



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Producción mejorada de polihidroxicanoatos en *Cupriavidus necator* utilizando una  
nueva estrategia de ingeniería metabólica.**

Tesis que presenta

**Alexis Jenatzy García Sebastian**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: Fermín Pérez Guevara

Asesores:

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la **Beca de Maestría del CONACYT (777136)**.

Al **CINVESTAV-IPN** por brindarme apoyo financiero, un lugar donde elaborar el proyecto, así como una educación competitiva y una formación como futuro investigador.

Al **Dr. Fermín Pérez Guevara** por apoyarme, corregirme, dirigirme, por ser un líder durante el desarrollo experimental y escrito de esta tesis, seminarios y tutoriales.

A mis padres, **Edith Sebastian Castro** y **Enrique Garcia Vazquez**, mi hermana **Itzel Guadalupe Garcia Sebastian**, por apoyarme a lo largo del proyecto y de mi vida. A mi pareja **Delia Zacnite Garcia Vargas** por su apoyo incondicional, su apoyo moral y emocional.

A mis compañeros de laboratorio, el **M. en C. Joel Alba Flores**, al **Técnico en Investigación Luis Francisco Flores Velazco**, al **Dr. Gurusamy Muniasamy** y al **M. en C. Leobardo Ottmar Palma Gallardo** por su apoyo, paciencia, guía y consejos durante el desarrollo del proyecto y los seminarios de investigación.

A mis sinodales el **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera** y el **Dr. Rodolfo Marsch Moreno**, por sus consejos, aportes, sugerencias, revisiones y discusiones para integrar mis conocimientos durante el desarrollo experimental y escrito de este trabajo, así como para mi formación como M. en C.

# Índice

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | 1  |
| Introducción .....   | 1  |
| Bacterias productoras de PHA y <i>C. necator</i> .....                                       | 1  |
| Rutas de producción de PHA.....  | 3  |
| Comparación de PhaJs y PhaCs .....   | 4  |
| Características de los PHAs .....  | 6  |
| Cepas mutantes de <i>C. necator</i> .....  | 8  |
| Comercialización y aplicaciones en los PHAs .....  | 8  |
| Identificación de gránulos de PHA mediante Rojo Nilo .....                                   | 8  |
| Identificación de PHA mediante cromatografía de gases .....                                  | 9  |
| Nueva estrategia de ingeniería .....   | 9  |
| Hipótesis.....   | 11 |
| Justificación:.....  | 11 |
| Objetivo general.....  | 11 |
| Objetivos particulares .....   | 11 |
| Metodología.....   | 12 |
| 1. Resumen de la metodología utilizada .....   | 12 |
| 2. Plásmidos y cepas utilizadas .....  | 13 |
| 3. Stock de glicerol y reactivación de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>C. necator</i> ..... | 14 |
| 4. Transformación química por choque térmico .....   | 14 |
| 5. Lisis de las células.....   | 15 |
| 6. Recuperación del DNA plasmídico a pequeña escala .....                                    | 15 |
| 7. Recuperación del DNA plasmídico a mediana escala .....                                    | 16 |
| 8. Preparación de gel de electroforesis .....  | 17 |
| 9. Digestión con enzimas de restricción.....   | 17 |
| 10. Tratamiento con la ligasa .....  | 18 |
| 11. Polimerización azarosa de fragmentos .....   | 18 |
| 12. Preparación de células electro competentes.....  | 18 |
| 13. Transformación por electroporación .....   | 19 |
| 14. Cultivo en matraz .....  | 19 |
| 15. Microscopia de fluorescencia .....   | 20 |
| 16. Recolección de biomasa y eliminación del aceite residual .....                           | 20 |

|   |    |
|---|----|
| 17. Extracción del polímero .....                                     | 20 |
| 18. Cromatografía de gases .....                                      | 20 |
| Resultados y discusión .....  | 21 |
| 1. Plásmido y gen <i>in silico</i> .....                              | 21 |
| 2. Resumen de la construcción del plásmido.....                       | 23 |
| 3. Preparación del plásmido pMPJAS01 y del fragmento de interés ..... | 24 |
| 4. A): Transformación y comprobación del plásmido P1P0 .....          | 25 |
| 5. Comprobación de la orientación.....                                | 26 |
| 6. Transformación de <i>C. necator</i> DSM-541 y SE-2133 .....        | 28 |
| 7. Biomasa final en peso seco .....                                   | 29 |
| 8. Microscopia de fluorescencia .....                                 | 29 |
| 9. Extracción y purificación del polímero.....                        | 30 |
| 10. Cromatografía de gases .....                                      | 31 |
| Conclusiones .....  | 33 |
| Observaciones, recomendaciones y perspectivas a futuro .....          | 33 |
| Referencias.....  | 34 |
| Apéndices.....  | 38 |
| Soluciones y amortiguadores.....                                      | 38 |
| Apéndice 1: Soluciones para amortiguadores de transformación.....     | 38 |
| Apéndice 2: Amortiguadores y soluciones de lisis celular .....        | 38 |
| Apéndice 3: Medios de cultivo y agarosa .....                         | 39 |

