



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Expresión funcional del gen *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 en *Cupriavidus
necator* para generar Polihidroxilacanoatos de cadena media.**

Tesis que presenta

Ma. del Rocio López Cuellar

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Codirectores de la Tesis

Dr. Fermín Pérez Guevara

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

A mis padres, mi mayor ejemplo a seguir.
A Gaby, Lili y Fer, mis mas grandes amigas.
Al pequeño Emilio, por llegar a la familia.
A Iván mi mayor motivación.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada (18073) para la realización de este proyecto.

Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Agradezco a mis directores de Tesis al Dr. Fermín Pérez Guevara y Dr. Jorge N. Gracida por su confianza, orientación y apoyo en cada momento en que lo solicité y así lograr finalizar esta etapa en mi vida profesional.

Al Dr. Jesús Valdés Flores por brindarme su tiempo, paciencia, ser una real guía durante mi formación. Muchas gracias doctor por los momentos de discusión científica que han fortalecido este proyecto.

De la misma forma al Dr. Rodolfo Marsch ¡gracias! por compartirme su experiencia, por los largos momentos de análisis y permitirme trabajar en su laboratorio en uno de los momentos mas críticos de esta tesis.

Al mis asoseres el Dr. Frédéric Thalasso y Dr. Ricardo Aguilar López por todas sus valiosas críticas y recomendaciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Humberto Vazquez Torres por su ayuda y consejos durante los estudios correspondientes a la caracterización térmica.

A Joel Alba por el apoyo brindado en la fase experimental del proyecto. ¡Muchas gracias Joel!. Este laboratorio no sería el mismo sin tu ayuda. A Juan Corona y Viky por estar siempre dispuesto a auxiliarnos.

Al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, España. Especialmente a la Dra. Ma Auxiliadora Prieto, por permitirme terminar mi formación como científica siendo parte de su grupo de trabajo.

A Nina Dinjaski, por su paciencia y consejos, sobre todo por compartir conmigo su experiencia en biología molecular. Al igual que, los chicos de los laboratorio de 302, 303, 304 del CIB, gracias por la hospitalidad y cariño con el que me adoptaron. Lore, Carlos, Isabel, Julia, Ife, Javi, Vir, Andrew muchas gracias por los momentos interminables de discusión científica y no científica.

A mis amigos que indudablemente han estado conmigo en todo momento.

A Cristal Zuñiga por los largos momentos trabajo conjunto y apoyar en todo momento desde de laboratorio. ¡Gracias Cris!.

A Alberto, Bere y Luisa que han crecidos junto conmigo y me han permitido ser parte importante de su formación profesional. Armando, Carla, Shio, Magnolía gracias por siempre estar ahí.

Y muy especialmente, quiero agradecer a mi familia.

A mis papas por su amor, apoyo y confianza, y porque su ejemplo me impulsa a buscar ser cada día una mejor persona.

A mis hermanas (Gaby, Lili y Fer), por siempre estar cuando las necesito y ser las mejores.

A Iván, por creer en mí y haberme dado la motivación para seguir adelante, y enseñarme que para ser el mejor se debe competir con uno mismo, gracias corazón.

Y a todas aquellas personas que de alguna forma colaboraron en la realización del proyecto. ¡MUCHAS GRACIAS!.

ÍNDICE GENERAL

Abstract	1
Resumen	2
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1 Polímeros Biodegradables	4
1.2 PHAs y los materiales de almacenamiento	6
1.2.1 Propiedades Biológicas de los PHAs	7
1.2.2 Estructura de los PHAs	9
1.3 <i>Cupriavidus necator</i> y su ruta biosintésintética	11
1.4 Biosíntesis y genes involucrados en la producción de PHAs _{cm} .	13
1.5 Sistema de polimerización monomérica	14
1.5.1 Clasificación de PHAs sintasas	14
1.6 Producción natural de PHAs	17
1.6.1 Producción de PHAs usando fuentes de carbono renovables	18
1.7 <i>Pseudomonas putida</i> CA-3 y su PHA sintasa	20
1.8 Justificación	21

2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivos particulares	24
4. ASPECTOS GENERALES	25
4.1 Clonación y Expresión de phaC2 de <i>Pseudomonas putida</i> CA-3 en <i>C. necator</i>	25
4.2 Producción de PHA _{cm} a partir de aceite de canola por <i>C. necator</i> -pMRC03 y DSM	25
4.3 Caracterización termoquímica de los PHAs obtenidos	25
 CAPÍTULO II	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Clonación y Expresión de phaC2 de <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> CA-3 en <i>C. necator</i>	26
5.1.1 Cepas bacterianas	27
5.1.2 Antibióticos usados	28
5.1.3 Condiciones de conservación de microorganismos	28
5.1.4 Preparación, purificación de plásmidos y análisis de DNA	29
5.1.5 Diseño de secuencia del phaC2	29
5.1.6 Construcciones plasmídicas	30

5.2 Producción de PHA _{cm} a partir de aceite de canola por <i>C. necator</i> -pMRC03 y PHB ⁻⁴ -pMRC03.	33
a) Producción de Polihidroxialcanoatos a nivel matraz	33
5.2.1 Etapas de producción nivel matraz	34
5.2.2 Medios de cultivo utilizados.	34
5.2.3 Procedimientos Analíticos	36
b) Producción de Polihidroxialcanoatos a nivel biorreactor	37
5.2.4 Medio utilizado para producción a nivel biorreactor	38
5.2.5 Etapas de producción a nivel biorreactor	38
5.2.6 Procedimientos Analíticos	41
5.3 Caracterización de Polihidroxialcanoatos	42
5.3.1 Determinación de unidades monoméricas por cromatografía de gases	42
5.3.2 Caracterización Termoquímica	43
5.3.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	43
5.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	44

CAPÍTULO III

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
6.1 Clonación y Expresión de phaC2 de <i>Pseudomonas putida</i> CA- 3 en <i>C. necator</i>	45
6.1.1 Diseño de secuencia del gen phaC2	45
6.1.2 Construcción de pMRC03	47

6.2 Producción de PHAcM a partir de aceite de canola	
por <i>C.necator</i> -pMRC03 y PHB ⁻⁴ -pMRC03	54
a) Producción de Polihidroxicanoatos a nivel matraz	54
b) Producción de Polihidroxicanoatos a nivel biorreactor	57
6.3 Caracterización de Polihidroxicanoatos	73
6.3.1 Determinación de unidades monoméricas por	
cromatografía de gases	73
6.3.2 Caracterización Termoquímica	82
6.3.2.3 Análisis de Calorimetría diferencial	
de barrido (DSC).	82
6.3.2.2 Análisis Resonancia Magnética Nuclear	85
CAPITULO IV	
7. CONCLUSIONES	87
8. APÉNDICES	88
8.1 Apéndice I: Construcción de un biosensor celular en	
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442 (2011). Centro de investigaciones	
biológicas: CIB . Madrid, España	88
8.2 Apéndice II: Procedimientos	107
9. BIBLIOGRAFÍA	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de polihidroxicanoatos (R1, R2 = grupo alquil C1-C13, X= 1-4, n=100-30000). B) Gránulos intracelulares de PHB, PHV y PHB-co-PHV formado en <i>C. necator</i> .	10
Figura 2. Ruta de biosíntesis de PHAs de cadena corta.	12
Figura 3. Ruta metabólica de producción de PHAs de cadena media (PHAS _{cm}).	14
Figura 4. Múltiples alineamientos de aminoácidos de las Pha sintasas de diferentes bacterias.	17
Figura 5. Esquema de la construcción del plásmido pMRC03.	32
Figura 6. Configuración del sistema de fermentación utilizado	39
Figura 7. Alineación de pares de bases del gen <i>phaC2</i> , con el aminoácido correspondiente. [1] <i>Pseudomonas putida</i> CA-3, [2] <i>C. necator</i> .	46
Figura 8. Restricciones del plasmido pRC001. (a) M: marcador, 1: Restricción con EcoRI y HindIII, 2.- pC001 sin digerir. (b) M: marcador, 1: Restricción con EcoRI. 2: Restricción con EcoRI y StyI, 3.- Restricción con Sty I 4: pRC001 sin digerir.	47
Figura 9. Construcción de pMRC01. M: λ (Sty I), 10.- clona 10 cortada con BamHI, 10'.- Clona sin cortar, P.- pBTB3 cortado con BamHI, P'.- pBTB3 sin cortar.	48
Figura 10. Restricciones de pMRC01 y pRC001. 1.- pMRC01 sin cortar, 2.- pMRC01 cortado con Bam H1, 3.- Marcador λ (Sty I), 4.- pRC001 cortado con EcoRI, 5.- pRC001 sin cortar, 6.- Marcador λ (Sty I).	49
Figura 11. Comprobación de pMRC02 cortado con diferentes enzimas de restricción. M: Marcador λ sty, 1: pMRC02 (SmaI), 2: pMRC02 (HindIII), 3:pMRC02 (StyI), 4: pMRC02.	49
Figura 12. Clonas candidatas para ser la construcción pMRC03	50
Figura 13. Restricción realizada para las clonas 1, 2. M : marcador λ styI,	

1: Clona 1(BamHI), 2: Clona 1 (EcoRI), 3: Clona 1 (sin digerir), 4: Clona 2 (BamHI), 5:Clona 2 (EcoRI), 6:Clona 2 (sin digerir).	51
Figura 14. Orientaciones de clonas obtenidas	51
Figura 15. Micrografías de Fluorescencia en <i>E. coli</i>	52
Figura 16. Perfiles de crecimiento y producción de PHAs de <i>C. necator</i> -pMRC03, PHB ⁻⁴ -pMRC03 y <i>C. necator</i> (Cepa silvestre)	55
Figura 17. Perfiles de producción de PHAs con <i>C. necator</i> –pMRC03. a) Producción de X, Xr, PHA b). Consumo de fructosa y sulfato de amonio.	58
Figura 18. Concentración de lípidos en el medio durante la producción de PHA con <i>C. necator</i> -pMRC03.	61
Figura 19. Perfiles de producción de PHAs con <i>C. necator</i> . a) Producción de X, Xr, PHA b). Consumo de fructosa y sulfato de amonio.	62
Figura 20. Fenotipo de <i>C. necator</i> observados con microscopia confocal. a) <i>C. necator</i> -pMRC03, b). <i>C. necator</i> .	64
Figura 21. Perfiles de OD y consumo de ácido y base durante la fermentación de (a) <i>C. necator</i> , (b) <i>C. necator</i> -pMRC03	65
Figura 22. Concentración de lípidos en el medio durante la producción de PHA con <i>C. necator</i> .	69
Figura 23. Cromatograma de unidades monoméricas identificadas en el biopolímero producido por <i>C.necator</i> -pMRC03.	74
Figura 24. RMN de ¹ H realizados para el biopolímero sintetizados por PHB ⁻⁴ -pMRC03.	85
Figura 25. RMN de ¹ H realizados para el biopolímero sintetizados por <i>C. necator</i> -pMRC03.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de biopolímeros	5
Tabla 2. Clases de PHA sintetas basadas en su estructura primaria y especificidad de sustrato	15
Tabla 3. Producción de PHA utilizando fuentes de carbono económicas.	19
Tabla 4. Cepas y plásmidos utilizados.	27
Tabla 5. Lista de antibióticos empleados y concentraciones utilizadas.	28
Tabla 6. Medio LB (Luria Broth)	28
Tabla 7. Medio NR (Nutrient Broth)	34
Tabla 8. Composición del Medio mineral para 1 litro de agua	36
Tabla 9. Composición del Medio mineral para biorreactor (g l ⁻¹)	38
Tabla 10. Comparación de condiciones de electroporación	53
Tabla 11. Rendimientos obtenidos en fermentación a nivel biorreactor de <i>C. necator</i> -pMRC03	68
Tabla 12. Rendimientos obtenidos en fermentación a nivel biorreactor de <i>C. necator</i> -pMRC03	68
Tabla 13. Composición monomérica del PHA acumulado	75
Tabla 14. Diferentes sistemas de producción de PHA reportados	79
Tabla 15. Caracterización termoquímica de diferentes PHAs obtenidos con diversos aceites como fuente de carbono.	84

Abstract

The enzyme PhaC2 of *Pseudomonas putida* CA-3 is capable of polymerizing medium chain polyhydroxyalkanoates (PHA_{mcl}). The enzyme affinity gives great ability to polymerize and obtain PHA_{mcl}. These biopolymers have low crystallinity and greater elastic ability than short-chain polyhydroxyalkanoates (PHA_{scl}). Such biopolymers are commercially more attractive due to low crystallinity, greater tenacity, and allowing them a longer life without becoming brittle. However, the percentage yield of PHAs obtained is low (60%), compared with that obtained with bacteria such as *C. necator* having the ability to accumulate up to 90% of its dry weight. The aim of this work is to use the strain *C. necator* to produce PHA_{mcl} expressing *phaC2* gene of *P. putida* CA-3 (*phaC2*_{PsCA-3}), in order to obtain medium-chain monomeric units using an economic carbon source such as canola oil. The canola oil provides a mixture of saturated and unsaturated fatty acids as substrates. The gene *phaC2*_{Ps CA-3} expressed in the mutant *C. necator* PHB⁻⁴ (PHB⁻⁴-pMRC03) and wild type *C. necator* (*C. necator*-PMRC03) with an intact copy of the gene *phaC1*, allowed a comparison of biopolymers obtained using canola oil as a carbon source. Monomers of 3-hydroxyoctanoate (3HO) and 3-hydroxyhexanoate (3HHx) were incorporated into the polymers synthesized by the synthesizing *C. necator*-pMRC03 approximately 96% dry weight of PHA. At 27 h of culture was able to obtain a molar composition of 84 mol% 3HB (3-hydroxybutyrate), 2.1 mol% 3HV (3-hydroxyvalerate), 9% and 4.1 mol mol% 3HO 3HHx and respectively. The presence of 3HB, 3HV, 3HHx and 3HO monomers in the polymers was confirmed by gas chromatography and NMR analysis.

Resumen

La enzima PhaC2 de *Pseudomonas putida* CA-3 es capaz de polimerizar hidroxialcanoatos de cadena media (PHAs_{cm}). Su amplia afinidad le da gran capacidad para polimerizar PHAs_{cm} y obtener biopolímeros de baja cristalinidad y mayor capacidad elástica que los polihidroxialcanoatos de cadena corta (PHAs_{cc}). Este tipo de biopolímeros son más atractivos comercialmente debido a una mayor tenacidad y baja cristalinidad, esto les permite una mayor vida útil sin llegar a ser frágiles. Sin embargo, el rendimiento porcentual de PHAs obtenido es bajo (60% aproximadamente), comparado con el obtenido con bacterias como *C. necator*, que tiene la capacidad de acumular hasta un 90% de su peso seco. El objetivo de este trabajo es utilizar a *C. necator* para producir PHAs_{cm} al expresar *phaC2* de *P. putida* CA-3 (*phaC2*_{PsCA-3}), con el fin de obtener PHA_{cm} utilizando una fuente de carbono económica. El aceite de canola es una fuente de carbono económica que proporciona una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados. El gen *phaC2*_{Ps CA-3} expresado en la mutante *C. necator* PHB⁻⁴ (PHB⁻⁴-pMRC03) y en la cepa silvestre *C. necator* (*C. necator*-PMRC03) con una copia intacta de su gen *phaC1*, permitió realizar una comparación de biopolímeros obtenidos al utilizar aceite de canola como fuente de carbono. Monómeros de 3-hidroxioctanoato (3HO) y 3-hidroxihexanoato (3HHx) fueron incorporados en los polímeros sintetizados por el *C.necator*- pMRC03 sintetizando aproximadamente el 96% del peso seco de PHA. A las 27 h de cultivo se logró obtener una composición molar de 84% mol 3HB (3-hidroxibutirato), un 2,1% mol 3HV (3-hidroxivalerato), el 9% y 4,1 mol 3HHx y 3HO mol% respectivamente. La presencia de 3HB, 3HV, 3HHx, y 3HO monómeros en los polímeros se confirmó por cromatografía de gases y RMN análisis.

CAPÍTULO I .

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El actual énfasis en la sustentabilidad y la ecoeficiencia han dado lugar a una intensa búsqueda de recursos renovables y procesos de producción amistosos con el medio ambiente. El desarrollo sustentable es reconocido como esencial para el crecimiento de la economía y la productividad industrial.

Por más de 70 años los plásticos derivados de petróleo han sido usados por su versatilidad y durabilidad. Sin embargo su acumulación como basura, en grandes volúmenes, en rellenos sanitarios ha tenido consecuencias negativas al medioambiente por ser recalcitrantes, resistentes a la biodegradación ó tóxicos después de incinerados. En la ciudad de México, en los últimos 10 años, se ha duplicado la generación de basura de plástico al pasar de 750 toneladas en promedio diario a 1500 toneladas, lo que representa aproximadamente el 14 por ciento del total de los residuos generados al día en el Distrito Federal. Por otra parte, recientes estimaciones sobre los recursos petroquímicos sugieren tasas alarmantes de agotamiento a nivel mundial. Desde diciembre de 2011, los precios de las materias primas plásticas están experimentando un aumento constante de 200 a 300 euros por tonelada (de casi el 20%), como consecuencia de la actual situación geopolítica y económica (crisis de abastecimiento, el aumento de precios de petróleo crudo, la debilidad del euro frente al dólar) (The economist, 2012).

El aumento del costo y la sensibilización de los consumidores respecto a los impactos ambientales negativos se han sumado a la necesidad de buscar nuevas alternativas. Materiales renovables o biodegradables producidos por microorganismos pueden ser una alternativa sustentable a los productos químicos derivados del petróleo como polímeros. De acuerdo con Bozell y Landucco (1993), la integración de materias primas renovables en la economía podría reducir la demanda de crudo, limitando así las crisis económicas en la industria química causada por la volatilidad de los precios del petróleo.

1.1. Polímeros Biodegradables.

Entre las alternativas para sustitución de plásticos de origen petroquímico se encuentran los polímeros biodegradables.

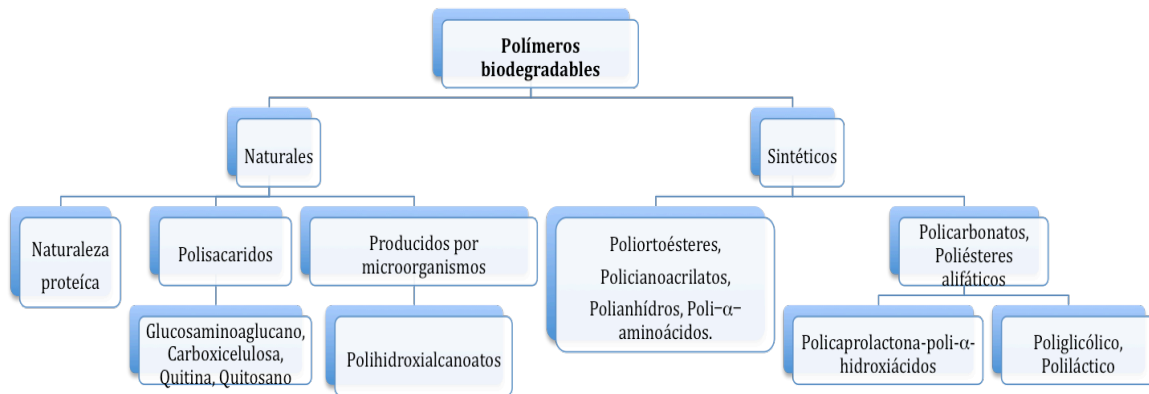
Estos polímeros presentaron una demanda total en Norteamérica, Europa Occidental y Asia de hasta 85,000 toneladas métricas, valuadas en aproximadamente 280 millones de dólares en 2005. Se ha estimado que el consumo de polímeros biodegradables en estas regiones se incrementó a 230,000 toneladas con una tasa media de crecimiento anual de 22% en 5 años a partir de 2005 a 2010 (Roy I *et al.*, 2010).

Los polímeros biodegradables liberan dióxido de carbono y vapor de agua en el aire mientras sufren descomposición biológica y permiten crecimiento de biomasa, son

sintetizados a partir de materia viva, productos agrícolas y procesos biotecnológicos (Steinbüchel, 2001).

Los polímeros biodegradables se dividen en dos grupos:

Tabla 1. Tipos de biopolímeros



Los polímeros químicamente sintetizados: Son susceptibles a la acción de microorganismos, altamente sensibles a la biodegradación y con débiles propiedades físicas. Ej., ácido poliglicólico, poli(ϵ -caprolactona), alcohol polivinilo, etc. (Khanna and Srivastava, 2004). Dentro de los polímeros biodegradables basados en carbohidratos, los a base de almidón actuan como relleno y agente adherente para crear la mezcla entre almidón y plástico (almidón-polietileno). Las bacterias del suelo degradan el almidón y también alteran la matriz del plástico, aumentando la biodegradabilidad pero generando nuevos compuestos recalcitrantes que quedarán en el ambiente durante muchos tiempo (Khanna y Srivastava , 2004).

Los polihidroxicanoatos (PHAs), Son los únicos polímeros 100% biodegradables, con gran versatilidad y potencial para ser usados en el área biomédica, alimentaria, textil y de empaque.

1.2 PHAs y los materiales de almacenamiento

Los organismos a lo largo de la naturaleza tienen diversos sistemas de almacenamiento de nutrientes esenciales para reserva de energía como son carbono, nitrógeno y fósforo. El nitrógeno puede ser almacenado como cianoficina en la célula, mientras que el fósforo se almacena en forma de polifosfato. Estos componentes son de interés científico, sin embargo el almacenamiento de moléculas de carbono tiene una amplia importancia industrial.

El almacenamiento de carbono está presente en todos los organismos procarióticos y eucarióticos. En mamíferos, glicógeno y triglicéridos (TAG) son almacenados como fuente de carbono y energía. El glicógeno es un combustible de corto plazo usado para regular la concentración de glucosa en la sangre, mientras que los TAG son como almacén de energía a largo plazo. Las plantas almacenan almidón y TAG en sus semillas para proveer alimento al crecimiento de sus embriones. Los procariotas almacenan moléculas de carbono como fuente de energía. En bacterias el almacenamiento de carbono se lleva en moléculas como glicógeno, TAG y PHAs, siendo estas últimas

moléculas de gran potencial para desarrollo de la biotecnología y aplicaciones industriales. Son macromoléculas estructuralmente simples sintetizadas por diversos organismos, principalmente bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La biosíntesis de PHAs por bacterias se realiza en el citoplasma como acumulación de fuente de carbono y energía. Esto usualmente es un mecanismo de defensa contra condiciones de estrés como limitación de nutrientes (ej. nitrógeno o fósforo) o cuando las condiciones del medio ambiente no son óptimas para el crecimiento, como ausencia de oxígeno y un pH no óptimo (de Eugenio, 2007).

El gran interés biotecnológico por los PHAs parte del potencial industrial, debido a la amplia variedad de sus propiedades similares a las de plásticos convencionales. Estos PHAs han recibido gran atención debido a su inherente biocompatibilidad y biodegradabilidad en el medio ambiente.

1.2.1 Propiedades Biológicas de los PHAs

Los PHAs muestran propiedades similares a algunos plásticos comunes como el polipropileno. La masa molecular de los PHAs está en el intervalo de 50 a 1,000 kDa dependiendo del microorganismo que los produzca y las condiciones de crecimiento. Las unidades monoméricas son todas en configuración R(-) debido a la estereoespecificidad de las enzimas biosintéticas (Suriyamonkol *et al.*, 2007; Salehizadeh *et al.*, 2004). Los PHAs están presentes como inclusiones intracelulares con un diámetro típico de 0.2-0.5

mm, estas inclusiones pueden ser visualizadas claramente por microscopía de fases debido a su alta refractabilidad.

Los PHAs son de interés biotecnológico por ser inmunológicamente inertes, lo que los hace prometedores para futuras aplicaciones, particularmente las relacionadas al área médica, a pesar de sus altos costos de producción (Keshavarz and Roy I, 2010). Como se mencionó anteriormente, a diferencia de los plásticos comunes, los PHAs son biodegradables. Varios microorganismos en la naturaleza han desarrollado mecanismos para degradar PHAs a través de la secreción de PHA depolimerasas intra- o extracelulares (de Eugenio *et al.*, 2007). La velocidad de degradación depende de varios factores relacionados con el medio ambiente (temperatura, pH, nivel de humedad) y con el mismo polímero (composición, cristalinidad, dimensión) (Sudesh *et al.*, 2000). Sin embargo, la tasa de degradación de PHAs varía desde unos pocos meses (en aguas residuales anaerobias) o años (en agua de mar) (Jendrosseck *et al.*, 2009).

Los PHAs también son materiales biocompatibles, lo que les permite ser evaluados como materiales para la liberación controlada de fármacos, suturas quirúrgicas, vendajes, material ortopédicos (Ojumu *et al.*, 2004). Además, los PHAs tiene un gran potencial para ser utilizado como andamios para la ingeniería de tejidos celulares (Hocking y Marchessault, 1994;. Ojumu *et al.*, 2004).

Lo más importante es que los PHA pueden ser producidos a partir de fuentes renovables, lo que los hace degradables por naturaleza. Por ejemplo, la producción fermentativa del

polímero se basa en productos agrícolas, tales como azúcares (de caña o de maíz) como fuentes de carbono y energía. Estos productos agrícolas utilizados para la producción de PHA se derivan de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Después de su conversión en PHA, seguida de la degradación del biopolímero, los productos finales son una vez más CO_2 y H_2O (Madison y Huisman, 1999).

1.2.2 Estructura de los PHAs

Las propiedades físico-químicas de estos materiales dependen de su estructura y ésta a su vez de los microorganismos productores y de los sustratos suministrados (Roy I *et al.*, 2010). Estos biopolímeros termoplásticos ó poliésteres elastoméricos (poli-oxoésteres) son ácidos R-hidroxicarboxílicos (AH) con unidades monoméricas basadas en cadenas hidro-carbónicas (Fig. 1a).

Estructuralmente, son clasificados en base al número de átomos de carbono de los monómeros que los conforman van de 4 a 14 carbonos. Los PHAs con monómeros 4 a 5 átomos de carbono: son considerados PHAs de cadena corta (PHA_{cc}); como lo es el poli (3-hidroxicarboxílico) (PHB). El PHB es el más común biopolímero de la familia de los PHAs. Este poliéster alifático fue descubierto por el microbiólogo francés Maurice Lemoigne en 1920 (Verlinde *et al.*, 2007). Lemoigne fue el primer científico en reconocer y aclarar la composición de estas partículas, identificando al 3-hidroxicarboxílico (HB) como el componente monomérico del gránulo (Khanna, Srivastava 2005). Años

después se encontró el poli (3-hidroxivalerato) (3HV) en bacterias crecidas en lodos activados (Rudnik, 2008).

Existen diversos tipos de PHAs dependiendo de las estructuras monoméricas que los constituyen y pueden estar formados por un solo tipo de estructura monoméricas (homopolímero) o por dos (copolímero) o más (heteropolímero) (Fig. 1b).

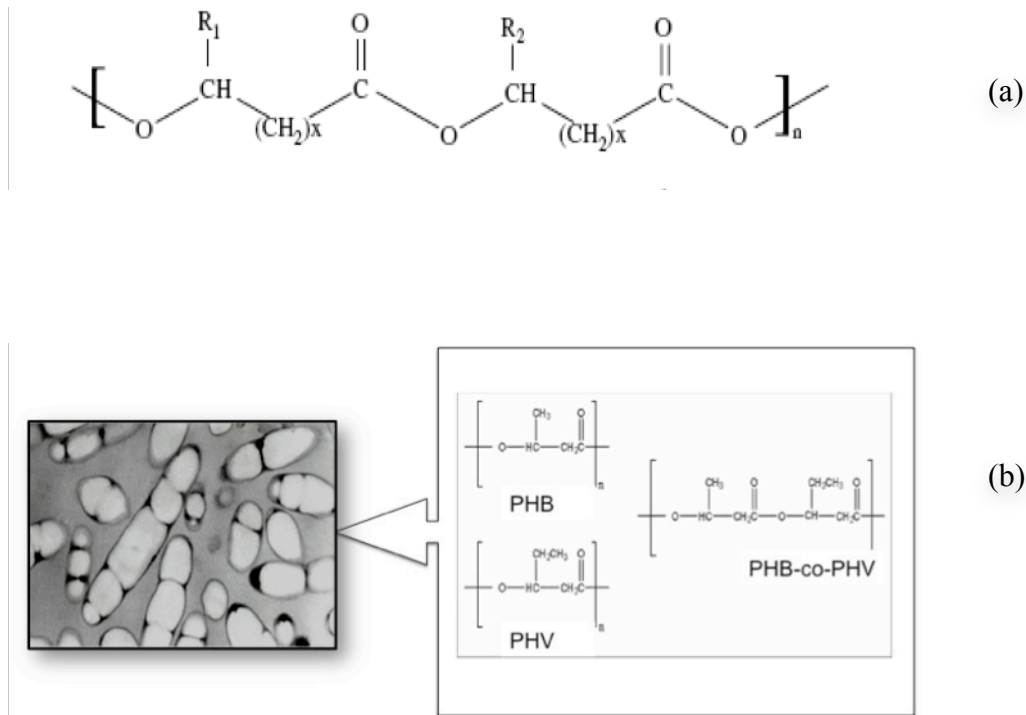


Figura 1. a) Estructura general de polihidroxiálcanoatos (R1, R2 = grupo alquil C1-C13, X= 1-4, n=100-30000). b) Gránulos intracelulares de PHB, PHV y PHB-co-PHV formado en *C. necator*.

Por otra parte, los PHAs de cadena media (PHA_{cm}) comprenden unidades con seis ó más átomos de carbono en sus unidades monoméricas (Steinbuchel and Luke-Eversloh, 2003). La estructura monomérica que conforma a los PHAs define sus características mecánicas, térmicas y cristalinas (Matsusaki *et al.*, 2000). Los PHA_{cm} exhiben mejores propiedades que los de cadena corta; más bajo punto de fusión, alta flexibilidad y bajo grado de

cristalinidad (Steinbuchel and Lutke-Eversloh 2003; Park *et al.*, 2005; Verlinden *et al.*, 2007). Por ejemplo, el PHB tiene una cristalinidad de 60%, un punto de fusión 180°C y una elongación a la ruptura de 5%. Sin embargo, los PHAs_{cm} presentan una baja cristalinidad (20-40%), no se rompen fácilmente, presentan una extensión a la ruptura de 300-450%, y se comportan como elastómeros lo que da como resultado una amplia variedad de aplicaciones.

1.3 *Cupriavidus necator* y su ruta biosintésintética.

