque regula estos genes de forma diferente. PhaR reprime la expresión de *phaP*, *phaR* y *phaZ*, pero no *phaC* [78]. Los genes *phaZ* y *phaC* se encuentran uno al lado del otro en una dirección opuesta y comparten el mismo motivo de unión a PhaR; sin embargo, la unión de PhaR a este motivo inhibe la expresión de *phaZ*, pero no tiene un efecto supresor sobre *phaC* [78]. Este arreglo genético es muy parecido al que presenta *phbZ1* y *phbP2* en *A.*

vinelandii, localizados de manera divergente (Figura 6). En el caso de la regulación de *phbP2* por PhbF aún no está clara, ya que los resultados fueron poco consistentes al realizar las réplicas biológicas, por lo que es necesario estudiar de manera más profunda este mecanismo.

Debido a la proximidad en la que se encuentran la PHB depolimerasa PhbZ1 y la phasina P2 se planteó la hipótesis de que esta última podría fungir como un modulador en el proceso de depolimerización de PHB, como ocurre en *Rhodospirillum rubrum*, donde al adicionar *in vitro* la phasina ApdA (activator of polymer degradation), en conjunto con la principal depolimerasa de este microorganismo PhaZ1, se promueve una degradación más eficiente [53]. Para verificar esta hipótesis se realizó un ensayo de doble híbrido para identificar una interacción directa entre ambas proteínas. Utilizando el sistema del adenilato ciclasa de *Bordetella pertusi* en *E. coli* no se detectó interacción entre estas proteínas; sin embargo, se identificaron seis interacciones, al detectarse un cambio de color que sugería actividad adenilato ciclasa en el medio (Figura17). Se observó que la phasinas P1 y P2 interaccionan consigo mismas, aunque la interacción más fuerte está presente en la phasina P1, de acuerdo con los resultados de β -galactosidasa. Ambas phasinas también son capaces de interaccionar una con la otra, lo que sugiere que estas proteínas no sólo son capaces de formar homo-oligómeros, sino que también pueden asociarse entre sí y pueden formar hetero-oligómeros. A pesar de que en este ensayo en *E. coli* no se detectó una interacción directa entre la PHB depolimerasa PhbZ1 y la phasina P2, no se puede descartar que estén interaccionando, pues probablemente se necesite un cofactor presente en *A.*

vinelandii y además el ensayo se realizó en ausencia de gránulos de PHB, donde estas proteínas se encuentran ubicadas en *A. vinelandii*.

CONCLUSIONES

PhbZ1 es una proteína asociada al gránulo de PHB de *A. vinelandii* que presenta características propias de una enzima de tipo intracelular, pues es activa con PHB amorfo, presenta una actividad adicional a la hidrólisis, pues presencia de CoA libre produce 3-hidroxibutiril- CoA.

- La inactivación de la depolimerasa PhbZ1 promueve un incremento en la capacidad de acumulación de PHB cuando crece bajo condiciones controladas en biorreactores, además de que genera polímeros de un peso molecular estable y constante a través del tiempo.
- La expresión de PhbZ1 esta modulada por el regulador transcripcional PhbF.

PRESPECTIVAS

- Determinar cuáles son las otras PHB depolimerasas que participan en la movilización de PHB en *A. vinelandii* así como en el proceso de síntesis.
- Determinar en qué estadio de vida de *A. vinelandii* son importantes cada una de las depolimerasas identificadas.
- Demostrar la unión de PhbF al posible sitio regulador identificado en la región promotora de *phbZ1* y *phbP2*.
- Identificar si otros reguladores de la biosíntesis de PHB participan en la movilización del polímero o bien si regulan la expresión de las depolimerasas en *A. vinelandii*.
- Analizar el tipo de polihidroxicanoatos (composición monomérica) que son sustrato de la depolimerasa PhbZ1.
- Evaluar si la proteína PhbP2 participa en el proceso de depolimerización de *A. vinelandii*.

REFERENCIAS

- [1] R. D. Ashby, "Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 4, pp. 2106–2112, 2005.
- [2] P. B. S. Albuquerque and C. B. Malafaia, "Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, no. PartA, pp. 615–625, 2018.
- [3] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Process Biochemistry*. 2005.
- [4] R. Nigmatullin, P. Thomas, B. Lukasiwicz, H. Puthussery, and I. Roy, "Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 7, pp. 1209–1221, 2015.
- [5] A. Anderson and E. Dawes, "Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates," *Am. Soc. Microbiol.*, 1990.
- [6] G. Q. Chen, "A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 8, pp. 2434–2446, 2009.
- [7] S. S. Kung, Y. C. Chuang, C. H. Chen, and C. C. Chien, "Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach," *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007.
- [8] R. W. Lenz and R. H. Marchessault, "Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology," *Biomacromolecules*. 2005.
- [9] J. Manchak and W. J. Page, "Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD," *Microbiology*, 1994.
- [10] M. Pötter and A. Steinbüchel, "Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation," *Biomacromolecules*. 2005.
- [11] M. Knoll, T. M. Hamm, F. Wagner, V. Martinez, and J. Pleiss, "The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases," *BMC Bioinformatics*, 2009.
- [12]. A. Dawes. Polyhydroxybutyrate: an Intriguing Biopolymer. Bioscience Rep.1988.
- [13] T. Iwata, "Strong fibers and films of microbial polyesters," *Macromol. Biosci.*, 2005.
- [14]. S. Hong., H. Hsu, M. Ye. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *J. Therm.* 2013
- [15] A. P. Bonartsev, V. L. Myshkina, D. A. Nikolaeva, E. K. Furina, "Biosynthesis , biodegradation , and application of poly (3- hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria," *Appl. Microbiol.*, 2007.
- [16] A. P. Bonartsev, A. P., Boskhomodgiev, V. L. Iordanskii, A. L., Bonartseva G.

- A., Rebrov A. V., Makhina, T. K., Myshkina, E. A. Yakovlev, S. A., Filatova, E. A., Ivanov, and D. V. Bagrov, "Degradation of poly(3- hydroxybutyrate) and its derivatives: Characterization and kinetic behavior," *Advances in Kinetics and Mechanism of Chemical reactions*. 2013.
- [17] G.-Q. Chen, "Industrial production of PHA from waste raw materials," *Plast. from Bact.*, vol. 14, pp. 17–37, 2010.
- [18] I. Ali and N. Jamil, "Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field," *Frontiers in Biology*. 2016.
- [19] P. L. Gould, S. J. Holland, and B. J. Tighe, "Polymers for biodegradable medical devices. IV. Hydroxybutyrate-valerate copolymers as non-disintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms," *Int. J. Pharm.*, 1987.
- [20] M. R. Brophy and P. B. Deasy, "In vitro and in vivo studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethizole," *Int. J. Pharm.*, vol. 29, no. 2–3, pp. 223–231, Apr. 1986.
- [21] A. Shrivastav, H.-Y. Kim, and Y.-R. Kim, "Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 581684, 2013.
- [22] G. Q. C. Z. Wang, W. Hongning, J. Chen, J. Zhang, Y Yao, "A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles," *Lab Chip*, 2008.
- [23] Y. C. Yao, X. Y. Zhan, J. Zhang, X. H. Zou, X. H. Wang, Z. H. Xiong, Y. Cui, J Chen, "A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands," *Biomaterials*, 2008.
- [24] X. Zhang, R. Luo, Z. Wang, Y. Deng, and G.-Q. Chen, "Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 4, pp. 707–711, Apr. 2009.
- [25] D. Jendrossek, "Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes)," *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 10, pp. 3195–3202, 2009.
- [26] S. Bresan, A. Sznajder, W. Hauf, K. Forchhammer, D. Pfeiffer, and D. Jendrossek, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids," *Sci. Rep.*, 2016.
- [27] M. Pötter, M. H. Madkour, F. Mayer, and A. Steinbüchel, "Regulation of phasin expression and polyhydroxylkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16," *Microbiology*, 2002.
- [28] M. Liebergesell, B. Schmidt, and S. Alexander, "Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D," *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992.
- [29] H. A. R. Bernd, "Polyester synthases: natural catalysts for plastics," *Biochem. J.*, vol. 376, no. 1, pp. 15–33, 2003.
- [30] T. Chek, M. Fey, S. Yong; Mori, Tomoyuki; Arsad, Hasni; Samian, Mohammed Razip; Sudesh, Kumar; Hakoshima, "Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2017.

- [31] K. Uchino and T. Saito, "Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*," *J. Biochem.*, 2006.
- [32] D. Pfeiffer and D. Jendrossek, "Localization of poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, phap6 and phap7, in *Ralstonia eutropha* H16," *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 21, pp. 5909–5921, 2012.
- [33] G. J. McCool and M. C. Cannon, "Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*," *J. Bacteriol.*, 1999.
- [34] U. Pieper-Furst, M. H. Madkour, F. Mayer, and A. Steinbüchel, "Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*," *J. Bacteriol.*, 1994.
- [35] A. Maehara, S. Ueda, H. Nakano, and T. Yamane, "Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of *Paracoccus denitrificans*," *J. Bacteriol.*, 1999.
- [36] M. A. Prieto, B. Bühler, K. Jung, B. Witholt, and B. Kessler, "PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes," *J. Bacteriol.*, 1999.
- [37] M. Peralta-Gil, D. Segura, J. Guzmán, L. Servín-González, and G. Espín, "Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR," *J. Bacteriol.*, 2002.
- [38] W. Hauf, B. Watzer, N. Roos, A. Klotz, and K. Forchhammer, "Photoautotrophic polyhydroxybutyrate granule formation is regulated by cyanobacterial phasin PhaP in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015.
- [39] H. X. S. Cai, L. Cai, H. Liu, X. Liu, J. Han, J. Zhou, "Identification of the haloarchaeal phasin (PhaP) that functions in polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in *Haloferax mediterranei*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012.
- [40] G. M. York, J. Stubbe, and A. J. Sinskeyl, "The *ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production," *J. Bacteriol.*, 2002.
- [41] M. P. Mezzina and M. J. Pettinari, "Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 17, pp. 5060–5067, 2016.
- [42] B. Maestro and J. M. Sanz, "Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins," *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1323–1337, 2017.
- [43] A. Steinbüchel *et al.*, "Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions.," 1995.
- [44] J. Tian *et al.*, "Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in *Wautersia eutropha* H16 by quantitative Western analysis and transmission electron microscopy," *J. Bacteriol.*, 2005.