## Índice de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Bacterias productoras de PHA y porcentaje de PHA del peso seco. ....  | 2  |
| Tabla 2 Diferentes tipos de PhaC de diferentes microorganismos y la gama de sustratos que pueden utilizar. ....   | 5  |
| Tabla 3 Diferentes tipos de PhaJ de diferentes microorganismos, su afinidad y gama de sustratos. ....   | 5  |
| Tabla 4 Comparativa de los diferentes trabajos que utilizan enzimas recombinantes y sus resultados reportados. ....   | 6  |
| Tabla 5 Propiedades térmicas y de tensión de los mcl-PHA (Dartailh et al., 2021). ....  | 7  |
| Tabla 6. Propiedades mecánicas de PHB comercial (dos Santos et al., 2017). ....   | 7  |
| Tabla 7 Cepas mutantes utilizadas, tipo de fermentaciones y polímeros producidos mediante co-expresión reportados en literatura (Budde et al., 2011; Jung et al., 2019; Valdés et al., 2018b). .... | 8  |
| Tabla 8 Cepas mutantes de <i>C. necator</i> utilizadas en el trabajo. ....  | 14 |
| Tabla 9 Características generales de las reacciones de restricción. ....  | 17 |
| Tabla 10 Características generales de una reacción de ligación. ....  | 18 |
| Tabla 11 Gama de separación en gel a diferentes concentraciones de Agarosa (Sambrook, J., E. F. Fritsch, 1989) ....   | 39 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Esquema representativo de la ruta de la $\beta$ -oxidación y la producción de PHA a partir de esta (Riedel et al., 2014).....   | 3  |
| Figura 2 Mapa descriptivo de las rutas de producción de PHA en <i>C. necator</i> (Liu et al., 2022).<br>.....  | 4  |
| Figura 3 Microscopía de fluorescencia de células cultivadas en placas de agar MMY suplementadas con glucosa al 2 % y teñidas con rojo Nilo, en las que se puede observar la acumulación de inclusiones intracelulares después de 72 h de incubación a 14 °C, en contraste con los controles negativos. Las imágenes de las células se tomaron con un microscopio ZEISS Axio Observer 7 a 100X y la intensidad de fluorescencia normalizada a 1500 para todas las imágenes. La barra de escala muestra 2 $\mu$ m (Christensen et al., 2021). .... | 9  |
| Figura 4 Gen quimérico propuesto que codifica la enzima PHA sintasa unida a la enzima Enoil CoA hidratasa conectadas mediante el enlazador (GS)8. ....   | 10 |
| Figura 5 Resumen de la metodología del proyecto.....   | 12 |
| Figura 6 Esquema representativo de los plásmidos pMPJAS01 (A) y pUC94 (B) con los sitios de restricción más relevantes (elaborado en SnapGene 3.2.1). ....   | 13 |
| Figura 7 Representación gráfica del fragmento que se mandó a sintetizar en GenScript, con todos sus elementos. ....  | 21 |
| Figura 8 Plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés insertado in silico (elaborado en SnapGene 3.2.1).....  | 22 |
| Figura 9 Modelado <i>de novo</i> en el software de tr-Rosetta visualizado con PyMol (Schrodinger, versión 2.5), en color naranja se observa la proteína PhaJ, en color azul el enlazador GS8 y en color magenta la proteína de PhaC. ....  | 23 |
| Figura 10 Esquema representativo del proceso de construcción del plásmido pMPJAS01-JGS8C, dividido en dos etapas marcadas como A y B.....  | 24 |
| Figura 11 Gel de electroforesis que muestra los productos de restricción enzimática de diferentes plásmidos, 1) Marcador molecular 1Kb DNA plus (NEB), 2) Plásmido pMPJAS01, 3) y 4) pMPJAS01 linealizado con SmaI, 5) pUC94 con el fragmento de interés, 6) y 7) pUC57 linealizado y el fragmento liberado con EcoRV. ....  | 25 |
| Figura 12 Gel de electroforesis del DNA extraído de las clonas de <i>E. coli</i> TOP10, el carril izquierdo es el marcador de tamaño molecular, los carriles del 1 al 18 es el DNA extraído de las clonas seleccionadas.....   | 26 |
| Figura 13 Representación gráfica de las posibles orientaciones del fragmento de interés insertado en pMPJAS01 que se pueden presentar. ....  | 27 |
| Figura 14 Gel de electroforesis de las muestras de DNA plasmídico extraído, el carril izquierdo es el marcador de tamaño molecular, los carriles C y L son el plásmido pMPJAS01 circular y lineal. Los carriles 2, 10 y 18 muestran el DNA extraído de las clonas seleccionadas en la sección cuatro restringido con PstI. ....  | 27 |
| Figura 15 Gel de electroforesis del DNA plasmídico extraído de las clonas de <i>C. necator</i> DSM-541 (A) y RE-2133 (B), el carril izquierdo muestra el marcador de tamaño molecular, en los carriles del 1 al 10 aparece el DNA plasmídico extraído de las clonas seleccionadas y en los carriles P1P0 se observa el plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés. ....   | 28 |
| Figura 16 Gel de electroforesis del DNA extraído de las clonas de <i>C. necator</i> DMS-541 (1-4) y RE2133 (5-9) restringido con HindIII. El carril izquierdo muestra el marcador de tamaño molecular, en los carriles del 1 al 18 se observa el DNA extraído de las clonas seleccionadas.<br>.....  | 28 |