Cupriavidus necator también llamada *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* o *Hidrogenomonas eutropha* es una bacteria no patógena Gram-negativa, encontrada en el suelo y agua, perteneciente a la familia de las β -proteobacterias (Park *et al.*, 2011). Esta bacteria es utilizada como modelo de producción de PHAs_{cc} a partir de sustratos simples como glucosa, fructosa o alcanos simples. Las tres principales enzimas de la biosíntesis β -cetotilasa, acetoacetyl-CoA reductasa y la Pha sintasa tipo I, son codificadas por los genes *phaA_{Cn}*, *phaB_{Cn}* y *phaC_{Cn}* respectivamente. Estos genes están formando el operón *phaCAB_{Cn}* (Suriyamonkol *et al.*, 2007) bajo el control de un promotor único (Fig. 2a) (Steinbuchel 2001; Reddy *et al.*, 2003, Verlinden *et al.*, 2007). En primer lugar, PhaA_{Cn} condensa dos moléculas de acetyl-CoA para formar acetoacetyl-CoA (Reddy *et al.*, 2003, Suriyamonkol *et al.*, 2007), que luego se reducirá bajo la acción de PhaB_{Cn} para formar (R)-3-hidroxiacetyl-CoA ((R)-3HB-CoA). El monómero generado (R)-3HA_{cc}-CoA será polimerizado por la PhaC_{Cn} para formar un polímero como PHB. En esta vía, PhaA_{Cn} y

PhaB_{Cn} sirven como suministro de monómeros, mientras que PhaC_{Cn} es la enzima clave en la biosíntesis de PHAs (Steinbuchel 2001; Reddy *et al.*, 2003, Verlinden *et al.*, 2007).

El flujo de acetil-CoA y la biosíntesis de PHAs_{cc} dependen de las condiciones de crecimiento. En condiciones de crecimiento equilibrado, la actividad de β-cetotilasa es inhibida por la CoA generada, como resultado de los flujos, principalmente acetil-CoA, en el ciclo de Krebs (Steinbuchel, 2001)(Fig. 2 b).

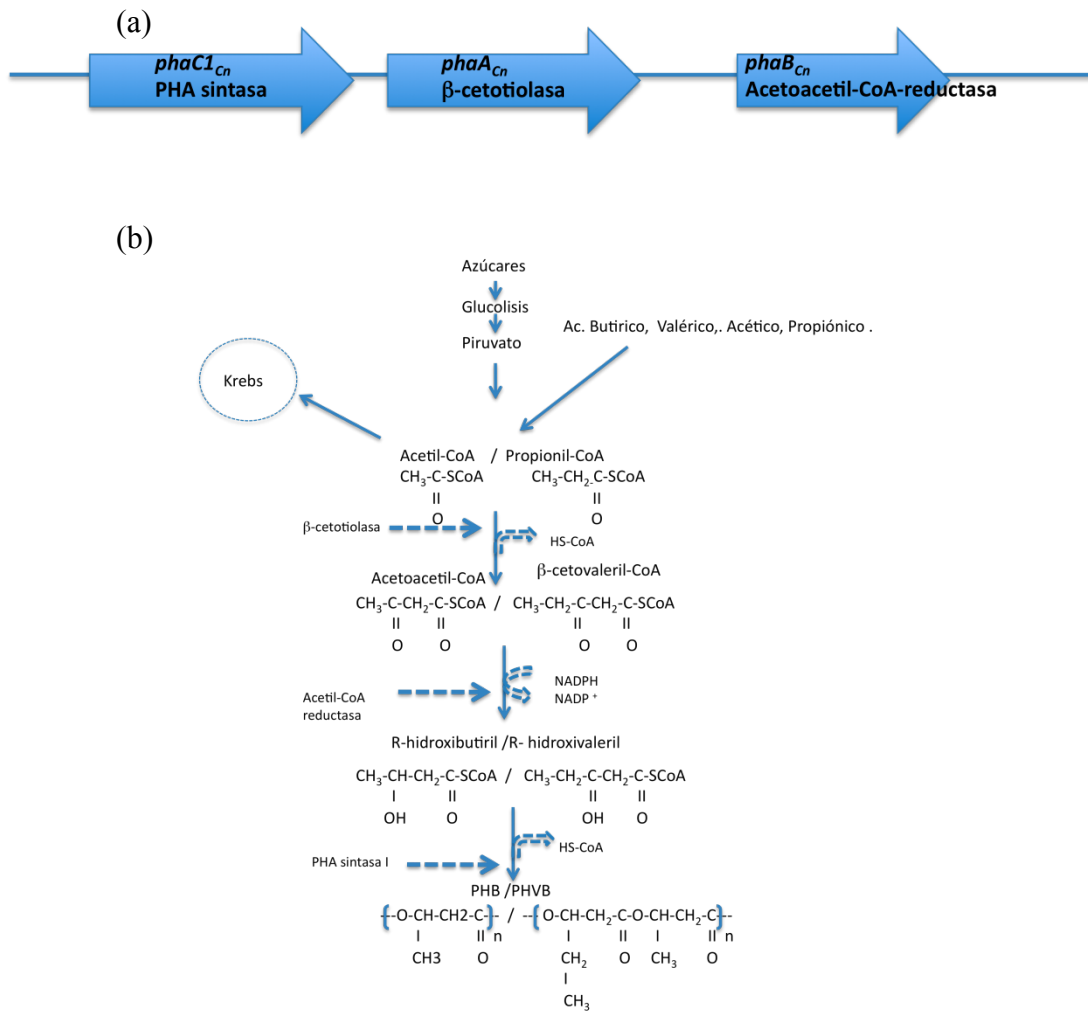


Figura 2. Ruta de biosíntesis de PHAs de cadena corta.

1.4 Biosíntesis y genes involucrados en la producción de PHAs_{cm}.

La eficiente síntesis de PHAs_{cm} se produce usando fuentes de carbono estructuralmente relacionadas, tales como alcanos y ácidos alifáticos (Lageveen *et al.* 1988). Los ácidos grasos son ácidos alifáticos que directamente relacionan la biosíntesis de PHAs_{cm} con el metabolismo de degradación de ácidos grasos. A partir de la β -oxidación, la biosíntesis de PHAs_{cm} es realizada por enzimas intermediarias para generar los monómeros (R)-3HA-CoA.

Bacterias del género *Pseudomonas sp* como *P. aeruginosa*, *P. Oleovorans* y *P. Putida* incorporan eficientemente monómeros del intervalo C6 –C14 a la síntesis de PHAs. En condiciones óptimas de crecimiento celular, los ácidos grasos de cadena larga, como el oleico (C18:1), necesitan múltiples ciclos por la ruta de β -oxidación para ser degradados hasta acetil-CoA. En condiciones de estrés, la degradación hasta acetil-CoA puede ser interrumpida por enzimas intermediarias de la biosíntesis del material reserva de energía. Las enzimas intermediarias de la β -oxidación enoil-CoA hidratasa (*phaJ_{Ps}*), 3-cetoacil CoA (*phaG_{Ps}*) y (S)-3-hidroxiacil CoA (*fadB_{Ps}*), ayudan a formar moléculas largas de R-hidroxiacil-CoA (Fig. 3) (Suriyamongkol *et al.*, 2007). Finalmente, estos monómeros R-hidroxiacil-CoA son polimerizados por una Pha sintasa tipo II (*phaC2_{ps}*) para incorporar unidades monoméricas de alto peso molecular y producir polímeros con mejores propiedades elásticas, en comparación con los obtenidos con la Pha sintasa tipo I (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

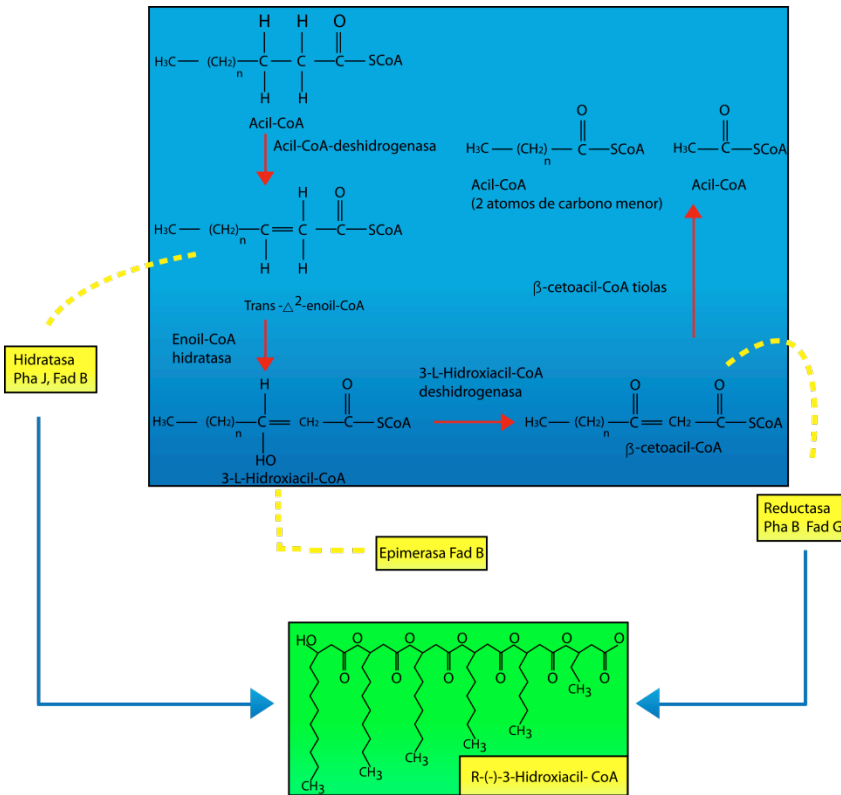


Figura 3. Ruta metabólica de producción de PHAs de cadena media (PHAs_{cm}).

1.5 Sistema de polimerización monomérica.

1.5.1 Clasificación de PHAs sintasas

Las PHA sintasas catalizan la incorporación a PHAs de R-3-hidroxiacil-CoA. Las PHAs sintasas de diferentes cepas presentan diferencias en su estructura primaria, composición en la subunidad y especificidad de sustratos. Basados en estos aspectos las PHAs sintasas son divididas en cuatro clases principales (Tabla 2) (Steinbüchel *et al.*, 1992).

Tabla 2. Clases de PHA sintasas basadas en su estructura primaria y especificidad de sustrato

Tipo	Subunidad de PHA sintasa	Microorganismos	Substrato	Referencia
I	<i>PhaC</i>	<i>Cupriavidus necator</i> , <i>Acinetobacter</i> <i>sp.</i> , R3849, <i>A.punctata</i> , <i>A. latus</i> , <i>B.cepacia</i> , <i>A. hydrophila</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>B.</i>	HA _{cc} - CoA	Qi y Rehm, 2001
II	<i>PhaC</i>	<i>caryophylli</i> , <i>P.putida</i> , <i>P.oleovorans</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P.</i> <i>resinovorans</i> ,	HA _{cm} - CoA	Amara y Rehm , 2003
III	<i>PhaC – PhaE</i>	<i>Allochromatium vinosum</i>	HA _{scl-co-mcl} CoA	Yuan <i>et al.</i> , 2001
IV	<i>PhaC – PhaR</i>	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus sp</i> <i>INT005</i>	PHA _{cc} - CoA	McCool y Cannon, 2001

Las Pha sintasas tipo I, comprenden una sola subunidad (PhaC) con un peso de 61-73 kDa. Esta clase de sintasas preferentemente utilizan monómeros HA_{cc}-CoA (C3-C5) para formar PHA_{cc}. Las Pha sintasa clase II, comprende dos subunidades de 63kDa cada una. Esta sintasa utiliza monómeros de AH_{cm}-CoA (C6-C14) para formar PHA_{cm}. La mayoría de las bacterias del género *Pseudomonas* sintetizan estas enzimas. La sintasa clase III, comprende dos diferentes subunidades, ambas de 40 kDa. La subunidad I presenta una secuencia de aminoácidos de 21 a 28% similares a la sintasa de clase I y clase II respectivamente. La segunda subunidad no presenta similaridad a ninguna sintasa. Un ejemplo de esta sintasa es la perteneciente a *Chromatium vinosum* (Amara y Rehm , 2003).

Los residuos conservados de Pha sintasa constituyen una tríada catalítica de las enzimas que pertenecen a α/β hidrolasas. Curiosamente, la superfamilia de α/β hidrolasas incluye también a las lipasas de células procariotas (Ollis *et al.*, 1992; Schrag y Cygler, 1997).

En muchos sentidos, las Pha sintasas y lipasas tienen importantes similitudes. Por ejemplo, las lipasas bacterianas funcionan como catalizadores interfaciales por actuar en la interfase lípido-agua de un sustrato micelar o emulsionados (Desnuelle, 1972). En el caso de las Pha sintasas, para que el proceso de la polimerización ocurra, las enzimas se unen a las superficies de los gránulos de PHA insoluble, así la enzima lleva a cabo su función en la interfase lípido-agua.

Múltiples alineamientos de secuencias de aminoácidos de PHA sintasas (Fig. 4) muestran que la región N-terminal de las enzimas es altamente variable. Las implicaciones funcionales de la homología entre la lipasa y la PHA sintasa se desconocen. Sin embargo algunos segmentos de la región C-terminal muestra gran similitud con una lipasa de *Burkholderia cepacia*. Esta similitud está en sitios conservados parecidos a la caja lipasa (GX-[S / C]-XG), en la cual la serina (S), que es esencial para el sitio catalítico de la lipasa, es cambiado por una cisteína en la sintasa de PHA.

<u>C.necator</u>	----NVLGFCVGGT---
<u>C.taiwanensis</u> LMG19424	----NVLGFCVGGT---
<u>P.putida</u> CA3	----NMLGACSGGI---
<u>P.aeruginosa</u> UCBPP PA14	----NLAGACAGGL---
<u>M.extorquens</u> PA1	----AAAGYCVGGT---
<u>B.cepacia</u>	----HAAGYCLGGT---
<u>B.cereus</u>	----SLLGYCMGGT---
<u>B.megaterium</u> DSM319	----SVLGYCMGGT---
<u>A.vinosum</u>	----NLLGICQGGA---
	[GXCXGX]
	Sitio activo

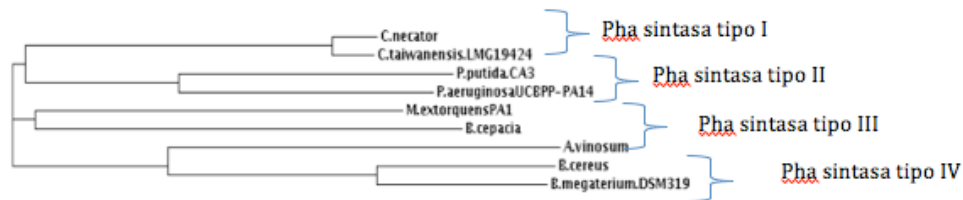


Figura 4. Múltiples alineamientos de aminoácidos de las Pha sintasas de diferentes bacterias.

1.6 Producción natural de PHAs

Aunque se han encontrado más de 250 diferentes cepas naturales productores de PHAs se han encontrado, sólo unas pocas bacterias han sido empleadas para la biosíntesis. En la década de 1980, una mutante de *C. necator* fue empleada por Imperial Chemical Industries (ICI, Reino Unido) para la producción industrial de [P(3HB-co-3HV) vendido bajo el nombre comercial de Biopol™ (Chanprateep, 2010).

Sin embargo, hay algunas limitaciones asociadas con el uso de los recursos naturales por bacterias productoras de PHAs. Para la producción industrial de la PHA, es deseable desarrollar cepas que pueden alcanzar alta densidad celular final en un período de tiempo relativamente corto y que produzcan alto contenido de producto. En *C. necator*, el metabolismo de hidratos de carbono conduce a la biosíntesis de PHAs_{cc}

principalmente PHB (Suriyamongkol *et al.*, 2007). Sistemas de producción en lote pueden ser utilizados para el desarrollo de modelos que faciliten un cultivo para la acumulación de PHAs_{cc}. Khanna y Srivastava (2004) demostraron que un cultivo por lote de *C. necator* produjo 19.7 g l⁻¹ de la biomasa y 10.89 g l⁻¹ de la acumulación de PHB en 60 h bajo condiciones de cultivo estadísticamente optimizada. Fukui *et al.*, 2002 reportaron un trabajo de ingeniería metabólica en el que *R. eutropha* produce HB-HHx (polihidroxibutirato-co-hexanoato) a partir de una fuente de carbono simple: fructosa. Esto fue posible por la introducción de genes de crotonil-CoA reductasa de *Streptomyces cinnamonesis* y un grupo de genes *pha P-C-J* pertenecientes a *A. caviae* los cuales codifican para proteínas asociadas a la formación de inclusiones de PHAs y (R)-enoil-CoA hidratasa respectivamente, logrando con esto una ruta artificial para la producción del copolímero. En esta cepa recombinante se formó C6-Acil-CoA por la vía β-cetotiolasa mediante la elongación de butiril-CoA, el cual fue generado de crotonil-CoA. Con esto la cepa logró acumular 48% en peso seco de copolímero con 1.5% de HHx.

1.6.1 Producción de PHAs usando fuentes de carbono renovables.

La producción de PHAs con azúcares como fuente de carbono ha sido optimizada para alcanzar alta productividad. Sin embargo, el costo de la producción de PHA utilizando azúcares es mayor, se obtiene un bajo rendimiento de PHA, de 0.3 a 0.4 g de P(3HB) por gramo de glucosa utilizada.

En la actualidad, se busca reducir el costo de producción de PHA utilizando fuentes de carbono simples de bajo costo, tales como el suero (Pantazaki *et al.*, 2009), xilosa y melaza de remolacha (Chee *et al.*, 2010). Utilizando estas fuentes de carbono con bacterias como *B. cepacia* ATCC 17759 crecido en 10 g l⁻¹ de xilosa, se han producido 2.6 g l⁻¹ de biomasa celular con un 60% en peso del peso seco de células de P(3HB) (Chee *et al.*, 2010). En un estudio separado, se encontró que *B. cepacia* tenía la capacidad de producir 70% en peso del peso seco de células de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-4-pentenoato) P-(3HB-co-3H4PE) partir de fuentes de carbono tales como sacarosa o gluconato (Chee *et al.*, 2010). En la Tabla 3 se resumen algunas fuentes de carbono económicas utilizadas para la producción de PHAs.

Tabla 3. Producción de PHA utilizando fuentes de carbono económicas.

Fuente de carbono	Cepas	Concentración celular (g l ⁻¹)	% PHA (peso seco)	PHA concentración (g l ⁻¹)	Referencia
Aceite de maíz hidrolizado	<i>P. putida</i>	103	27.2	28 PHAs _{cm}	Shang <i>et al.</i> , 2008
Suero de Leche	<i>P. hidrogenovora</i>	5	5	1.27 PHB	Koller <i>et al.</i> , 2008
Moladas de soya	<i>P. corrugada</i>	3.6	5-17	----	Solaiman <i>et al.</i> , 2006
Moladas de caña de azúcar	Cultivo mixto de bacterias	100	30	30 P(HDD-HO)	Albuquerque <i>et al.</i> , 2007
Glicerol Crudo	<i>Cupriavidus necator</i> JMP	50	48	PHB	Mothes <i>et al.</i> , 2007
Aceite crudo de palma	<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁴	7.9	79		Bhubalan <i>et al.</i> , 2010
Aceite de plantas	<i>Cupriavidus necator</i> H16	4.4-5.6	80	6.8 PHBV	Lee <i>et al.</i> , 2008

Por otra parte, se prevé que los aceites vegetales proporcionan un mayor rendimiento de biomasa celular y producción de PHA (0.6 a 0.8 g de PHA por g de aceite), ya que es mayor el contenido de carbono por unidad de peso en comparación con los azúcares (Akiyama *et al.*, 2003). Diversos grupos han intentado aumentar la producción de PHA_{cm}: Tsuge *et al.*, 2004 reportan una cepa recombinante de *R. eutropha* PHB⁻⁴ con el gen de *phaC_{Ac}* de *Aeromonas caviae*, capaz de incorporar 3HB e 3HHx con una fracción molar que varió del 0 a 5.1% mol HHx, utilizando aceite de soya como fuente de carbono. Esta misma cepa fue utilizada con varias concentraciones de aceite de palma (1 a 5 g l⁻¹), con lo que se obtuvo una fracción molar constante de 5% mol de HHx. Con 5 g l⁻¹ de la fuente de carbono la concentración de biomasa y PHAs total fueron de 4.3 g l⁻¹ y 87 % (w/w) respectivamente (Loo *et al.*, 2005). Aceite crudo de palma y aceite de palma ácido fueron utilizados para la síntesis de P(3HB-co-3HHx) por una cepa mutante de *W. eutropha* conteniendo un gen sintasa de *A. caviae*. El aceite de palma fue una excelente fuente de carbono para la producción de biomasa de células y P (3HB-co-3HHx). Alrededor del 87% (w/w) del peso seco de células como P (3HB-co-3HHx) se obtuvo con 5 g de aceite de almendra de palma por litro.

1.7 *Pseudomonas putida* CA-3 y su PHA sintasa

La especificidad de la PHA sintasa es un factor determinante para establecer la composición monomérica del biopolímero sintetizado. Bacterias como *Pseudomonas sp.* presentan más de una PHA sintasa (PhaC1 y PhaC2). Antonio *et al.* (2000) y Dennis *et al.* (1998) estudiaron por primera vez la especificidad de las sintasas mostrando que

PhaC2 presenta una mayor especificidad por sustratos similares a la 3-hidroxi-decanoil-CoA (Remh *et al.*, 2003). En presencia de ácido octanoico *P.putida* KT2440 sintetiza hasta 70% de la PHA en peso seco (Sun *et al.*, 2007), y utilizando varias fuentes de carbono de alto costo como azúcares y n-octanoico Santhanam and Sreenivasan (2010) encontraron que se lograba una concentración máxima de 2.06 g l⁻¹ de PHA.

La PhaC2 sintasa de *P. Putida* CA-3 tiene gran afinidad por una gran cantidad de sustratos. Patrick *et al.*, (2005) han reportado que *P. putida* CA-3 tiene gran habilidad para acumular altos niveles de heteropolímeros de PHAs compuestos de monómeros alifáticos y aromáticos. Por ejemplo, al utilizar fuentes de carbono como ácido hexanoico y ácido dodecanoico puede polimerizar unidades de carbono de 6 a 12 átomos de carbono. Sin embargo, las concentraciones que alcanza en peso seco de PHAs son de 56 % aproximadamente.

1.8 Justificación

La PhaC2 de *Pseudomonas putida* CA-3 es capaz de polimerizar hidroxialcanoatos de cadena media. Su amplia afinidad le da una gran capacidad para polimerizar PHAs_{cm} y obtener biopolímeros de baja cristalinidad y mayor capacidad elástica que los PHAs_{cc}. Este tipo de biopolímeros son más atractivos comercialmente debido a una mayor tenacidad y baja cristalinidad lo que les permite una mayor vida útil sin llegar a ser frágiles. Sin embargo, el rendimiento porcentual de PHAs obtenido es de bajo rendimiento (60% aproximadamente), comparado con el obtenido con bacterias como *C.*

necator que tiene la capacidad de acumular hasta un 90% de su peso seco. López-Cuellar *et. al.*, (2011) demostraron que *C. necator* tiene la capacidad de producir hasta 90% en peso seco de PHAs. Utilizando fructosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y durante la fase de producción de PHAs, aceite de canola como fuente de carbono. El aceite de canola es uno de los principales aceites vegetales económicos producidos a nivel mundial (INIFAP, 2010) con alto contenido de ácidos grasos de cadena largas como C:18 y C:22 que pueden ser utilizado como sustratos para la producción de biopolímeros de cadena media.

Por tanto, el objetivo de este trabajo utilizar a *C. necator* para producir PHAs_{cm} al expresar *phaC2* de *P. putida* CA-3, con el fin de obtener unidades monoméricas de cadena media utilizando una fuente de carbono económica como aceite de canola, que proporciona una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados. Con lo anterior, se podrá hacer una comparación de la producción de PHA de la cepa silvestre con una cepa transformada, así como determinar las velocidades de consumo de sustrato y finalmente como afecta la composición de los PHAs que se obtengan.

2. HIPÓTESIS

1. La transformación de *C. necator* con el gen *phaC2* de *P. putida CA-3* dará una célula viable capaz de sintetizar PHAs de cadena media a mayor velocidad y con mayor proporción de unidades monoméricas de cadena media.
2. El consumo de aceite de canola para producir PHAs de cadena media será mayor para la cepa transformada que en la cepa silvestre.
3. El consumo de sustratos ricos en ácidos grasos afectará las propiedades térmicas y químicas del PHAs que se obtenga.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Expresar el gen *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 en *Cupriavidus necator* para generar polihidroxialcanoatos de cadena media.

3.2. Objetivos particulares

1. Diseñar el gen *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 de acuerdo al uso de codones de *C. necator*
2. Clonar el gen *phaC2* dentro de *E. coli* Top 10.
3. Transformar genéticamente a las cepas de *C. necator* y *C. necator* PHB⁻⁴ (DSM 541) con el gen *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3.
4. Producir PHAs de cadena media con la cepa transformada y silvestre para comparar las cinéticas de producción de los polímeros.
5. Determinar las unidades monoméricas obtenidas en la cepa transformada y la cepa silvestre.
6. Evaluar las características termo-químicas del PHA producido, mediante técnicas químicas (RMN, FT-IR) y térmicas (DSC).
7. Evaluar a nivel biorreactor la cinética de producción de PHAs de *C. necator* – pMRC03 y su cepa silvestre.

4. Aspectos generales

Para facilitar la lectura del documento, éste se dividió en tres secciones

1. Clonación y Expresión de *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 en *C. necator*
2. Producción de PHA_{cm} a partir de aceite de canola por *C. necator-pMRC03* y DSM PHB⁻⁴-pMRC03.
 - 2.1 Producción a nivel matraz
 - 2.2 Producción a nivel biorreactor.
3. Caracterización termoquímica de los PHAs obtenidos

CAPÍTULO 2

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Clonación y expresión de *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 en *C. necator*.

Las manipulación por ingeniería genética de *C. necator* para producir PHAs de cadena media es descrito en esta sección.

El gen *phaC2* fue diseñado sintéticamente de acuerdo al uso de codones reportado para la bacteria hospedera. pBTB-3 es un plásmido de la familia pRanger, los cuales presentan gran estabilidad en bacterias Gram negativas en ausencia de antibiótico, utilizando un replicón de pBBR1 aislado de *Bordetella bronchiseptica*. De acuerdo a la habilidad que tienen para mantenerse dentro de un hospero, pBTB-3 fue utilizado como plásmido para la replicación y expresión del gen *phaC2* en *C. necator*.

5.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas y plásmidos que se utilizaron se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepas y plásmidos	Características Relevantes	Referencia
Bacterias		
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrrhsdRMSmcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1λ-</i>	Invitrogen
<i>Cupriavidus necator</i>	ATCC 17699	ATCC17699
<i>C. necator</i> PHB ⁻⁴	Mutante negativa H16 de PHA	DSM 541
Plásmidos		
pRC001	Derivado de pUC57; gen <i>phaC2</i> de <i>Pseudomonas putida</i> CA-3, Am ^R	GenSript
pBTB-3	Origen de replicación pBBR1, promotor pBAD, promotor CAT, Cm ^R , <i>tonB</i> ter .	Lynch and Gill, 2006
pK18	Origen de replicación ColE1, Km ^R .	Pridmore, 1987
PMRC01	Origen de replicación pBBR1, pBTB3 derivado Cm ^R	Presente trabajo
PMRC02	Origen de replicación pBBR1, derivado de PMRC01, Cm ^R	Presente trabajo
PMRC03	Origen de replicación pBBR1, derivado de PMRC02, Cm ^R	Presente trabajo

5.1.2 Antibióticos usados

Los antibióticos empleados (Sigma y/o grado farmacéutico) fueron preparados de acuerdo a Sambrok y Rusell (2001). Fueron esterilizados con filtros de 0.22 μm de diámetro de poro y mantenidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las concentraciones se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Lista de antibióticos empleados y concentraciones utilizadas.

Antibiótico	Solución stock (mg ml^{-1})	Concentración final ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Marca
Ampicilina	100 (en H_2O bidestilada)	100	Geopen, Pfizer
Kanamicina	50 (en H_2O bidestilada)	50	Kantrex, Bristol
Cloranfenicol	25 (en etanol)	25	Sigma

5.1.3 Condiciones de conservación de microorganismos

Las cepas bacterianas fueron crioconservadas en glicerol como describen Sambrok y Rusell (2001). Fueron distribuidas en alícuotas de 1 ml para ser almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El medio de cultivo utilizado para conservación fue LB (Luria Bertani),

Tabla 6. Composición del medio LB

Reactivo	Concentración (g l^{-1})
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10

5.1.4 Preparación, purificación de plásmidos y análisis de DNA.

Los plásmidos fueron purificados siguiendo la técnica de Birnboim y Doli (Sambrok y Rusell, 2001) con modificaciones y adaptaciones (Ver apéndice 2). Los plásmidos fueron almacenados a -20°C. Endonucleasas de restricción, fragmento Klenow y DNA ligasa de T4, se obtuvieron de New England Biolabs (EE.UU.) y se utilizaron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

La concentración de DNA y las restricciones realizadas se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % utilizando regulador TAE (Sambrok y Rusell, 2001); el voltaje usado dependió del tiempo de electroforesis, del tamaño del gel y de la cámara de electroforesis empleada. El regulador de carga de DNA se preparó con naranja G (ver apéndice 2). El marcador de referencia fue DNA del bacteriófago λ digerido con *StyI* (Ver apéndice 2). Para la observación y toma de fotografía de geles de electroforesis analítica, se utilizó una tinción con bromuro de etidio (Sambrok y Rusell, 2001).

5.1.5 Diseño de secuencia del *phaC2*

La secuencia de *phaC2* de *P. putida* CA-3 fue obtenida de la base de datos de NCBI (código de referencia AY714618). La frecuencia del uso de codones de *C. necator* se obtuvo de la base de datos; Codon Usage Database. La secuencia de aminoácidos *phaC2*

de *P. putida* CA-3 se utilizó para diseñar el gen a introducir a *C. necator* de acuerdo al uso de codones reportado. La secuencia de *phaC2* diseñada para *C. necator* y la reportada para *P. putida* CA-3 fueron alineadas a través del programa ClustalW 2.0.8. para comprobar que la secuencia del gen era la deseada.