- [45] R. Wieczorek, A. Pries, A. Steinbuchel, and F. Mayer, "Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*," *J. Bacteriol.*, 1995.
- [46] K. Kuchta, L. Chi, H. Fuchs, M. Pötter, and A. Steinbüchel, "Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16," *Biomacromolecules*, 2007.
- [47] T.-R. Lee, J.-S. Lin, S.-S. Wang, and G.-C. Shaw, "PhaQ, a new class of poly-beta-hydroxybutyrate (phb)-responsive repressor, regulates phaQ and phaP (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB.," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 10, pp. 3015–21, May 2004.
- [48] A. Maehara, S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane, and Y. Doi, "A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA," *J. Bacteriol.*, 2002.
- [49] D. Pfeiffer, A. Wahl, and D. Jendrossek, "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," *Mol. Microbiol.*, 2011.
- [50] D. Pfeiffer and D. Jendrossek, "PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014.
- [51] N. Tarazona, A. Hernandez-Arriaga, R. Kniwel, M. Auxiliadora-Prieto. Phasin interactome reveals the interplay of PhaF with the polyhydroxyalkanoate transcriptional regulatory protein PhaD in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology.*, 2020.
- [52] B. Galan B., Dinjaski N., B. Maestro, L. I. de Eugenio, I. F. Escapa, J. M. Sanz, J. L. García, M. A. Prieto. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology.*, 2011.
- [53] R. Handrick *et al.*, "Unraveling the Function of the *Rhodospirillum rubrum* Activator of Polyhydroxybutyrate (PHB) Degradation: The Activator Is a PHB-Granule-Bound Protein (Phasin)," *J. Bacteriol.*, 2004.
- [54] K. Uchino, T. Saito, B. Gebauer, and D. Jendrossek, "Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA," *J. Bacteriol.*, 2007.
- [55] H. Abe, I. Matsubara, Y. Doi, Y. Hori, and A. Yamaguchi, "Physical Properties and Enzymatic Degradability of Poly(3-hydroxybutyrate) Stereoisomers with Different Stereoregularities," *Macromolecules*, 1994.
- [56] D. Jendrossek, A. Schirmer, and H. G. Schlegel, "Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996.
- [57] L. I. De Eugenio *et al.*, "Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: Characterization of a paradigmatic enzyme," *J. Biol. Chem.*, 2007.
- [58] K. E. Jaeger, A. Steinbuchel, and D. Jendrossek, "Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases

- hydrolyze poly(-hydroxyalkanoates)," *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995.
- [59] J. M. Merrick, R. Steger, and D. Dombroski, "Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases," in *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999.
- [60] D. Jendrossek and R. Handrick, "Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates," *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002.
- [61] R. Handrick, S. Reinhardt, M.L. Focarete, M. Scandola, G. Adamus, M. Kowalczyk, D. Jendrossek. "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*. 2001.
- [62] K. Kasuya, Y. Inoue, T. Tanaka, T. Akehata, T. Iwata, T. Fukui, "Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater," *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997.
- [63] F. Romen, S. Reinhardt, and D. Jendrossek, "Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of *Schlegellella* sp. KB1a," *Arch. Microbiol.*, 2004.
- [64] B. Klingbeil, R. M. Kroppenstedt, and D. Jendrossek, "Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene," *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996.
- [65] C. L. Brucato and S. S. Wong, "Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: General characteristics and active site studies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991.
- [66] D. Y. Kim, H. W. Kim, M. G. Chung, and Y. H. Rhee, "Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates," *J. Microbiol.*, 2007.
- [67] R. Handrick, S. Reinhardt, and D. Jendrossek, "Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*," *J. Bacteriol.*, 2000.
- [68] T. Kobayashi, K. Uchino, T. Abe, Y. Yamazaki, and T. Saito, "Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16," *J. Bacteriol.*, 2005.
- [69] C. L. Tseng, H. J. Chen, and G. C. Shaw, "Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis* phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase," *J. Bacteriol.*, 2006.
- [70] K. Uchino, T. Saito, and D. Jendrossek, "Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008.
- [71] A. Sznajder and D. Jendrossek, "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," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014.
- [72] J. Eggers and A. Steinbüchel, "Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA," *J. Bacteriol.*, vol. 195, no. 14, pp. 3213–23, Jul. 2013.
- [73] A. Sznajder, D. Pfeiffer, and D. Jendrossek, "Comparative proteome analysis

- reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015.
- [74] Q. Ren, G. De Roo, K. Ruth, B. Witholt, M. Zinn, and L. Thöny-Meyer, “Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: Futile cycle or clever regulation?,” in *Biomacromolecules*, 2009.
- [75] N.N. Rao, M.R. Gomez-García, A. Kornberg. “Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival”. *Annu Rev Biochem.* 2009.
- [76] Jüngert J.R., Borisova M., Mayer C., Wolz C., Brigham C.J., Sinskey A.J., Jendrossek D. Absence of ppGpp leads to increased mobilization of intermediately accumulated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol.* 2017.
- [77] Jüngert J.R., Patterson C., Jendrossek D. Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) polymerase PhaC1 and PHB depolymerase PhaZa1 of *Ralstonia eutropha* are phosphorylated in vivo. *Appl Environ Microbiol.* 2018.
- [78] M. E. Chou and M. K. Yang, “Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010.
- [79] J. D. Noar and J. M. Bruno-Bárcena, “*Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 164, no. 4, pp. 421–436, 2018.
- [80] D. Segura, O. Vite, Y. Romero, S. Moreno, M. Castañeda, and G. Espín, “Isolation and characterization of *Azotobacter vinehdii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: Alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance,” *J. Bacteriol.*, 2009.
- [81] G. Q. Chen and W. J. Page, “Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process,” *Biotechnol. Tech.*, 1997.
- [82] C. Peña, S. López, A. García, G. Espín, A. Romo-Uribe, and D. Segura, “Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN),” *Ann. Microbiol.*, 2014.
- [83] P. J. Senior and E. A. Dawes, “The Regulation of Poly-beta-hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*,” *Biochem. J.*, 1973.
- [84] M. Castañeda, J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espín, “The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*,” *J. Bacteriol.*, 2000.
- [85] G. Wu, A. J. G. Moir, G. Sawers, S. Hill, and R. K. Poole, “Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001.
- [86] L. F. Muriel-Millán, M. Castellanos, J. A. Hernandez-Eligio, S. Moreno, and G. Espín, “Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014.
- [87] C. Velázquez-Sánchez, G. Espin, C. Peña, D. Segura, “The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoate Metabolism to Improve Their Production”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020.
- [88] D. Segura, T. Cruz, and G. Espín, “Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis,” *Arch. Microbiol.*, 2003.

- [89] L.F. Muriel-Millán, S. Moreno, R. Gallegos-Monterrosa, G. Espin. "Unphosphorylated EI_{IIA}N tr induces C_{1p} AP-mediated degradation of R_{po} S in *Azotobacter vinelandii*", *Molecular Microbiology*, 2017.
- [90] A. Hernandez-Eligio, S. Moreno, M. Castellanos, M. Castañeda, C. Nuñez, L.F. Millan, G. Espin, "RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*," *Microbiol. (United Kingdom)*, 2012.
- [91] E. Quiroz-Rocha, R. Moreno, A. Hernández-Ortíz, J.C. Frago Jiméne z, L. F. Muriel-Millán, J. Guzmán, G. Espín, F. Rojo, C. Núñez. "Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems", *Scientific reports*, 2017.
- [92] M. Martínez-Valenzuela, J. Guzmán, S. Moreno, C. L. Ahumada-Manuel, G. Espín, C. Núñez, "Expression of the sRNAs CrcZ and CrcY modulate the strength of carbon catabolite repression under diazotrophic or non-diazotrophic growing conditions in *Azotobacter vinelandii* ", *Plos One*.2018.
- [93] L. P. Bedoya-Pérez, L. F. Muriel-Millán, S. Moreno, E. Quiroz-Rocha, N. Rivera-Gómez, G. Espín, "The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*", *Microbiological research*, 2018.
- [94] D. Jendrossek and D. Pfeiffer, "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)," *Environmental Microbiology*. 2014.
- [95] F. Reinecke and A. Steinbüchel, "*Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers.," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2009.
- [96] C. Kennedy, R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Bringle, D. Dean. "NifH, NifM and NifN genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene bank". *Molecular and general genetics*. 1986
- [97] A. Bali, G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy, "Excretion of ammonium by a nifL mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen," *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992.
- [98] J.A. Bush, P.W. Wilson. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature*.1959.
- [99] M. Millán, D. Segura, E. Galindo, and C. Peña, "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 Biochem.*, 2016.
- [100]. P. Canales. "Sistema PhbF-PhbP en *Azotobacter vinelandii*". Tesis de licenciatura en Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de ciencias. 2013.
- [101] F.R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao. "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12". *Science*. 1997.
- [102] S. Centeno-Leija, G. Huerta-Beristain, M. Giles-Gómez, F. Bolivar, G. Gosset, and A. Martinez, "Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia*

- coli by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability,” *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 2014
- [103] T. Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, “Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition,” *Cold Spring Harb. Lab. Press*, 1989.
- [104] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977.
- [105] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent,” *J. Biol. Chem.*, 1951.
- [106] J. H. Law and R. A. Slepecky, “Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid,” *J. Bacteriol.*, 1961.
- [107] D. M. Horowitz and J. K. M. Sanders, “Amorphous, Biomimetic Granules of Polyhydroxybutyrate: Preparation, Characterization, and Biological Implications,” *J. Am. Chem. Soc.*, 1994.
- [108] R. Noguez, D. Segura, S. Moreno, A. Hernandez, K. Juarez, and G. Espín, “Enzyme INtr, NPr and IANtrare involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*,” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2008.
- [109] M. Cocotl-Yañez, S. Moreno, S. Encarnación, L. López-Pliego, M. Castañeda, and G. Espín, “A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*,” *Microbiol. (United Kingdom)*, 2014.
- [110] T. Kobayashi, M. Shiraki, T. Abe, A. Sugiyama, and T. Saito, “Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase,” *J. Bacteriol.*, 2003.
- [111] A. Hernandez-Eligio, M. Castellanos, S. Moreno, and G. Espín, “Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS,” *Microbiology*, 2011.
- [112] H. Saegusa, M. Shiraki, C. Kanai, and T. Saito, “Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product,” *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 1, pp. 94–100, Jan. 2001.
- [113] T. Abe, T. Kobayashi, and T. Saito, “Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16,” *J. Bacteriol.*, 2005.
- [114] Y. Jia, T. J. Kappock, T. Frick, A. J. Sinskey, and J. A. Stubbe, “Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: Characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase,” *Biochemistry*, 2000.
- [115] Y. Doi, A. Segawa, Y. Kawaguchi, and M. Kunioka, “Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990.
- [116] Y. Bin Yan, Q. Wu, and R. Q. Zhang, “Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ^{13}C NMR,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000.
- [117] S. Arias, M. Bassas-Galia, G. Molinari, and K. N. Timmis, “Tight coupling of polymerization and depolymerization of polyhydroxyalkanoates ensures

- efficient management of carbon resources in *Pseudomonas putida*," *Microb. Biotechnol.*, vol. 6, no. 5, pp. 551–563, Sep. 2013.
- [118] L. Cai, M. Q. Yuan, F. Liu, J. Jian, and G. Q. Chen, "Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442," *Bioresour. Technol.*, 2009.
- [119] D. K. Y. Solaiman, R. D. Ashby, and T. A. Foglia, "Effect of inactivation of poly(hydroxyalkanoates) depolymerase gene on the properties of poly(hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas resinovorans*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003.
- [120] T. Tsuge, "Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis," *Polymer Journal*. 2016.
- [121] V. L. Myshkina, D. A. Nikolaeva, T. K. Makhina, A. P. Bonartsev, and G. A. Bonartseva, "Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B," *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2008.
- [122] H. Arikawa, S. Sato, T. Fujiki, and K. Matsumoto, "A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16," *J. Biotechnol.*, vol. 227, pp. 94–102, 2016.

ANEXO 1. ARTICULO.

Adaya L., Millán M, Peña C, Jendrossek D, Espin G., Tinoco-Valencia R, Guzman J, Pfeiffer D, Segura D. 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* (2018) 102:2693–2707 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y> .



Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass

Libertad Adaya¹ · Modesto Millán² · Carlos Peña² · Dieter Jendrossek³ · Guadalupe Espín¹ · Raunel Tinoco-Valencia² · Josefina Guzmán¹ · Daniel Pfeiffer⁴ · Daniel Segura¹

Received: 21 August 2017 / Revised: 16 January 2018 / Accepted: 18 January 2018 / Published online: 12 February 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

A novel poly-3-hydroxybutyrate depolymerase was identified in *Azotobacter vinelandii*. This enzyme, now designated PhbZ1, is associated to the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granules and when expressed in *Escherichia coli*, it showed in vitro PHB depolymerizing activity on native or artificial PHB granules, but not on crystalline PHB. Native PHB (nPHB) granules isolated from a PhbZ1 mutant had a diminished endogenous in vitro hydrolysis of the polyester, when compared to the granules of the wild-type strain. This in vitro degradation was also tested in the presence of free coenzyme A. Thiolytic degradation of the polymer was observed in the nPHB granules of the wild type, resulting in the formation of 3-hydroxybutyryl-CoA, but was absent in the granules of the mutant. It was previously reported that cultures of *A. vinelandii* OP grown in a bioreactor showed a decrease in the weight average molecular weight (Mw) of the PHB after 20 h of culture, with an increase in the fraction of polymers of lower molecular weight. This decrease was correlated with an increase in the PHB depolymerase activity during the culture. Here, we show that in the *phbZ1* mutant, neither the decrease in the Mw nor the appearance of a low molecular weight polymers occurred. In addition, a higher PHB accumulation was observed in the cultures of the *phbZ1* mutant. These results suggest that PhbZ1 has a role in the degradation of PHB in cultures in bioreactors and its inactivation allows the production of a polymer of a uniform high molecular weight.