Figura 17 Células de *C. necator* teñidas con rojo Nilo, las imágenes A-D de fluorescencia se obtuvieron a 300ms de tiempo de exposición 12 ng/ml de RN. A). Cepa DSM 541, B) y C) Cepa DSM-541Z, D) Cepa RE-2133F, las flechas amarillas indican los gránulos de PHA. ...30

Figura 18 Cromatogramas obtenidos después de la propanólisis de A) Estándar de polihidroxi-butilato-valerato (PHB-V), B) Polímero purificado de la cepa DSM-541Z y C) Polímero purificado de la cepa RE2133F, marcado con flechas negras etiquetadas se encuentran las señales de los compuestos conocidos y sin etiquetar los compuestos desconocidos en el cromatograma. ....32

## Resumen

El continuo aumento de la contaminación causada por el uso indiscriminado de plásticos del petróleo ha llevado a la investigación de substitutos amigables con el medio ambiente, siendo los polihidroxicanoatos (PHAs) los candidatos más prometedores. Es de particular importancia en la producción de PHAs, mejorar la incorporación de monómeros de cadena media (mcl) para obtener características similares a los polímeros derivados del petróleo. En este trabajo se pretende incorporar mcl en el PHA por medio de una estrategia de ingeniería metabólica, que implica modificar la ruta de oxidación de ácidos grasos. Para este propósito, diseñamos una proteína quimérica compuesta de una enoyl-CoA hidratasa (PhaJ) y una PHA sintasa (PhaC) separadas por un linker de GS8 en las cepas mutantes de *C. necator* PHB-4, y utilizamos un aceite de origen vegetal como fuente de carbono. Se logró la construcción del plásmido pMPJAS01-J con los genes de interés, y la expresión de la enzima quimérica en dos cepas mutantes de *C. necator*.

## Introducción

Durante décadas algunas ramas de la investigación científica se han enfocado en la producción, aprovechamiento y comercialización de diversos materiales producidos por organismos vivos, todos dirigidos hacia el bienestar de la sociedad. Entre los materiales que han demostrado poseer un gran potencial se encuentran la celulosa, quitina, polietileno y poliésteres, entre otros. En particular, la familia de poliésteres llamados en su conjunto polihidroxicanoatos (PHAs) ha llamado notoriamente la atención científica (Zhong et al., 2009). Los PHAs se localizan intracelularmente en inclusiones citoplasmáticas hidrofóbicas y amorfas, principalmente en bacterias, con un diámetro que oscila entre 50-500 nm.

### Bacterias productoras de PHA y *C. necator*

Los PHAs son producidos por diversos microorganismos como *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas caviae*, *Synechocystis* sp, entre muchos otros más. Los PHAs son ampliamente utilizados como una alternativa de los plásticos sintéticos. Además, su naturaleza biodegradable y biocompatible, hace posible su uso en diversas funciones biológicas, aplicaciones terapéuticas o como biocatalizadores (Bugnicourt et al., 2014).

Entre las bacterias capaces de producir PHA, destaca *C. necator* (antes *Ralstonia eutropha*) H16, la cual es capaz de acumular más de 90% de PHA de su peso seco (Tabla 1) (Borrero-de Acuña et al., 2014; Sharma et al., 2016; Thapa et al., 2019; Ward et al., 2005).