5.1.6 Construcciones plasmídicas

Plásmido PRC001: La banda del gen *phaC2* de *P. putida* CA-3 1689 pb fue sintetizada por GenScrip Corporación y se inserta en el plásmido pUC57 entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII. El plásmido pBTB-3 (Lynch and Gill, 2006) de 3586 pb (GenBank DQ058731) con la resistencia a cloranfenicol se utilizó para obtener pMRC01.

Plásmido pMRC01: pBTB-3 fue digerido con BamHI para eliminar un fragmento que contiene *araC* y pBAD y se rellenó con enzima Klenow. Plásmido pMRC02: El fragmento EcoRI-HindIII 1689-pb de pRC001 estaba embotado y sub-clonado en el sitio rellenado BamHI del plásmido pMRC01. Una vez obtenida la construcción, *E. coli* Top 10 fue transformada con el plásmido pMRC02 (Ver apéndice 2).

El plásmido pK18 (Pridmore, 1987) presenta resistencia a kanamicina, por lo tanto este plásmido fue fusionado con la construcción pMRC02 con el objetivo de tener dos casetes de selección en la construcción final. La construcción final fue nombrada pMRC03 con resistencia a cloranfenicol y kanamicina. En la Figura 5 se resume la metodología y las enzimas de restricción utilizadas para la construcción pMRC03.

La construcción pMRC03 fue insertada en *C. necator* mediante electroporación según Sambrok y Rusell (2001) (Ver apéndice 2). Varias condiciones de electroporación fueron evaluadas hasta obtener la mayor eficiencia.

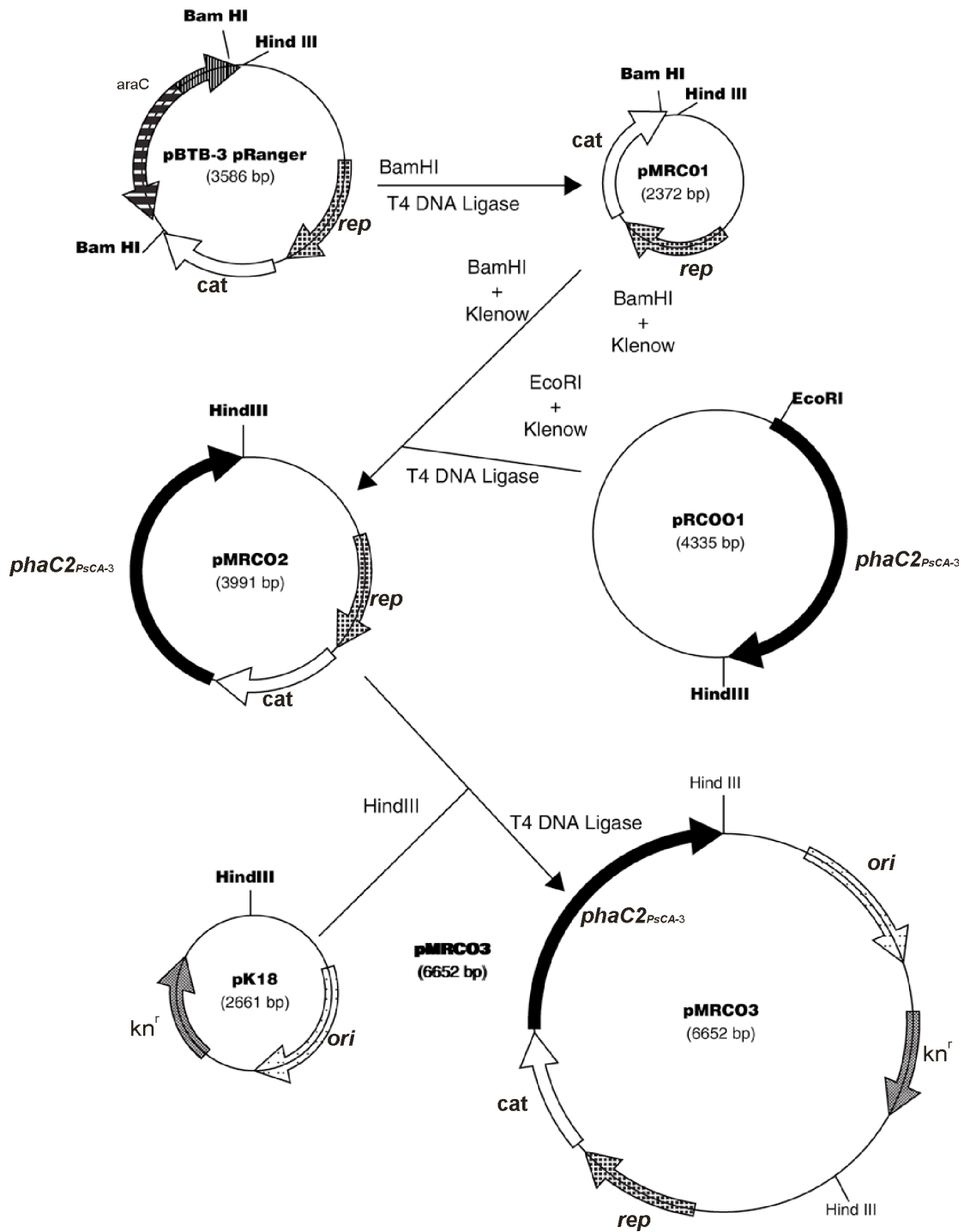


Figura 5. Esquema de la construcción del plásmido pMRC03.

5.2 Producción de PHA_{cm} a partir de aceite de canola por *C. necator*-*pMRC03* y PHB⁻⁴ -*pMRC03*.

a) Producción de Polihidroxicanoatos a nivel matraz

Cupriavidus necator es una cepa resistente con una gran capacidad para producir altas concentraciones de biomasa y un alto porcentaje de PHAs_{cc} en peso seco, pero con bajas aplicación industriales debido a que se trata de los PHA menos elastoméricos (Lee *et al.*, 2008). En esta sección, el gen sintético *phaC2* ha sido optimizado para *C. necator* y la cepa PHB⁻⁴. Ambas cepas fueron cultivadas en paralelo para demostrar el correcto funcionamiento del gen insertado. Los experimentos fueron llevados a nivel matraz para evaluar las diferencias cinéticas de crecimiento y producción de PHAs, utilizando aceite de canola como materia prima renovable de bajo costo, como fuente de carbono.

5.2.1 Etapas de producción nivel matraz

Se realizaron fermentaciones a nivel matraz. *C. necator*, *C. necator*-pMRC03 y *C. necator* PHB⁴ se cultivaron en 50 ml de medio NR. Kanamicina y cloranfenicol fueron adicionados cuando fue necesario Las cepas fueron crecidas a 30 °C, 200 rpm por 30 h.

Los experimentos se llevaron a cabo en dos etapas:

Primera etapa: Después de 24 h, 2.5 ml del precultivo celular fue lavado para ser transferido asépticamente a 50 ml de un medio de mineral de producción de PHA.

Segunda etapa: Después de 18 h 0.5% v/v de aceite de canola se agregó cuando la fructosa fue consumida.

5.2.2 Medios de cultivo utilizados.

Tabla 7. Composición del medio NR (Nutrient Broth)

Reactivo	masa por litro de agua
Peptona de carne	5
NaCl	5
Extracto de carne	1.5
Extracto de Levadura	1.5
pH	7

Tabla 8. Composición del Medio mineral para 1 litro de agua

Reactivo	masa por litro de agua
Fructosa	10 g
NH ₄ SO ₄	3.14 g
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	5.66 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20 mg
Solución de microelementos	de 1 mL

Solución de microelementos (g l⁻¹): 0.3 H₃BO₃, 0.2 CoCl₂·6H₂O, 0.1 ZnSO₄·7H₂O, 30 mg MnCl₂·4H₂O, 30 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 20 mg NiCl₂·6H₂O y 10 mg CuSO₄·5H₂O, en HCl 0.1N

Aceite de Canola

El aceite de canola fue esterilizado y conservado bajo refrigeración hasta su uso.

5.2.3 Procedimientos Analíticos

La biomasa total (X) fue determinada por peso seco. La concentración de PHA fue determinado llevando las células a ebullición en cloroformo por 10 min. Posteriormente se filtró para remover la biomasa. Este último paso fue repetido dos veces. Finalmente, el PHA fue precipitado con hexano frío y filtrado. El solvente residual fue eliminado por evaporación. La biomasa residual (X_r) metabolitamente activa es definida como la diferencia entre biomasa total menos el PHA.

La concentración de fructosa y la concentración de amonio fueron determinados por el método DNS (Miller, 1959) y Watherburn (1967) respectivamente. La acumulación de gránulos de PHA en células bacterianas se comprobó mediante tinción con rojo Nilo. La fluorescencia del rojo del Nilo fue inducida con luz láser de 488 nm y las emisiones fueron medidas en el rango de 580-620 nm (Ver apéndice 2) (Yang *et al.*, 2003), usando como referencia polihidroxibutirato obtenido de Sigma Aldrich (EE.UU.). La fluorescencia se determinó con un fluorómetro Turner Designs, modelo 10-AU (Sunnyvale, CA, EE.UU.).

b) Producción de Polihidroxialcanoatos a nivel biorreactor.

En la constante búsqueda de mejorar sistemas de producción PHAs, en este trabajo se diseñó una cepa (*C. necator*-pMRC03) capaz de producir eficientemente tetrapolímeros con unidades monoméricas de cadena corta (cc) y unidades monoméricas de cadena media utilizando una sintasa *phaC2_{Ps CA-3}* a partir de una fuente de carbono renovable.

C. necator -pMRC03 al igual que su cepa silvestre fueron probadas a nivel matraz. El escalamiento a nivel biorreactor permitió determinar cómo afecta la expresión de pMRC03 en *C. necator* silvestre, monitoreando los parámetros cinéticos de la fermentación.

Con lo anterior, se podrá realizar una comparación de la producción de PHA de la cepa silvestre con una cepa transformada, así como de las velocidades de consumo de sustrato.

5.2.4 Medio utilizado para producción a nivel biorreactor.

Tabla 9. Composición del Medio mineral para biorreactor (g l^{-1})

Reactivo	masa por litro de agua
Fructosa	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.07
Na_2HPO_4	4.5
KH_2PO_4	1.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20mg
Solución de microelementos	1 ml

5.2.5 Etapas de producción a nivel biorreactor

C. necator y *C. necator*-pMRC03 se cultivaron en 600 ml de medio con mineral. *C. necator*-pMRC03 fue crecida con kanamicina 50 mg ml^{-1} y cloranfenicol 25 mg ml^{-1} en el medio.

Los experimentos se llevaron a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 14 l (BIOFLO 15000,NBS) con un volumen inicial de trabajo de 6 l. El reactor fue equipado

con sondas de temperatura, pH y oxígeno disuelto. La concentración de O₂ y CO₂ a la salida fueron analizados por un analizador de gas (EX-2000 Off-Gas Analyzer, NBS).

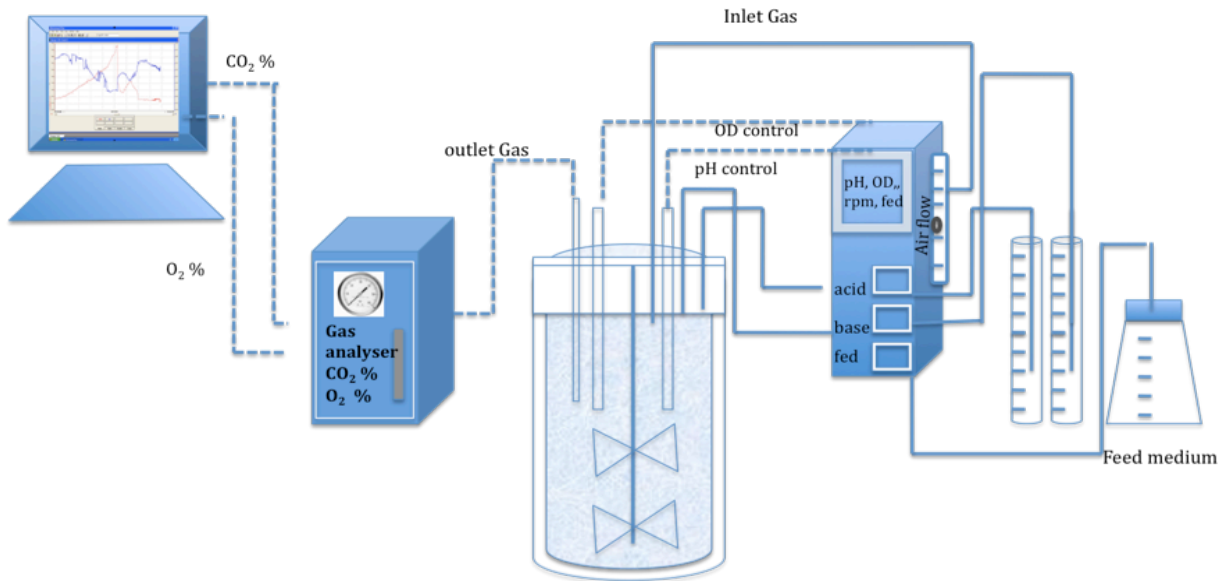


Figura 6. Configuración del sistema de fermentación utilizado

Para todas las fermentaciones la temperatura se controló a 30 °C, mientras que el pH se ajustó a 7 usando soluciones 0.47 M H₃PO₄ y 2 M NaOH. El flujo de aire fue mantenido en 1 vvm, mientras que el oxígeno disuelto se mantuvo en un mínimo de 40% variando la agitación de 300 a 550 rpm.

La bacteria fue crecida previamente en medio mineral por 20 h, para inocular el reactor a 10% v/v.

Las fermentaciones fueron realizadas en tres etapas:

Etapa 1 : Producción de biomasa en cultivo por lote, a una C/N = 7, con un volumen de 6 l.

Etapa 2: Producción de biomasa por lote alimentado con solución de fructosa concentrada. La solución de alimentación contenía por litro de agua: 194 g de Fructosa, 60 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 11.6 g de KH_2PO_4 . C/N =7. El flujo de alimentación inicial fue 6.2 g h^{-1} , hasta llegar a un flujo máximo de 15 g h^{-1} de acuerdo a los requerimientos de fructosa durante la alimentación.

Etapa 3: Producción de PHAs alimentando aceite de canola como fuente de carbono, en limitación de nitrógeno.

5.2.6 Procedimientos Analíticos

La concentración de biomasa total (X), biomasa residual (X_r), PHA, concentración de fructosa y amonio fueron determinadas como se describió en la sección anterior. (Sección 2.1).

La acumulación de gránulos de PHA en células bacterianas observadas por microscopía confocal a 460 nm es determinada por tinción Rojo Nilo. La fluorescencia del Red del Nilo se provoca con luz láser de 488 nm y las emisiones en el intervalo de 580-620 nm se midieron (Aneja *et al.*, 2009). Se usó como referencia PHB de Sigma, Aldrich.

La concentración de lípidos en el medio se determinó de acuerdo a Budde *et. al.* (2011) con la ecuación 1. Diez ml de medio de cultivo fueron centrifugados a 7200 x g por 10 min en un tubo Falcon de 15 ml. El sobrenadante se transfirió a un tubo falcon de 50 ml. El sedimento fue centrifugado de nuevo con 5 ml de agua para recuperar el aceite asociado con el sedimento celular. Este sobrenadante se combinó luego con el sobrenadante de la centrifugación anterior (15 ml en total). Veinte mililitros de una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo y metanol se añadieron al tubo, y la muestra se sometió a agitación en Vórtex durante 1 min. La muestra se centrifugó y se transfirieron 5 ml de la fase orgánica a un tubo de ensayo previamente pesado. El disolvente se eliminó mediante evaporación. Después del secado, las muestras se pesaron para determinar la masa de lípidos recuperados.

$$\text{Concentración de Lípidos} = \text{Masa_recuperada} \left(\frac{V_{\text{organico}}}{V_{\text{transferido}}} \right) \left(\frac{1}{V_{\text{muestra}}} \right) \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde

$V_{\text{orgánico}}$: 13 ml

$V_{\text{transferido}}$: 5 ml

V_{muestra} : 10 ml

5.3 Caracterización de Polihidroxicanoatos

5.3.1 Determinación de unidades monoméricas por cromatografía de gases

El contenido de unidades monoméricas en el PHA producido fue determinado en biomasa seca por cromatografía de gases (CG), previa propanólisis en presencia de ácido sulfúrico al 15 % a 105 °C durante 4 h (Ver apéndice 2). El estándar de ácidos hidroxialcanoicos se obtuvo de Sigma Aldrich (EE.UU.) y el ácido benzoico se utilizó como estándar interno. Las unidades monoméricas se determinaron con un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 6890N, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una columna AT-WAX capilar (25 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,2 micras de espesor) (Alltech, Deerfield, IL, EE.UU.). El flujo de los gases acarreadores fue: helio 25 ml min⁻¹, el hidrógeno 40 ml min⁻¹ y el aire de 250 ml min⁻¹.

5.3.2. Caracterización Termoquímica.

El biopolímero bacteriano que se utiliza como referencia fue Poli(β -hidroxibutirato) [PHB,] (Goodfellow Cambridge Limited).

5.3.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los estudios se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo DSC823). Con el objetivo de borrar la historia térmica, las muestras (*ca.*4 mg .) fueron enfriadas a -20 °C para después ser calentadas a 180°C. Posteriormente se enfriaron rápidamente hasta -20 °C manteniéndose 5 min a esta temperatura, para después efectuar el análisis térmico calentando lentamente hasta 180°C. La rampa de calentamiento usada fue de 5 °C min⁻¹.

El porcentaje de cristalinidad se estimó a partir de las entalpías de fusión determinadas en el calorímetro. Las entalpías de fusión son utilizadas en la Ecuación 2 (Nojima *et al.*, 2005), tomando como base la entalpía de fusión del polímero 100% cristalino, suponiendo una entalpía de 146 J/g para PHB (Gunaratne *et al.*, 2004).

$$X_p = \frac{\Delta H_m}{W_p \times \Delta H_m^\circ} \times 100\% \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Donde:

X_p = cristalinidad del polímero(%).

ΔH_m = entalpía de fusión del polímero (J/g).

W_p =proporción del polímero en caso que se trate de una mezcla polimérica.

ΔH_m° = entalpía de fusión del polímero 100% cristalino.

5.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los estudios de Resonancia magnética nuclear se realizaron con un equipo Bruker (DM X 500 MHz) empleando cloroformo deuterado como disolvente. Se obtuvieron espectros a 500 y 125 MHz de ^{13}C y ^1H , respectivamente. Los espectros correspondientes a ^1H fueron analizados con el programa Spinwoks versión 2.5.5.

CAPÍTULO 3

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Clonación y Expresión de *phaC2* de *Pseudomonas putida* CA-3 en *C. necator*

6.1.1 Diseño de secuencia del gen *phaC2*

Un gen *phaC2* sintético fue diseñado en base al gen *phaC2* de *P. putida* CA-3 reportado en la base de datos NCBI (AY714618) y la frecuencia de codones reportada en codon data base usage para *C. necator* (Fig. 7).

```

M T E K P G K G S T T L P A T R M N V Q N A I L G L R G R D L L S T L R N V G R
[1] ATGACAGAAAAACGGGCAAAGGATCGACAACGCTCCCCGCCACCCGATGAACGTGCAGAACGCCATCTCGGCCCTGCGCGCCGCGACCTGCTTCCACGCTGCGCAACCTGGCCCG 120
[2] ATGACCGAAGCCGGGCAAGGGCAGCACCACTCTGCCGGCCACGCGCATGAACGTGCAGAACGCCATCTCGGCCCTGCGCGCCGCGACCTGCTGAGCACCTGCGCAACCTGGCCCG 120

H G L R H P L H T A H H L L A L G G Q L G R V M L G D T P Y Q P N P R D A R F S
[1] CACGGCTGCGCCACCCGCTGCATACCGCGCATCATCTGCTGGCGCTTGGCGGGCAGTGGGGCGGGTGTGCTGGGGGACACGCCCTACCAGCCAAACCCGCTGACGCACGCTTCACT 240
[2] CACGGCTGCGCCACCCGCTGCACACCGCCACCACTGCTGGCCCTCGGGCCAGTGGGGCGGGTGTGCTGGGGGACACGCCCTACCAGCCAAACCCGCGGACGCCCGCTTCACT 240

D P T W S Q N P F Y R R G L Q A Y L A W Q K Q T R Q W I D E S H L N D D D R A R
[1] GACCCGACCTGGAGCCAGAACCCTTCTACCGCCGCGCCCTGCAGGCCTACCTGGCCCTGCAGAACGACACGCCAGTGGATCGATGAAAGCCACTTGAACGACGATGATCGAGCCCGC 360
[2] GACCCGACCTGGAGCCAGAACCCTTCTACCGCCGCGCCCTGCAGGCCTACCTGGCCCTGCAGAACGACACGCCAGTGGATCGAGAGGCCACTTGAACGACGACGACGCCCGCCCG 360

A H F L F N L I N D A L A P S N S L L N P L A V K E L F N T G G Q S L V R G V A
[1] GCCCACTTCTTCAACCTGATCAACGATGCGCTGGCGCCGCAACTCGCTCAATCCGCTGGCCGTCAGGAGCTGTTCAACACCCGCGCCAGAGCTGGTACGCGCCGCTGGCC 480
[2] GCCCACTTCTTCAACCTGATCAACGATGCGCTGGCGCCGCAACTCGCTCAATCCGCTGGCCGTCAGGAGCTGTTCAACACCCGCGCCAGAGCTGGTGGCGCCGCTGGCC 480

H L L D D L R H N D G L P R Q V D E R A F E V G V N L A A T P G A V V F R N E L
[1] CACCTGCTCGACGACCTGCGTCACAACGATGGCTGCCGCTCAGGTGGACGAGCGCGCCTTCGAAGTGGCGCTTAACCTGGCCGCAACCCCTGGCCGAGTGGTATTTGCAACGAGCTG 600
[2] CACCTGCTCGACGACCTGCGTCACAACGATGGCTGCCGCTCAGGTGGACGAGCGCGCCTTCGAAGTGGCGCTTAACCTGGCCGCAACCCCTGGCCGAGTGGTATTTGCAACGAGCTG 600

L E L I Q Y S P M S E K Q H A R P L L V V P P Q I N R F Y I F D L S A T N S F V
[1] CTAGAGCTGATCCAGTACGCGGATAAGCGAAAAGCAGCACGCGCCACTGCTGGTGGTGGCGCCCTCAGATCAACCCGCTTCTACATCTTCGACCTCAGCGCGCAACAGCTTCTGCT 720
[2] CTGAGCTGATCCAGTACGCGGATAAGCGAAAAGCAGCACGCGCCACTGCTGGTGGTGGCGCCCTCAGATCAACCCGCTTCTACATCTTCGACCTCAGCGCGCAACAGCTTCTGCT 720

Q Y M L K S G L Q V F M V S W S N P D P R H R E W G L S S Y V Q A L E E A L N A
[1] CAGTACATGCTCAAAAAGCGGCTTCCAGGTGTTTCAATGGTCACTGGTGGAGTAAACCCGACCCGACCCGTCGAATGGGGCCTTCCAGCTATGTGCAAGCCCTGGAGGAAGCGCTAAATGCC 840
[2] CAGTACATGCTCAAAAAGCGGCTTCCAGGTGTTTCAATGGTCACTGGTGGAGTAAACCCGACCCGTCGAATGGGGCCTTCCAGCTATGTGCAAGCCCTGGAGGAAGCGCTAAATGCC 840

C R S I S G N R D P N L M G A C A G G L T M A A L Q G H L Q A K K Q L R R V R S
[1] TGCCGAGTATCAGCGGCAACCCGACCCCAACTGATGGTGGCTGTGGCGCGCCCTGACCATGGCCGACTGCAAGGCCATCTGCAAGCCAAAGAACATTCGCGCGGGTACGCGAT 960
[2] TGCCGAGTATCAGCGGCAACCCGACCCCAACTGATGGTGGCTGTGGCGCGCCCTGACCATGGCCGACTGCAAGGCCATCTGCAAGCCAAAGAACATTCGCGCGGGTACGCGAT 960

A T Y L V S W L D R K F E S P A S L F A N E Q T I E A A K R R F Y Q R G V L D G
[1] GCCACCTATCTGGTCACTGGCTGGACAGAAAGTTCGAAAAGCCCGCCGACCTGTTCCGCAATGAGCAGACCATGAAAGCCGCAAGCCGCTTCTATCAGCGCGGCTGCTGGACGGT 1080
[2] GCCACCTATCTGGTCACTGGCTGGACAGAAAGTTCGAAAAGCCCGCCGACCTGTTCCGCAATGAGCAGACCATGAAAGCCGCAAGCCGCTTCTATCAGCGCGGCTGCTGGACGGT 1080

G E V A R I F A W M R P N D L I W N Y W V N N Y L L G K T P P A F D I L Y W N A
[1] GCGGAAGTGGCGGGATCTTCGCTGGATGCGGCCCAAGCAGCTGATCTGGAAGTACTGGGTCAACAACCTGCTCGGCAAGACGCGCGCGCTTCGACATCTTGTACTGGAATGCC 1200
[2] GCGGAAGTGGCGGGATCTTCGCTGGATGCGGCCCAAGCAGCTGATCTGGAAGTACTGGGTCAACAACCTGCTCGGCAAGACGCGCGCGCTTCGACATCTTGTACTGGAATGCC 1200

D S T R L P A A L H G D L L E F F K L N P L T Y A S G L E V C G T P I D L Q Q V
[1] GACAGACGCGCTTCCGCGCGCGCTGCATGGCAGCTGCTGGAGTTTTCAGCTCAACCCCTGACCTACCGCTCCGCGCTGGAGGTGTGCGGTACCCGATGACCTGCAGCAGGTG 1320
[2] GACAGACCCCGCTTCCGCGCGCGCTGCACGCGGACCTGCTGGAGTTTTCAGCTCAACCCCTGACCTACCGGAGCGCGCTGGAGGTGTGCGGCACCCGATGCATGTCAGCAGGTG 1320

N I D S S T V A G S N D H I T P W D A V Y R S A L L L G G E R R F V L A N S G H
[1] AATATCGACAGCTTACCGTGGCCGGCAGCAACGACCATCACGCCATGGGACGCGGTG TACCGCTCGGCCCTTGTGCTGGGTGGCGAGCGCGCTTCGCTGCTGGCCAAACGCGGCA 1440
[2] AATATCGACAGCTTACCGTGGCCGGCAGCAACGACCATCACGCCATGGGACGCGGTG TACCGCTCGGCCCTTGTGCTGGGTGGCGAGCGCGCTTCGCTGCTGGCCAAACGCGGCA 1440

I Q S I I N P P G N P K A Y Y L A N P K Q S S D P R A W F H D A K R S E G S W W
[1] ATCCAGAGCATCATCAACCCGCGAGCAACCCCAAGGCCCTACTACCTGGCAACCCCAAGCAGAGCAGCCACCGCGCTGGTTCACAGCGCCAGCGCAGTGAAGCAGCTGGTGG 1560
[2] ATCCAGAGCATCATCAACCCGCGAGCAACCCCAAGGCCCTACTACCTGGCAACCCCAAGCAGAGCAGCCACCGCGCGCTGGTTCACAGCGCCAAAGCGCAGCGAAGCAGCTGGTGG 1560

P L W L G W I T A R S G L L K A P R T E L G N A T Y P P L G P A P G T Y V L T R
[1] CCGTTGTGGTGGGTGGATCACCGCAGCTCCGGCTGCTCAAGGCGCGCGCAGTGAACCTGGGCAACGCCACTTACCACCGCTAGGCCCGCGCGCAGGACCTACGCTGCTGACCCGA 1680
[2] CCGCTGTGGTGGGTGGATCACCGCCGCTCGGGCTGCTGAAGGCGCGCGCAGTGGGCAACGCCACTTACCACCGCTGGGCCCGCGCGCCCGCGCCACCTACGCTGCTGACCCGC 1680

[1] TGA 1683
[2] TGA 1683

```

Figura 7. Alineación de pares de bases del gen *phaC2*, con el aminoácido correspondiente. [1]

Pseudomonas putida CA-3, [2] *C. necator*.

En la Figura 7 se puede observar una alineación de bases del gen *phaC2* perteneciente a *Pseudomonas putida* CA-3 (*phaC2*_{Ps CA-3}). *phaC2*_{Ps CA-3} fue diseñado de acuerdo al uso de codones reportado para *C. necator*. La traducción de los pares de bases y el

alineamiento para comprobar que codificará para la misma secuencia se realizó con los programas *ExpASy* y *Clustal W* respectivamente.

6.1.2 Construcción de pMRC03

La secuencia sintetizada se muestra en la Figura 8 a. A la secuencia diseñada se le agregó un sitio de unión a ribosoma GGAG (Saegusa *et al.*, 2002; Shinohe *et al.*, 1996). Esta secuencia Shine-Dalgarno fue añadida seis pares de bases río arriba del codón de inicio, lo que da un total de 1694 pb. Para conocer la orientación del fragmento de *phaC2_{Ps CA-3}* en pUC57, se realizó un mapa de restricción del fragmento, observando que la posición 902 era un sitio único de corte para Sty I (Fig. 8 b).

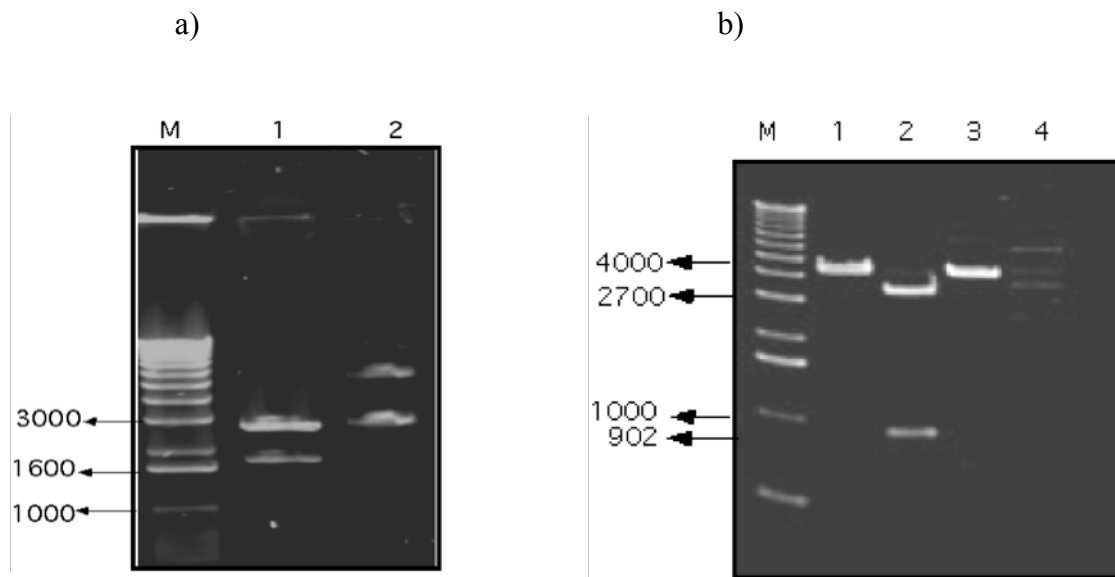


Figura 8. Restricciones del plasmido pRC001. (a) M: marcador, 1:Restricción con EcoRI y HindIII, 2.- pC001 sin digerir. (b) M: marcador, 1: Restricción con EcoRI. 2: Restricción con EcoRI y StyI, 3.- Restricción con Sty I 4: pRC001 sin digerir.