Keywords Polyhydroxybutyrate · Depolymerase · Bioplastic · Molecular mass

Introduction

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is a polymer produced by many *Eubacteria* and *Archaea* for storage of carbon and

energy. This polymer is intracellularly accumulated in the form of inclusion bodies named PHB granules or carbonosomes (Jendrossek and Pfeiffer 2014). PHB exhibits thermoplastic properties and is also biodegradable and biocompatible, which make it a promising industrial material that has been studied extensively for its application in the production of biodegradable plastics and other products (Chen 2009). Based on its properties of biocompatibility, new attractive applications for PHB have been proposed in the medical and pharmaceutical fields (Nigmatullin et al. 2015; Wu et al. 2009).

The mechanical properties of the polymer are very important for its applications. It is well known that the PHB homopolymer is a plastic with poor properties of stiffness and brittleness (De Koning and Lemstra 1993; Kusaka et al. 1999); however, for several polymers, a high molecular weight is one of the most important factors contributing to have high elastic modulus and high strength (Aoyagi et al. 2003). In the case of PHB, it has been shown that those polymers reaching an ultra-

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Daniel Segura
daniel@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, 62271 Cuernavaca, Morelos, México

² Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

³ Institute of Microbiology, University Stuttgart, Stuttgart, Germany

⁴ Department of Microbiology, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany

high molecular weight ($3\text{--}11 \times 10^6$ Da) yield improved, more ductile, and flexible materials, with high tensile strength and high elongation to break, without affecting biodegradability (Aoyagi et al. 2003; Kusaka et al. 1999).

The molecular weight of PHB can be affected by culture parameters, like medium composition, pH, temperature, and aeration conditions (Agus et al. 2010; Asenjo et al. 1995; Bocanegra et al. 2013; Myshkina et al. 2008; Peña et al. 2014; Shimizu et al. 1993). Other factors, such as the relative expression level or activity of the biosynthetic enzymes (Hiroe et al. 2012; Sim et al. 1997), the type of PHB synthase present (Agus et al. 2006; Hiroe et al. 2012), and mutations on this enzyme (Zheng et al. 2006), can also influence the molecular weight of the polymer produced.

PHB and other polyhydroxyalkanoates (PHA) are catabolized through intracellular or extracellular depolymerases, depending on its location. Intracellular PHA depolymerases hydrolyze native PHA granules that contain the polymer in an amorphous state, whereas extracellular PHA depolymerases degrade extracellular granules released from accumulating cells after death, which contain denatured and partially crystalline polymer (Jendrossek and Handrick 2002). The effect of inactivating the PHA depolymerases of *Ralstonia eutropha* on the molecular weight of the PHA produced was recently reported. Inactivation of depolymerase PhaZ6 (PhaZd1) allowed to produce an ultra-high molecular weight PHA (PHBHHx), with an average molecular weight approximately double of that produced by the original strain (Arikawa et al. 2016), showing that PHA depolymerase activity also has a significant influence on the molecular weight of the PHA accumulated.

Azotobacter spp. are able to synthesize a PHB of high molecular weight (Chen and Page 1994; Myshkina et al. 2008, Peña et al. 2014). In these species, the molecular weight of PHB can also be influenced by the medium composition and aeration conditions (Chen and Page 1994; Myshkina et al. 2008; Quagliano and Miyazaki 1997). In bioreactor cultures, *A. vinelandii* is able to produce a PHB of an ultra-high molecular weight of 4800 kDa during the exponential growth phase; however, during the stationary phase, the mean molecular weight decreases to 3600 kDa, coincident with an increased PHB depolymerase activity (Millán et al. 2016).

In *A. vinelandii*, the genetics of PHB biosynthesis and the regulatory elements involved have been widely studied (Castañeda et al. 2000; Hernández-Eligio et al. 2011, 2012; Muriel-Millán et al. 2014; Noguez et al. 2008; Peralta-Gil et al. 2002); however, the process of PHB mobilization is known only at the biochemical level (Manchak and Page 1994). In the genome of this bacterium, there are seven genes putatively coding for PHB depolymerases, but evidence for the role of their products is missing. In the present report, we characterized one of these PHB depolymerases. We demonstrated that it has hydrolytic activity on amorphous but not on

crystalline PHB and it additionally has a thiolytic activity on the polymer in the presence of free coenzyme A. We also studied the effect of inactivating this gene on the molecular weight of the polymer produced in a bioreactor and on the amount of PHB produced.

Materials and methods

Bacterial strains, media, and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The *A. vinelandii* strains PhbZ1, PhbZ1-C, PhbZ1-OP, and phbZ1-phbC were deposited in a microbial collection (Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, CINVESTAV) with codes CDBB-B-2007, CDBB-B-2008, CDBB-B-2009, and CDBB-B-2010, respectively. Inocula were grown on BS medium (Kennedy et al. 1986), washed with 10 mM MgSO_4 , and transferred to the indicated medium. For PHB production, *A. vinelandii* strains were grown on peptone-yeast (PY) medium supplemented with 2% sucrose as carbon source (PYS; in g l^{-1} , sucrose, 20; yeast extract, 3.0 and peptone, 5.0) (Peña et al. 2014). Liquid cultures were carried out in 250-ml flasks containing 50 ml of medium at 250 rpm and 30 °C. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C on Luria-Bertani medium and M9 medium with glucose 10 g l^{-1} . *A. vinelandii* transformation was carried out as described in Bali et al. (1992). When needed, antibiotics were added at the following concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$): for *A. vinelandii* rifampicin, 10; nalidixic acid, 30; kanamycin, 1; and gentamicin, 0.25 and for *E. coli* ampicillin, 100; kanamycin, 30; and spectinomycin, 100.

DNA manipulations, molecular, and microbiological procedures

DNA manipulations were performed according to standard protocols, as described (Sambrook and Russell 2001). Restriction enzymes were obtained from Thermo Scientific and used according to the manufacturer's instructions. DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method (Sanger et al. 1977), using a Perkin-Elmer/Applied Biosystems DNA sequencer. The oligonucleotides used in this work were synthesized at the oligonucleotide synthesis facility at the Instituto de Biotecnología/UNAM.

In order to generate specific DNA fragments suitable for cloning, PCR amplifications were carried out using Taq DNA polymerase (Thermo Scientific). The amplification protocol consisted of 1 cycle at 95 °C for 3 min and 30 cycles at 95 °C for 1 min and 1 min at variable temperatures, depending on the primer alignment temperature, 1 to 3 min at 72 °C, and a final extension for 15 min. The PCR products were purified

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Reference or source
<i>A. vinelandii</i> OP	Wild type	Bush and Wilson 1959 ATCC® 13705™
<i>A. vinelandii</i> PhbZ1	UW136 with the <i>phbZ1</i> ::Gm gene inactivation	This study CDBB-B-2007
<i>A. vinelandii</i> PhbZ1-C	PhbZ ₁ with plasmid pJG03910 cointegrated in the chromosome	This study CDBB-B-2008
<i>A. vinelandii</i> PhbZ1-OP	OP with the <i>phbZ1</i> ::Gm gene inactivation	This study CDBB-B-2009
<i>A. vinelandii</i> <i>phbC-phbZ1</i>	PhbZ1 with the <i>phbC</i> ::Sp gene inactivation	This study CDBB-B-2010
<i>A. vinelandii</i> CS18	UW136 with the <i>phbC</i> ::Sp gene inactivation	Segura et al. 2003
<i>A. vinelandii</i> UW136	Natural rifampin-resistant mutant of OP, nonmucoicid	Bishop and Brill 1977
<i>E. coli</i> BL21DE3	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> MG1655	<i>E. coli</i> K-12 wild type	ATCC 700926
pBSL98	Source of the gentamycin resistance cassette	Alexeyev et al. 1995
pCS18	Plasmid carrying a <i>phbC</i> ::Sp mutation	Segura et al. 2003
pET24a+	Expression vector with the selectable marker kanamycinan, C-terminal His*Tag sequence	Novagen
pJET1.2/blunt	Cloning vector	Thermo Fisher Scientific
pJG03910	pET24a + with a 2.7 kb DNA fragment containing the <i>A. vinelandii</i> <i>phbZ1</i> gene (<i>avin03910</i>) for its expression.	This study
pJG03910::Gm	pJG03910 with the <i>SalI</i> DNA fragment containing the gentamicin cassette from pBSL98 replacing an internal 0.4 kb <i>SalI</i> fragment of <i>phbZ1</i> .	This study
pPHB _{Av}	Plasmid pTrc99A expressing the <i>phbBAC</i> operon from <i>A. vinelandii</i> .	Centeno-Leija et al. 2014
pET24a+	Expression vector with the selectable marker kanamycinan, C-terminal His*Tag sequence	Novagen

using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), digested with the appropriate restriction enzyme(s) and finally purified from agarose gels.

PHB quantification

The quantification of PHB was performed as previously reported (Law and Slepecky 1961). The samples containing PHB were centrifuged for 10 min at 13700g and the supernatant was decanted. One milliliter of sodium hypochlorite at 30% was added and incubated 1 h at 37 °C. The PHB was washed with 1 ml of water and centrifuged for 10 min at 13700g. This process was repeated with acetone and ethanol and the samples were air dried. Finally, 1 ml of concentrated sulfuric acid was added and the sample was heated for 10 min at 90 °C. The samples were diluted in sulfuric acid, according to the PHB content, and measured spectrophotometrically at 235 nm.

Expression of the *A. vinelandii* PhbZ1 PHB depolymerase in *E. coli*

To express the PhbZ1 PHB depolymerase in *E. coli* BL21DE3, a 2.7-kb fragment, corresponding to the *phbZ1* gene (*avin03910*), lacking the first and last codons, was amplified by PCR using primers Fw 5'-TAGGTACATATGAGCCAGACTTTTTTTG-3' and Rv 5'-CTGTCAAAGCTTAGTATTGTCGCTAGGCTGAG-3' with Phusion high-fidelity Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific). The resulting PCR product was digested with *NdeI* and *HindIII* and cloned into plasmid pET24a (invitrogen). The resulting plasmid was named pJG03910. The DNA fragment was sequenced in order to confirm the presence of an intact *phbZ1* gene and the plasmid was transformed into *E. coli* BL21DE3. The expression of the protein was induced by the addition of IPTG (0.5 mM). After the 8-h induction at 27 °C, the cells were centrifuged, resuspended in buffer at 4 °C, and lysed by sonication at 8 kHz at 4 °C in a Vibra Cell (Sonics) in the presence of a protease

inhibitor (complete tablets; Roche Diagnostics). The protein extract was concentrated using Microcon YM-50 centrifugal filters (Amicon) and stored at 4 °C. Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951) using BSA as a standard. SDS-PAGE of the purified protein revealed the expression of a protein.

SDS-PAGE and Western blot assays

Whole-cell extracts were prepared from *E. coli* BL21DE3 cells grown on LB and expressing PhbZ1 from plasmid pJG03910. Five micrograms of protein of each extract was subjected to electrophoresis on SDS-12% polyacrylamide gels and then transferred using a semidry transfer system (Thermo Fisher Scientific) to a nitrocellulose membrane (General Electric). The membranes containing the transferred proteins were blocked in 1% albumin and 0.1% of tween 20 overnight. Immunoblots were performed with anti-His monoclonal antibody (Qiagen) at 1:10,000 dilution. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Pierce) was used as the secondary antibody at 1:10,000 dilution. Bands on the blotted membranes were developed by incubation with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer).