Tabla 1 Bacterias productoras de PHA y porcentaje de PHA del peso seco.

| <i>Bacteria</i>                | <i>%PHA</i> |
|--------------------------------|-------------|
| <i>Pseudomonas putida CA-3</i> | 76.5        |
| <i>P. putida</i>               | 80          |
| <i>Cupriavidus necator</i>     | 87          |
| <i>C. necator H16</i>          | >90         |
| <i>Bacillus pasteurii</i>      | 36.41       |
| <i>Micrococcus luteus</i>      | 34.59       |
| <i>B. megaterium</i>           | 28.63       |
| <i>B. pumilus</i>              | 21.46       |
| <i>B. sphaericus</i>           | 18.45       |
| <i>B. cereus</i>               | 14.91       |
| <i>Arthrobacter spp.</i>       | 8.56        |

*C. necator* H16 es una bacteria litoautotrófica Gram negativa perteneciente a la subclase  $\beta$  de las proteobacterias. Es un habitante omnipresente del suelo y los biotopos de agua dulce, y está bien adaptado a la vida en hábitats sujetos a anoxia transitoria. Además, la bacteria puede acumular carbono orgánico en forma de poli [R-(X)-3- hidroxibutirato] (PHB) en gránulos de almacenamiento especializados (Pohlmann et al., 2006).

*C. necator* no es patógeno, en comparación con otras cepas pertenecientes al género *Cupriavidus*. A diferencia otros de productores, *C. necator* H16 no contiene ningún elemento secundario que contamine el medio, es decir, ningún metabolito secundario que se tenga que separar o tener a consideración durante la extracción del polímero (Yabuuchi et al., 1995).

## Rutas de producción de PHA

En *C. necator*, *Escherichia coli* y la mayoría de las otras bacterias Gram negativas que pueden utilizar ácidos grasos como fuentes únicas de carbono y de energía, los metabolizan por la vía de la  $\beta$ -oxidación. La vía de la  $\beta$ -oxidación actúa de manera cíclica para reducir la cadena acilo del ácido graso mediante la eliminación de un grupo acetyl-CoA de dos carbonos en cada ciclo (Brigham et al., 2010).

Es bien sabido que el acetyl-CoA, el principal producto de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, se utiliza como molécula precursora de otras vías, como la biosíntesis de aminoácidos y el ciclo del ácido cítrico. En *C. necator*, los productos intermedios (Enoil-CoA, 3-hidroxiacil-CoA, etc.) y los productos del metabolismo de los ácidos grasos están relacionados con otras vías metabólicas clave. Además, tanto las cepas de tipo silvestre, y en mayor medida las cepas recombinantes de *C. necator* pueden producir precursores de PHA, moléculas de (R) -hidroxiacil-CoA, a partir de la biosíntesis de ácidos grasos o la  $\beta$ -oxidación. Para obtener precursores de PHA a partir de intermediarios de la  $\beta$  oxidación, el gen *phaJ*, que codifica para una hidratasa (R)-enoil coenzima-A que cataliza la conversión de enoil-CoA a un precursor general de PHA (R) -3- hidroxiacil-CoA donde el gen *phaC* que codifica para una PHA sintasa o PhaC cataliza la polimerización de dichos compuestos (Figura 1) (Riedel et al., 2014).