El plasmido pBTB3 fue digerido con la endonucleasa BamHI para eliminar un fragmento de 1000pb, con el fin de utilizar el promotor CAT (cloranfenicol- acetiltransferasa) de pBTB3. El fragmento del gen *phaC2_{Ps CA-3}* se insertó orientado hacia el promotor CAT (Fig. 5). Diez clonas fueron obtenidas, la restricción fue comprobada al digerir con BamHI (Fig. 9 y 10). El vector obtenido fue llamado pMRC01. El plásmido pBTB3 fue utilizado por tener un replicón de pBBR1 aislado de *Bordetella bronchiseptica* (Kanter-smoler and Sunnerhagen, 1994, Lynch and Gill, 2006). Este plásmido realiza el control de su propia replicación con un iniciador de replicación Rep A. Esta proteína funciona en la replicación como un factor positivo por la unión a las tres repeticiones directas en el origen dando comienzo a la formación de un replisoma. RepA pueden interactuar con proteínas del huésped (por ejemplo, DnaA), lo que es esencial para el comienzo de la replicación (Kanter-smoler and Sunnerhagen, 1994., Szpirer *et al.*, 2001).

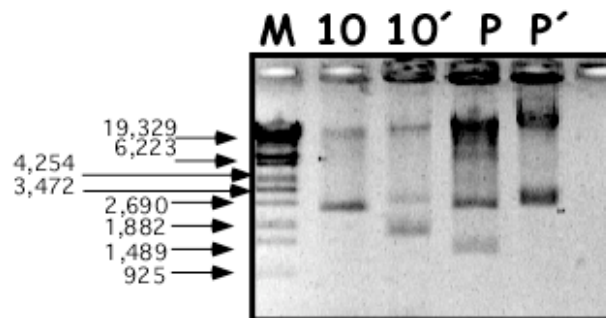


Figura 9. Construcción de pMRC01. M: λ (Sty I), 10.- clona 10 cortada con BamHI, 10'.- Clona sin cortar, P.- pBTB3 cortado con BamHI, P'.- pBTB3 sin cortar.

Para construir pMRC02 se realizó la restricción de pMRC01 con BamHI y pRC001 con EcoRI

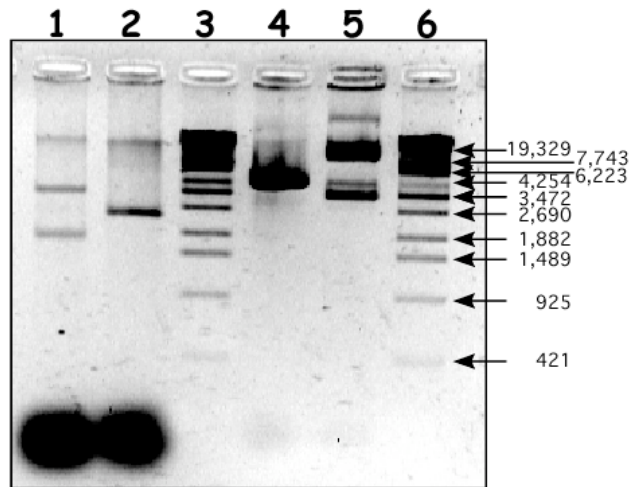


Figura 10. Restricciones de pMRC01 y pRC001. 1.- pMRC01 sin cortar, 2.- pMRC01 cortado con Bam H1, 3.- Marcador λ (Sty I), 4.- pRC001 cortado con EcoRI, 5.- pRC001 sin cortar, 6.- Marcador λ (Sty I).

El plásmido PMRC02 fue construido y comprobado mediante 3 enzimas de restricción SmaI, HindIII y Sty I. En la Figura 11 se presenta los cortes característicos de pMRC02.

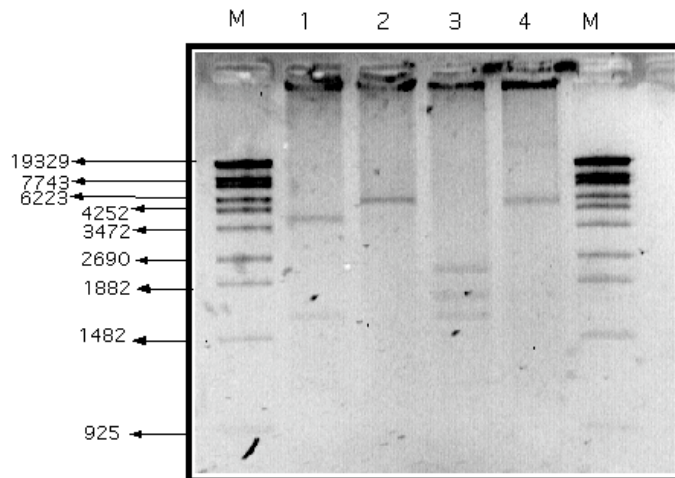


Figura 11. Comprobación de pMRC02 cortado con diferentes enzimas de restricción. M: Marcador λ sty, 1: pMRC02 (SmaI), 2: pMRC02 (HindIII), 3: pMRC02 (StyI), 4: pMRC02.

La construcción pMRC02 se probó en un control negativo para comprobar la expresión de la proteína *PhaC2*. Para esto, se seleccionó la cepa mutante para PHB DSM 541 PHB⁻ ⁴. Esta cepa es resistente a cloranfenicol, por tanto, se hizo una construcción más llamada pMRC03 con los dos casetes de resistencia (Cloranfenicol 25 mg/ml, Kanamicina 50 mg/ml).

El plásmido pMRC03 fue construido con el plásmido pK18 y la construcción pMRC02. Ambos plásmidos fueron digeridos con Hind III y posteriormente ligados. Esta ligación fue transformada dentro de *E.coli* Top 10 y se obtuvieron seis colonias candidatas a clonas en altas concentraciones de plásmido (Fig. 12).

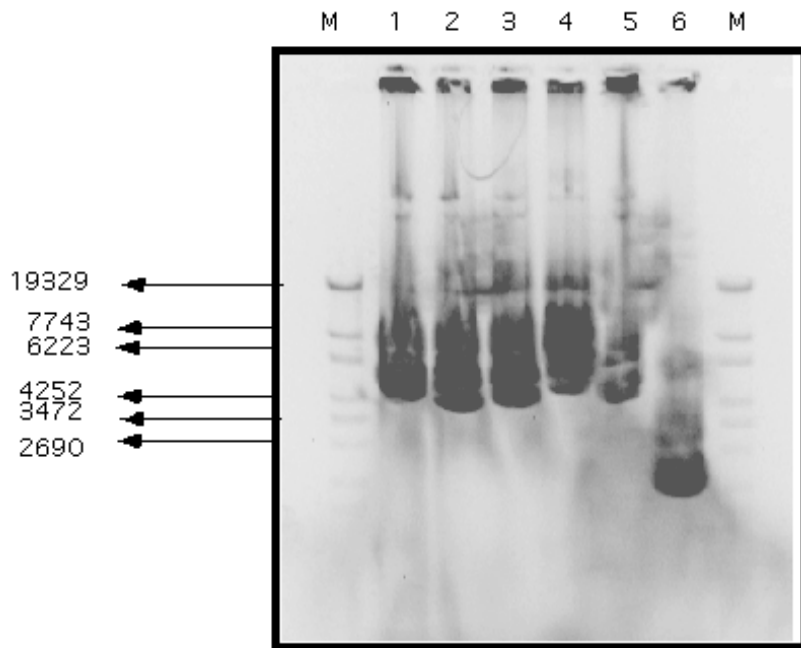


Figura 12. DNA plásmidico de las clonas candidatas a contener la construcción pMRC03

Las candidatas a clonas deseadas fueron digeridas con tres enzimas de restricción. En la Figura 13 se observa el corte de dos clonas candidatas a pMRC03. Existían dos posibilidades de orientación en la construcción obtenida (Fig.14). Por diferencia en corte con EcoRI se seleccionó la clona 1.

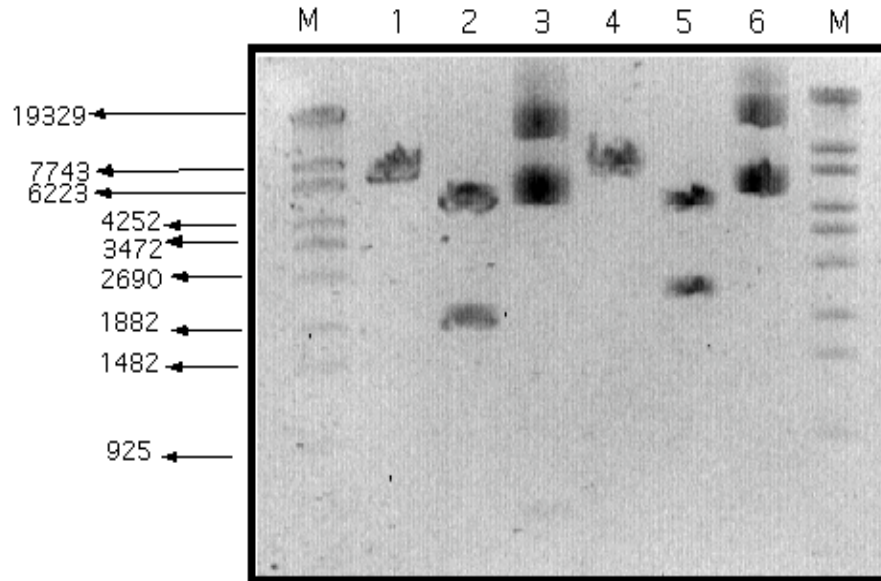


Figura 13. Restricción realizada para las clonas 1, 2. M : marcador λ styI, 1: Clona 1(BamHI), 2: Clona 1 (EcoRI), 3: Clona 1 (sin digerir), 4: Clona 2 (BamHI), 5: Clona 2 (EcoRI), 6: Clona 2 (sin digerir).

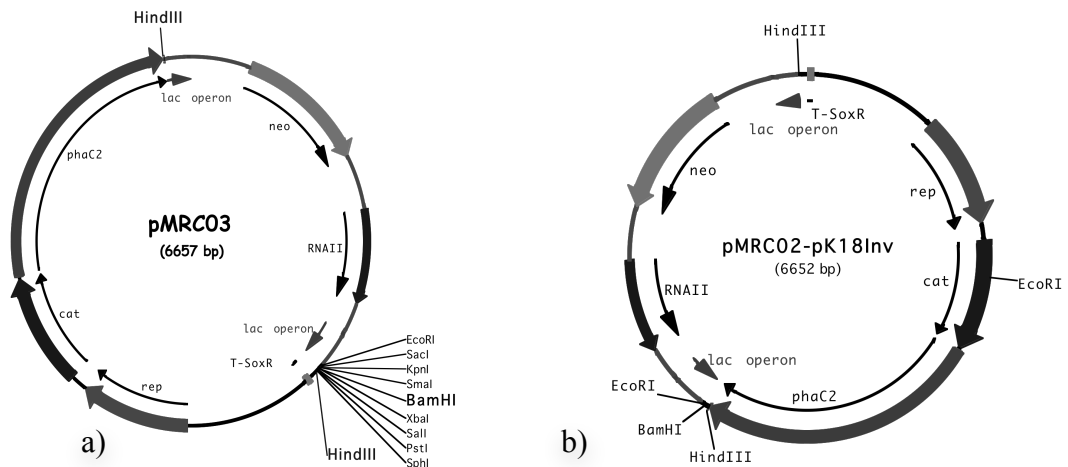


Figura 14. Orientaciones de clonas obtenidas

Para comprobar el previo funcionamiento de la construcción pMRC03, fueron tomadas micrografías de la clona 1 (*E. coli* -pMRC03) con tinción con Azul Nilo A (Fig. 15). Estas micrografías muestran diferencias en la concentración de fluorescencia de gránulos intracelulares teñidos con el colorante. A las 30 h de crecimiento celular se observa que hay más gránulos teñidos en *E. coli* transformada con pMRC03 que en la cepa silvestre (*E. coli* Top 10). *E. coli* pMRC01 es un control de plásmido sin inserto.

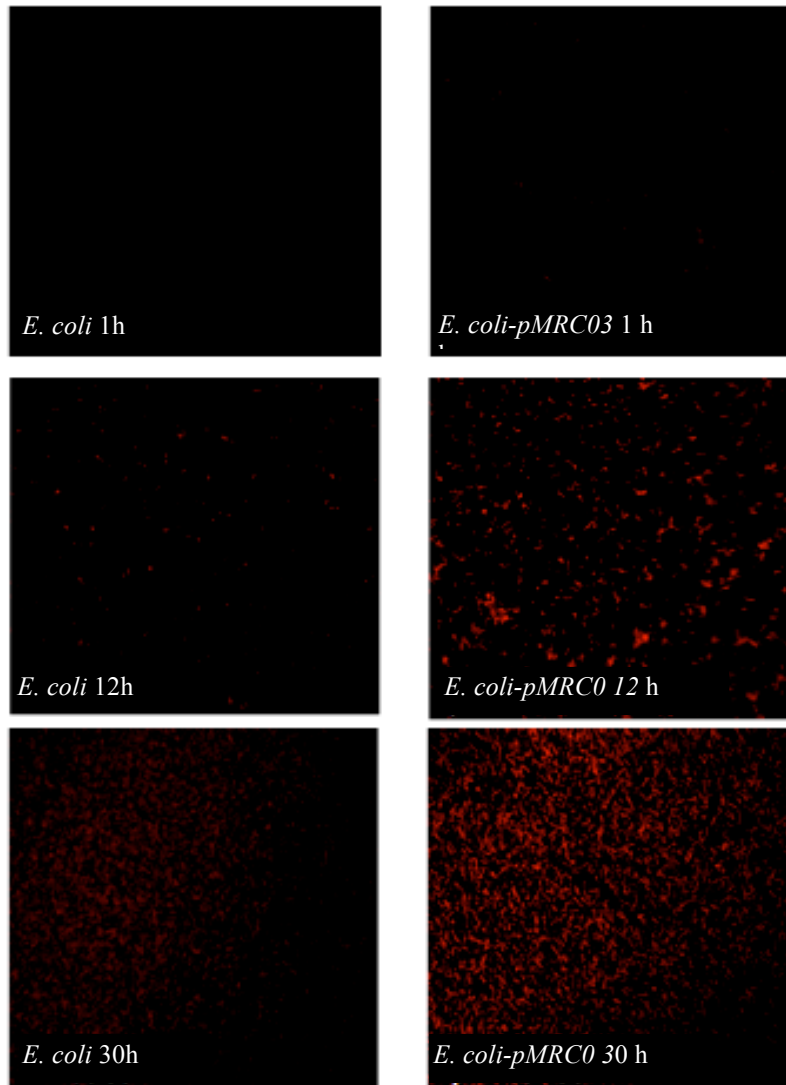


Figura 15. Micrografías de Fluorescencia en *E. coli*

Lo anterior puede indicar que la construcción pMRC03 está expresando *phaC2* utilizando al promotor CAT dentro de *E. coli*.

Posteriormente el plásmido pMRC03 fue introducido a *C. necator* por electroporación, esta cepa fue llamada *C. necator*-pMRC03. Las condiciones de electroporación usadas se muestran en la Tabla 10. Primero fueron usadas las condiciones reportadas por otros autores para *C. necator* comprobando que estas condiciones no son las adecuadas para la cepa usada en este trabajo.

Tabla 10. Comparación de condiciones de electroporación

Referencia	Capacidad electrostática (μF)	Voltaje (kV)	Resistencia (Ω)	Ms
Sato et al., 2008	25	1.5	800	---
Park et al ., 1995	25	10.5-12.5	800	5
Presente trabajo	25	1.8	200	5.6-5.8
Taghavi et al. 2004	25	2.43	200	

6.2 Producción de PHA_{cm} a partir de aceite de canola por *C.necator-pMRC03* y PHB⁴ -pMRC03.

a) Producción de Polihidroxicanoatos a nivel matraz

Con la finalidad saber si el plásmido causa algún cambio en el crecimiento de *C. necator* se realizaron cinéticas de crecimiento con la cepa transformada *C. necator-pMRC03* y la cepa silvestre.

El crecimiento y producción de PHA_{sc-cm} se llevó a cabo en dos diferentes etapas. En una primera etapa, las células fueron cultivadas en medio mineral con fructosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, durante 18 h. La segunda etapa utiliza aceite de canola como fuente de carbono para la producción PHAs. La Figura 16 muestra los perfiles de producción de PHA con la cepa silvestre y las cepas transformadas con la construcción pMRC03. En la primera etapa se obtuvo 22.6% de acumulación de PHA, mientras que la biomasa de *C. necator-pMRC03* alcanzó 4.6 g l⁻¹ de concentración de biomasa total (X) y 3.56 g l⁻¹ de biomasa residual (X_r). Esto indica que el consumo de sustrato fue para la producción de biomasa. Así, fueron consumidos 9,45 g l⁻¹ de fructosa del los 9.7 g l⁻¹ disponibles. Esto corresponde a un rendimiento de 0,31 g_{Xr} g_s⁻¹ y una velocidad de consumo de 0.52 g l⁻¹ h⁻¹. Inicialmente, la relación C/N fue de 7, se observa que la fructosa es convertida en acetyl-CoA y la mayor parte se utiliza para el metabolismo relacionados con el crecimiento. De manera similar, la cepa *C. necator* alcanzó 4,9 g l⁻¹ de biomasa con un 25% la producción de PHA y un rendimiento de 0.33 g_{Xr} g_s⁻¹.

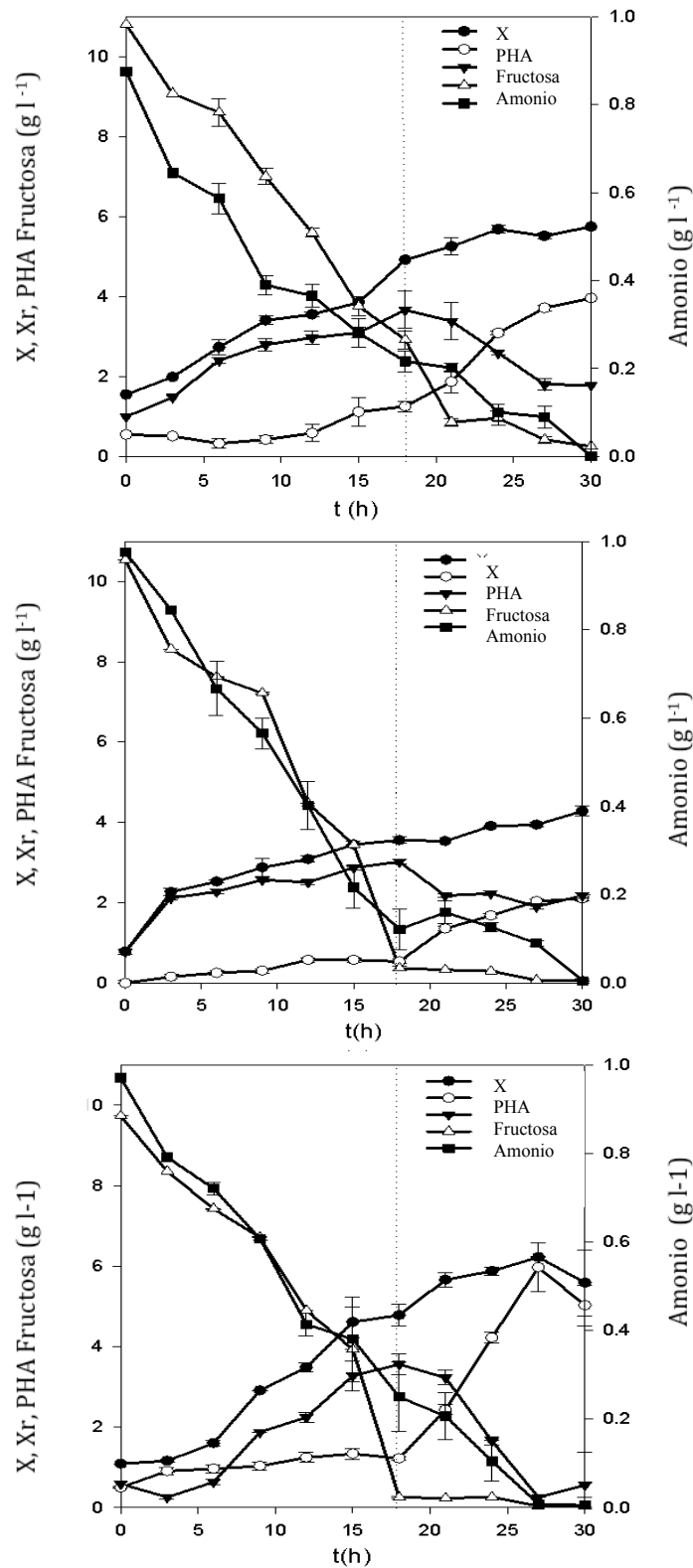


Figura 16. Perfiles de crecimiento y producción de PHAs de *C. necator*-pMRC03, PHB⁴-pMRC03 y *C. necator* (cepa silvestre).

La relación C/N del medio de cultivo juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis de PHAs durante la fermentación bacteriana (Kek *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2003). La principal actividad metabólica para crecimiento celular se logró con una baja relación C/N, observado que un aumento de C/N promovió la biosíntesis de PHAs. Después de 18 h, en la segunda etapa, 5% v/v de aceite de canola fue añadido, lo que aumentó la relación C/N a 60.

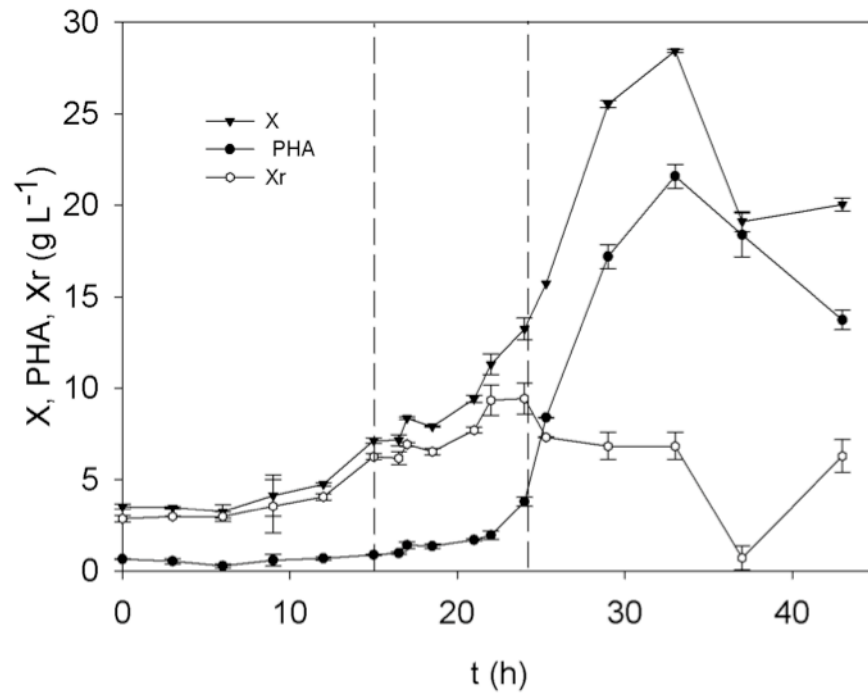
Las células comenzaron la producción de PHAs cuando la concentración de amonio osciló desde 0.25 hasta 0.005 g l⁻¹. Yan *et al.* (2003) demostraron que *C. necator* se mantiene suficientemente activa y capaz de producir PHA con 0.1 g l⁻¹ de amonio en el medio. Esta concentración de amonio es limitante para crecimiento bacteriano aunque las condiciones ideales para la producción de PHA requieren sólo una fuente de carbono disponible.

Después de la adición de aceite de canola la concentración de PHA alcanzada en PHB⁴-pMRC03 fue de 58%, mientras que *C. necator*-pMRC03 fue capaz de sintetizar de 96%, PHA.

b) Producción de Polihidroxicanoatos a nivel biorreactor

C. necator-pMRC03 fue cultivada en fermentador utilizando un sistema de producción en tres etapas. La primera etapa de fermentación fue de adaptación y crecimiento celular, la segunda etapa (lote alimentado) en el que se logra una mayor producción de biomasa total y en la tercera etapa se adicionó el aceite vegetal al medio para producir PHAs. En la siguiente figura se puede observar el perfil de producción de biomasa total (X), biomasa residual (X_r) y PHAs. La fase de producción en lote se inicia con un volumen de 6 l y una concentración de 10 g l^{-1} de fructosa, observándose una fase lag de 6 h. La concentración de biomasa total alcanzada en esta primer fase fue de 7 g l^{-1} a las 15 h de fermentación obteniendo un rendimiento $Y_{xs} = 0.48 \text{ gx gs}^{-1}$ y una velocidad de consumo promedio de fructosa fue $0.49 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que la velocidad de consumo de amonio en esta etapa fue de $0.028 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

a)



b)

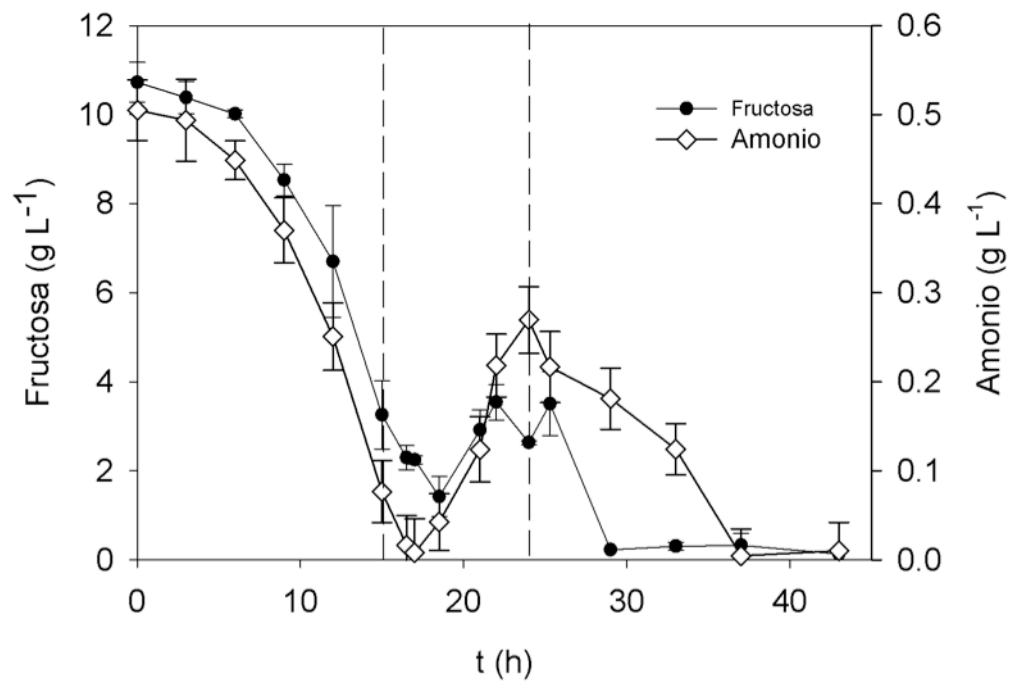


Figura 17. Perfiles de producción de PHAs con *C. necator* -pMRC03. a) Producción de X, Xr, PHA b)

Consumo de fructosa y sulfato de amonio.

En la segunda etapa la fructosa fue agregada a una concentración de 194 g l^{-1} y un flujo inicial de 31 ml h^{-1} . La concentración de fructosa mantenida en el reactor durante la alimentación fue de 2 g l^{-1} . Durante esta fase se alcanzaron concentraciones de biomasa total y biomasa residual de 13.6 y 10 g l^{-1} respectivamente con una velocidad de consumo de sustrato de $1 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$, esto indica que el sustrato alimentado fue utilizado para producción de biomasa residual con un rendimiento de $0.21 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$.

La fructosa fue consumida desde el inicio de la fermentación hasta llegar una concentración de 2 g l^{-1} , concentración que se mantuvo durante el lote alimentado. Al terminar la alimentación de fructosa el reactor se operó en lote. Al final de la alimentación, se comprobó que la fructosa alimentada en el medio había sido consumida (Fig. 17 b) antes de adicionar el aceite de canola, con el fin de comenzar la tercera etapa.

En esta tercera etapa se acumuló un 86% de PHAs de los 28 g l^{-1} de biomasa total obtenida con *C. necator*-pMRC03. Al adicionar aceite de canola, la concentración de amonio fue de 0.3 g l^{-1} , sin embargo a las 33 h de fermentación había una concentración aproximada de 0.18 g l^{-1} . Yan *et al.*, 2003 reportan que *C. necator* se mantiene suficientemente activa para producir PHAs a una concentración de 0.1 g l^{-1} de amonio. Lo que indica que la bacteria se encontró con limitaciones de nitrógeno para seguir con un metabolismo de crecimiento, pero tenía las condiciones óptimas para producir PHAs con la única fuente de carbono presente. Al tener un exceso de carbono en el medio y una baja concentración de sulfato de amonio, las condiciones se mostraron ideales para producir PHAs a partir de la fuente de carbono mencionada.