Construction of *A. vinelandii* *phbZ1::Gm^r* mutant strains

In order to generate a *phbZ1* mutant derivative of *A. vinelandii* UW136, plasmid pJG03910 was digested with *SalI* (ThermoScientific) in order to delete a 0.4-kb fragment of the gene. This fragment was replaced by a *SalI* DNA fragment containing the gentamicin cassette excised from plasmid pBSL98 (Alexeyev et al. 1995), resulting plasmid pJG03910::Gm that is unable to replicate in *A. vinelandii*. Competent cells of *A. vinelandii* UW136 were transformed with this plasmid and a gentamicin-resistant transformant was isolated and confirmed to carry the *phbZ1::Gm* mutation by PCR analysis using primers Fw 5'-AACA GCGAGGAGATCGAGAC-3' and Rv 5'-CTCC TCGAACGCCTGTACGCCG-3 (data not shown). This strain was named PhbZ1. To construct a *phbZ1* mutant derivative of strain OP, competent cells of this strain were transformed with chromosomal DNA from mutant PhbZ1 and a gentamicin-resistant transformant was isolated and confirmed to carry the mutation by PCR analysis using the same primers (data not shown). This strain was named PhbZ1-OP.

To construct a *phbZ1-phbC* double-mutant derivative of UW136, competent cells of strain PhbZ1 were transformed with plasmid pCS18, which contains a spectinomycin-resistance cassette inserted into the *KpnI* site of *phbC* (Segura et al. 2003). A spectinomycin-resistant transformant was confirmed to carry the *phbC::Sp* mutation by PCR analysis.

Complementation of mutant PhbZ1

For the complementation of the PhbZ1 mutant, this strain was transformed with plasmid pJG03910 for its co-integration into the chromosome, producing strain PhbZ1-C. The co-integration of the plasmid by a single recombination was verified by PCR analysis using primers Fw 5'-TCGTGTACCCTCCGCTATAA-3' and Rv 5'-CGTACAGGCGTTCCAGGAG-3'.

Isolation of native PHB granules

Native PHB (nPHB) granules were purified as previously described (Gebauer and Jendrossek 2006; Handrick et al. 2000). Briefly, *A. vinelandii* cells were grown for 48 h on PYS medium and were collected by centrifugation at 1448 g at 4 °C for 20 min. The cells were resuspended in buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, containing 1 mM DTT and were disrupted using a French press. The nPHB granules were separated using two glycerol gradients (first gradient, 87 and 50%, second gradient 87, 80, 60, and 40%) in buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. The purified granules were dialyzed with the corresponding reaction buffer. The nPHB granules from the *E. coli* strain MG1655 expressing the *A. vinelandii* PHB biosynthetic operon *phbBAC* from plasmid pPHB_{Av} (Centeno-Leija et al. 2014) were purified in the same way, except that the cells were grown for 24 h in M9 medium.

Production of artificial PHB granules

Commercial PHB (Sigma Aldrich) was used for the generation of artificial PHB (aPHB) granules. One hundred and fifty milligrams per milliliter of PHB was dissolved in heated chloroform at 65 °C for 10 min and 20 volumes of CTAB 50 mM in water were added as surfactant agent. The mix was sonicated three times for 15 s in a Virsonic 60 sonicator and heated at 75 °C to evaporate the chloroform (Horowitz and Sanders 1994). These aPHB granules, nPHB granules produced in *E. coli* expressing plasmid pPHB_{Av}, and crystalline PHB (cPHB) granules were used as substrates for the PHB hydrolytic activity determinations with cell extracts of *E. coli* cells expressing PhbZ1 protein from plasmid pJG03910. The activity determinations were done in buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

Identification of proteins associated to the granules

For the proteomic analysis of the proteins present in the *A. vinelandii* nPHB granules, cells were grown for 48 h in PYS medium. The granules were isolated as described above. The granule suspension was centrifuged and resuspended in the loading buffer and was subjected to PAGE in 12% SDS. The protein spots were excised and analyzed at the

Laboratorio Universitario de Proteómica of the Instituto de Biotecnología for identification. Briefly, gel plugs were destained, reduced with dithiothreitol, and alkylated with iodoacetamide. The samples were subjected to overnight proteolytic digestion with 10 ng μl^{-1} trypsin at 37 °C (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) and the peptides generated were extracted and desalted with Zip Tip C18 (Millipore).

The tryptic peptide mixture was analyzed by online nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on Accela system (1/20 split-flow) connected to the LTQ Orbitrap Velos instrument (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) through a nano-electrospray ionization detector (ESI). The equipment was calibrated with a mixture of ten calibration molecules (Calmix) to allow determination of mass with accuracy within 5 ppm. The peptide mixture was sampled directly onto a capillary column in-house packed with 3- μm C18 beads with a flow of 300 nl min^{-1} . The peptides were eluted with a 120-min gradient from 5 to 70% acetonitrile in 0.1% formic acid. The effluent from the capillary column was directly electrosprayed into the mass spectrometer. For peptide fragmentation, collision-induced dissociation (CID) and high-energy collision dissociation (HCD) were used. Only 2+- and 3+-charged ions were selected for fragmentation events, while singly charged ions, 4+- or higher-charged ions, and ions for which no charge state could be determined were excluded from selection. All mass spectra were acquired in the positive-ion mode. MS data were acquired using a data-dependent method dynamically choosing the most abundant precursor ions from the survey scan for fragmentation. Mass spectra were collected using normalized collision energy of 35%, isolation width of 3.0 (m/z), activation Q of 0.25, activation time of 10 ms, and maximum ion injection time of 10 ms per micro-scan. Dynamic exclusion was used to reduce the redundancy of the data. Dynamic exclusion settings were (i) exclusion list size of 400, (ii) pre-exclusion duration of 30 s, and (iii) exclusion duration of 300 s. The MS data set produced by the amino acid sequence of the corresponding peptides was searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant database using Mascot software (Matrix Science, Boston, MA).

Determination of endogenous PHB hydrolytic activity of nPHB granules

In order to measure the contribution of the depolymerase PhbZ1 to the endogenous PHB hydrolytic activity of the granules, 5 mg of nPHB granules was used per reaction (1 ml) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The reaction was incubated at 37 °C for 72 h, with constant agitation at 600 rpm and a sample of 100 μl was collected for the quantification of the

remaining amount of PHB by spectrophotometric methods (Law and Slepecky 1961).

Determination of the PHB thiolytic activity

The thiolytic activity of the PhbZ1 protein was measured using nPHB granules, as described previously (Uchino et al. 2007), using 1 mg of granules. The reaction buffer was 50 mM potassium phosphate (pH 7) containing 50 mM DTT. CoA was added to complete 1 mM in a total volume of 1 ml. Of the samples, 100 μl was taken every 30 min. The samples were centrifuged for 3 min at 13700g before analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC determination of 3-hydroxybutyryl-CoA and CoA was performed essentially as described (Uchino et al. 2007). Samples of 20 μl of the products of the enzymatic reaction were injected onto a Waters Xterra MS C18 column and were eluted with a gradient (0–40% A:B) of water acidified with 1% trichloroacetic acid (solution A) and pure methanol (solution B), at a flow rate of 0.8 ml/min, 1200 psi, at 30 °C with a detector of UV/vis at $\lambda = 260$ nm.

Determination of the PHB synthase activity

For the quantification of PHB synthase activity in crude extracts of *E. coli*-pPHBAv, *E. coli*-JG03910 and *E. coli*PET24a+, the cultures were grown to an OD of 0.4–0.6 and were induced with 0.5 mM IPTG. After 3 h, the cells were washed twice with phosphate buffer (25 mM), pH7, and were disrupted by ultrasonic treatment at 4 °C and centrifuged at 9660 g for 15 min at 4 °C. For the determination of this activity in the *A. vinelandii* strains UW136, PhbZ1, PhbZ1-C, and the *phbC*⁻ mutants CS18 and PhbZ1-phbC, the cells were grown on PYS medium for 48 h, washed twice with phosphate buffer (25 mM), pH 7, and disrupted by ultrasonic treatment at 4 °C and centrifuged at 9660 g for 15 min at 4 °C. The protein content of all cell extracts was quantified by the method of Lowry et al. (1951). The PHB synthase activity was assayed in all cases spectrophotometrically by quantifying at 412 nm the CoA released in a final volume of 1 ml of 25 mM phosphate buffer at pH 7, with 0.1 mM DTNB, 55 μM B-hydroxybutyryl-CoA, and 1 mg of total protein extract, as described by Millán et al. (2016).

Culture conditions in bioreactor under limited oxygen conditions

Batch cultures of *A. vinelandii* OP and its mutant derivative PhbZ1-OP⁻ were conducted in a 3-l stirred tank glass bioreactor (Applikon Biotechnology, Netherlands), equipped with two Rushton turbines of 4.5 cm of diameter and operated at 500 rpm, as previously described (Millán et al. 2016). The bioreactor was initially loaded with 1.8 l

of PYS medium. The inoculum was previously grown in an Erlenmeyer flask with 100 ml of medium and incubated on rotatory shaker (New Brunswick Scientific Co., model G25) during 20–22 h at 29 °C and 200 rpm. In all the experiments, the temperature was controlled at 29 ± 0.5 °C and the pH of the medium was adjusted to 7.2 ± 0.09 by the automatic addition of a 2 N NaOH or HCl solutions using a peristaltic pump. The dissolved oxygen tension (DOT) was measured with an Ingold polarographic probe (AppliSens, Applikon, The Netherlands) that was controlled automatically by gas blending, varying the proportions of oxygen and nitrogen in the inflowing gas through two mass flow controllers (Brook Instruments B. V. model 5850F, The Netherlands). Both strains were grown under oxygen limited conditions at $\text{DOT} = 1.0 \pm 0.2\%$ of saturation (Millán et al. 2016) and the results showed are the average of three independent runs.

Analysis of the molecular weight of the PHB produced

For the analysis of PHB molecular weight, the polymer was recovered by using organic solvents as previously described (Millán et al. 2016). The recovered PHB samples were dissolved in chloroform at a concentration of $2\text{--}3 \text{ mg ml}^{-1}$ and were filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ GHP membrane (PALL Acrodisc, cat. number 21854606). Then, the samples were injected into the HPLC. The HPLC system (Waters Alliance 2695, USA) used for the PHB molecular weight analysis consisted of two columns for gel permeation chromatography (GPC) (Styragel HR5E and HR6, Waters) connected in series and coupled with a refractive index detector (Waters 2414, USA). The mobile phase was chloroform at 30 °C at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} . A calibration curve was constructed with polystyrene standards in the range of 2.94×10^3 to $5.97 \times 10^6 \text{ g g}_{\text{mol}}^{-1}$ and the data was processed with the Empower software.

Results

Identification of PhbZ1 as a PHB granule-associated protein

Using the sequences from several well-characterized PHB depolymerases in a *blast* search in the *A. vinelandii* genome, we found seven genes whose deduced proteins showed significant similarity with these enzymes. Because PHB depolymerases are usually granule-associated proteins (Abe et al. 2005; Kobayashi et al. 2003; Saegusa et al. 2001; Sznajder and Jendrossek 2014; Sznajder et al. 2015; Uchino et al. 2007), in order to further support the participation in PHB metabolism of

the putative enzymes encoded in the genome, we isolated nPHB granules from *A. vinelandii* UW136 grown in Erlenmeyer flasks containing PYS medium, separated the associated proteins in SDS-PAGE and identified the main bands by mass spectrometry (Table 2). As expected, we found proteins involved in PHB biosynthesis, such as the acetoacetyl-CoA reductase (WP_012700951; Avin_23650), PHB synthase (WP_012700949; Avin_23630), and the phasin protein PhbP (WP_012700953; Avin_23670). Several other proteins (mainly membrane proteins), probably artifacts from the separation procedure, were also found attached to the purified granules. Some of these proteins have also been found on the granules of other bacteria, like porins and other membrane or hydrophobic proteins, and have been proposed to be there as product of contamination during nPHB granule isolation (Jendrossek and Pfeiffer 2014; Tirapelle et al. 2013). Interestingly, one of the putative PHB depolymerases identified in the genome was found associated to the granule, migrating in the gel with an apparent molecular mass of 100 kDa (Fig. 1). According to the DNA sequence of its gene, this protein (WP_012699077; Avin_03910), now named PhaZ1, has 914 amino acids, a molecular mass of 101,057.8 Da, and a theoretical pI of 5.52. When compared to the proteins encoded in the genome of *R. eutropha* H16, the model organism for PHB metabolism (Reinecke and Steinbüchel 2009), it shows an overall identity of 48% with an uncharacterized protein annotated as PHA synthase (H16_A0671) and 44% identity with the uncharacterized putative PHA depolymerase H16_B1632; however, the protein PhaZ1 from *A. vinelandii* UW136 shows a low similarity with the main PHB depolymerase from *R. eutropha* H16, PhaZa1 (H16_A1150) (Handrick et al. 2000; Saegusa et al. 2001; Uchino et al. 2008). The PhaZ1 protein shows a high identity with uncharacterized proteins present in several Proteobacteria, which are its probable orthologs that are annotated as PHB synthases or PHB depolymerases. It is interesting to note that it also shows similarity in its amino terminal half with the PhaC subunit of the heterodimeric form of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) synthases class III. Interestingly, the *phbZ1* gene is located adjacent to *phbP2*, which encodes a protein (WP_012699079; Avin_03930) paralog of the main phasin PhbP. Due to these characteristics, this protein was chosen for further analysis to investigate its role in PHB metabolism.