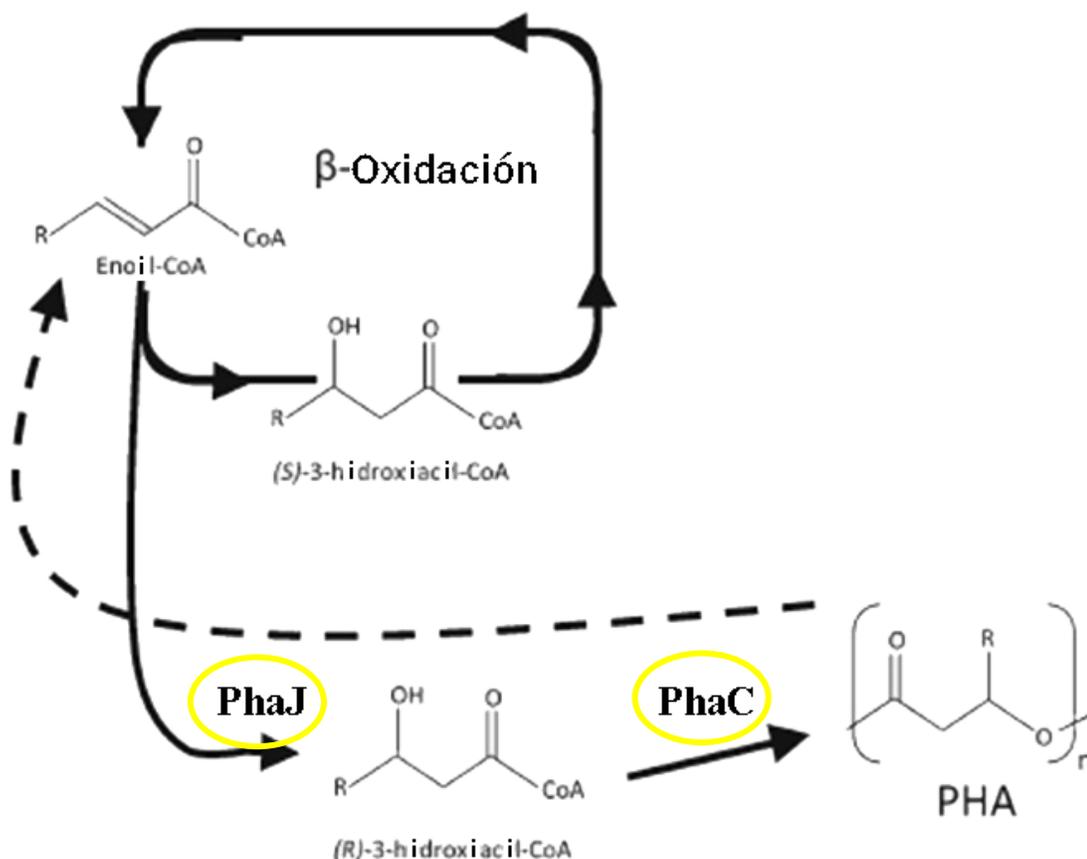


Figura 1 Esquema representativo de la ruta de la  $\beta$ -oxidación y la producción de PHA a partir de esta (Riedel et al., 2014).

La  $\beta$ -oxidación no es la única ruta involucrada en la producción de PHA. La Figura 2 muestra otras rutas que participan en la producción de PHA, siendo la ruta I la predominante en *C. necator*.

El acetil-CoA es una molécula esencial para las células, la cual participa en las rutas mostradas en la figura 2, marcado con círculos rojos y contribuye a la incorporación de scl principalmente y mcl en menor medida. Por otra parte, si se utiliza un aceite vegetal como única fuente de carbono, al romper este aceite, se obtendrá glicerol, molécula que contribuye directamente a la incorporación de scl, estas dos características descritas dan como resultado un PHA compuesto principalmente por scl o polihidroxibutirato (PHB) que se acumula en el interior de *C. necator* H16.

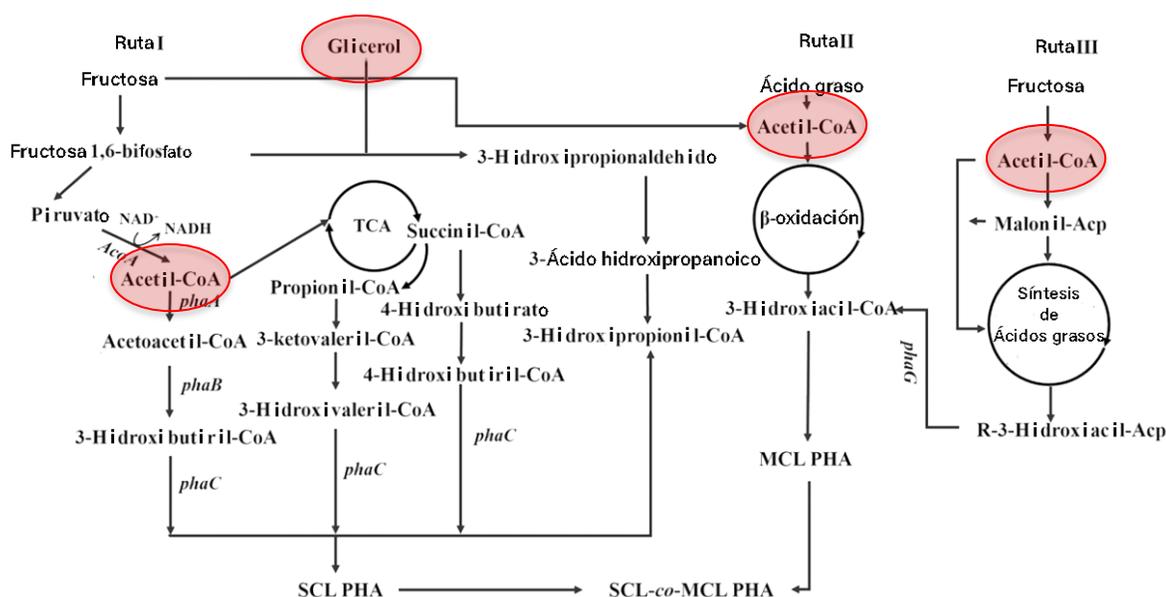


Figura 2 Mapa descriptivo de las rutas de producción de PHA en *C. necator* (Liu et al., 2022).