La estimación de la concentración de lípidos durante la etapa de producción de PHAs se observa en la Figura 18. De acuerdo a esta estimación, el rendimiento alcanzado a las 33 h de cultivo fue $Y_{g_{\text{PHA}}} g_{\text{aceite}}^{-1} = 0.85 g_{\text{pha}} g_{\text{aceite}}^{-1}$ y una productividad de $0.74 g l^{-1} h^{-1}$. Ha sido reportado que la utilización metabólica de ácidos grasos es lenta comparada con el uso de azúcares simples (Yu J *et al.*, 2001). Fukui T y Doi Y (1998) utilizaron *Alcaligenes eutrophus* (actualmente *C. necator*) en cultivo por lote para producir PHAs a partir de aceite de oliva, maíz y palma, obteniendo una concentración celular máxima (para aceite de oliva) de $4.3 g l^{-1}$, la máxima concentración de biopolímero fue 80% (PHB, específicamente) en peso seco. La velocidad de consumo para el aceite de oliva fue muy baja ($0.077 g l^{-1} h$) comparada con la observada en el presente trabajo. Por otra parte, Yu J *et al.*, (2002) reportan un rendimiento menor ($0.39 g_{\text{pha}} g_{\text{suatrato}}^{-1}$) al obtenido en este trabajo, al utilizar una mezcla de ácidos volátiles.

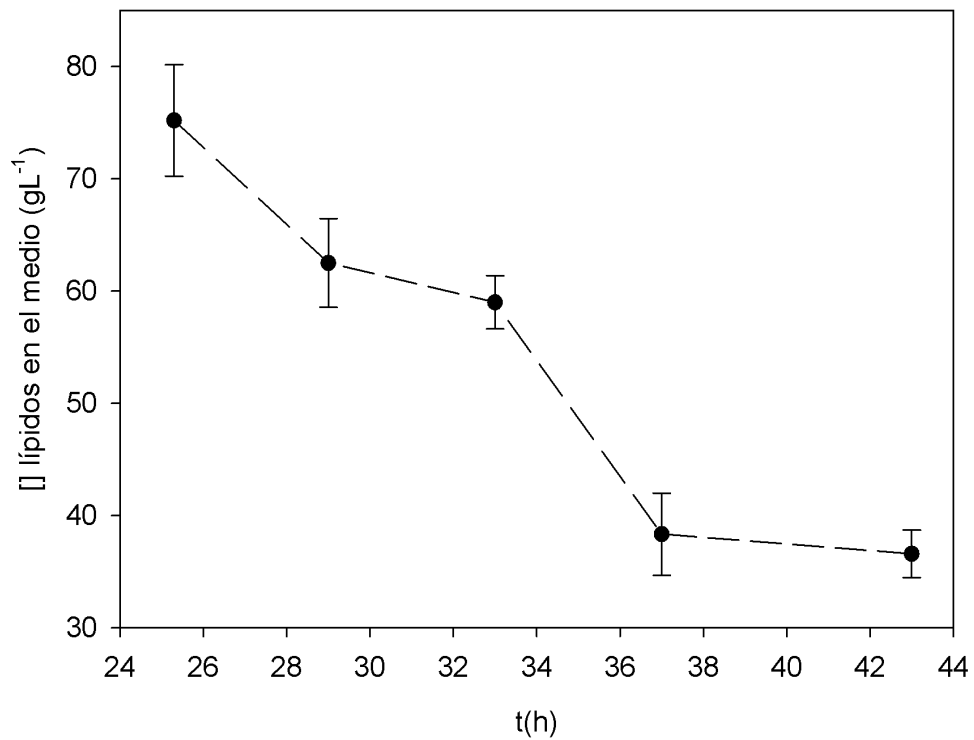


Figura 18. Concentración de lípidos en el medio durante la producción de PHA con *C. necator*-pMRC03.

La cepa silvestre *C. necator* fue crecida en las mismas condiciones que *C. necator*-pMRC03 para evaluar las diferencias cinéticas a nivel biorreactor. En la Figura 19 (a, b) se muestran los perfiles de crecimiento y consumo de sustratos de la cepa silvestre.

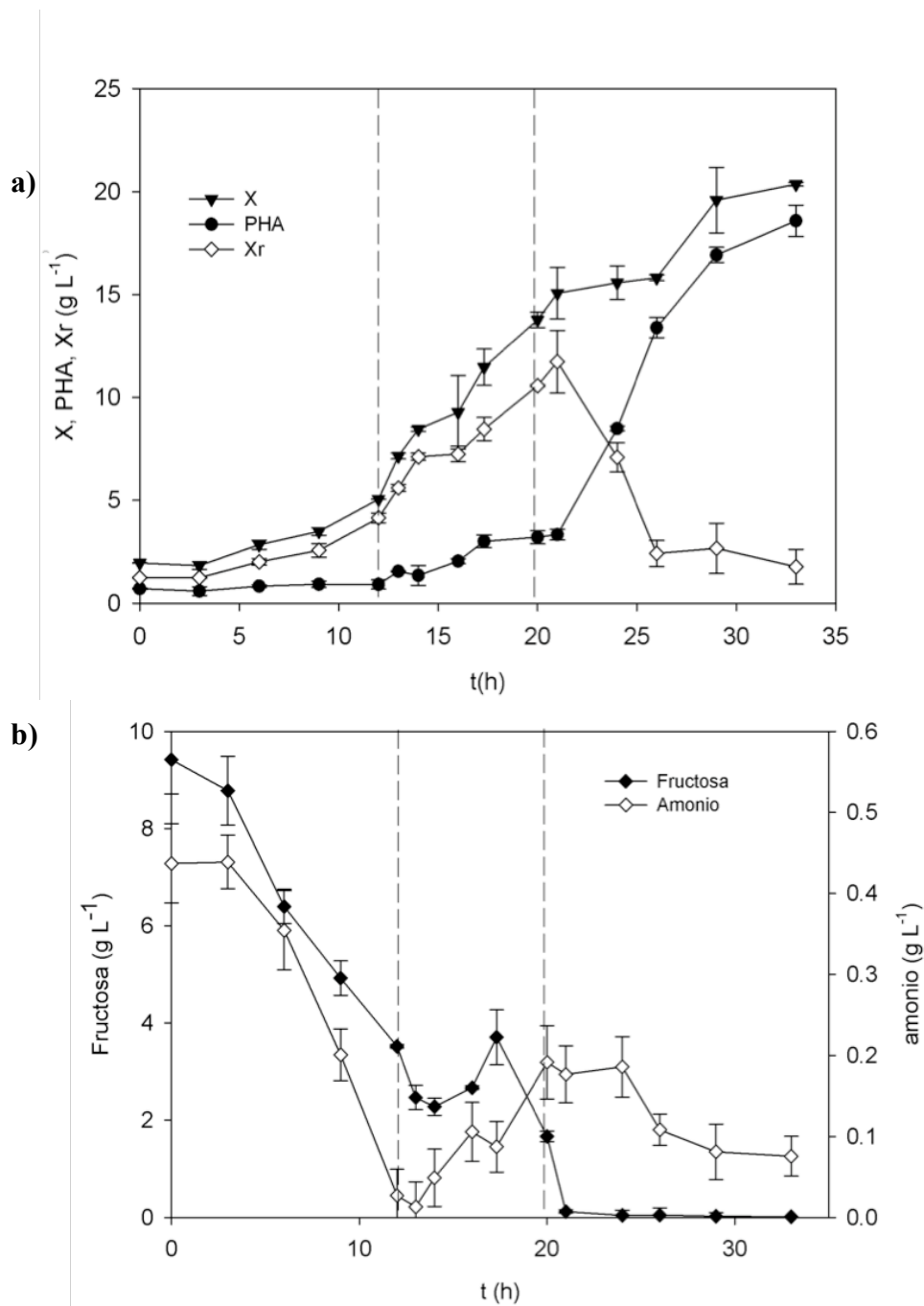


Figura 19. Perfiles de producción de PHAs con *C. necator*. a) Producción de X, Xr, PHA

b) Consumo de fructosa y sulfato de amonio.

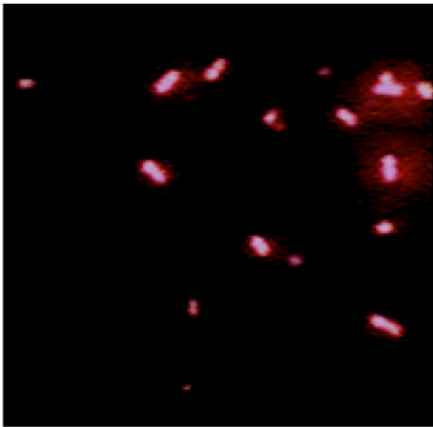
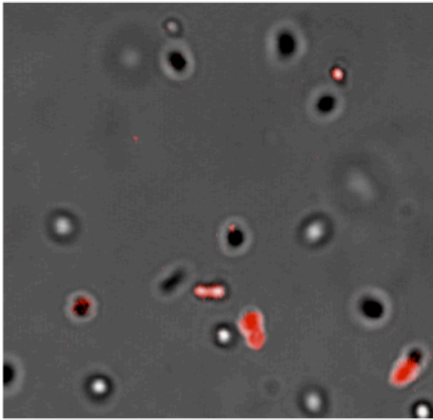
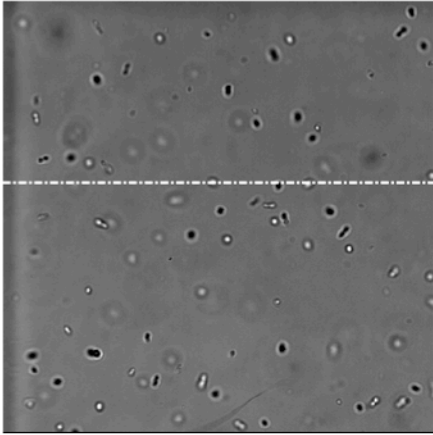
El crecimiento de *C. necator* silvestre mostró una fase lag de 3 h, a diferencia de las 6 h observadas por la cepa que expresa el gen *phaC2* como proteína recombinante dentro de

C. necator. Esto es debido a la combinación de kanamicina y cloranfenicol como antibióticos de selección de cepa y mantenimiento del plásmido pMRC03 dentro de *C. necator*.

La etapa de alimentación en *C. necator* comenzó a las 12 h de crecimiento y adaptación celular, cuando la concentración de fructosa en el medio era 3 g l^{-1} . Durante esta etapa la concentración de Xr alcanzada fue 10.5 g l^{-1} con una productividad de $0.5 \text{ g}_{\text{Xr}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Al igual que en la fermentación anterior, al final de la alimentación, se comprobó que la fructosa alimentada estaba en concentraciones limitantes (Fig. 19 b) al comenzar la tercer etapa. Al adicionar el aceite de canola la concentración de amonio fue de 0.2 g l^{-1} , sin embargo al llegar a 33 h de fermentación había una concentración menor a 0.1 g l^{-1} , esto permitió tener un exceso de carbono en el medio y una baja concentración de sulfato de amonio, logrando las condiciones ideales para producir PHAs a partir de la fuente de carbono mencionada.

Por otra parte, a través de la microscopía confocal se observaron cambios fenotípicos ocasionados en *C. necator* por la transformación bacteriana y el uso de dos antibióticos en el medio (Fig. 20). Durante la división celular, en fase lag, *C. necator* hace largos filamentos durante la división celular en condiciones normales (Fig. 20 b). Sin embargo, la cepa transformada se observó como cortos bacilos durante la misma condición.

a)



b)

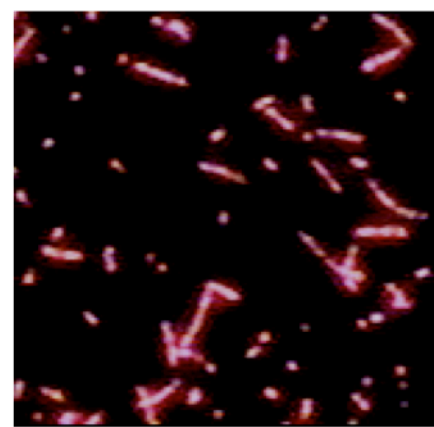
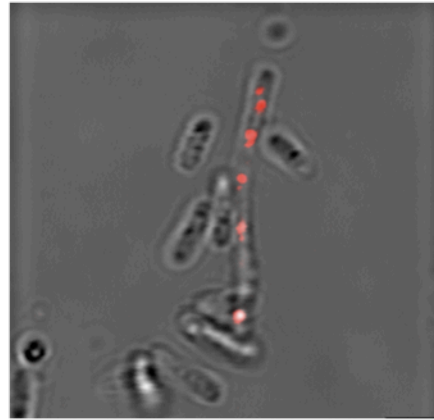
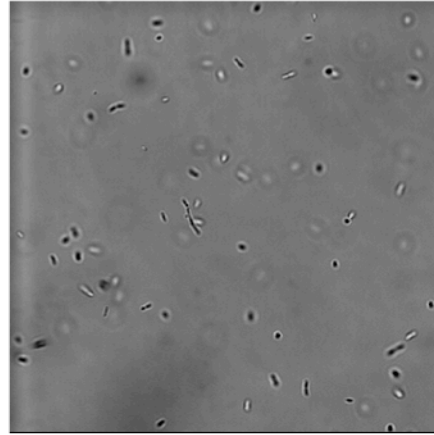


Figura 20. Fenotipo de *C. necator* observados con microscopia confocal. a) *C. necator-pMRC03*, b). *C. necator*.

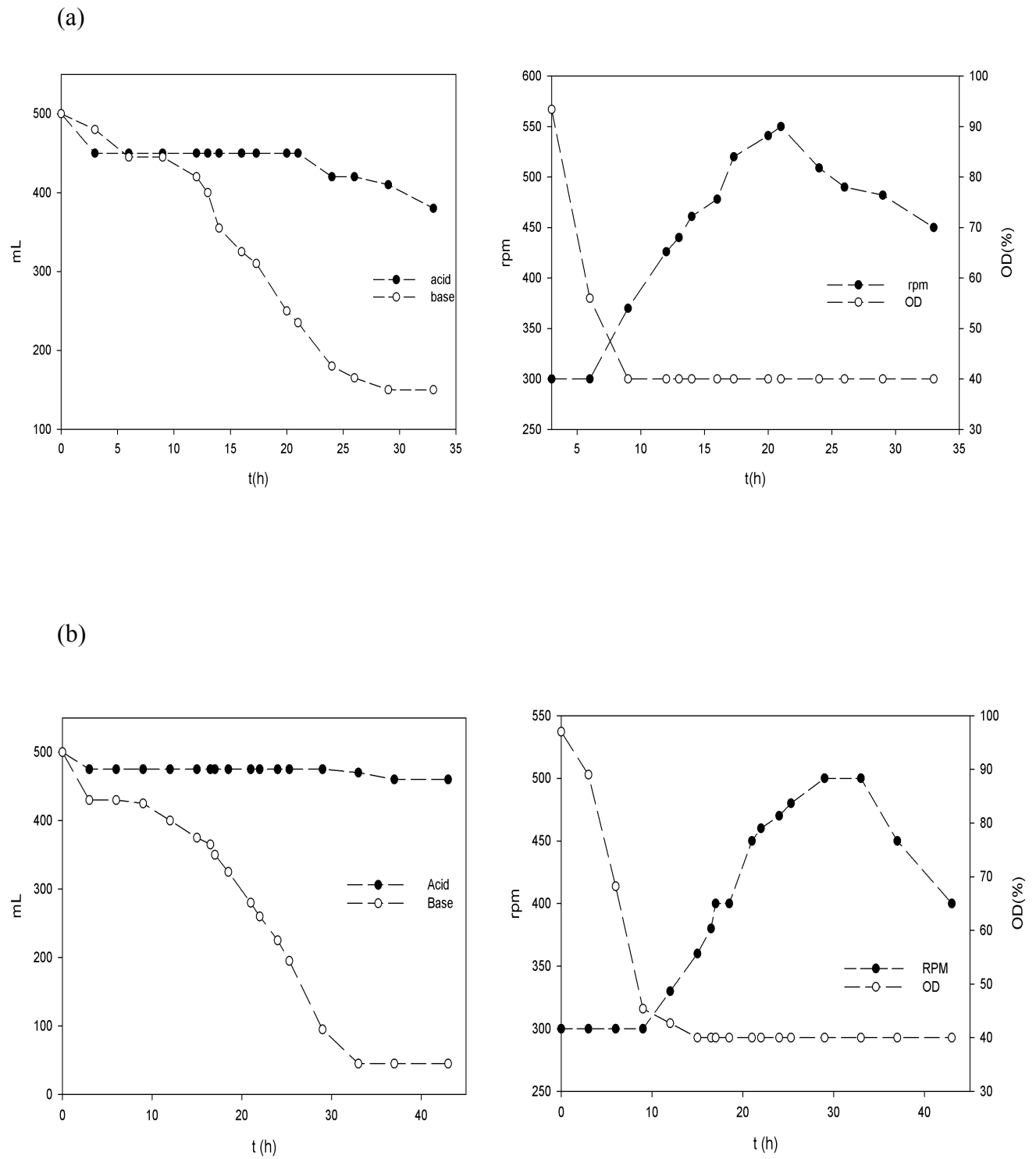


Figura 21. Perfiles de OD y consumo de ácido y base durante la fermentación de (a) *C. necator*, (b) *C. necator-pMRC03*.

Durante el crecimiento celular y producción de PHAs el pH fue mantenido a 7 y el OD en 40 %, controlado con la velocidad de agitación del reactor iniciando con 300 *rpm*. En la Figura 21 se observan los perfiles de consumo de ácido y base durante la fermentación. El pH del cultivo celular puede ser afectado por diversos factores, dos de los más importantes; la producción de biomasa metabólicamente activa y la producción y transferencia de CO₂. En el cultivo de *C. reactor* y *C. necator-pMRC03*, durante la acumulación de biomasa activa, hay una gran producción de ácidos orgánicos y protones provenientes de la disociación de los ácidos volátiles, resultado de metabolismo celular. Estos ácidos, son rápidamente difundidos desde la célula bacteriana para ser disociados y modificar la carga de protones del medio celular, lo que ocasiona una acidificación del medio con la consecuente disminución del pH. Por otra parte, la acumulación de CO₂ en la fase líquida incrementa la concentración de H⁺ a través del sistema bicarbonato-carbonato (Dias *et al.*, 2006).

Por tanto, el perfil de consumo de la base (NaOH) puede ser proporcional a la producción celular y consumo de sustrato, ya que la demanda de álcali para controlar el pH muestra que el sustrato alimentado está en relación con la base consumida. En estos experimentos el consumo de base por *C. necator-pMRC03* ocurre después de las 10 h, justo cuando se observa el término de la fase de adaptación celular. En la etapa de producción por lote, el consumo de los 10 g l⁻¹ de fructosa disponibles resulta en un mayor consumo de OD llegando a las 10 h al límite de 40% de OD prefijado en la fermentación. Durante la etapa de lote-alimentado, el perfil de NaOH consumido y el incremento de las *rpm* mantienen una correlación indicando actividad metabólica en producción de biomasa. Al

término del lote alimentado, el consumo de OD disminuye, observando una disminución en las *rpm* y el consumo de base.

Diferentes concentraciones de polímero fueron obtenidas en las fermentaciones realizadas. En las Tablas 11 y 12 se observan los diferentes rendimientos obtenidos en ambas fermentaciones. Observándose que la concentración de polímero para *C. necator*-pMRC03 a las 33 h fue 6 g l⁻¹ de biomasa mayor que su cepa silvestre, sin embargo, el porcentaje de PHA acumulado en peso seco para *C. necator*-pMRC03 fue de 5%, menor que para la cepa silvestre.

Tabla 11. Rendimientos obtenidos en fermentación a nivel biorreactor de *C. necator*-pMRC03.

Tiempo (h)	X (g l ⁻¹)	X _r (g l ⁻¹)	PHA (g l ⁻¹)	r _x (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _s (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _{SA} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _{pha} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Y _x (g _x g _s ⁻¹)	Y _{xr} (g _{xr} g _s ⁻¹)	Y _{p1} (g _{pha} g _s ⁻¹)	Y _{p2} (g _{pha} g _{aceite} ⁻¹)
15	7.14	6.2	0.87	0.47	0.49	0.028	-	0.48	0.45	0.029	-
24	13.2	9.44	3.8	0.55	1	0.1	-	0.37	0.21	0.16	-
33	28.3	7.3	24.4	0.86			0.74				0.85

r_x= Velocidad de producción de biomasa

r_s= Velocidad de consumo de fructosa

r_{SA}= Velocidad de consumo de amonio

r_{pha}= Velocidad de producción de pha

Y_x= rendimiento de biomasa

Y_{xr}= Rendimiento de biomasa residual

Y_{p1}= Rendimiento de producción de pha con fructosa

Y_{p2}= Rendimiento de producción de pha con aceite

Tabla 12. Rendimientos obtenidos en fermentación a nivel biorreactor de *C. necator*.

Tiempo (h)	X (g l ⁻¹)	X _r (g l ⁻¹)	PHA (g l ⁻¹)	r _x (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _s (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _{SA} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r _{pha} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Y _x (g _x g _s ⁻¹)	Y _{xr} (g _{xr} g _s ⁻¹)	Y _{p1} (g _{pha} g _s ⁻¹)	Y _{p2} (g _{pha} g _{aceite} ⁻¹)
12	5	4.1	0.9	0.42	0.49	0.026	-	0.45	0.42	0.029	-
20	13.7	10.5	3.6	0.68	1	0.05	-	0.31	0.23	0.07	-
33	20.3	1.7	18.5	0.61			0.56				0.43

La estimación de la concentración de lípidos durante la etapa de producción de PHAs se observa en la Figura 22. De acuerdo a esta estimación, el rendimiento alcanzado a las 33 h de cultivo fue $Y_{\text{gpha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite}} = 0.4$. Al adicionar el aceite de canola, la concentración de amonio era de 0.2 g l^{-1} , sin embargo al llegar a 33 h de fermentación había una concentración menor a 0.1 g l^{-1} .

De acuerdo a esta estimación, el rendimiento alcanzado a las 33 h de cultivo fue $Y_{\text{gpha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite}} = 0.6$ $\text{g}_{\text{pha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite}}$ y una productividad de $0.56 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

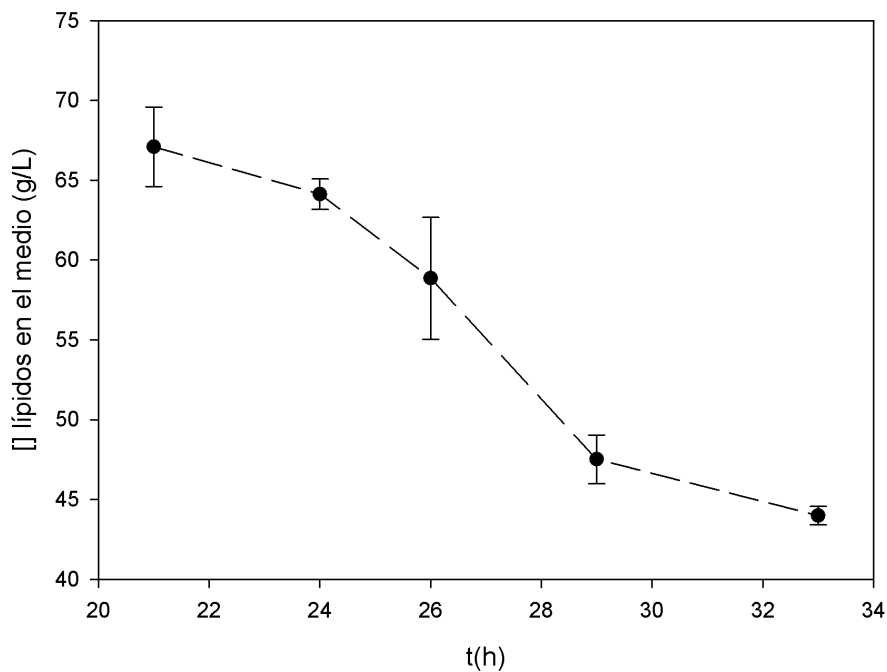


Figura 22. Concentración de lípidos en el medio durante la producción de PHA con *C. necator*.

La fuente de carbono es un factor determinante del tipo de unidades monoméricas en los PHAs que son producidos por los microorganismos. La habilidad de cada microorganismo para utilizar diferentes fuentes de carbono también depende de la especificidad de la PHA sintasa que se está expresando en el microorganismo. Esta biosíntesis requiere el transporte de la fuente de carbono hacia dentro de la célula, la conversión de la fuente de carbono a su respectivo ácido hidroxialcanoico y la polimerización del ácido hidroxialcanoico-CoA por una Pha sintasa. El aceite de canola no puede ser incorporado directamente dentro de la célula bacteriana, por consiguiente, debe ser hidrolizado por lipasas secretadas por la misma bacteria, a glicerol y ácidos grasos; para después ser metabolizado hasta acetil-CoA por la ruta de β -oxidación de ácidos grasos (Fukui T y Doi Y 1998).

Metabólicamente, los ácidos grasos fueron hidrolizados para ser incorporados a la célula y producir acetil-CoA; el amonio residual del medio y el acetil producido fueron metabolizados en el ciclo de Krebs. En este ciclo de metabolismo primario los restos acetil (de dos átomos de C) deben ser degradados hasta CO_2 y átomos de hidrógeno, para ser conducidos hasta el O_2 que se reduce para formar H_2O en la cadena de transporte de electrones (Nelson y Cox 2000). El ciclo de Krebs es esencial, de éste se obtiene la energía necesaria para el mantenimiento de la biomasa residual.

Para la producción de PHAs de cadena corta, el acetil-CoA sigue una ruta metabólica secundaria donde es condensado con otro acetil-CoA, para después ser reducido a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA por una acetil-CoA reductasa NADPH-dependiente. Por último, éste es

polimerizado a poli(3-hidroxibutirato) por una polimerasa (Madison and Huisma, 1999). Mientras, para PHAs de cadena media, los ácidos grasos provenientes de la β -oxidación son hidratados o reducidos (según sea el caso) para después ser polimerizados.

Diferentes autores han investigado tratando de obtener cepas recombinantes con la capacidad de producir PHAs de cadena media utilizando fuentes de carbono complejas y de bajo costo como aceites vegetales; por ejemplo, el aceite de soya, con el que se han obtenido copolímeros de [P(3HB-co-5mol%3HHx)] sintetizados por *R. eutropha* H16 y su cepa recombinante PHB⁴/pJRDEE32d13a obteniendo un alto contenido de PHA de 71-74% en peso seco.

De acuerdo con López-Cuellar *et al.* (2011) mediante la manipulación de sustrato y las estrategias de fermentación en *W. eutropha* ATCC 17699, el organismo era capaz de sintetizar PHA de longitud de cadena media usando aceite de canola como única fuente de carbono. Alrededor del 90% en peso seco de copolímeros fueron producidos utilizando la estrategia de fermentación en tres etapas - adaptación de la biomasa, la producción de biomasa y la producción de PHA.

En este trabajo, los datos demuestran que *C. necator* tiene la capacidad de llegar hasta un 90% en su peso seco de PHA acumulado. Sin embargo, hubo un consumo de 33 % del aceite disponible. La PHA sintasa nativa muestra alta afinidad para polimerizar unidades monoméricas de cadena corta. Esto significa que esta PHA sintasa tiene mayor preferencia por polimerizar hidroxibutiril-CoA que provengan de la β -oxidación. Por

tanto, todo los ácidos grasos que se estén oxidando hasta acetyl, serán desviados hasta formar hidroxibutiril-CoA que finalmente es almacenado por *C. necator*. Esto significa, que por ejemplo, si un ácido oleico es oxidado, se obtendrán ocho moléculas de acetyl-CoA, que posteriormente son llevados hasta cuatro monómeros de 3-hidroxibutiril, esto por tanto reduce la necesidad energética de consumir el aceite presente en el medio por cada ácido graso que se oxida. Por otra parte, *C. necator*-PMRC03 presenta la disponibilidad de consumir más fuente de carbono, debido a la presencia de dos sintasas, la nativa y una recombinante con una amplia especificidad por unidades monoméricas de cadena media, perteneciente a *P. putida* CA-3. La presencia de ambas sintasas le debe dar mayor disposición de consumir un aceite de canola como fuente de carbono, que se refleja en un consumo del 50% del aceite disponible.

6.3 Caracterización de Polihidroxicanoatos

6.3.1 Determinación de unidades monoméricas por cromatografía de gases

Durante la producción de PHA, se observa el aumento de concentración de PHA después de adicionar el aceite de canola. Es posible que *C. necator* utilizará la ruta de degradación de ácidos grasos para consumir el aceite agregado y producir PHA. Brigham *et al.*, (2010) sugiere que la enzima del gen A1322 lipasa juega un rol crítico en la capacidad de *C. necator* para emulsionar los aceites vegetales y producir ácidos grasos libres. Sin embargo, el vínculo entre la vía de la PHA y el ciclo de la β -oxidación no ha sido bien dilucidado (Brigham *et al.*, 2010, Mifune *et al.*, 2010). En el modelo actual del catabolismo microbiano de ácidos grasos para la producción de PHA, los ácidos grasos libres dentro de la célula se vinculan a la coenzima A (CoA) por la enzima FadD. Cuando es sometida a un tipo de estrés, se forma acil-CoA para producir moléculas cortas o largas de acil-CoA. Se ha reportado que la estructura de los esqueletos de carbono de los ácidos hidroxialcanoicos incorporados en el PHA son directamente afectados por el sustrato utilizado (Brigham *et al.*, 2010).

Un tetrapolímero formado por P(3HB-co-3HV-co-co-3HHx-3HO) fue biosintetizado con éxito por *C. necator*-PMRC03 cuando el aceite de canola fue adicionado. La composición

de las unidades monoméricas sintetizadas fueron 3HB (84% mol), 3HV (2.1% en mol), 3HHx (9% en mol) y 3HO (4.6% en mol) en 27 h. El cromatograma muestra que los grupos hidroxialcanoicos son detectados a tiempos de retención mayores a 2.5 min. El tiempo de retención para 3PHB es 2.59 min, mientras que para 3HHx y 3HO se observaron tiempos de retención mayores (3.6 y 6.5 min, respectivamente) (Fig. 23). Los tiempos de retención identificados para cada grupo 3-hidroxialcanoico encontrado son mostrados en el Apéndice 2.