The PhbZ1 protein expressed in *E. coli* has hydrolytic activity on amorphous PHB

In order to test the PHB hydrolysis activity of PhbZ1, its gene was cloned and expressed in pET24a+ (plasmid

Table 2 Granule-associated proteins identified by ESI LC-MS

No.	Protein ID	Locus tag	Protein name	Short name	Theoretical MW (kDa)	Fragments	Coverage (%)
1	WP_012700116	Avin_14810	Ribonuclease E/G	RneE	128.96	18	17
2	WP_012699077.1	Avin_03910	PHB depolymerase	PhaZ1	101.06	16	20
3	CAA30987.1	Avin_44910	Dihydrolipoyltransacetylase component of the pyruvate dehydrogenase	Ipd	65.03	4	6
4	WP_012700949.1	Avin_23630	PHB synthase	PhbC	64.40	8	14
5	WP_012701529.1	Avin_29760	Dihydrolipoamide succinyltransferase component of the α -ketoglutarate dehydrogenase	SucB	41.98	10	35
6	WP_012700919.1	Avin_23330	Outer membrane porin	OprF	37.61	17	71
7	WP_012700953.1	Avin_23670	Phasin	PhbP	20.27	12	78
11	WP_012700951.1	Avin_23650	Acetoacetyl-CoA reductase	PhbB	26.71	3	20
12	WP_012700616.1	Avin_20000	Cytochrome C oxidase	CcoO/FixO	22.62	1	9
14	WP_012701814.1	Avin_32730	VacJ-like lipoprotein	–	25.97	7	57
15	WP_012702001.1	Avin_34720	Hypothetical protein	–	21.78	1	6
16	WP_012700896.1	Avin_23100	Outer membrane lipoprotein	OprI	8.73	2	24

pJG03910). Most of the protein remained insoluble, but by modification of the protocol, we were able to obtain an amount in the soluble fraction that was clearly detected by Western blot (data not shown). Several attempts to purify the initially soluble protein were unsuccessful, because most of it precipitated during purification; thus, the PHB hydrolytic activity was measured using the soluble *E. coli* cell extracts containing the protein. The enzymatic assay

was done using three different substrates: nPHB granules purified from *E. coli* expressing the PHB biosynthetic operon of *A. vinelandii*, aPHB granules, and cPHB granules. The enzyme present had activity on nPHB ($93.0 \pm 1.4 \mu\text{g}$ of PHB $\text{h}^{-1} \mu\text{g}$ of protein $^{-1}$) and aPHB ($66.1 \pm 3.6 \mu\text{g}$ of PHB $\text{h}^{-1} \mu\text{g}$ of protein $^{-1}$), but no hydrolytic activity was detected on cPHB. No activity was detected in the corresponding controls with the empty plasmid.

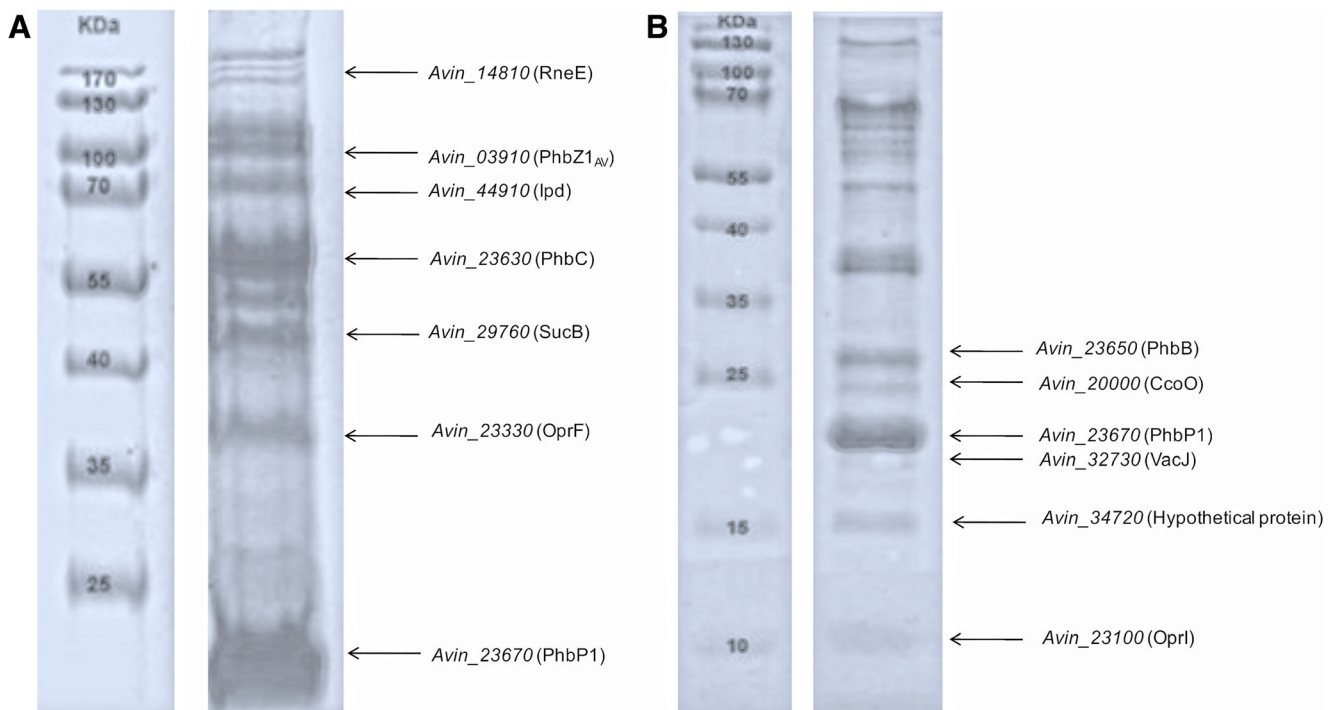


Fig. 1 Analysis of the granule-associated proteins of *A. vinelandii* UW136 (WT) separated by SDS-PAGE. The cells were grown in Erlenmeyer flasks with PYS medium and were collected at 48 h

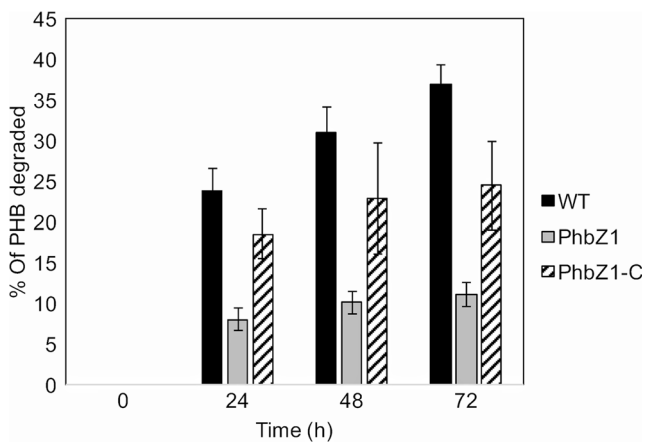


Fig. 2 Endogenous PHB hydrolytic activity of nPHB granules isolated from *A. vinelandii* UW136, its mutant derivative PhbZ1, and the complemented strain PhbZ1-C. The granules (5 mg of nPHB per 1 ml of reaction) were incubated in buffer Tris-HCl 50 mM at pH 7.5 and 37 °C. The PHB content of the granules was quantified at different times and the values are the mean of triplicates and the standard deviation is shown

Inactivation of the *phbZ1* gene negatively affects the PHB hydrolytic activity present in the nPHB granules of *A. vinelandii*

To further investigate the role of the granule-associated enzyme PhbZ1 in the metabolism of PHB, we inactivated the *phbZ1* gene. We purified nPHB granules from the wild-type strain and the PhbZ1 mutant after 48 h of growth on PYS medium and compared their PHB mobilization capacity in vitro. As shown in Fig. 2, the PHB granules from the wild type degraded $37.0 \pm 2.5\%$ of the polymer after 72 h of incubation, whereas the granules of the mutant degraded only $11.2 \pm 1.5\%$ of the initial content of PHB. The PhbZ1 mutant was complemented with the *phbZ1* wild-type allele by co-integration of the plasmid pJG03910 in the chromosome. The complemented strain partially recovered the PHB mobilization activity, degrading $24.5 \pm 5.5\%$ of the PHB present in the granules after 72 h (Fig. 2).

PhbZ1 participates in the thiolysis of nPHB in the presence of free CoA

In *R. eutropha*, the model organism for PHB metabolism, one PHB depolymerase (PhbZa1) has been shown to be able to perform a thiolytic reaction on PHB, in addition to the hydrolytic reaction. This thiolysis occurs in the presence of free CoA, producing hydroxybutyryl-CoA (Eggers and Steinbüchel 2013; Uchino et al. 2007). Because the PhbZ1 enzyme of *A. vinelandii* shows some similarity with PhbZa1, mainly with respect to the presence of the amino acid residues forming the putative catalytic triad in that protein (Kobayashi and Saito 2003), the thiolysis activity of PhbZ1 was assayed. This experiment was conducted using purified nPHB granules

from the wild-type strain UW136, the PhbZ1 mutant and the complemented strain PhbZ1-C (Table 3). The granules of the wild-type strain were able to carry out the thiolytic reaction in the presence of CoA, forming hydroxybutyryl-CoA. In contrast, the nPHB granules from the mutant showed a 90% reduced activity, whereas the complemented strain PhbZ1-C restored most of the thiolytic activity of the wild-type strain (Table 3 and Fig. 3).

The PhbZ1 protein has no significant PHB synthase activity

Due to the similarity of the amino terminal half of PhaZ1 with the PhaC subunit of PHA synthases class III, and because the reverse reaction (thiolysis) has also been reported to occur with the PHA synthase PhbC from *R. eutropha* (Uchino and Saito 2006), we tested the PHA polymerization activity toward β -hydroxybutyryl-CoA of PhbZ1 expressed in *E. coli* from plasmid pJG03910 (Table 4). As controls, we used cell extracts of *E. coli* expressing the PHB synthase PhbC of *A. vinelandii* (WP_012700949) from plasmid pPHB_{Av} and cell extracts of *E. coli* with the empty vector pET24a+. The presence of soluble PhbZ1 in the cell extract from *E. coli* containing plasmid pJG03910 was confirmed by Western blot (Fig. S1). The PHB polymerization activity (Table 4), measured as the release of free CoA, was clearly detected in the *E. coli* cells expressing the *A. vinelandii* PHB synthase PhbC, whereas a very low value was quantified in the cells expressing PhbZ1. This value was more than 20 times lower than the positive control and very similar to the negative control.