### Comparación de PhaJs y PhaCs

Los PHAs se sintetizan por polimerización de monómeros de tres hidroxiaácidos grasos solubles, hasta formar partículas hidrófobas insolubles. La PHA sintasa es una enzima de la familia de las lipasas, que es la encargada de llevar a cabo esta polimerización de manera estéreo selectiva. La mayoría de los monómeros tienen C3 a C14 átomos de carbono, con una variedad de cadenas saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, que contienen grupos laterales alifáticos o aromáticos. Su síntesis deriva principalmente de los compuestos procedentes de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos sintetizados de *novo* a partir de fuentes de carbono simples, o bien, ácidos grasos proporcionados directamente como fuentes de carbono. Las PHA sintasas de diversos microorganismos se han clasificado en cuatro clases, las cuales difieren en las subunidades que las conforman y en su especificidad por el sustrato (Kutralam-Muniasamy & Pérez-Guevara, 2018).

No todas las PHA sintasas son capaces de polimerizar todo tipo de monómeros, por ejemplo, se ha demostrado que la *PhaC*<sub>*C.necator*</sub> polimeriza monómeros que van desde C3 a C6 y la capacidad de la *PhaC*<sub>*P.pu*</sub> se extiende desde monómeros de C6 a C14 (alifáticos y aromáticos).

En las Tablas 2 y 3 se encuentran varios ejemplos de diferentes PhaJ y PhaC reportadas en la literatura, cada enzima posee pequeñas diferencias en su composición de aminoácidos lo que ocasiona un cambio en la preferencia y gama de sustratos que utilizan. La PhaJ de *P. putida* destaca por su afinidad a mcl y por su gama de sustratos más amplio. La PhaC de *P. putida* CA-3 destaca por tener una amplia gama de sustratos que abarca mcl alifáticos y aromáticos, por lo tanto, puede ampliar las aplicaciones del polímero producido (Amara & Moawad, 2011; Arikawa & Matsumoto, 2016; Fiedler et al., 2002a; Sato et al., 2011).

**Tabla 2** Diferentes tipos de PhaC de diferentes microorganismos y la gama de sustratos que pueden utilizar.

| Sintasa  | Microorganismo                                | Gama                           |
|----------|---|--------------------------------|
| PhaC I   | <i>C. necator</i>                             | scl, mcl                       |
| PhaC II  | <i>P. putida</i> CA-3                         | alifáticos y aromáticos de mcl |
| PhaC II  | <i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. | mcl, lcl                       |
| PhaC III | <i>Allochromatium vinosum</i>                 | mcl, scl                       |
| PhaC IV  | <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>       | scl                            |

**Tabla 3** Diferentes tipos de PhaJ de diferentes microorganismos, su afinidad y gama de sustratos.

| Enoil-CoA Hidratasa | Microorganismo                                 | Monómero a fin                        |
|---------------------|--|---------------------------------------|
| PhaJ4a-b            | <i>C. necator</i> H16                          | R-3-hidroxihexanoato-CoA (R)-3HHx-CoA |
| PhaJ1               | <i>P. aeruginosa</i> , <i>Aeromonas caviae</i> | scl-Enoil-CoA                         |
| PhaJ1               | <i>P. putida</i> , <i>P. oleovorans</i>        | mcl-Enoil-CoA                         |
| PhaJ2               | <i>P. aeruginosa</i>                           | mcl-Enoil-CoA                         |
| PhaJ4               | <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i>        | mcl-Enoil-CoA                         |

Los genes *phaJ* utilizados en la ingeniería genética son típicamente de *Pseudomonas* sp. Sin embargo, también se han identificado y caracterizado genes *phaJ* nativos en *C. necator* de tipo silvestre (Riedel et al., 2014).

PhaJ y PhaC se han expresado y estudiado en diferentes bacterias, algunas de las cuales se muestran en la Tabla 4, junto con los diferentes sustratos de carbono usados. En comparación con otras enzimas, PhaJ y PhaC de *P. putida* y *P. putida* CA-3 destacaron por incorporar

monómeros de cadena más larga (hexanoato, octanoato y decanoato) en el producto, cuando se usó un aceite vegetal como fuente de carbono (Araceli et al., 2022; Valdés et al., 2018).