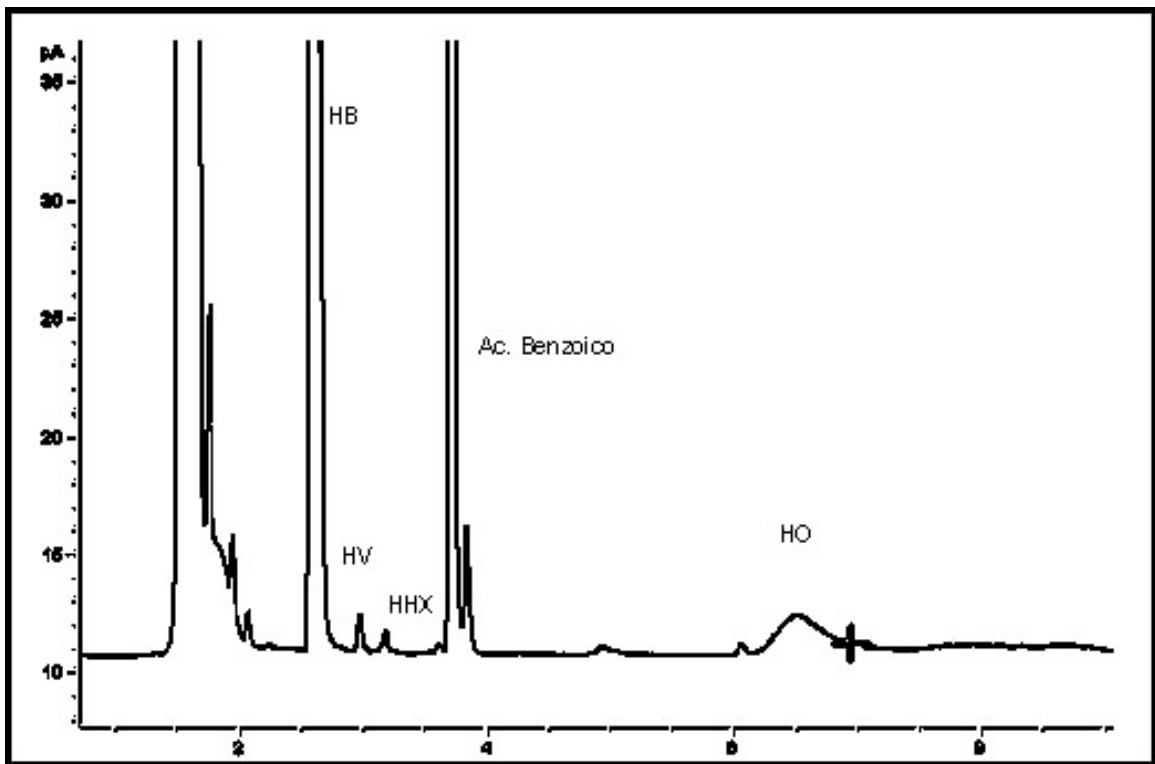


Figura 23. Cromatograma de unidades monoméricas identificadas en el biopolímero producido por *C.necator*-pMRC03.

Los rendimientos de PHA y las composiciones monoméricas del PHA producido por *C. necator*-pMRC03 y la cepa de control de PHB⁻⁴ se muestran en la Tabla 13. Curiosamente, en presencia de aceite de canola, la cepa PHB⁻⁴-pMRC03 logró acumular 12% mol 3HHx formando un copolímero con PHB P (3HB-co-3HHx).

Tabla 13. Composición monomérica del PHA acumulado^a

Cepa <i>C. necator</i>	X (CDW) ^b (g l ⁻¹)	PHA (%)	Composición de PHA (mol %)			
			3HB ^c	3HV ^b	3HHX ^d	3HO ^f
18h						
<i>Cepa silvestre</i>	4.9 ± 0.2	39.1 ± 1.0	100	nd ^g	nd	nd
PHB ⁻⁴	4 ± 0.05	0 ± 0.2	nd	nd	nd	nd
PHB ⁻⁴ -pMRC03	3.5 ± 0.1	15 ± 2	100	nd	nd	nd
pMRC03	4.6 ± 0.1	36 ± 0.8	98.6	1.4	nd	nd
30h						
<i>Cepa silvestre</i>	5.7 ± 0.3	67 ± 0.5	99.3	0.7	nd	nd
PHB ⁻⁴	3.7 ± 0.2	0 ± 0.3	nd	nd	nd	nd
PHB ⁻⁴ -pMRC03	3.7 ± 0.3	58 ± 1	88	0	12	nd
a pMRC03	6.2 ± 0.15	96 ± 2	84.3	2.1	9	4.6

Incubado por 27 h a 30 °C, pH inicial 7.0, 200 rpm. Los datos son mostrados por triplicado

^b X: biomasa en peso seco; ^c 3-HB, 3-hidroxibutirato; ^d 3-HV, 3-hidroxivalerato; ^e 3HHx, 3-hidroxihexanoato; ^f 3HHO, 3-hidroxioctanoato; ^g nd: no determinado

En este trabajo, el aumento de unidades monoméricas de cadena media en la composición del polímero producido con aceite de canola se relaciona, presumiblemente, con las altas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados en este sustrato, tales como ácido oleico (C18:1) y ácido eúrico (C22:1). Se ha reportado que *C. necator* utiliza ácidos grasos monoinsaturados preferentemente en lugar de ácidos grasos poliinsaturados (Lee *et al.*, 2008, Loo *et al.*, 2005). Esto es porque los números crecientes de dobles enlaces en las moléculas ejercen inhibición metabólica (Kahar *et al.*, 2004). Nuestros datos experimentales muestran también que el uso de una fuente de carbono de cadena larga podría proporcionar mayores rendimientos de PHA. En este caso, la formación de 3HHx y 3HO probablemente es resultado de la oxidación parcial de los ácidos oleico y eúrico. En *C. necator* han sido reportadas dos enzimas intermediarias principales; una enoil-CoA hidratasa (enoil-hidratasa) y una β -cetotilasa de *C. necator* (BktB_{Cn}) (Brigham *et al.* 2010). Se ha demostrado que 3HHx-CoA o moléculas 3HO-CoA pueden ser producidas por una enoil hidratasa (Bhubala *et al.*, 2010), mientras que Mifune *et al.*, (2010) reportan que el aumento de la actividad de la BktB_{Cn} es fundamental en la formación de unidades monoméricas de cadena media, ya que promueve la formación de 3-cetohexanoil-CoA. Esta enzima es activa con ácidos grasos como sustrato, promoviendo la formación de ácidos 3-hidroxicanoicos. En este estudio, PHB⁻⁴ y su cepa silvestre fueron capaces de formar unidades monoméricas de cadena media cuando fue complementada con phaC2_{Ps-CA3}. Esto podría deberse a que BktB_{Cn} ayuda en la formación de 3HHx y 3HO, que después serán polimerizados por phaC2_{Ps-CA3}.

En la Tabla 13, se observa la producción de PHB en la cepa mutante PHB⁻⁴, transformada

con el gen *phaC2_{ps}* CA-3. Está reportado que en *P. Putida* CA-3 no se ha observado la producción de PHB (Patrik *et al.*, 2005). Por lo tanto, esto demuestra que esta enzima, perteneciente a *P. Putida* CA-3 tiene una amplia capacidad de polimerizar diversos sustratos. La producción de un monómero nuevo en diferentes cepas huésped podría estar relacionada con la abundancia molar y la especificidad por el sustrato de las enzimas. Así, un gen que se expresa en el microorganismo podría resultar en la formación de enzimas con especificidad por el sustrato diferente en comparación con la del microorganismo de tipo silvestre. Además, la disponibilidad de una enzima en el nuevo huésped puede influir en la producción de PHA y sus monómeros.

Por otra parte, varios grupos han estudiado la producción del monómero 3HHx expresando diferentes sintasas de PHA (Bhubala *et al.*, 2010, Fukui y Doi 1997, Mifune *et al.*, 2010, Loo *et al.*, 2005) (Tabla 14). Por ejemplo, la sintasa de *Aeromonas caviae*, conocida por sintetizar monómeros tanto de cadena corta como de cadena media (Shimamura *et al.*, 1994), ha sido estudiada dentro de una cepa recombinante PHB⁻⁴ utilizando varios fuentes de carbono, principalmente aceites vegetales, incluyendo aceite crudo de palma (CPKO) y aceite de soya. Con estas fuentes de carbono se ha logrado producir copolímero P(3HB-co-3HHx) con 5% mol de HHx (Loo *et al.*, 2005, Fukui y Doi, 1997, Kahar *et al.*, 2005). Bhubala *et al.* (2010) trabajaron con PHB⁻⁴ produciendo 4% mol 3HHx en una cepa recombinante que contenía una sintasa perteneciente a *Chromobacterium sp* USM2. Ellos demostraron que con el uso de CPKO como fuente de carbono obtenían 2.52 g l⁻¹ de PHA en 48 h de producción, mientras que Mifune *et al.*, (2010) reportara una producción de 10% mol 3HHX utilizando aceite de soya como

fuentes de carbono. En este trabajo, la cepa de PHB⁴-pMRC03 acumuló P (3HB-co-3HHx) copolímero con 12% en moles de 3HHx con aceite de canola en tan sólo 27 h.

Está reportado hasta ahora el aceite de palma había resultado excelente fuente de carbono para la producción de biomasa celular y P (3HB-co-3HHx) (Bhubalan *et al.*, 2010.), utilizando oleína de palma y aceite crudo de palma como sustratos de una cepa mutante *W. eutropha* que albergaba el gen *phaC* de *A. caviae*, se obtuvo P (3HB-co-5% mol 3HHx) representando el 87% (w/w) del peso seco celular (Loo *et al.*, 2005). En este trabajo, se encontró que el aceite de canola resulta ser un buen sustrato para *C. necator*-pMRC03 obteniéndose la síntesis de unidades de cadena media como son 9% mol 3HHx y 4.6 % mol 3HO. Pocos autores han reportado la producción de 3HO con *C. necator*. Green *et al.* (2002) reportan la producción de un terpolímero P(-3HB-3HHx-3HO), haciendo uso de acrilato de sodio como inhibidor de la β -oxidación y de octanoato sódico como fuente de carbono. Chen *et al.* (2007) reporta la producción de unidades monoméricas de ocho carbonos (HO) con una cepa PHB⁴ que albergaba una sintasa PhaC de baja especificidad de sustrato. La composición monomérica reportada fue de 52% mol de HO utilizando ácido octanoico puro como sustrato. Sin embargo, sólo 2.8 g l⁻¹ de biomasa se obtuvieron en 72 h. En este estudio, *C. necator* fue capaz de usar el gen *phaC2_{Ps CA-3}* sintetizando 3HO dentro de un tiempo corto (27 h) con una fuente de carbono rica en ácidos grasos monosaturados menos costosa y una sintasa con amplia afinidad a diferentes sustratos (Tabla 14).

Tabla 14. Diferentes sistemas de producción de PHA reportados

No	Microorganismo	Características	Substrato	Concentración Substrato		Sistema de Fermentación
				Lote (g l ⁻¹)	Lote alimentado (g l ⁻¹)	
1	<i>Ralstonia eutropha</i> NRRL B14690	Cepa silvestre	Fructosa	40		Lote
2	<i>Ralstonia eutropha</i> NRRL B14690	Cepa silvestre	Fructosa	40	350	Lote alimentado
3	Recombinant <i>Ralstonia eutropha</i>	<i>ccr_{ss}</i> , <i>pha C_J</i> , <i>AC</i>	Fructosa	5		Estudio en matraz
4	<i>Ralstonia eutropha</i> HI6	Cepa silvestre	Aceite de soya	20	20	Lote alimentado
	Recombinant <i>Ralstonia eutropha</i>	gen <i>phaC_{AC}</i>	Aceite de soya	20	20	Lote alimentado
5	<i>Cupriavidus necator</i> (PHB ⁻⁴)	gen <i>phaC_{CS}</i>	Aceite crudo de Palma kernel	2.5		Estudio en matraz
			Valerato de sodio	2.5		
6	<i>Ralstonia eutropha</i> Re2058/pCB113	gen <i>phaC_{AC}</i>	Aceite de Palma	45		Lote
	<i>Ralstonia eutropha</i> Re2160/pCB113			40		
7	<i>Wauteria eutropha</i> (PHB ⁻⁴)	gen <i>phaC_{AC}</i>	Aceite de Palma	5		Estudio en matraz
8	<i>Ralstonia eutropha</i> HI6	Cepa silvestre	Fructosa y Aceite de canola	10	30 & 55	Lote y Lote alimentado
9	<i>C. necator</i>	Cepa silvestre	Aceite de canola	10	194	Lote y Lote alimentado
10	<i>C. necator</i> -pMRC03	Gen <i>pha C2</i> , Ps_{CA-3}	Aceite de canola	10	194	Lote y Lote alimentado

Tabla 14. Continuación.....

No	Duración (h)	X (g l ⁻¹)	PHA (g l ⁻¹)	Contenido PHA (% w/w)	Productividad (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Composición monomérica (% mol/mol)				Referencias
						HB	HV	HO	HHx	
1	60	20.73	9.35	45*	0.15	100				(Khanna and Srivastava, 2005)
2	40	39.2	18.46	47*	0.46	100				(Khanna and Srivastava, 2006)
3	72	1.48	0.71*	48	0.0098*	98.5		1.5		Fukui <i>et al.</i> (2002)
4	96	118-126	84.96 - 95.76*	72-76	0.88 - 0.997*	100				Kahar <i>et al.</i> (2004)
	96	128 - 138	90.88 - 102.12*	71 - 74	0.94 - 1.06*	95		5		
5	48	3.7	1.5*	42	0.03*	87	9	4		Bhubalan <i>et al.</i> (2010)
6	120	25	17.75	71	0.14*	83		17		Budde <i>et al.</i> (2011)
	120	18	11.66	66	0.09*	70		30		
7	72	4.3	3.74*	87	0.059*	95		5		Loo <i>et al.</i> (2005)
8	36	21.4	19.7	92	0.54	95		5		López-Cuellar <i>et al.</i> (2011)
9	33	20.3	18.5	91	.56	99.3	0.6			Presente trabajo
10	33	28.3	24.4	86	.74	84.3	2.1	4.6	9	Presente Trabajo

* Valores calculados

Estudios previos a nivel matraz, demostraron que *C. necator*-pMRC03 tiene la capacidad de producir tetra-monómeros de PHAs, 3-hidroxobutirato-co-3-hidroxivalerato-co-3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxi octanoato (3HB-co-3HV-co-3HHx-3HO), mientras que su cepa silvestre sólo produjo 3HB-co-3HV. A nivel biorreactor se puede observar que la cepa transformada logra un mayor aprovechamiento del aceite como fuente de carbono en medio al obtenerse un rendimiento de $0.85 \text{ g}_{\text{pha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite}}$, mayor al que se observó con su silvestre.

Los aceites vegetales o sus ácidos grasos derivados son fuentes de carbono utilizables para la producción de PHAs, renovables y económicas (0.3 US\$ por Kg-aceite vegetal). El rendimiento reportado hasta ahora es $0.72 - 0.76 \text{ g}_{\text{pha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite de soya consumido}}$, con una productividad de $1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En este trabajo, se obtuvo un rendimiento $0.86 \text{ g}_{\text{pha}} \text{ g}^{-1}_{\text{aceite de canola}}$, con una productividad de $0.74 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, sin embargo, exitosamente se demostró que *C. necator* además de lograr un alto rendimiento bajo las condiciones presentadas en nivel biorreactor, también es capaz de sintetizar un tetrapolímero compuesto de P(3HB-co-3HV-co-3HHx-co-3HO).

6.3.2 Caracterización Termoquímica

6.3.2.3 Analisis de Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La incorporación de monómeros induce cambios en las propiedades térmicas del biopolímero producido. El análisis calorimétrico mostró que el estándar de PHB tenía una temperatura de fusión (T_m) de 180 °C mayor que la de 158 °C del biopolímero producido (Tabla 14). Industrialmente, esto indica que se requiere menos energía para fundir el biopolímero producido por *C. necator*-pMRC03 con aceite de canola como fuente de carbono.

Se ha reportado el uso de diferentes aceites como fuentes de carbono como aceite de girasol y CPKO en cepas recombinantes para la producción de PHAs, resultando biopolímeros con baja T_m .

La temperatura de transición vítrea (T_g) es alcanzada cuando el material pierde su aspecto vítreo y se convierte en un material más flexible (Bhubala *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2007) y Keenan *et al.* (2006), demostraron que cuando el número de unidades monoméricas de cadena media aumenta, la temperatura de transición vítrea se reduce considerablemente obteniendo valores de T_g y T_m bajos en comparación con los obtenidos para PHB, siendo esto resultado de un polímero más flexible y amorfo. En este trabajo, el

tetrapolímero producido con 3HHX y 3HO como unidades monoméricas mostró una temperatura de transición vítrea a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 15), mientras que la del polímero obtenido con PHB⁴-pMRC03 fue de -5°C .

El PHB fue altamente cristalino con una entalpía de fusión de 74.8 J g^{-1} , mientras que el polímero sintetizado muestra ser más amorfo, con una entalpía de fusión de 30.1 J g^{-1} , debido a la incorporación heterogénea de unidades monoméricas que conforman el tetrapolímero producido por *C. necator*-pMRC03.

Tabla 15. Caracterización termoquímica de diferentes PHAs obtenidos con diversos aceites como fuente de carbono.

Cepa	Substrato	Composición de unidades monoméricas	T_g^b (°C)	T_m^c (°C)	ΔH_m^d (J g ⁻¹)	Cristalinidad (%)	Referencia
Biopol	Fructosa	PHB	-2±0.2	180± 4	84.7 ± 2	100	Presente trabajo
<i>C. necátor</i>	Aceite de canola	PHB-co-PHV	-2.3±0.1	170± 2	78±1	92	Presente trabajo
<i>C. necator</i> –PMRC03	Aceite de canola	PHB-co-PHV-co-PHHx-co-PHO	-14±0.1	158± 1	30.19±3	35.64	Presente trabajo
PHB ⁻⁴ -pMRC03	Aceite de canola	PHB-co-PHV-co-PHHx	-5±0.05	165± 2	60±5	70	Presente trabajo
PHB ⁻⁴ -pBBREE32d13	Aceite ácido de Palma	PHB-co-PHHx	-1	155	44	51	Loo <i>et al.</i> , 2005
<i>C. necator</i>	Aceite de girasol+ valerato de sodio	PHB-co-PHV	-20	170	43.3	59.8	Lee <i>et al.</i> , 2008
PHB ⁻⁴ -pBBR1MCS-C2	Aceite crudo de palma kernel + valerato de sodio	PHB-co-PHV-co-PHHx	-2.3	144	60		Bhubalan <i>et al.</i> , 2010
PHB ⁻⁴ -pBBR1MCS-C2	Aceite de palma kernel+ ácido isocaproico	PHB-co-PHHx	-0.6	129	66.7	78	Chia <i>et al.</i> , 2010

PHB, polihidroxitirato; PHV, polihidroxitirato; PHHx, polihidroxitirato; PHO, polyhydroxyoctanoate.

^b Temperatura de transición vítrea, ^c Temperatura de fusión, ^d Entalpía de fusión

6.3.2.2 Análisis Resonancia Magnética Nuclear.

Para observar presencia de monómeros de PHA mayores a cuatro carbonos, los polímeros sintetizados por *C. necator*-pMRC03 y *PHB*⁴-pMRC03 fueron analizados mediante ¹H RMN (Fig. 24, 25).

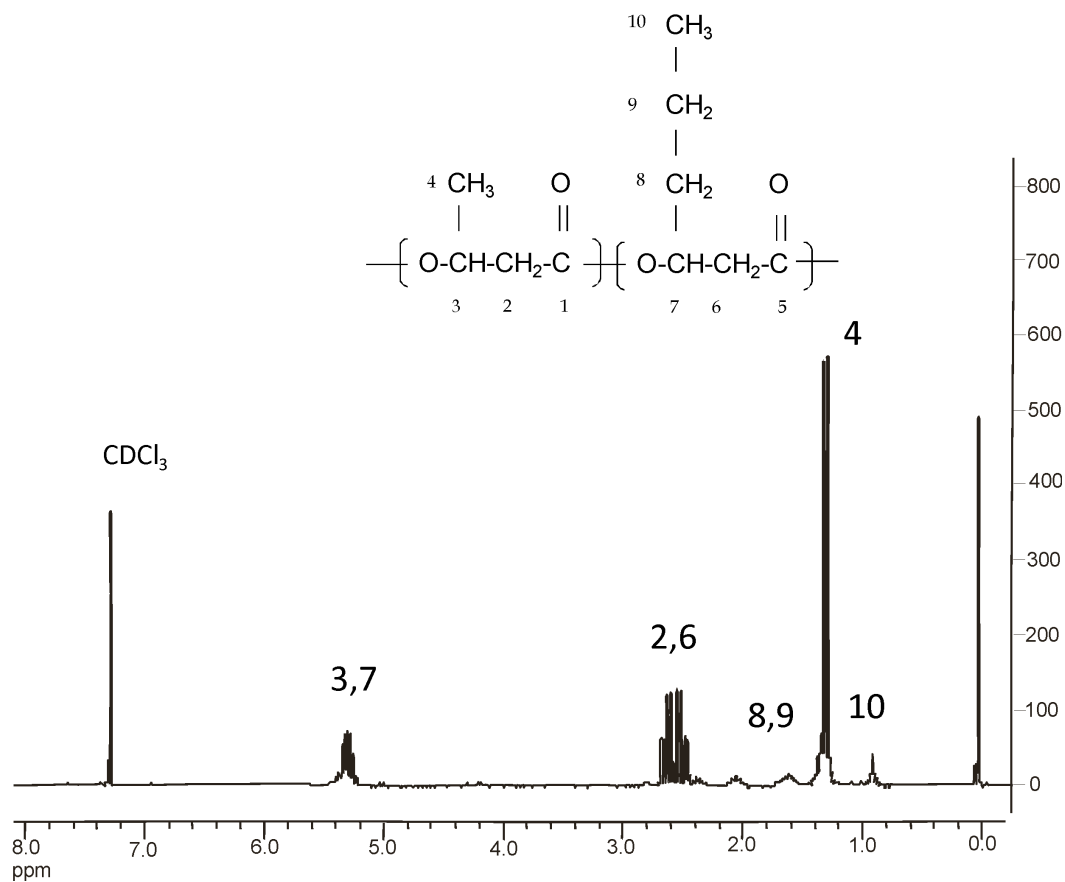


Figura 24. RMN de ¹H realizados para el biopolímero sintetizados por PHB⁴-pMRC03.

El polímero sintetizado por PHB^4 -pMRC03 mostró resonancia en protones pertenecientes a 3HB y 3HV, sugiriendo una conformación copolimérica. Los protones identificados son numerados y relacionados con la estructura polimérica esperada.

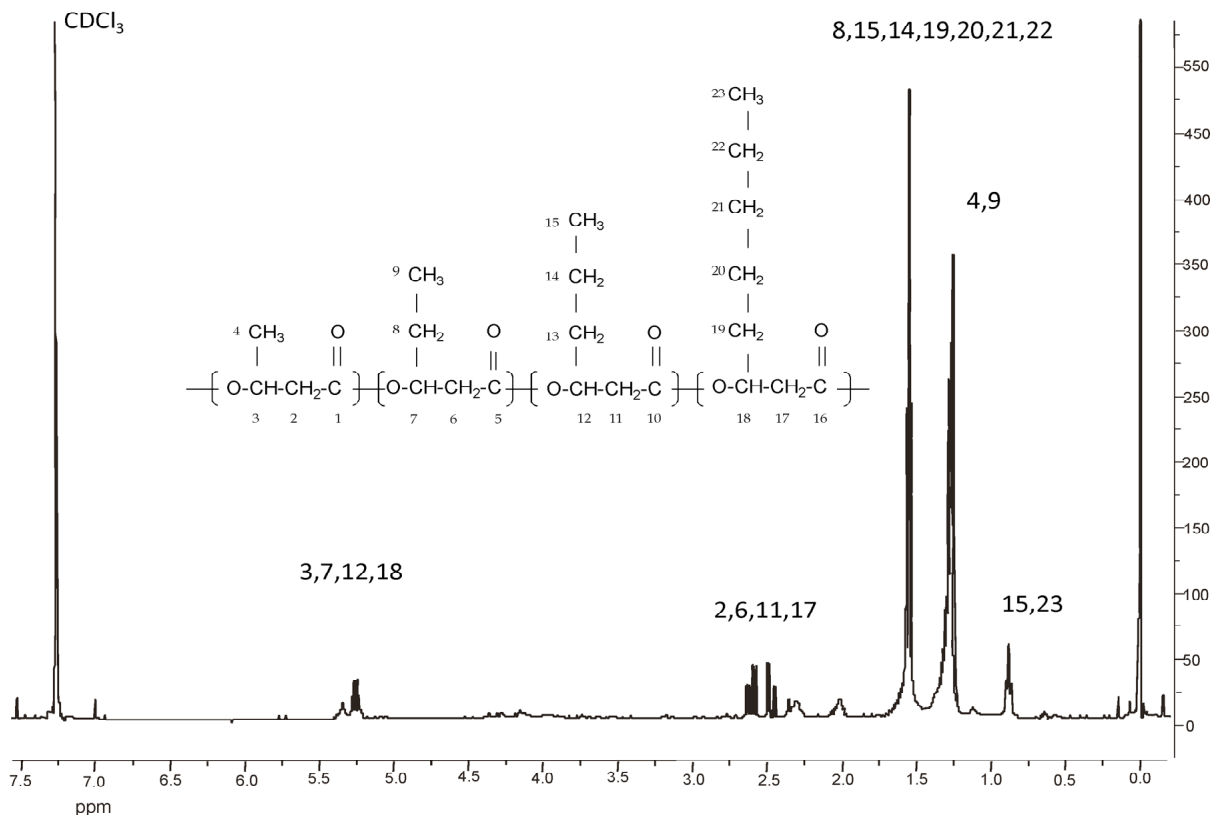


Figura 25. RMN de ^1H realizados para el biopolímero sintetizados por *C. necator*-pMRC03.

Los monómeros 3HB, 3HV, 3HHx y 3HO producidos por *C. necator*-pMRC03 fueron confirmados en el espectro obtenido para este polímero. La resonancia del protón metilo (CH_3) a 0.9 ppm se puede asignar a protones terminales de la cadena de PHA. Mientras que la resonancia a 1.7 ppm es incrementada por la resonancia de los protones metilenos (CH_2) perteneciente a HV, HHX, HO

7. CONCLUSIONES

En este estudio, se logró expresar una proteína recombinante PhaC_{2Ps CA-3} en *C. necator*. Esta expresión fue comprobada en la cepa PHB⁻⁴-pMRC03 a nivel matraz.

El desarrollo de este cultivo permitió la síntesis de un copolímero P(3HB-co-HHx) en cepa PHB⁻⁴-pMRC03. Mientras que en la cepa *C. necator*-pMRC03 sintetizó una mezcla de PHAs_{cc-cm} con 4, 5, 6, y 8 carbonos en la unidad monomérica.

La síntesis de unidades monoméricas de cadena corta en la cepa PHB⁻⁴, permite demostrar por primera vez, la capacidad de la enzima PhaC_{2Ps CA-3} de polimerizar diferentes grupos hidroxialcanoicos, por su amplia especificidad de sustrato.

Fue investigado, el alto rendimiento en la producción de los polihidroxialcanoatos (PHA) por *C. necator*-pMRC03 procedente de fuentes de carbono renovable y de bajo costo como aceite de canola. A nivel bioreactor, la cepa silvestre produjo 20.3 g l⁻¹ de biomasa celular y un 91 % PHA (w/ w), mientras que *C. necator*-pMRC03 acumuló 28.3 g l⁻¹ con 86% de PHA sintetizando un tetrapolímero de P (HB-HV-HHx-HO) basado en unidades monoméricas y de cadena corta y media en 33 h de fermentación. Esto permitió obtener un rendimiento de 0.85 g PHA/g aceite de canola consumido. La estrategia experimental pudo establecerse usando fuentes de carbono de bajo costo para aumentar la productividad y la incorporación de monómeros de longitud de cadena media al PHA.

8. APÉNDICES

8.1 Apéndice I:

López-Cuellar MR, Dinijanski N, Prieto MA. Construcción de un biosensor celular en *Pseudomonas putida* KT2442 (2011). Centro de investigaciones biológicas: CIB . Madrid, España

1. Introducción

Los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo (PSG) rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.*, 1995).

Hasta el momento se han definido tres clases de GAPs en bacterias: i) las PHA polimerasas o sintasas, que llevan a cabo la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las fasinas que generalmente son el componente principal de las GAPs. Las fasinas han sido identificadas en varios microorganismos y se cree que tienen una función similar al de las oleosinas en las inclusiones de triacilglicerol de semillas y polen de plantas, es decir, forman una capa proteica en la superficie del gránulo, generando una interfase entre el citoplasma celular (ambiente hidrofílico) y el núcleo hidrofóbico del gránulo de PHA (Steinbüchel *et al.*, 1995). Además de esta función estructural, algunas fasinas poseen otras funciones relacionadas con la regulación de la biosíntesis del PHA (Prieto *et al.*, 1999^a; Galan et al, 2011). El *cluster* de genes responsable de la síntesis de mcl-PHA en la

bacteria modelo *Pseudomonas putida* KT2442, uno de los organismos más utilizados en biotecnología medioambiental (Nelson *et al.*, 2002), contiene dos genes que codifican las polimerasas PhaC1 y PhaC2, responsables de la síntesis del bioplástico (Madison y Huisman, 1999) (Fig. 1).

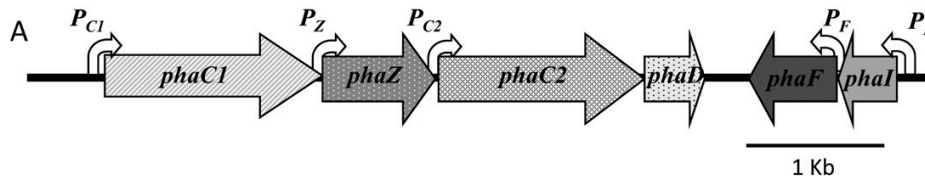


Figura 1. Cluster de genes responsable de la síntesis de mcl-PHA en *P. putida* KT2442 (Galán B. *et al.*, 2011).

Los genes *phaC1* y *phaC2* corresponden a las dos proteínas sintetas, *phaD* codifica un regulador de la transcripción (de Eugenio *et al.*, 2010), mientras que los genes *phaF* y *phaI* codifican las fasinas. Entre estos dos genes se localiza el gen *phaZ* que codifica la depolimerasa (De Eugenio *et al.*, 2007). Los genes *phaF* y *phaI* fueron por primera vez identificados en la estirpe GPo1, y codifican las fasinas (Prieto *et al.*, 1999a). Del análisis de la secuencia de aminoácidos de la fasina PhaF se deduce que esta proteína está estructurada en dos dominios: la región C-terminal, que contiene un dominio de unión a DNA y el extremo N-terminal, que presenta 57% de similitud con la secuencia de aminoácidos completa de la fasina PhaI (15,4 kDa) (Prieto *et al.*, 1999a). El dominio C-terminal es similar al de las histonas H1 de organismos eucariotas, y se ha demostrado muy recientemente que está implicado en la segregación de los gránulos entre las células hijas durante la división celular (Galán *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha demostrado que la producción de una única fasina como PhaI en un mutante PhaF⁻ de *P. putida* permite la síntesis de gránulos de PHA en este microorganismo y que PhaI es la proteína mayoritaria en los gránulos de PHA (Prieto *et al.*, 1999a).