Although we did not detect significant PHB synthase activity for the PhbZ1 protein in this experiment, this could be due to the requirement of some additional factor not present in *E. coli*. To analyze this possibility, we tested the effect of the inactivation of *phbZ* on the PHB synthase activity of *A. vinelandii*. The activities of the wild type, the PhbZ1 and the complemented strains were quantified and compared to the activities of a PHB synthase mutant *phbC*⁻ (strain CS18, Segura et al. 2003) and a double-mutant *phbC-phbZ1*. As shown in Table 5, the PHB synthase activities of the wild-type strain, the PhbZ1 mutant, and the complemented strain were similar, whereas the *phbC-phbZ1* and the *phbC* mutants showed a considerably diminished activity and were similar.

Table 3 Thiolytic activity of native PHB granules purified from different *A. vinelandii* strains in the presence of coenzyme A

Strain	Specific activity (3HB-CoA μ mol/h/mg of protein)
WT	20.0 ± 1.0
PhbZ1	1.8 ± 0.5
PhbZ1-C	18.6 ± 0.5

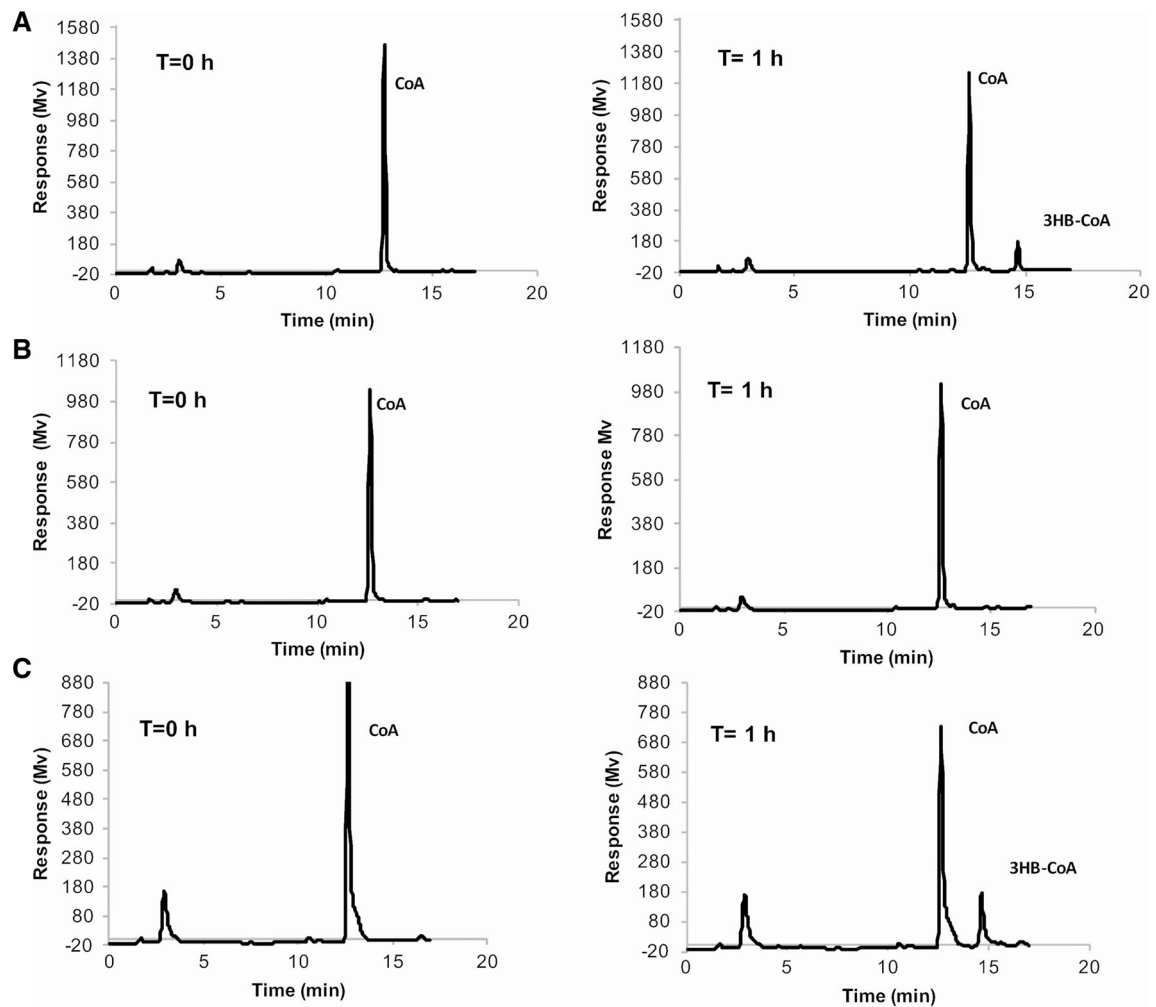


Fig. 3 HPLC analysis of the 3-hydroxybutyryl-CoA formed during the thiolysis of nPHB granules from **a** *A. vinelandii* UW136 (WT), **b** its PhbZ1 mutant, and **c** the complemented strain PhbZ1-C, in the presence

of free CoA. A sample of 20 μ l of the supernatant obtained after centrifugation was analyzed by HPLC at the indicated times (0 and 1 h)

The mutant PhbZ1 has no phenotype in flask cultures

To determine the effect of the inactivation of *phbZ1* on the metabolism of PHB, the accumulation of PHB of the mutant PhbZ1 was compared to that of the wild-type strain on PYS medium. The growth kinetics of both strains, measured as cellular protein, showed no difference (Fig. 4a). The maximum PHB accumulation, reached at the stationary phase (48 h; Fig. 4b) was very similar for both strains. The wild-type strain UW136 produced $1860 \pm 49 \mu\text{g ml}^{-1}$, whereas the PhbZ1 mutant accumulated $2029 \pm 41 \mu\text{g ml}^{-1}$ of PHB. No significant difference in the maximum content of polymer was observed. To find out if the expression pattern of the *phbZ1* gene could explain the lack of phenotype, a transcriptional fusion was constructed with the reporter gene *gusA* and the β -glucuronidase activity was measured at different times (Fig. 4c). The *phbZ1* gene was found to have a higher expression during the stationary phase, when the PhbZ1 protein was found attached to the PHB granules (Fig. 1).

In order to compare the PHB mobilization phenotype, we analyzed the changes in the content of the polymer in both strains after the maximal PHB accumulation was reached and under carbon limitation. Cultures of the wild-type strain and the mutant, grown for 48 h to late stationary phase, were incubated for additional 48 h and the polymer content was measured every 8 h. No differences in PHB mobilization were observed between the two strains (not shown). We tried by transferring the cells after PHB accumulation, to different media and conditions, in order to determine if the mutant could show a phenotype. A defined medium with no carbon source and with different concentrations of sucrose, phosphate, ammonium, and different aeration conditions were tested. The sucrose concentration on PY medium was also modified. The mutant and the wild-type strains showed similar amount of PHB under all the conditions and times tested in Erlenmeyer flasks and no phenotype was observed (data not shown).

Table 4 PHB synthase activity of the PhbZ1 protein expressed in *E. coli*

Strain and plasmid	Specific activity (nmol of β -hydroxybutyryl-CoA monomer/minute/mg of protein)
<i>E. coli</i> –pET24a	93.1 \pm 8.0
<i>E. coli</i> –pJG03910	80.0 \pm 11.0
<i>E. coli</i> –pPHB _{AV}	1848.0 \pm 97.0

Effects of *phbZ1* inactivation on the amount of PHB produced in bioreactors and its molecular weight

It was previously reported that in *A. vinelandii* OP cultures grown in a 3-l bioreactor (Millán et al. 2016), the mean molecular weight of the PHB produced during the exponential growth phase reached 4800–5500 kDa, but decreased to 3600 kDa after 20 h of culture, at the stationary growth phase. This decrease correlated with the appearance of a fraction of polymers of low molecular weight (lower than 1000 kDa) and also with an increase in the PHB depolymerase activity during the stationary phase of the culture. In order to determine if the PhbZ1 enzyme could be involved in the putative degradation of the PHB in the bioreactor, a PhbZ1-OP mutant derivative of *A. vinelandii* OP was constructed and studied in the bioreactor.

Both strains showed a similar growth in the bioreactor. The specific growth rate (μ) in the case of strain OP was $0.08 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, whereas for the PhbZ1 mutant, it was $(0.09 \pm 0.01 \text{ h}^{-1})$. When the growth was measured as protein (Fig. 5a), both strains also showed similar values, so the *phbZ1* gene inactivation had no significant effect on the growth capacity of the strain. However, when growth was measured as cell dry weight (CDW, Fig. 5b), some differences were observed. In the case of strain OP, the CDW was $3.9 \pm 0.35 \text{ g l}^{-1}$ at the end of the culture, while for PhbZ1-OP, it was $5.2 \pm 0.23 \text{ g l}^{-1}$. The accumulation of PHB also showed some interesting differences (Fig. 5c). The cultures of the OP strain had a maximum PHB accumulation of $79.6 \pm 6.1\%$ at 42 h and this value decreased to $70.7 \pm 5.9\%$ at the end of the culture. For the PhbZ1-OP mutant, the

Table 5 Effect of *phbZ1* gene inactivation on PHB synthase activity

Strain	Specific Activity (μmol of the β -hydroxybutyryl-CoA monomer/minute/mg of protein)
WT	6.98 \pm 0.08
PhbZ1	6.71 \pm 0.10
PhbZ1-C	6.90 \pm 0.04
PhbZ1-PhbC	0.17 \pm 0.03
CS18	0.12 \pm 0.01

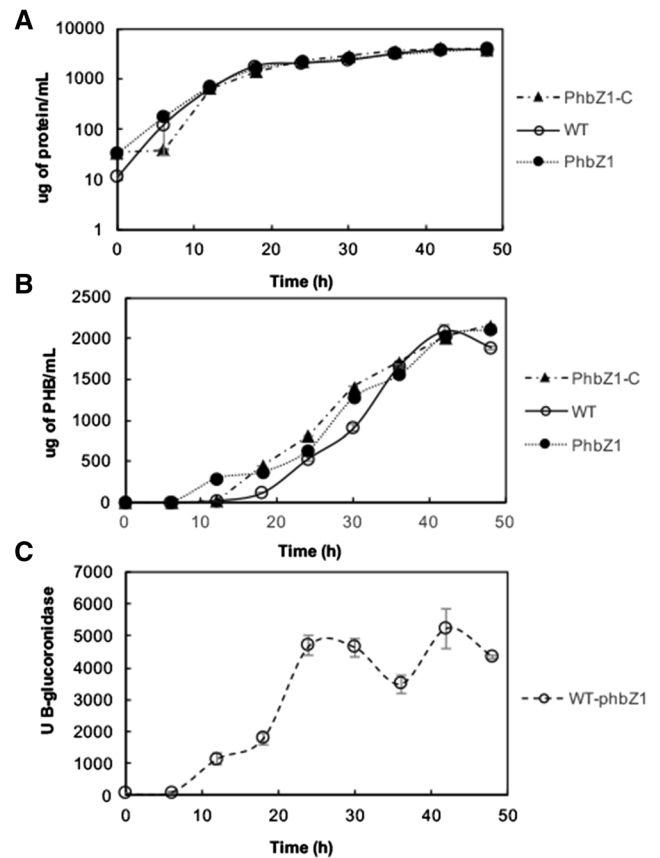


Fig. 4 Growth kinetics of strains WT, PhbZ1, and PhbZ1-C in Erlenmeyer flasks. **a** Growth quantified as protein. **b** Accumulation of PHB. **c** Transcriptional expression of the *phbZ1* gene using the reporter β -glucuronidase gene *gusA*

accumulation of PHB reached $90.0 \pm 1.0\%$ in the stationary phase, at a similar cultivation time, and the polymer content was stable during the rest of the culture.