**Tabla 4 Comparativa de los diferentes trabajos que utilizan enzimas recombinantes y sus resultados reportados.**

| Sustrato                              | MO                        | <i>phaC</i>                                    | <i>phaJ</i>                               | Monómeros del PHA   | Tipo de cadena | Referencia                     |
|---------------------------------------|---------------------------|--|---|---|----------------|--------------------------------|
| Ácidos grasos de cadena corta y media | <i>Bacillus sp.</i> CYR1  | <i>Bacillus sp.</i> CYR1                       | <i>Bacillus sp.</i> CYR1                  | HBV (20:80%)  | scl            | (Reddy et al., 2020)           |
| Ácido dodecanoico                     | <i>E. coli</i> LS5218     | <i>Chromobacterium sp.</i> USM2                | <i>A. caviae</i>                          | 3HHx 6.6% mol, 3HV  | scl            | (Chuah et al., 2013)           |
| Dodecanoato                           | <i>A. hydrophila</i> 4AK4 | <i>A. punctata</i>                             | <i>A. punctata</i>                        | 3HHx 9% mol   | scl, mcl       | (Han et al., 2004)             |
| Dodecanoato de sodio                  | <i>E. coli</i> JM109      | <i>C. necator</i> y <i>A. caviae</i>           | --  | 3HB, 3HHx 2% mol  | scl, mcl       | (Matsumoto et al., 2009)       |
| Aceite de canola                      | <i>C. necator</i> H16     | <i>P. putida</i> CA-3<br><i>C. necator</i> H16 | <i>C. necator</i> H16                     | 3HB, 3HV 1% mol, 3HHx 4% mol, 3HO 1% mol                    | scl, mcl       | (Valdés et al., 2018a)         |
|                                       | <i>C. necator</i> PHB-4   | <i>P. putida</i> CA-3                          | --  |   | scl, mcl       |                                |
| Aceite de aguacate y canola           | <i>C. necator</i> H16     | <i>C. necator</i> H16                          | <i>P. Putida</i><br><i>C. necator</i> H16 | 3HB, 3HV0.53% mol, 3HHx0.42% mol, 3HO0.39% mol, 3HD0.1% mol | scl, mcl       | (Flores-Sánchez et al., 2020a) |

### Características de los PHAs

Los PHAs son termoplásticos cuyas propiedades son afectadas por su composición química. Algunos grados de PHB tienen resistencia mecánica y a la humedad, similares a las del polipropileno. Sin embargo, el ácido polihidroxibutírico sintetizado a partir de PHB puro es relativamente frágil (es decir, tensión de fractura típicamente por debajo del 15%) y rígido (es decir, módulo E por encima de 1 GPa). El PHB es un material frágil debido a la recristalización que tiene lugar durante el envejecimiento a temperatura ambiente, por lo tanto, las propiedades mecánicas cambian con el tiempo. Por estas razones, se ha dedicado mucho esfuerzo de investigación a la búsqueda de plastificantes y/o agentes nucleantes capaces de reducir el proceso de cristalización y mejorar la flexibilidad (Bugnicourt et al., 2014).

La gama de monómeros que se pueden incorporar en los PHAs depende del sustrato suministrado durante el proceso de fermentación. En consecuencia, los PHAs varían en sus propiedades fisicoquímicas dependiendo del porcentaje y tipo de monómero presente en ellos (Kutralam-Muniasamy & Pérez-Guevara, 2018).

La Tabla 5 muestra las propiedades de algunos PHAs de mcl reportados en literatura. Como era de esperar, las proporciones de mcl y scl que componen el PHA resultante cambian dependiendo del sustrato utilizado, dando por resultado polímeros con diferentes propiedades. Por otra parte, el PHB comercial (Goodfellow 829-511-84) presenta características muy diferentes, mostradas en la tabla 6, demostrando la amplia variedad de características que presentan los PHAs.

**Tabla 5 Propiedades térmicas y de tensión de los mcl-PHA** (Dartiailh et al., 2021).

| Sustrato                                 | T <sub>g</sub><br>(°C) | T <sub>M</sub><br>(°C) | T <sub>D</sub><br>(°C) | ΔH <sub>M</sub><br>(J/g) | T<br>(MPa)   | E<br>(%)        | EM<br>(MPa)   |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------|-----------------|---------------|
| Glicerol                                 | -47.0<br>± 0.7         | 43.2<br>± 0.9          | n.d.                   | 10.3<br>± 1.7            | 1.0 ±<br>0.1 | 20<br>±<br>3.6  | 17.3 ±<br>7.2 |
| Valerato<br>(C <sub>5</sub> )            | -46.9                  | N/A                    | n.d.                   | N/A                      | N/A          | N/A             | N/A           |
| Ácido<br>hexanoico<br>(C <sub>6</sub> )  | -29.7<br>± 1.1         | 131.1<br>± 5.6         | n.d.                   | 0.27<br>±<br>0.23        | N/A          | N/A             | N/A           |
| Ácido<br>octanoico<br>(C <sub>8</sub> )  | -38.1<br>± 1.9         | 51.2<br>± 0.9          | 249<br>±<br>1.3        | 21.0<br>± 0.8            | 4.3<br>± 0.4 | 162<br>±<br>6.7 | 25.3 ±<br>1.8 |
| Ácido<br>nonanoico<br>(C <sub>9</sub> )  | -41.3<br>± 0.9         | 47.2<br>± 0.4          | 246<br>±<br>3.1        | 17.6<br>± 3.8            | 2.6 ±<br>0.8 | 184<br>± 18     | 12.6 ±<br>4.7 |
| Ácido<br>decanoico<br>(C <sub>10</sub> ) | -44.0<br>± 1.1         | 45.5<br>± 1.3          | 254<br>±<br>6.1        | 15.2<br>± 0.1            | 2.8 ±<br>0.4 | 171<br>±<br>1.4 | 10.8<br>0.6   |
| Aceite de<br>Canola                      | -52.7<br>± 0.5         | N/A                    | 253<br>±<br>2.3        | N/A                      | N/A          | N/A             | N/A           |
| Aceite de<br>linaza                      | -46.9<br>± 5.8         | N/A                    | n.d.                   | N/A                      | N/A          | N/A             | N/A           |