1.2 Objetivos de la estancia

- Construcción de una cepa mutante de *P. putida* KT2442 en el gen regulador *phaD*.
- Construcción de una fusión transcripcional entre el gen trazador *gfp* y el promotor *Pi*.
- Construcción de un biosensor celular en *P. putida* KT2442 para monitorizar la expresión de las fasinas PhaI y PhaF.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Las cepas y plásmidos usados se muestran en la Tabla 1. *P. putida* KT2442 y *Escherichia coli* DH10B fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) ó M63 (Sambrook y Rusell, 2001; Miller 1972) a 30 y 37°C, respectivamente. El crecimiento fue monitorizado por DO a 600nm (DO₆₀₀). Para la óptima producción de PHA, se utilizó un pre-cultivo de *P. putida* KT2442 en medio LB, lavado con solución salina e inoculado a 0.3 DO₆₀₀ en medio mínimo limitado en nitrógeno (0.1N M63) en presencia de 15mM de ácido octanoico como fuente de carbono (de Eugenio *et al.*, 2010). Kanamicina (50mg/mL), gentamicina (50mg/mL), cloranfenicol (34mg/mL), ampicilina (100mg/mL) o rimfapicina (50mg/mL), fueron adicionados cuando fue necesario. Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas usando el método RbCl ([Sambrook](#) y Rusell, 2001).

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepa	Genotipo y Características relevantes	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	<i>P. putida</i> mt-2 sin plásmido TOL, hsdR, Rf	Franklin <i>et al.</i> , (1981)
<i>E. coli</i> DH10B	F', <i>mcrA</i> <i>D(mrr hsdRMS-mcrBC)</i> <i>f80dlacdM15</i> <i>dlacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA</i> <i>araD139</i> <i>d(ara-leu)7697</i> <i>galU</i> <i>galKl</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> .	Invitrogen
<i>P. putida</i> KT42D ₂	<i>P. putida</i> KT2442 mutante en <i>phaD</i> por delección génica	Presente trabajo
<i>P. putida</i> KT42I ₂	<i>P. putida</i> KT2442 mutante en <i>phaI</i> por delección génica	Presente trabajo
<i>P. putida</i> KT42C ₁ ZC ₂ D	<i>P. putida</i> KT2442 mutante en C ₁ , Z, C ₂ y D	Presente trabajo
Plásmidos usados		
pK18mobsacB	Vector de clonación derivado de pBR322 para llevar a cabo recombinación doble; RP4 mob, lacZ, sacB, Km ^R .	Shäfer <i>et al.</i> , (1994)
pK18mob-mutD	Derivado de pK18mob con un fragmento de los genes <i>phaC2</i> y <i>phaF</i> , Km ^R	Presente trabajo
pGEM-T Easy	Vector para clonar productos de PCR; <i>lacZa</i> , oriF1	Promega
pRK600	Vector helper; <i>mob</i> ⁺ <i>tra</i> ⁻ <i>ori</i> ColE1 Cm ^R	Sharma y Singer <i>et al.</i> , (2011)
pIZD	Derivado de pIZ1016 con el gen <i>phaD</i>	De Eugenio <i>et al.</i> , (2010)
pIZ1016	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, <i>ori</i> pBBR1MCS <i>Mob</i> ⁺ , <i>lacZa</i> , <i>P_{lac}/lacI^q</i> , Gm ^R	De Eugenio <i>et al.</i> , (2010)
pGreenTIR	Vector con casete de <i>gfp</i> con una región TIR (transcriptional enhancer region), Amp ^R .	Miller <i>et al.</i> , (1997)

2.2 Construcción de la cepa mutante *P. putida* KT42D₂.

P. putida KT42D₂, fue construida por delección del gen *phaD* usando el plásmido pK18mobsacB (Schanfer *et al.*, 2004). Los fragmentos de los genes *phaC2* y *phaF*, (adyacente al gen *phaD*) fueron obtenidos mediante amplificación por PCR. El fragmento del gen *phaF* fue amplificado con los oligonucleótidos (los sitios corte de las enzimas de restricción utilizadas son subrayados): F5-MutD (5'-CGGAATTCGACGCGGTATCAGATCAG-3' *EcoRI*) y F3-MutD (5'-CCCCCGGGCGCAACGAGATCAAGGCACT-3' *SmaI*). El fragmento del gen *phaC2* se amplificó con los siguientes oligonucleótidos: C23'mutD (5'-CCGGAATTCCAGTCAGCAGCTCATCG-3' *EcoRI*) y C25'MutD (5'-CGCGGATCCGATCTGGA^{ACT}ACTGGGTAA-3' *BamHI*). Para amplificación de PCR se usaron dos unidades de AmpliTaq DNA polymerasa (PerkinElmer Life Sciences), 1 mg de DNA, 1 mg de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) y 2.5 mM MgCl₂ en el buffer recomendado por el fabricante. Las condiciones de amplificación fueron acorde al contenido de G + C. Los productos de PCR fueron purificados con High Pure plasmid isolation kit (Roche Applied Science). Los productos de PCR fueron clonados utilizando el plasmido pGEM-T. Los fragmentos de los genes *phaC2* y *phaF* se obtuvieron de pGEM-T por digestión (*BamHI/EcoRI* y *EcoR/SmaI* respectivamente) y se ligaron con T4 ligasa, para luego ser clonados en el polilinker de pK18mobsacB (*SmaI/BamHI*). Los fragmentos de DNA fueron purificados con Gene-Clean Turbo (Q-BIO-gene). La construcción resultante pK18mobsacB-mutD fue introducida en *P. putida* KT2442 por conjugación triparental (de Lorenzo *et al.*, 1990). Las células conjugantes fueron

seleccionadas en medio M63, 0.2% citrato, 5% sacarosa y kanamicina. La delección del gen *phaD* en la cepa *P. putida* KT42D₂ fue confirmada por análisis en PCR y análisis SDS-PAGE.

2.3 Complementación del mutante KT42D₂

El plasmido pIZD (*phaD*⁺) fue construido previamente (de Eugenio *et al.*, 2010). La cepa *P. putida* KT42D₂, fue complementadas con los plásmidos pIZD y el control pIZ1016 mediante electroporación (de Eugenio *et al.*, 2010).

2.4 Construcción de la cepa mutante *P. putida* KT42I₂.

P. putida KT42I₂, fue construida por delección del gen *phaI* usando el plásmido pK18mobsacB (Schanfer *et al.*, 2004). Los fragmentos de el gen *phaF* y promotor *Pi*, (adyacente al gen *phaI*) fueron obtenidos mediante amplificación por PCR. El fragmento del gen *phaF* fue amplificado con los oligonucleótidos (los sitios corte de las enzimas de restricción utilizadas son subrayados): F5-MutI (5'-CGGGATCCCCGGTCAGCTTCTCGATCT-3' *Bam*HI) y F32-MutI (5'-GGCATATGGCTGGCAAGAAGAACACCG-3' *Nde*I). El fragmento del promotor *Pi* se amplificó con los siguientes oligonucleótidos: PimutI (5'-CCCATATGGCTGTGTACCTCATGCTCAACTGA-3' *Nde*I) y Pi5'MutI2 (5'-CGGAATTCAGATCACCTGTGCTGGCC-3' *Eco*RI). Para amplificación de PCR se usaron 2 unidades de AmpliTaq DNA polymerasa (PerkinElmer Life Sciences), 1 mg de

DNA, 1 mg de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) y 2.5 mM MgCl₂ en el buffer recomendado por el fabricante. Las condiciones de amplificación fueron acorde al contenido de G+C. Los productos de PCR fueron purificados con High Pure plasmid isolation kit (Roche Applied Science). Los productos de PCR fueron clonados utilizando el plasmido pGEM-T. Los fragmentos del gen *phaF* y el promotor *Pi* se obtuvieron de pGEM-T por digestión (*BamHI/EcoRI* y *EcoR/SmaI* respectivamente). Los fragmentos de DNA fueron purificados con Gene-Clean Turbo (Q-BIO-gene) y luego ligados con T4 ligasa, para posteriormente ser clonados en el polilinker de pK18mobsacB (*SmaI/BamHI*). La construcción resultante pK18mobsacB-mutI fue introducida en *P. putida* KT2442 por conjugación triparental (de Lorenzo *et al.*, 1990). Las células conjugantes fueron seleccionadas en medio M63, 0.2% citrato, 5% sacarosa y kanamicina. La delección del gen *phaI* en la cepa *P. putida* KT42I₂ fue confirmada por análisis en PCR y análisis SDS-PAGE.

2.5 Amplificación del promotor *Pi* y el gen *gfp*.

El gen *gfp* fue amplificado del plásmido pGreenTIR. Los oligonucleótidos diseñados fueron: GFp5'(XbaI) (GCTCTAGAAAAACATATGAGTAAAGGAGAAG-3' XbaI) y 3gfpMUTdgfp (5'-ACCAAGCTTGGGTTTGTATAGTTCATCCATGCCAT-3' HindIII). La amplificación fue llevada de acuerdo a Miller and Lindow (1996). El promotor *Pi* fue amplificado con los sitios XbaI/BamHI.

Los oligonucleótidos diseñados fueron: 5PiGFP(XbaI)3' (5'-GCTCTAGAATGCTGTGTACCTCATGCTC-3'), 5PimutDgfp (5'-CGCGAATTCGCTGAATTTGAAACACATGG-3' *BamHI*).

2.6 Amplificación del promotor *Ptac* y el gen *phaD*

El promotor *Ptac* y el gen *phaD* fueron amplificados del plásmido pIZD. Los iniciadores diseñados fueron: *Ptac*5': CGCGGATCCACATCATAACGGTTCTGGCAA *BamHI* y *phaD*3' (5'-CCGAGCTCCTACCCCTCCAGGTACTTCAC-3' *SacI*)

3. RESULTADOS

3.1 Construcción de una cepa mutante de *P. putida* KT2442 en el gen regulador *phaD*.

Se construyó una cepa mutante de *P. putida* KT2442 deletando el gen *phaD* mediante el sistema de entrecruzamiento por recombinación homóloga mediada por el plásmido pKmob18*sacB*. La cepa resultante se utilizó como *huésped* de la fusión transcripcional que se diseñará en el segundo objetivo.

En primer lugar, la cepa de *E. coli* DH10B fue transformada con la construcción plásmidica pK18mob-mutD). El plásmido pK18mob-mutD se utilizó para la recombinación mediante conjugación triparental (previamente descrito) en *P. putida* KT2442 (Figura 2). Las cepas mutadas fueron seleccionadas mediante amplificación por PCR. En la Figura 2 se observa la amplificación de los fragmentos de los genes *phaC2* y *phaF* delecionando el gen *phaD*.

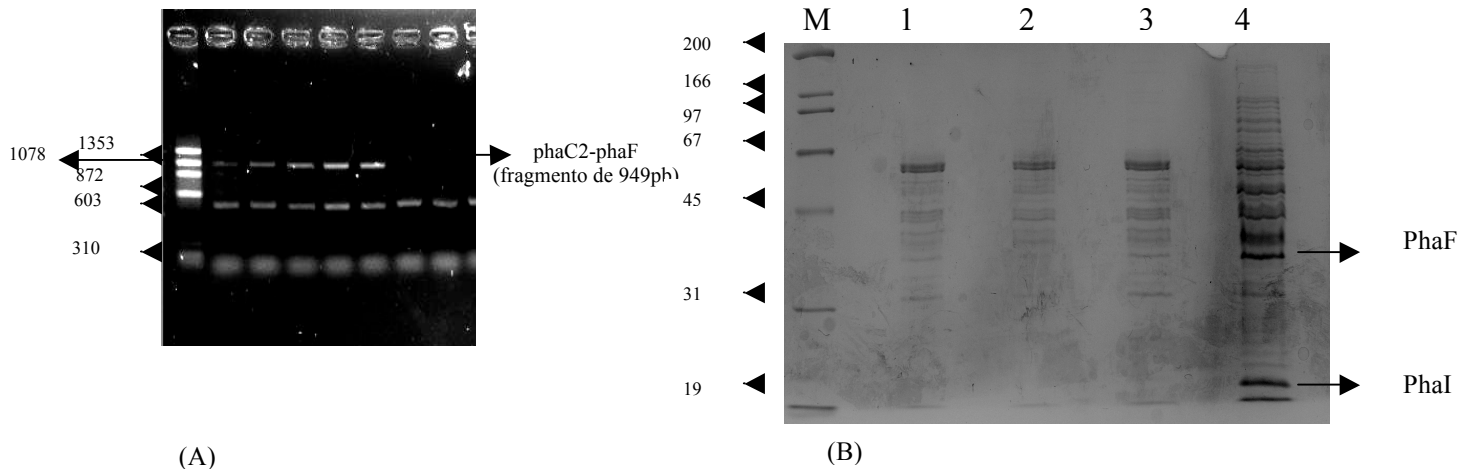


Figura 2. Obtención de la mutante *P. putida* KT42D₂. (A) Amplificación del fragmento phaC2-phaF en *P. putida* KT2442. (B) Análisis comparativo de proteínas asociadas al gránulo de tres mutantes obtenidas (M: Marcador, 1: *P. putida* KT42D₂-1, *P. putida* KT42D₂-2, *P. putida* KT42D₂-3, 4: *P. putida* KT2442).

Está descrito que las proteínas PhaF y PhaI tienen un peso de 15 kDa y 26 kDa, respectivamente aunque debido a su alto contenido en aminoácidos cargados presenta una movilidad anómala en SDS-PAGE (Prieto *et al*, 2007). En base a los resultados presentados en la Figura 2, se seleccionó la mutante 3 para realizar un análisis comparativo de la expresión de proteínas asociadas al gránulo.

A continuación se complementó la cepa mutante en el gen *phaD* mediante la expresión en *trans* del gen *phaD*. Para ello, se transformó *P. putida* KT42D₂ con el plásmido pIZD que induce la expresión de *phaD* en presencia de 1 mM de IPTG (Fig. 3). Como cepa control se utilizó el mutante *phaD* transformado con el vector pIZ1016.

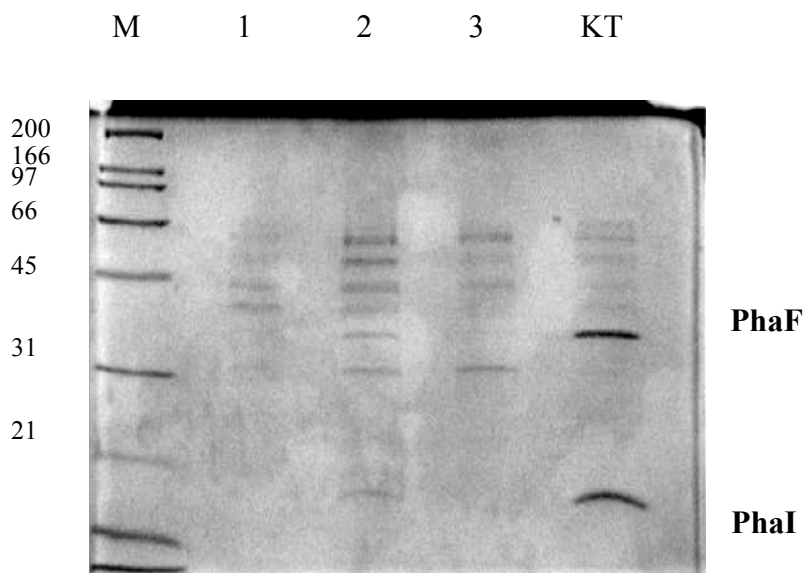


Figura 3. Análisis comparativo de proteínas asociadas al gránulo de las cepas complementadas (SDS-PAGE). M: Marcador, 1: *P. putida* KT42D₂, 2: *P. putida* KT42D₂ (pIZD), 3: *P. putida* KT42D₂ (pIZ1016), 4: *P. putida* KT2442.

Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que la cepa complementada produce las fasinas PhaF y PhaI asociadas al gránulo.

En la Figura 4 se observan las diferencias fenotípicas de *P. putida* KT2442, *P. putida* KT42D, y la cepa complementada. Claramente se observa la disminución de gránulos intracelulares de PHA, así como la segregación del gránulo durante la división celular, ocasionando células hijas sin PHA. Previamente se ha reportado que una mutación en la proteína PhaF afecta la presencia de PHA por ser un modulador durante la acumulación del gránulo, ocasionando efectos en la localización y distribución durante la división celular (Galan *et al.*, 2011).

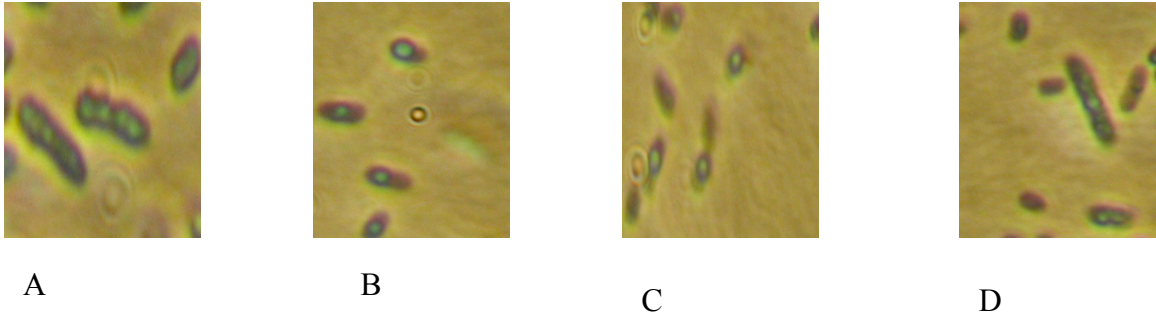


Figura 4. Fenotipo de cepa silvestre, mutante PhaD y mutante complementada después de 24 h de crecimiento. Fotografías tomadas al microscopio de contraste de fase. (A) *P. putida* KT2442, (B) *P. putida* KT42D₂, (C) *P. putida* KT42D₂ (pIZ1016), (D) *P. putida* KT42D₂ (pIZD).

3.2 Construcción de una cepa mutante de *P. putida* KT2442 en el gen regulador phaD.

En resultados anteriores se mostraron dos cepas mutantes construidas *P. putida* KT42D y *P. putida* KT42C₁ZC₂D, con un análisis comparativo de la expresión de proteínas PhaI y PhaF asociadas al gránulo. Se ha demostrado que la proteína PhaD desempeña un papel importante en la síntesis de mcl-PHA. Una cepa mutante en este gen produjo un 20% menos de PHA que la cepa silvestre, formándose más gránulos en el interior celular, aunque de menor tamaño. Estos efectos se han atribuido a la expresión alterada de las fasinas. La proteína PhaD es un regulador transcripcional de la expresión de PhaI y PhaF. El gen regulador *phaD* actúa como activador de la transcripción del promotor *P_i*, el cual

dirige la expresión de las proteínas asociadas al gránulo PhaI y PhaF. Con el fin de analizar la influencia de la presencia de las fasinas en la regulación mediada por la proteína PhaD, se ha construido una mutante de *P. putida* KT2442 en el gen *phaI* que codifica la fasina PhaI. La mutación se ha diseñado de forma que la transcripción del gen *phaF* se lleva a cabo mediante el promotor P_I (Fig. 5). Esta estrategia permitirá además observar como la proteína PhaI influye en la formación, tamaño y localización de gránulos intracelulares.

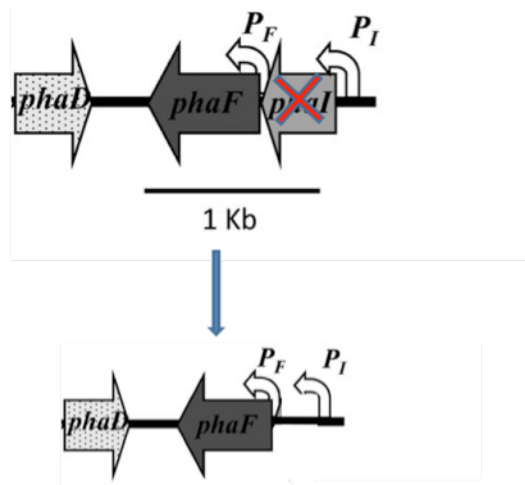


Figura 5. Mutación del gen *phaI*.

Se construyó una cepa mutante de *P. putida* KT2442 deletando el gen *phaI* mediante el sistema de entrecruzamiento por recombinación homóloga mediada por el plásmido pKmob18*sacB*. La cepa resultante se utilizó como *huésped* de la fusión transcripcional que se diseñará en el segundo objetivo.

En primer lugar, la cepa *E. coli* DH10B fue transformada con la construcción plásmidica pK18mobsac-mutI. Mediante conjugación triparental (previamente descrito) el plásmido pK18mobsac-mutI fue transferido a *P. putida* KT2442 (Fig. 3). Las cepas mutadas fueron seleccionadas mediante amplificación por PCR. En la Figura 6 (A) se observa que fueron probadas 10 posibles clones, de las cuales sólo en cuatro se amplificó el gen *phaF* y el promotor *Pi* de 784pb deletando el gen *phaI* en carriles 3, 4, 7, 9.

Pseudomas putida KT2442 y *P. putida* KT42I₂ fueron crecidas en condiciones de producción de PHA durante 24 h y los gránulos aislados fueron aislados y resuspendidos usando un gradiente de glicerol por centrifugación (de Eugenio et al., 2007). En la Figura 6 (B) muestra una comparación de la expresión de proteínas PhaF y PhaI asociadas al gránulo de las mutantes *P. putida* KT42I₂ con respecto a la cepa silvestre. Se puede observar que la fasina PhaI no es detectada en los gránulos cuando las células son cultivadas en condiciones de producción de PHA en presencia de octanoato.

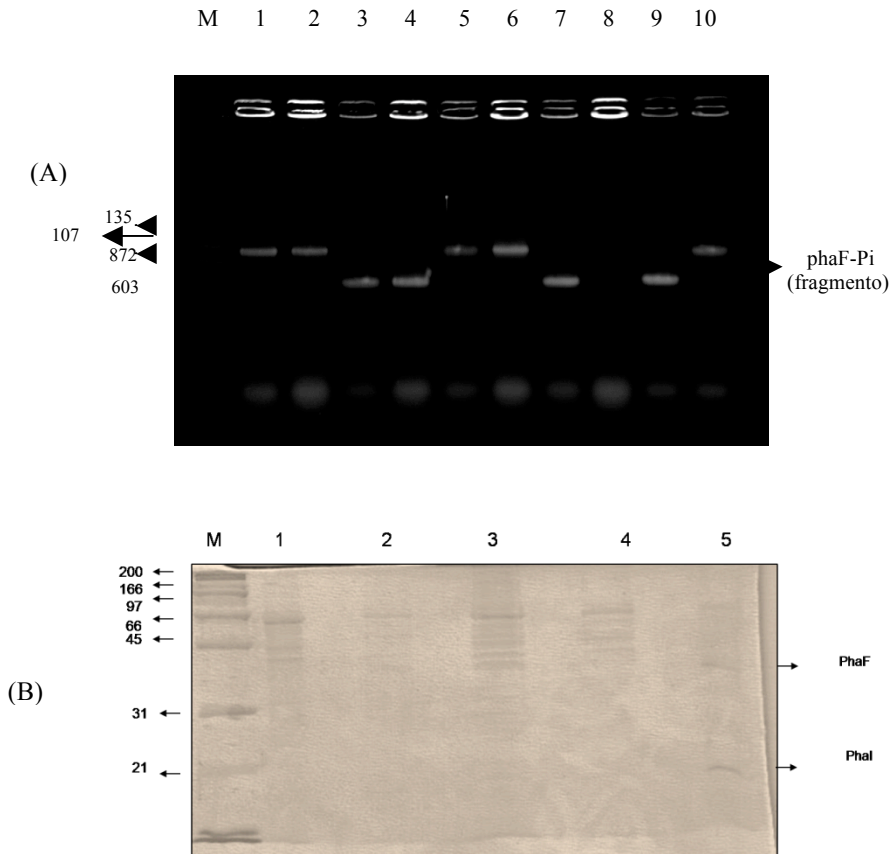


Figura 6. Obtención de la mutante *P. putida* KT42I₂. (A) Amplificación del fragmento *phaF-Pi*. M: marcador, 3:clon 4, 4:clon 7, 7: clon 13, 9:clon 22. Los otros carriles corresponden a clones negativos. (B) Análisis comparativo de proteínas asociadas al gránulo de 4 mutantes obtenidas y *P. putida* KT2442 (M: Marcador, 1: *P. putida* KT42I₂-clon-4, 2: *P. putida* KT42I₂-clon-7, 3: *P. putida* KT42I₂-clon-13, 4: *P. putida* KT42I₂-clon-22, 5: *P. putida* KT2442).

En la Figura 7 se observan las diferencias fenotípicas de *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT42I₂. Claramente se observa la disminución de número de los gránulos intracelulares

de PHA, así como la segregación del gránulo durante la división celular, ocasionando células hijas sin PHA.

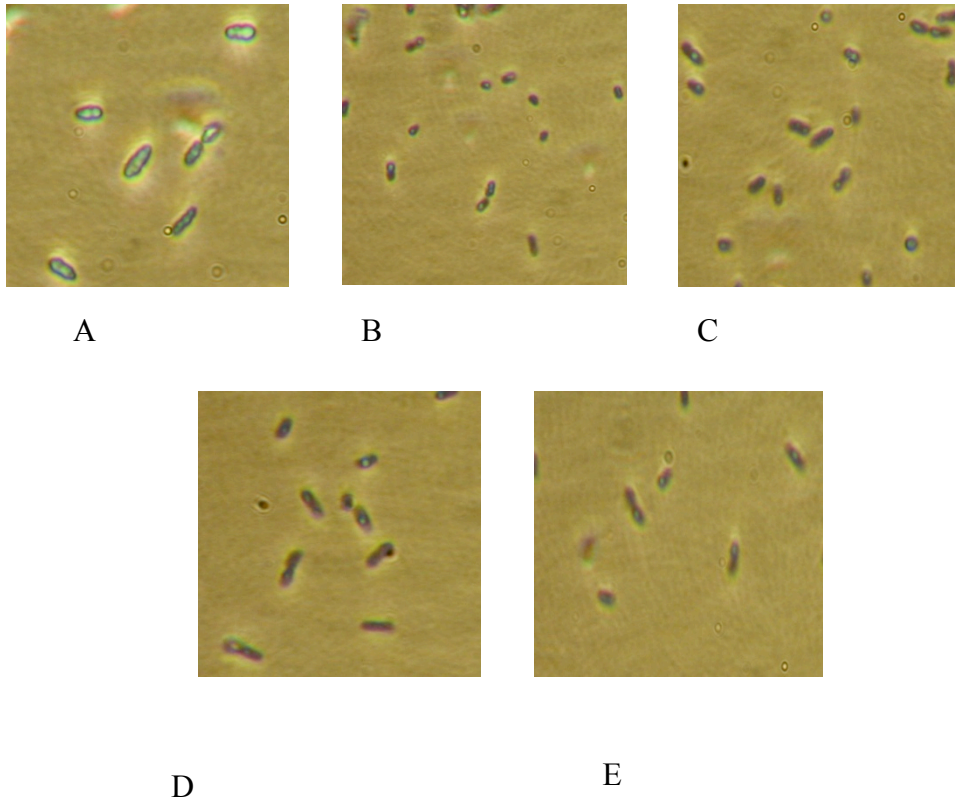


Figura 7. Fenotipo de cepa silvestre, mutantes PhaI. Fotografías tomadas al microscopio de contraste de fase. (A) *P. putida* KT2442, (B) *P. putida* KT42I₂-clon-4, (C) *P. putida* KT42I₂-clon-7, *P. putida* KT42I₂-clon-13, *P. putida* KT42I₂-clon-22.

3.3 Construcción de una fusión transcripcional entre el gen trazador *gfp* y el promotor.

En este objetivo se construyó una fusión transcripcional entre el gen trazador *gfp*, que codifica la proteína *green fluorescent protein*, y el promotor *P_i*, que dirige la

transcripción del operón *phaI-phaF*. Además, y en posición *upstream* al promotor *Pi*, se clonó en *cis* el gen regulador *phaD* con el promotor *Ptac*. El gen *phaD* actúa como activador de la transcripción del promotor *Pi*. El casete *phaD::Ptac-Pi::gfp* resultante se clonará en un plásmido pCAC4 con un minitransposon-Tn7 (De las Heras, *et. al.* 2008) para poder insertarlo en las cepas mutantes *phaD* y *phaI* construidas en el objetivo 1. El plásmido pCAC4 es un mini-Tn7 optimizado contiene los genes *tnsABCD* que son necesarios para el sitio y orientación específica de transposición de mini-Tn7 (Fig. 8). La organización de pCAC4 es tal que el segmento regulador/promotor que se inserta es un fragmento de DNA con sitios *NotI*, por tanto, el plásmido auxiliar es pUC18Not (A. de las Heras, 2008).

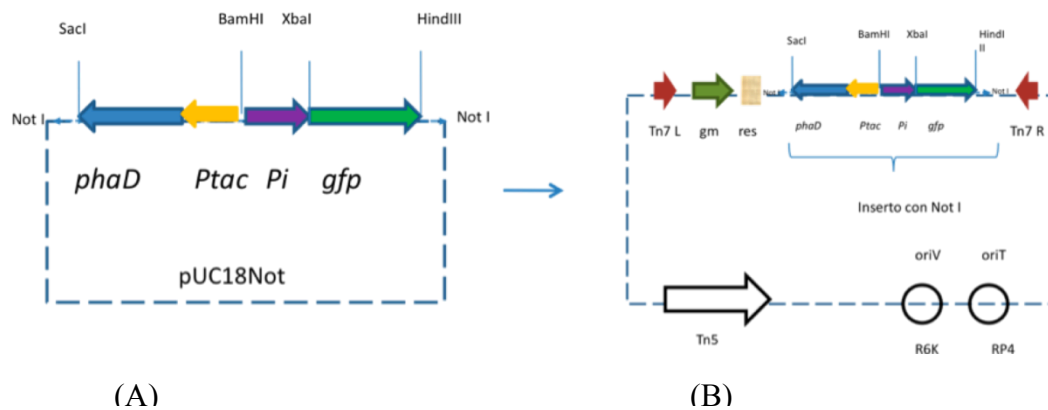


Figura 8. Diseño de la construcción para hacer el seguimiento de la actividad del promotor *Pi*. (A).