The analysis of the PHB produced at different culture times (Fig. 6) showed that the polymer accumulated in the PhbZ1-OP mutant strain had a higher weight average molecular weight (Mw) (6100 kDa), when compared with that of the polymer produced by strain OP (5200 kDa). Furthermore, the Mw of the PHB produced by strain OP decreased during the exponential growth phase (from 5200 to 3600 kDa), remaining in values of 3500 kDa during the stationary phase. In the case of mutant PhbZ1-OP, the Mw of the polymer remained practically constant in the range of 5500 to 6200 kDa during the 48 h of cultivation. The molecular weight distribution (MWD) of the polymer accumulated by both strains was also different (Fig. 7). In the case of the PHB produced by strain OP, the polymer was constituted by fractions with molecular weights from 10 to 25,000 kDa at different times of the culture (Fig. 7a). Also, the fraction of PHB molecules with low molecular weights, in the range of 10 to 350 kDa, increased with respect to the cultivation time, reaching about 28% of the whole sample at the end of the culture (48 h) (Fig. 7a). In contrast, for the polymer produced

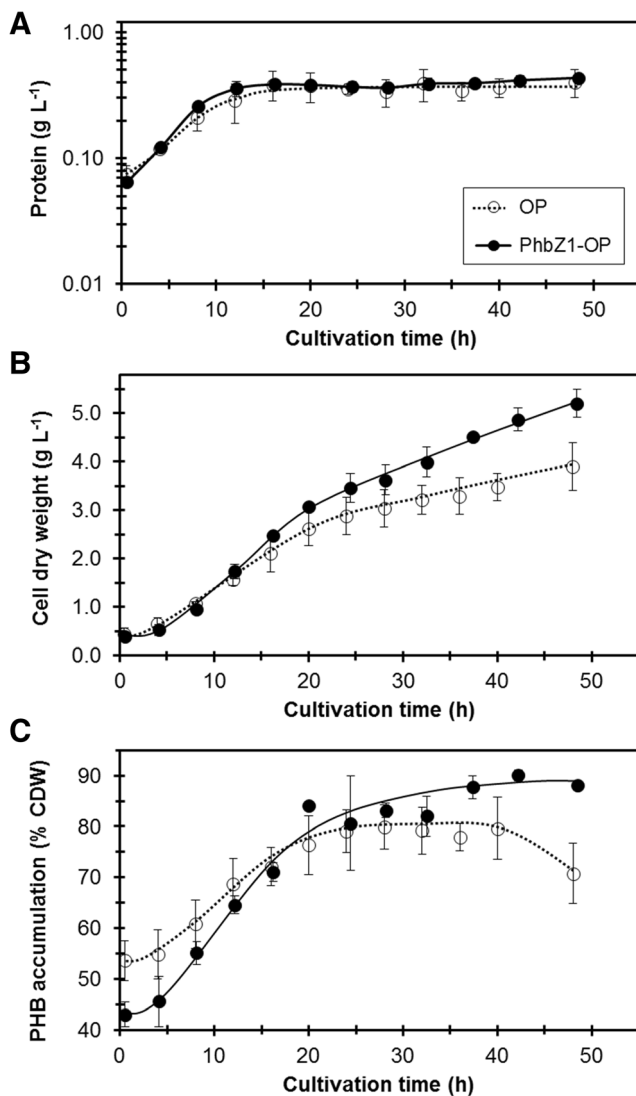


Fig. 5 Growth kinetics, measured as protein (a) and cell dry weight (b), and PHB accumulation (c) of *A. vinelandii* OP (white circles) and its mutant derivative *phbZ1* (black squares). Cultures were grown in a stirred tank bioreactor containing 2 l of PYS medium, as indicated in the “Materials and methods” section. Quantifications are the average of triplicates and the standard deviation for each point is shown

by the PhbZ1-OP mutant, the MWD showed molecular weights from 350 to 25,000 kDa and this distribution was similar for all the culture times analyzed (Fig. 7b). The fraction of 10–350 kDa was not observed in the samples obtained from strain PhbZ1-OP (Fig. 7c).

Discussion

The PHB biosynthetic process and the genetic elements involved are well known in *A. vinelandii* (Castañeda et al. 2000; Hernández-Eligio et al. 2011, 2012; Muriel-Millán et al. 2014; Noguez et al. 2008; Peralta-Gil et al. 2002); however, little is known about the mobilization of PHB. The localization in the

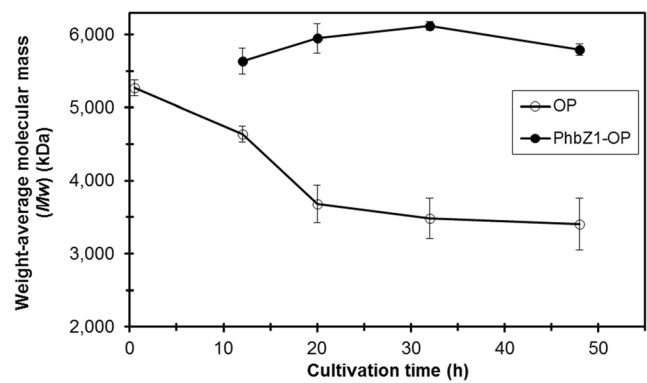


Fig. 6 Weight average molecular weight (Mw) of the PHB produced by *A. vinelandii* OP (white circles) and its mutant derivative PhbZ1-OP (black squares) at different culture times in a stirred tank bioreactor containing 2 l of PYS medium

nPHB granules of one of the putative PHB depolymerases identified in the genome sequence (Fig. 1), together with other proteins involved in PHB metabolism (Table 2), suggested that this protein could be a participant in the mobilization of the polymer. In accordance with this hypothesis, when expressed in *E. coli* and although most of the protein was insoluble, the soluble enzyme showed in vitro hydrolytic activity on nPHB and aPHB, but not of cPHB, as it is characteristic of intracellular PHB depolymerases that are active on

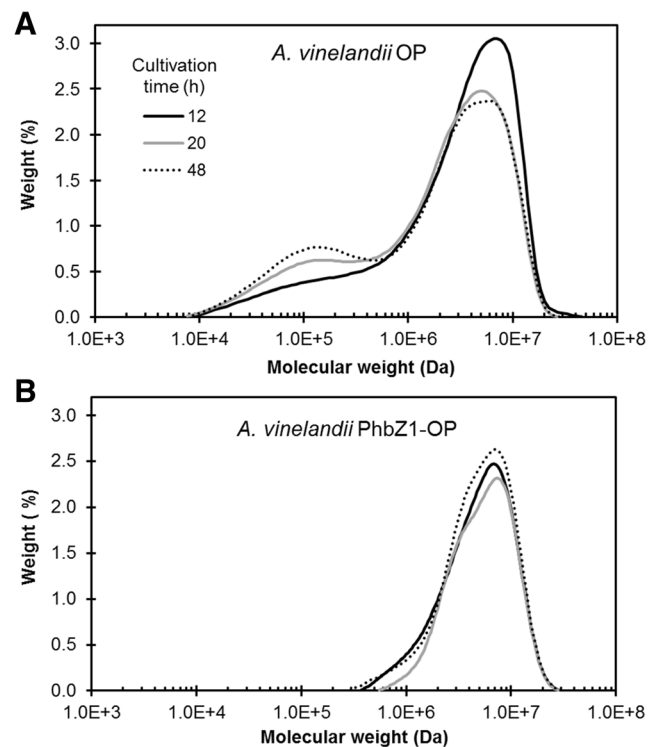


Fig. 7 Molecular weight distributions of PHB isolated from *A. vinelandii* OP (a), and its PhbZ1-OP mutant derivative (b) grown in a stirred tank bioreactor containing 2 l of PYS medium, as indicated in the “Materials and methods” section. The molecular mass was determined by gel permeation chromatography (GPC)

amorphous PHB (Saegusa et al. 2001; Sznajder and Jendrossek 2014).

Although the *phbZ1* gene was expressed in the wild-type strain in cultures grown in shake flasks (Figs. 1 and 4c), the *phbZ1* knockout mutant did not show a clear phenotype on PHB accumulation under this condition; However, the nPHB granules purified from mutant PhbZ1 had a clearly diminished in vitro auto-hydrolytic activity, when compared to those of the wild type (Fig. 2). This negative effect of the lack of PhbZ1 on the mobilization of PHB occurring in the isolated granules shows the participation of this enzyme in the degradation of the polymer. This result is similar to that reported for the mutant of PhaZa1, the main PHB depolymerase of *R. eutropha* (Handrick et al. 2000; Uchino et al. 2008). Both the lack of phenotype of the PhbZ1 mutant in shake flasks and the degradation still present in its granules (Fig. 2) suggest the presence of additional depolymerizing enzymes under this condition. We did not identify other PHB depolymerases in the mass spectrometry analysis because we only analyzed the main protein bands obtained from the granules. In the model organism *R. eutropha*, the existence of multiple PHA depolymerases is well documented, and at least seven PHB depolymerases and two oligomer hydrolases have been identified (Abe et al. 2005; Handrick et al. 2000; Kobayashi et al. 2003, 2005; Saegusa et al. 2001, 2002; Sznajder and Jendrossek 2014; Uchino et al. 2008; York et al. 2003). It is interesting to note that although the PHB depolymerizing activity in vitro has been reported for these enzymes of *R. eutropha*, the inactivation of their genes had no effect on PHB degradation, except for PhaZa1 that showed a partial phenotype on PHB mobilization (Handrick et al. 2000; Saegusa et al. 2001; Uchino et al. 2008; York et al. 2003). In the case of the *A. vinelandii* mutant PhbZ1, both its lack of a phenotype in flasks (although the PhbZ1 protein was present in the wild type; Fig. 1) and the residual auto-hydrolysis activity detected in its granules (Fig. 2) suggest a complexity of the mobilization system similar to that of *R. eutropha*.

The granules purified from *A. vinelandii* UW136 showed thiolytic activity in the presence of free CoA, forming hydroxybutyryl-CoA. The very low level of this activity in the granules of the PhaZ1 mutant and its reestablishment by complementation with *phbZ1* (Table 3 and Fig. 3) show that this activity is due to PhbZ1. This capacity has only been reported for the intracellular PHA depolymerase PhaZa1 from *R. eutropha* H16 (Eggers and Steinbüchel 2013; Uchino et al. 2007), an enzyme that lacks the lipase box sequence (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly) present in many PHB depolymerases, having a cysteine instead of serine. This cysteine forms part of the catalytic triad (cysteine, aspartate, and histidine) (Kobayashi and Saito 2003), which is conserved and positioned similarly to the catalytic amino acids present in PHA synthases (Jia et al. 2000), which catalyze the reverse reaction. It is interesting to note that the *A. vinelandii* enzyme also lacks the lipase

box and shows similarity in its amino terminal half with the PhaC subunit of the heterodimeric PHA synthases class III. From an alignment of PhbZ1 with PhaC from *Thiocystis violascens* and *Allochromatium vinosum*, it is interesting to note that although the overall identity with these proteins is low (21%), the amino acids of the catalytic triad (cysteine, aspartate, and histidine) seem to be conserved in PhbZ1 (positions 216, 371, and 410, respectively), as in PhaZa1. It would be interesting to know if this is a characteristic of other PHA depolymerases able to perform thiolytic mobilization.

Due to the similarity of the PhbZ1 protein with class III PHB synthases, the possible role of this protein as a PHB polymerizing enzyme was raised. The comparison of the PHB synthase activity of this protein with that of the PhbC enzyme of *A. vinelandii*, both expressed in *E. coli*, suggests that PhbZ1 is not a PHB polymerizing enzyme, because we did not detect any significant activity for PhbZ1 (Table 4). The small activity (free CoA released) obtained in the extracts containing PhbZ1 and in the negative control (empty plasmid) was very similar and could be due to other activities, like 3HB thiokinase or CoA transferase, that might be present in the *E. coli* extracts (Uchino and Saito 2006). Nevertheless, the lack of PHB synthase activity of the PhbZ1 protein in this experiment could also be due to the requirement of some additional factor not present in *E. coli*; however, when the PHB synthase activities of the *A. vinelandii* wild type, the PhbZ1 mutant and the complemented strain PhbZ-C were compared (Table 5), and no effect of the inactivation of *phbZ1* gene was observed. We also compared the PHA synthase activities of a PHB synthase (*phbC*) knockout mutant and a *phbC/phbZ1* double mutant of *A. vinelandii*, and in both strains, the activities were ten times lower, but similar, showing that this phenotype is due to the lack of PhbC and confirming that although the PhbZ1 enzyme has similarity with class III PHB synthases, it has no significant PHB polymerizing activity. Class III and IV PHA synthases require an additional polypeptide (PhaE and PhaR, respectively) that noncovalently associates with the catalytic subunit to have full functional activity (Rehm 2003). Homologs to such polypeptides were not found in the *A. vinelandii* genome.