Casete *phaD::Ptac-Pi::gfp* clonado en pUC18Not (B). pCAC4 con Casete *phaD::Ptac-Pi::gfp*.

En la Figura 9 se observan los fragmentos *Ptac-phaD* y *Pi-gfp* amplificados. Estos fragmentos han sido confirmados por secuenciación y ligados al plásmido pUC18Not.

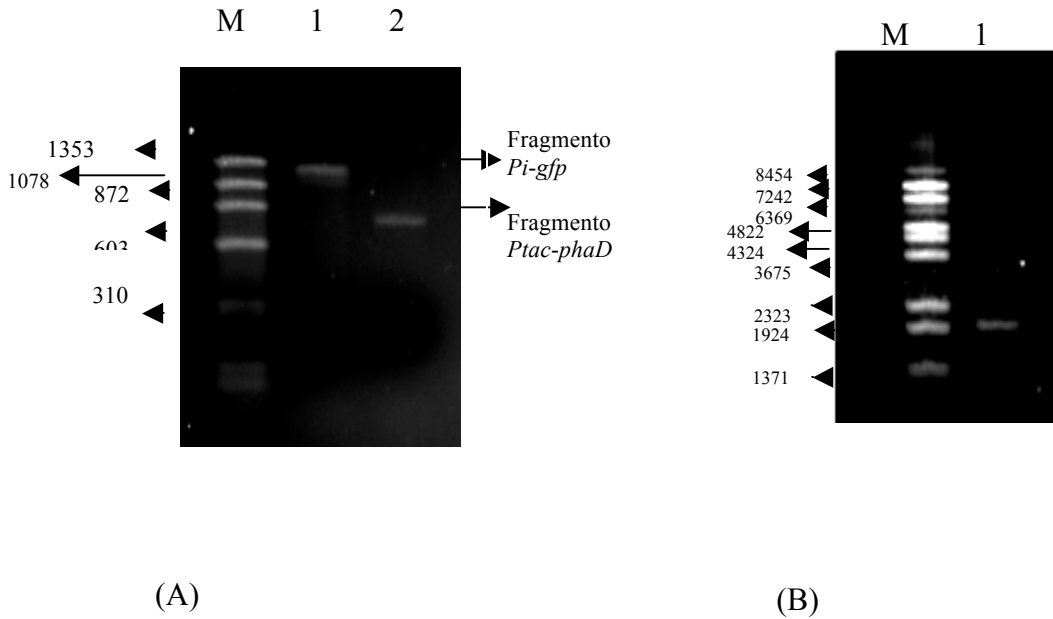


Figura 9. (A): M: Marcador; 1: Fragmentos *Pi::gfp* purificado de 1154pb, 2: Fragmento *Ptac-phaD* purificado de 820pb. (B): Fragmento *Ptac-phaD::Pi::gfp* purificado de1974pb.

Esta construcción será unida al plásmido pCAC4 que contiene el mini-Tn7, para después hacer un apareamiento triparental y usarlo como biosensor celular de la expresión de los genes que codifican las fasinias en *P. putida* KTD₂.

4. Conclusiones.

Este trabajo demuestra que PhaF juega un papel crucial en la localización de gránulos dentro de la célula. Las micrografías de fluorescencia mostraron que PhaF dirige los gránulos de PHA hacia el centro de las células. Nuestros estudios demostraron la existencia de dos poblaciones de células muy diferentes en la cepa que carecen de la proteína PhaF, es decir, células con y sin PHA. Los estudios de complementación definitivamente han demostrado un papel clave de PhaF en la segregación de gránulos durante la división celular y asegura la distribución equitativa de los gránulos entre las células hijas. Los estudios *in vitro* mostraron que PhaF se une al DNA a través de su dominio C-terminal de una manera no específica. Todos estos hallazgos sugieren un papel principal de PhaF sobre los gránulos de PHA es a través de interacciones como la segregación de los cromosomas.

5 Perspectivas

Al mutar *phaI*, se observó una dependencia de funcionamiento de *phaF*, esto se podrá comprobar haciendo estudios de regulación de expresión, para observar la dependencia de ambas enzimas.

El biosensor construido permitirá estudiar el funcionamiento del regulador *Pi* en la actividad de *phaF* y *pha I*.

Además, permitirá analizar el nivel de actividad enzimática al probar diferentes fuentes de carbono para la producción de PHAs.

8.2 Apéndice II: Procedimientos

Las fórmulas de técnicas moleculares fueron proporcionadas por el Dr. Rodolfo Marsch Moreno.

1.1 Preparación de buffer de carga

Solución de carga: El buffer de carga fue preparado con las siguientes concentraciones: Glicerol 30.0 %, EDTA (pH 8.0) 25.0 mM, Naranja G 0.025 %. La solución se almacenó a 4°C.

1.2 Preparación de marcador de DNA λ digerido con la enzima *StyI*

Para preparar 3 ml de marcador:

Mezcla de digestión	Volumen	Concentración
λ (500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) New England Biolabs, Inc	300 μl	150.0 μg
Regulador "Cuts all" 10X	50 μl	
<i>StyI</i> (10 u/ μl)	20 μl	200.0 u
Agua destilada estéril	130 μl	
Volumen final	500 μl	

Incubar a 37°C por 2 h, tomar 1 μl para comprobar la digestión completa del DNA, mediante electroforesis y continuar con la preparación:

Mezcla para rellenar extremos de λ con Klenow	Volumen	Concentración
λ (<i>StyI</i>)	499 μl	150.0 μg
dNTPs (5 mM c/u)	10 μl	
Klenow (5 u/ μl)	2 μl	10.0 u
Volumen final	511 μl	

Incubar a 37°C por 15 min. e inactivar Klenow calentando a 65°C por 20 min.

Solución de marcador final:

Solución de marcador final	Volumen	Concentración
λ (<i>Sfy</i> I + Klenow)	511 μ l	150.0 μ g
Buffer de carga	1,200 μ l	
Agua destilada estéril	1,289 μ l	
Volumen y concentración final	3,000 μ l	50.0 ng/ μ l

Dosificar y almacenar a -20°C.

1.3 Preparación de plásmidos (miniprep) por la técnica modificada de Birnboim y Doly (BD).

Solución I BD ^a :	Volumen (ml)	Concentración Final
Tris·HCl (pH 8.0) 1 M	1.25	25 mM
EDTA 0.25 M	2	10 mM
Glucosa 1 M	2.5	50 mM
Agua destilada c.b.p.	50	

Sol IBD :Se almacenó a 4 °C

Solución II BD:	Volumen	Concentración final
NaOH 1 N	5.00	0.2 N
SDS al 10 %	2.50	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	25.00	

Sol II BD: Guardar a temperatura ambiente (únicamente dos meses).

Solución III BD:	Volumen
Acetato de potasio 5 M	30.00
Ácido acético glacial	5.75
Agua destilada c.b.p.	50.00

Sol III BD: Se almacenó a 4°C.

Procedimientos de preparación a pequeña escala.

- De cultivo en placa o medio líquido :
- A partir de medio líquido, colocar en un tubo para microcentrífuga, 3 mL de un

cultivo de toda la noche en el medio selectivo apropiado, centrifugar 1 min en una microcentrífuga, eliminar el sobrenadante, agregar 150 ml de solución I BD y agitar hasta que se resuspenda el paquete celular.

- A partir de un cultivo en placa de toda la noche en medio selectivo sólido, tomar una asada gruesa y resuspenderla en 150 ml de solución I BD, en un tubo para microcentrífuga.
- Agregar 300 ml de la solución II BD y agitar en agitador orbital por 30 seg y dejar reposar 5 min en un baño de hielo.
- Agregar 300 ml de la solución III BD, agitar por inversión unas 100 veces para mezclar perfectamente y dejar reposar en el baño de hielo por 10 min.
- Centrifugar por 10 min (de preferencia a 4°C) y transferir el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga nuevo y estéril.
- Agregar 700 ml de isopropanol, agitar bruscamente por inversión y dejar reposar por 10 a 15 min en el baño de hielo o bien, por 20 min a -20°C.
- Centrifugar por 15 min (de preferencia a 4°C) y eliminar el sobrenadante.
- Para eliminar el exceso de sales agregar 1 ml de etanol al 70 %, agitar en agitador orbital por 30 seg y centrifugar nuevamente por 5 min, eliminar el sobrenadante.
- Secar la pastilla calentando a 56 ó 65°C el tiempo requerido y resuspenderla con 40 ml de agua bidestilada estéril.

1.4 Técnica para rellenar extremos de DNA.

Para rellenar los extremos de DNA lineal, utilizar el fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Fragmento Klenow), obtener el DNA lineal cortando con la

endonucleasa de restricción adecuada en el regulador apropiado, no es necesario inactivar la enzima de restricción (excepto cuando se desee un corte parcial), limpiar el DNA, ni eliminar el regulador.

- Colocar juntos todos los componentes de la mezcla de reacción según la siguiente tabla: Incubar a 37°C por 10 min, inactivar a 65°C por 20 min

Mezcla de reacción	Volumen (µl)	Cantidades
DNA cortado		de 0.1 a 5.0 µg
Regulador de ligación 5 X	8.0	
dNTPs ^c (5 mM ^c /u)	1.0	
Klenow (4 ó 5 u/µl)	0.5	2 a 2.5 u
Agua destilada estéril c.b.p.	40.0	

1.5 Preparación de células para transformación y electrotransformación.

Preparación de células competentes en pequeña escala.

- Con un cultivo de toda la noche, inocular un matraz con medio fresco, el volumen del inóculo es de la centésima parte del volumen de medio.
- Incubar a 37°C con agitación vigorosa durante 90 min.
- Enfriar rápidamente el matraz en un baño de hielo.
- Colocar en tubos de microcentrífuga estériles y fríos, 1.5 ml del cultivo frío.
- Centrifugar por 1min. Descartar el sobrenadante.
- Agregar 100 µl de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 15%, resuspender haciendo uso de un agitador orbital a la máxima velocidad por 5 a 10 seg. Enfriar inmediatamente en el baño de hielo.
- Centrifugar por 25 seg. Descartar el sobrenadante y resuspender con 33 µl de la solución fría de CaCl₂ y glicerol.

- Después de 5 min en baño de hielo, agregar la solución de DNA, a razón de 3.3 ml por tubo y continuar con la transformación como se indicó arriba.

Procedimiento de transformación de E. coli

- Descongelar las células competentes en un baño de hielo, transferir 100 μ l de la suspensión de células competentes a cada uno de los tubos para microcentrífuga que se requiera (los tubos deben estar enfriados previamente).
- Agregar la solución de DNA, el volumen no debe ser mayor de 10 μ l, mezclando suavemente mientras se va depositando el DNA en el seno de la suspensión bacteriana, incubar en el baño de hielo por 20 min.
- Dar un choque térmico a las células, incubando a 42°C C por 90 sec.
- Incubar nuevamente en el baño de hielo por 2 min.
- Agregar 1 ml de caldo LB, incubar con agitación vigorosa a 37°C por 1 h.
- Sembrar sobre las placas con medio selectivo, incubar a 37°C por toda la noche.

Preparación de células electrocompetentes de Cupriavidus necator.

- De un cultivo fresco en NR, tomar seis a ocho colonias aisladas y con la morfología característica de *Cupriavidus necator*, e inocular un matraz con 20 ml de NR. Incubar en agitación a 30°C por toda la noche.
- Inocular dos matraces con 200 ml de NR cada uno, con 10 ml del cultivo anterior. Incubar en agitación a 30°C, hasta alcanzar una DO₆₂₅ entre 5.0 y 6.0.
- Centrifugar en frío en frascos para centrifuga de 500 ml limpios y estériles, por 7 min a 900 x g. Descartar el sobrenadante.

- Resuspender las células en el mismo volumen que el del cultivo, con glicerol al 10%, preparado con agua destilada y desionizada, y esterilizado en autoclave, la solución debe estar fría (0-4°C) y los frascos se deben mantener en un baño de hielo. Centrifugar con las mismas condiciones y descartar el sobrenadante.
- Hacer otro lavado con glicerol al 10% frío, utilizando ahora sólo 100 ml en total, centrifugar y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 20 ml de glicerol al 10% frío y juntar las células en un sólo frasco. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 2 ó 3 ml de glicerol al 10% frío y transferir en volúmenes de 100 µl, a tubos para microcentrífuga nuevos, estériles y enfriados en el baño de hielo. Congelar las células con nitrógeno líquido y guardar los tubos a -80°C.

Electrotransformación de *Cupriavidus necator*.

- Descongelar las células electrocompetentes en un baño de hielo.
- Mezclar de 1 a 10 µl de la solución de DNA (dializada contra agua desionizada estéril), con 50 µl de células y colocarlas en una celda para electrotransformación fría.
- Colocar los indicadores del aparato de electrotransformación, BIO-RAD Gene Pulser™, en 1.8 kV, 200 Ω y 25 µF y efectuar la descarga. El tiempo de descarga generalmente es de 5.2 a 5.5 mseg.
- Agregar inmediatamente 950 µl de NR e incubar con agitación vigorosa por 1 h a 30 °C.
- Sembrar en el medio selectivo e incubar a 30°C hasta la aparición de colonias.

1.6 Tinción Azul Nilo

Se requieren dos soluciones:

a) solución acuosa al 1% de Azul Nilo A : (sigma Chemicals 0766. lote 017H4384).

La solución debe ser filtrada antes de su uso. Para una mejor disolución se calienta de manera moderada. Con este colorante no es necesario el reflujo con solución ácida para formar la oazona.

b) solución acuosa al 8% de ácido acético.

Procedimiento de tinción.

a). Hacer un frotis delgado a partir de células lavadas (dos veces). (con solución salina y agua destilada respectivamente).

b). Secar la preparación al calor.

c). Cubrir con colorante azul nilo a 55°C por 10 min.

d). Lavar con agua destilada

e). Remover el exceso de colorante con sol. acética al 8%

d). Lavar la preparación

f). Dejar secar

g). Humedecer con una gota de agua y colocar un cubreobjetos.

h). Observar a microscopio con luz UV a 460 nm.

La máxima excitación del colorante se obtiene a 362 nm. Aunque 460nm es adecuada para la observación microscópica. Por lo general la fluorescencia se incrementa al aumentar la concentración de PHB. Sin embargo no se recomienda el uso de esta tensión para cuantificar PHB.

1.7 Tinción Rojo Nilo

Preparar una solución:

1 mg del Nilo rojo ml^{-1} de acetona

Procedimiento:

10 μl de solución madre del Nilo de color rojo se adicionan 1ml de muestra y se mantiene en la oscuridad durante 15 min. La fluorescencia de la Red del Nilo se emite con una línea de 488 nm láser y las emisiones entre 580-620 nm.

1.8 Determinación de hidroxiácidos por cromatografía de Gases

1.8.1 Propanolisis de Hidroxiácidos

Esta técnica es una adaptaciones a dos métodos propuestos por Braunegg *et al.*, (1978) y Riis y Mai (1988).

Soluciones:

1. Preparar una solución de 1-propanol con HCl al 20 %.
2. Preparar una solución de 2.0 g de ácido benzoico en 50 ml de propanol, usado como estándar interno.

Procedimiento:

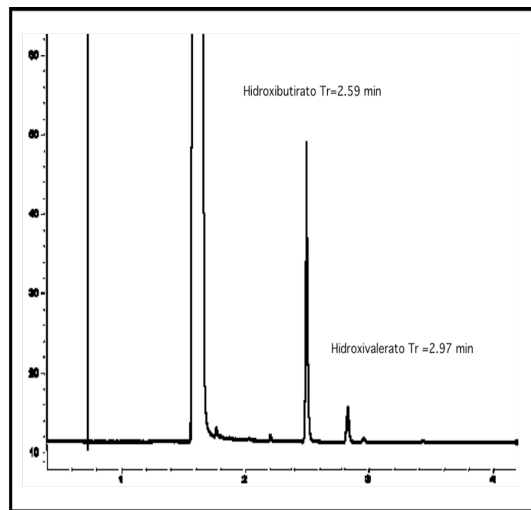
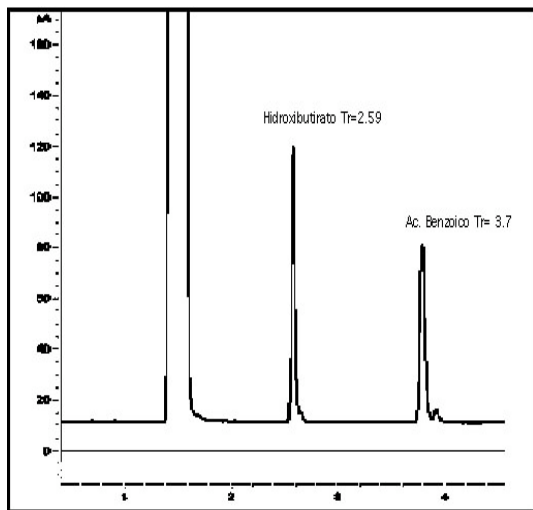
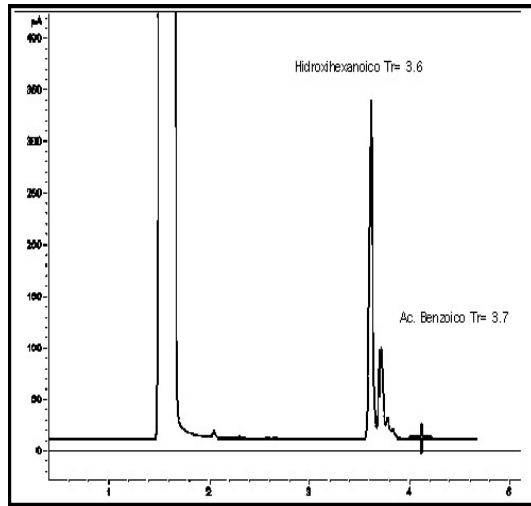
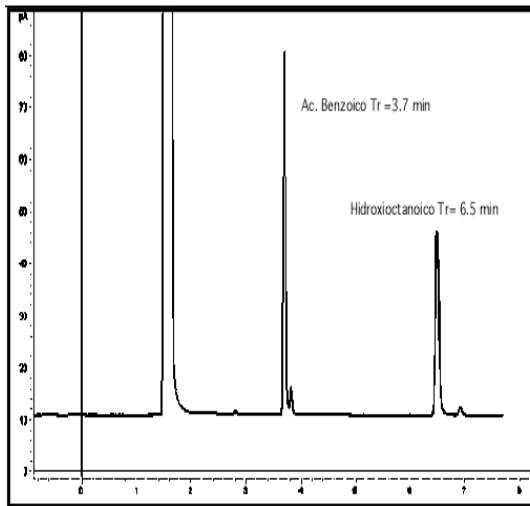
Centrifugar 3 ml de muestra en dos tubos eppendorf (1.5 ml c/u) a 10000 rpm durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y adicionar 1 ml de propanol ácido al 20%. (sol 1).

Primero añadir 0.5 ml en el tubo eppendorf, resuspender y vaciarlo en un tubo HACH con rosca, después agregar otros 0.5 ml para enjuagar el tubo eppendorf y vaciarlo en el tubo HACH nuevamente.

Adicionar al tubo 2 ml de cloroformo, y 50 ml de sol 2 sellarlos con cinta teflón, poner a 100°C durante 4h en el digestor HACH.

Una vez concluido el tiempo, enfriar a temperatura ambiente y adicionar 1 ml de agua desionizada y agitar vigorosamente durante 1min. Dejar reposar y esperar a que se formen las dos fases, tomar la fase orgánica (inferior) con una pipeta Pasteur colocarla en un vial, posteriormente se filtra y se inyecta al cromatógrafo de gases 1 ml de muestra siempre y cuando el Cromatografo de Gases ya haya alcanzado las condiciones antes mencionadas. El tiempo de retención de estandar (β -hidroxibutirato) y ácido benzoico es de 3.5 min y 4.5 min respectivamente.

1.8.2 Tiempos de retención obtenidos para los hidroxiacidos analizados



9. BIBLIOGRAFÍA

- Bozell JJ, Landucco R. (1993) Alternative Feed stocks Program Technical and Economic Assessment: Thermal/Chemical and Bioprocessing Components, US Department of Energy, Office of Industrial Technologies. Washington DC, pp. 11–126.
- Akaraonye E, Keshavarz T and Roy I (2010) Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol* 85: 732–743.
- Steinbüchel A (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol Biosci* 1: 1–24.
- Madison L, Huisman W (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hidroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:21-53.
- Khanna S, Srivastava A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* 40: 607-619.
- de Eugenio, L. I., P. Garcia, J. M. Luengo, J. M. Sanz, J. S. Roman, J. L. Garcia, and M. A. Prieto. 2007. 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.* 282:4951-4962.
- Salehizadeh H. Van Loosdrecht M (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological important. *Biotechnology Advances*. 22: 261-279..
- Plastics prices Pretty pricey polymer. The economist (2011)
<http://www.economist.com/node/21015854>
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. *Biotechnol Adv* 25: 148-175.
- Verlinden. R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka, I. (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* 102: 1437-1449.
- Rudnik E (2008) Compostable Polymer Materials ISBN: 978-0-08-045371-2 Amsterdam, The Netherlands. (Eds) Elsevier.

- Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J* 16: 81-96.
- Matsusaki H, Abe H, Doi Y (2000) Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules* 1:17-22.
- Park S, Choi J, Lee S (2005) Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme and Microbial technology* 36:579-588.
- Keshavarz T, Roy I (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr Opin Microbiol* 3:321-6.
- Jendrossek D (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol* 191:3195.
- Ojumu T, Yu J, Solomon B (2004) Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* 3: 18-24.
- Hocking PJ, Marchessault RH (1994) In: Chemistry and technology of biodegradable polymers. Griffin GJL (eds) Blackie Academic. New York, pp. 48-96.
- Reddy C, Ghsi R, Rashmin, Kalia V (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*. 87: 137-146.
- Park JM, Kim TY, Lee SY (2011) Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems biology* 5:101.
- Yu J, Si Y (2004). Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on Short Chain Fatty acids. *Biotechnol Prog* 20:1015-1024.
- Suriyamongkol P, Weselake R, Suresh N, Moloney M, Shah S (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants-A review. *Biotechnological Adv* 25:148-175.
- Qi, Q. and Rehm, B.H.A. (2001) Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* 147: 3353–3358.
- Amara, A.A. and Rehm, B.H.A. (2003) Replacement of the catalytic nucleophile Cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa* - mediated synthesis of a new polyester: Identification of catalytic residues. *Biochem J* 374: 413–421.

- Yuan, W., Jia, Y., Tian, J., Snell, K.D., Muh, U., Sinskey, A.J., Lambalot, R.H., Walsh, C.T. and Stubbe, J. (2001) Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies. *Arch Biochem Biophys* 394: 87–98.
- McCool, G. and Cannon, M.C. (2001) PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol.* 183: 4235–4243.
- Chanprateep, S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Bioscience Bioengineering.* 110: 621-632.
- Pantazaki AA, Papanephytous CP, Pritsa AG, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA. (2009) Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* 44:847-853.
- Chee JY, Y SS, Lau NS, Ling SC, Abed RMM, Sudesh K (2010) Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. In Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (Ed.) Vol.2, pp.1395-1404. ISBN (13):978-84-614-6195-0 Formatex Research Center (Spain).. 1395-1404.
- Shang L, Jiang M, Yun Zh, Yan HQ, Chang HN (2008). Mass production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *Pseudomonas putida*. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 2783-2787.
- Koller M, Bona R, Chiellini E, Fernandes EG, Horvat P, Kutschera C, Hesse P, Braunegg G (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresour. technol.* 99: 4854-63.
- Solaiman D, Ashby R, Hotchkiss A, Foglia T (2006). Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. *Biotechnol Lett.* 28:57-162.
- Albuquerque MGE, Eiroa M, Torres C, Nunes BR, Reis MAM (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130:411-421.
- Mothes G, Schnorpfel C, Ackermann JU (2007). Production of PHB from Crude Glycerol. *Eng. Life Sci.* 7: 475-479.
- Bubalan K, Kam, Y C, Yong K H, Sudesh, K. Cloning and expression of the PHA synthase gene from a locally isolated *Chromobacterium* sp. USM2 Malaysian *J. Microbiol.* 6:81-90.
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Nomura, C. T. and Sudesh, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3- hydroxyvalerate

- precursors. *Bioresource Technology*. 99: 6844-6851.
- Tsuge T, Saito Y, Kikkawa Y, Hiraishi T, Doi Y (2004) Biosynthesis and compositional regulation of Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyhexanoate)] in recombinant *Ralstonia eutropha* expressing mutated polyhydroxyalkanoate synthase genes. *Macromol Biosci*. 4:238-242.
- Akiyama, M., Tsuge, T. and Doi, Y. (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym Degrad Stab*. 80:183-94.
- Loo, C.Y., Lee, W.H., Tsuge, T., Doi, Y. and Sudesh, K. (2005) Biosynthesis and Characterisation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wausteria eutropha* mutant. *Biotechnol Lett*. 27: 1405-1410.
- Antonio R, Steinbüchel A, Rhem B (2000) Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. *Fems Microbiol Lett*. 182: 111-117.
- Dennis D, McCoy M, Stangl A, Valentin HE, Wu Z, (1998) Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *J Biotechnol*. 64: 177-186.
- Sun ZY, Ramsay JA, Guay M, Ramsay BA (2007). Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75:475-485.
- Rehm, B.H.A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*. 376: 15-33.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Birnboim, H. C., y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res*. 7:1513-1523.
- Lynch MD, Gill RT (2006) Broad host range vectors for stable genomic library construction. *Biotechnol Bioeng*. 94: 151-158.
- Pridmore RD (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*. 56: 309-12.
- Saegusa H, Shiraki M, Saito T. (2002) Cloning an Intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and Identification of the Active Site Serine Residue by Site-Direct Mutagenesis. *J Biosci Bioeng*. 94:106-112.

- Shinohe T, Nojiri M, Saito T, Stanislawski T, Jendrossek D. (1996) Determination of the active sites serine of the Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases of *Pseudomonas lemoignei* (PhaZ5) and *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 141:103-109.
- Kanter-Smoler G, Sunnerhagen P (1994) pBBR1MSC: A Broad-Host-Range Cloning vector. *BioTechniques.* 16:800-802.
- Szpirer C, Faelem M, Couturier M. (2001) Mobilization Function of the pBHR1 Plasmid, a Derivative of the Broad-Host-Range Plasmid pBBR1. *J Bacterol.* 183: 2101-2120
- Yan Q, Du G, Chen J (2003) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.* 39: 387-391.
- Waterburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem.* 39: 971-974.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-428.
- Nojima S, Aktutsu Y, Akaba M, Tanimoto S (2005) Crystallization behavior of Poly(ϵ -caprolactone) blocks Starting from polyethylene lamellar morphology in poly(ϵ -caprolactone)-block-Polyethylene copolymers. *Polymer.* 46:4060–4067.
- Gunaratne LMWK, Shanks RA, Amarasinghe G (2004) Thermal history effects on crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate). *Thermochim Acta.* 423:127–135.
- Kek IK, Chang CW, Amirul AA, Sudesh K (2010) Heterologous expression of *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 PHA synthase gene in PHB⁻⁴ mutant for the production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:1595-1603.
- Chen JY, Zhang L, Chen JC, Chen GQ (2007) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate copolyesters in *Ralstonia eutropha* PHB⁻⁴ harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC_{2Ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Chin J Chem Eng.* 15:391-396.
- Loo CY, Lee WH, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K (2005) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnol Lett.* 27:1405–1410.
- Fukui T, Doi Y (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.* 179:4821–4830.
- Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polym Degrad Stab.* 83:79–86.

- Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, Shiotani T, Shima Y, Doi Y (1994) Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromol.* 27:878-880.
- Bhubalan K, Lee WH, Loo CY, Yamamoto T, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K (2008) Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and HV-presursors. *Polym Degrad Stab.* 93:17-23.
- Keenan TM, Nakas JP, Tanenbaum SW (2006) Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33: 616–626
- Chia KH, Ooi TF, Saika A, Tsuge T, Sudesh K (2010) Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymers with high elastic property by *Cupriavidus necator* PHB⁴ transformant. *Polym Degrad Stab* 95:2226-2232.
- Aneja KK, Ashby RD, Solaiman DKY (2009) Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalkanoate) through expression of PHA synthase from *Allochromatium vinosum* ATCC 35206. *Biotechnol Lett.* 31:1601-16127.
- de Eugenio L.I., García P., Luengo, J.M., Sanz, H.M., Roman, J.S., García, J.L., Prieto., M. A. 2007. Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular médium Caín length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J Biol Chem.* 16;282(7):4951-62.
- De Eugenio L.I., Galan B., Escapa I.F., Maestro B., Sanz J.M., Garcia J.L. and Prieto M.A 2010. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environ. Microbiol.* 12:1591-1603.
- Galan B., Dinjaski N., Maestro B, de Eugenio L.I, EscapaI.F., Sanz J.M and Prieto M.A. 2011. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442.. *Mol. Microbiol.* 79:402-418.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* 41:98-105.
- Luengo, J.M., B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro, E. R. Olivera. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:251-60.
- Madison, L.L., and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:21-53.

- Miller W.G , Lindow S.E. 1972. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. [Gene](#) 191: 3
- Moldes, C., P. García, J. L. García, and M. A. Prieto. 2004. In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl. Env. Microbiol.* 70:3205-3212.
- Moldes C., G.P. Farinós, L.I. de Eugenio, P. García, J.L. García, F. Ortego, P. Hernández-Crespo, P. Castañera and M. A. Prieto. 2006. New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *App Microbiol Biotech.* 72: 88-93.
- Nelson, K.E., C. Weinel, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J.A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler, and C.M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4:799-808.
- Prieto, M. A., B. Buehler, K. Jung, B. Witholt, and B. Kessler. 1999a. PhaF, a polyhydroxyalkanoate granule associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GP01 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* 181:858-868.
- Prieto, M. A., de Eugenio L.I., Galan, B., Luengo, J.M., Witholt, B. 2007. *Pseudomonas*: A Model System in Biology. 14:397-429.
- Steinbüchel, A., and Valentin H.E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219-228.
- Steinbüchel, A., K. Aerts, W. Babel, C. Föllner, M. Liebergesell, M. H. Madkour, F. Mayer, U. Pieper-Fürst, A. Pries, H. E. Valentin, and R. Wieczorek. 1995. Considerations of the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41:94-105.
- Zinn, M., B. Witholt and T. Egli. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Rev.* 53:5-21.