In several bacteria, including *A. vinelandii* (Doi et al. 1990; Ren et al. 2009; Yan et al. 2000), PHB synthesis and mobilization occur simultaneously; therefore, the inactivation of the mobilization system could be expected to improve the accumulation of PHB. The presence of both the PHB synthase PhbC and PhbZ1 in the purified granules of *A. vinelandii* (Fig. 1) is in accordance with the concomitant synthesis and degradation of PHB. The inactivation of *phbZ1* did not affect cell growth (measured as protein, Fig. 5a) but, as expected, had a positive effect on the PHB content (Fig. 5c); the *phbZ1* mutant reached a 13% higher content of PHB than the wild-

type strain. The higher cell dry weight obtained for the *phbZ1* mutant (Fig. 5b), having a similar growth estimated as protein, is in accordance with this higher accumulation of PHB. Previous reports have shown increased production in mutants where *phaZ* genes have been knocked out, like *Pseudomonas putida* strain U (Arias et al. 2013) and *P. putida* KT2442 (Cai et al. 2009), although in other cases, no effect has been observed, like in *P. resinovorans* (Solaiman et al. 2003).

Because the mechanical strength of PHB has been positively correlated with its molecular size, a polymer of high molecular weight is preferred for those applications where a higher resistance is required (Tsuge 2016). *A. vinelandii* is able to produce a PHB of high molecular weight (Chen and Page 1994; Myshkina et al. 2008; Peña et al. 2014). However, a decrease in its mean molecular weight occurs during the stationary growth phase of cultures grown in bioreactors and this is concomitant with the appearance of a fraction of polymers of low molecular weight. This behavior correlated with an increase in the PHB depolymerizing activity (Millán et al. 2016). The present study confirmed that this decrease in the molecular weight (Fig. 6) and the corresponding appearance of PHB molecules of lower size (Fig. 7) in *A. vinelandii* strain OP are due to the degradation of the polymer by the activity of the PhbZ1 PHB depolymerase. In the case of the mutant strain, the change in the molecular weight distribution during stationary phase did not occur and the molecular size remained high and constant. A recent work where the genes of several PHA depolymerases of *R. eutropha* were deleted showed a similar result allowing the production of high-molecular-weight PHA (Arikawa et al. 2016).

In summary, the results presented show that PhbZ1 participates in the mobilization of PHB in *A. vinelandii* and is able to do it producing hydroxybutyryl-CoA. This enzyme is the main PHB depolymerase active during the stationary phase in bioreactors and its inactivation allows the production of a PHB of uniform high molecular weight.

Acknowledgements The authors are grateful to Soledad Moreno and Ramón de Anda for the technical assistance and Déborah Yanajara-Parra for her assistance in the purification of the PHB granules. L. Adaya is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México). This work was supported by grants 255158 and 238535 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and IT200415 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA-UNAM, as well as by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D. J.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical statement This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Abe T, Kobayashi T, Saito T (2005) Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J Bacteriol* 187:6982–6990
- Agus J, Kahar P, Abe H, Doi Y, Tsuge T (2006) Altered expression of polyhydroxyalkanoate synthase gene and its effect on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Polym Degrad Stab* 91(8):1645–1650. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2005.12.011>
- Agus J, Kahar P, Hyakutake M, Tomizawa S, Abe H, Tsuge T, Satoh Y, Tajima K (2010) Unusual change in molecular weight of polyhydroxyalkanoate (PHA) during cultivation of PHA-accumulating *Escherichia coli*. *Polym Degrad Stab* 95(12):2250–2254. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2010.09.009>
- Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP (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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-1)
- Aoyagi Y, Doi Y, Iwata T (2003) Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: effects of annealing and two-step drawing. *Polym Degrad Stab* 79(2):209–216. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00273-2)
- Arias S, Bassas-Galia M, Molinari G, Timmis KN (2013) Tight coupling of polymerization and depolymerization of polyhydroxyalkanoates ensures efficient management of carbon resources in *Pseudomonas putida*. *Microb Biotechnol* 6(5):551–563. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12040>
- 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. *J Biotechnol* 227:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.004>
- Asenjo JA, Schmidt AS, Andersen PR, Andrews BA (1995) Effect of single nutrient limitation of poly-beta-hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol Bioeng* 46(5):497–502. <https://doi.org/10.1002/bit.260460514>
- Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C (1992) Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 58(5):1711–1718
- Bishop PE, Brill WJ (1977) Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J Bacteriol* 130(2):954–956
- Bocanegra JK, Da Cruz Pradella JG, Da Silva LF, Taciro MK, Gomez JGC (2013) Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 170(6):1336–1347. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0257-4>
- Bush JA, Wilson PW (1959) A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 184(4683):381. <https://doi.org/10.1038/184381a0>
- Cai L, Yuan MQ, Liu F, Jian J, Chen GQ (2009) Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Bioresour Technol* 100(7):2265–2270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.020>
- Castañeda M, Guzmán J, Moreno S, Espín G (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-β-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 182(9):2624–2628. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2624-2628.2000>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0124-5>

- Chen G-Q (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev* 38(8):2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Chen G, Page WJ (1994) The effect of substrate on the molecular weight of poly- β -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol Lett* 16(2):155–160. <https://doi.org/10.1007/BF01021663>
- De Koning GJM, Lemstra PJ (1993) Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer* 34(19):4089–4094. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90671-V](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90671-V)
- Doi Y, Segawa A, Kawaguchi Y, Kunioka M (1990) Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett* 67(1-2):165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb13856.x>
- Eggers J, Steinbüchel A (2013) Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme a (CoA) via crotonyl-CoA. *J Bacteriol* 195(14):3213–3223. <https://doi.org/10.1128/JB.00358-13>
- Gebauer B, Jendrossek D (2006) Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl Environ Microbiol* 72(9):6094–6100. <https://doi.org/10.1128/AEM.01184-06>
- Handrick R, Reinhardt S, Jendrossek D (2000) Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 182:5916–5918
- 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051649-0>
- Hernández-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millán LF, Espín G (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol (United Kingdom)* 158:1953–1963
- Hiroe A, Tsuge K, Nomura CT, Itaya M, Tsuge T (2012) Rearrangement of gene order in the *phaCAB* operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 78:3177–3184
- Horowitz DM, Sanders JKM (1994) Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *J Am Chem Soc* 116(7):2695–2702. <https://doi.org/10.1021/ja00086a001>
- Jendrossek D, Handrick R (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* 56(1):403–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- Jendrossek D, Pfeiffer D (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* 16(8):2357–2372. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Jia Y, Kappock TJ, Frick T, Sinskey AJ, Stubbe J (2000) Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. *Biochemistry* 39(14):3927–3936. <https://doi.org/10.1021/bi9928086>
- Kennedy C, Gamal R, Humphrey R, Ramos J, Brigle K, Dean D (1986) The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol Gen Genet* 205(2):318–325. <https://doi.org/10.1007/BF00430445>
- Kobayashi T, Saito T (2003) Catalytic triad of intracellular poly(3-Hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J Biosci Bioeng* 96(5):487–492. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)70136-4](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)70136-4)
- Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A, Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J Bacteriol* 185:3485–3490
- Kobayashi T, Uchino K, Abe T, Yamazaki Y, Saito T (2005) Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J Bacteriol* 187:5129–5135
- Kusaka S, Iwata T, Doi Y (1999) Properties and biodegradability of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol* 25(1-3):87–94. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00019-7)
- Law JH, Slepecky RA (1961) Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82:33–36
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem* 193(3):265–275
- Manchak J, Page WJ (1994) Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology* 140(4):953–963. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-4-953>
- 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 Biochem* 51(8):950–958. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.013>
- Muriel-Millán LF, Castellanos M, Hernandez-Eligio JA, Moreno S, Espín G (2014) Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2173–2182
- Myshkina VL, Nikolaeva DA, Makhina TK, Bonartsev AP, Bonartseva GA (2008) Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Appl Biochem Microbiol* 44(5):482–486. <https://doi.org/10.1134/S0003683808050050>
- Nigmatullin R, Thomas P, Lukasiewicz B, Puthussery H, Roy I (2015) Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1209–1221
- Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernandez A, Juarez K, Espín G (2008) Enzyme I^{NPr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15(4):244–254. <https://doi.org/10.1159/000108658>
- Peña C, López S, García A, Espín G, Romo-Urbe A, Segura D (2014) Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Ann Microbiol* 64(1):39–47. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0630-0>
- Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín-González L, Espín G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184:5672–5677
- Quagliano JC, Miyazaki SS (1997) Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(5):662–664. <https://doi.org/10.1007/s002530051112>
- Reinecke F, Steinbüchel A (2009) *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16(1-2):91–108. <https://doi.org/10.1159/000142897>
- Rehm BHA (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* 376(1):15–33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>
- Ren Q, De Roo G, Ruth K, Witholt B, Zinn M, Thöny-Meyer L (2009) Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation?

- Biomacromolecules 10(4):916–922. <https://doi.org/10.1021/bm801431c>
- Saegusa H, Shiraki M, Kanai C, Saito T (2001) Cloning of an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J Bacteriol* 183(1):94–100. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.94-100.2001>
- Saegusa H, Shiraki M, Saito T (2002) Cloning of an intracellular D(-)-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the active site serine residue by site-directed mutagenesis. *J Biosci Bioeng* 94(2):106–112. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80128-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80128-1)
- Sambrook JF, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 2100
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467
- Segura D, Cruz T, Espín G (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in polyhydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* 179:437–443
- Shimizu H, Tamura S, Shioya S, Suga K-I (1993) Kinetic study of poly-D (-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. *J Ferment Bioeng* 76(6):465–469. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90242-Z](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90242-Z)
- Sim SJ, Snell KD, Hogan SA, Stubbe J, Rha C, Sinskey AJ (1997) PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. *Nat Biotechnol* 15(1):63–67. <https://doi.org/10.1038/nbt0197-63>
- Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA (2003) Effect of inactivation of poly(hydroxyalkanoates) depolymerase gene on the properties of poly(hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas resinovorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(5-6):536–543. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1317-4>
- 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. *Appl Environ Microbiol* 80(16):4936–4946. <https://doi.org/10.1128/AEM.01056-14>
- Sznajder A, Pfeiffer D, Jendrossek D (2015) Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 81(5):1847–1858. <https://doi.org/10.1128/AEM.03791-14>
- Tirapelle EF, Müller-Santos M, Tadra-Sfeir MZ, Kadowaki MAS, Steffens MBR, Monteiro RA, Souza EM, Pedrosa FO, Chubatsu LS (2013) Identification of proteins associated with polyhydroxybutyrate granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1—old partners, new players. *PLoS One* 8(9):e75066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075066>
- Tsuge T (2016) Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polym J* 48(11):1051–1057. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.78>
- Uchino K, Saito T (2006) Thiolytic of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*. *J Biochem* 139(3):615–621. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj069>
- Uchino K, Saito T, Gebauer B, Jendrossek D (2007) Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme a (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J Bacteriol* 189(22):8250–8256. <https://doi.org/10.1128/JB.00752-07>
- Uchino K, Saito T, Jendrossek D (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 74:1058–1063
- Wu Q, Wang Y, Chen GQ (2009) Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 37(1):1–12. <https://doi.org/10.1080/10731190802664429>
- Yan Y, Wu Q, Zhang R (2000) Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ¹³C NMR. *FEMS Microbiol Lett* 193:269–273
- York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe J, Sinskey AJ (2003) *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J Bacteriol* 185(13):3788–3794. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3788-3794.2003>
- Zheng Z, Li M, Xue XJ, Tian HL, Li Z, Chen GQ (2006) Mutation on N-terminus of polyhydroxybutyrate synthase of *Ralstonia eutropha* enhanced PHB accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(5): 896–905. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0371-0>