T<sub>g</sub>, temperatura de transición vítrea; T<sub>M</sub>, temperatura de fusión; T<sub>D</sub>, temperatura de degradación; ΔH<sub>M</sub>, entalpía de fusión; T, fuerza de tensión; E, ruptura de elongación; EM, módulo elástico; N/A, no aplicable (sin derretir); n.d., no determinado.

**Tabla 6. Propiedades mecánicas de PHB comercial** (dos Santos et al., 2017).

| Propiedad                    | B189C-1/18BC-1 | B189D-1 | B1000 |
|------------------------------|----------------|---------|-------|
| Fuerza de tensión (MPa)      | 30             | 32      | 36    |
| Ruptura de elongación (%)    | 2.2            | 4.0     | 2.0   |
| Módulo de Young (MPa)        | 2600           | 2200    | 3800  |
| Resistencia de impacto (J/m) | 23             | 28      | 36    |

Datos proporcionados por el fabricante según normas ASTM, considerando diferentes formulaciones; resistencia al impacto por ensayo Izod.

Desarrollar rutas avanzadas para incorporar monómeros mcl-PHA se han convertido en el centro de atención ya que se ha reportado que la incorporación de monómeros 3-HHx en el polímero PHB en crecimiento podría resultar en productos con propiedades parecidas a la de los plásticos comunes derivados del petróleo.

## Cepas mutantes de *C. necator*

La búsqueda de un PHA con mayor porcentaje de mcl incentivó el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica que incluyen la generación de mutantes de *PhaB* para limitar el suministro de monómeros 3-HB, una coexpresión de las enzimas de la ruta de la  $\beta$ -oxidación como lo son FadA y PhaJ, que canalizan monómeros de 3-hidroxiacil-CoA en la síntesis del PHA, así como el uso de inhibidores de las rutas involucradas en la producción de scl con el fin de mejorar la producción de mcl-PHA (Kutralam-Muniasamy & Pérez-Guevara, 2018).

**Tabla 7 Cepas mutantes utilizadas, tipo de fermentaciones y polímeros producidos mediante co-expresión reportados en literatura** (Budde et al., 2011; Jung et al., 2019; Valdés et al., 2018b).

| Cepa                      | Fermentación | PHA producido por co-expresión %mol   |
|---------------------------|--------------|---|
| <i>C. necator</i> DSM-541 | Matraz       | 3HB, 3HV 1%, 3HHx 4%, 3HO 1%  |
| <i>C. necator</i> RE-2133 | Matraz       | P (66% 3HB-co-12% 3HV-co-22% 3HHx)<br>P (61% 3HB-co-21% 3HV-co-18% 3HHx)<br>P (54% 3HB-co-36% 3HV-co-10% 3HHx)<br>P (HB-co-HHx 23.3%) |

Para incrementar la incorporación de mcl al PHA producido, se han desarrollado cepas mutantes incapaces de producir PHA de forma natural las cuales se modifican para co-expresar otras enzimas (e.g., PhaJ y PhaC) (Tabla 7). Dichas cepas se han estudiado utilizando un medio mínimo adicionado con fructosa y alguna otra fuente de carbono (Aceite o ácido graso) en fermentaciones a nivel matraz, obteniendo resultados prometedores en la incorporación de mcl al PHA producido.

## Comercialización y aplicaciones en los PHAs

Actualmente, el PHA es producido y comercializado por diversas empresas como Goodfellow y Sigma-Aldrich, lo que ha incentivado su aplicación en diferentes campos, principalmente en ingeniería de tejidos, parches de bio-implantes, liberación de fármacos, aplicaciones quirúrgicas y en nanotecnología. Dichas aplicaciones son muy específicas y costosas debido a su alto coste actual de producción comparado con otros polímeros como el ácido poliláctico (Raza et al., 2018).

## Identificación de gránulos de PHA mediante Rojo Nilo

Para la identificación de gránulos de PHA, usualmente se utiliza el fluorocromo Rojo Nilo combinado con microscopia de fluorescencia. Este compuesto se adhiere al PHA de los gránulos, presentando una intensa fluorescencia dentro de la célula bacteriana. La Figura 3 muestra gránulos de PHA teñidos con rojo Nilo en el interior de células de *Cobetia sp.* (Christensen et al., 2021; Legat et al., 2010; Spiekermann et al., 1999).

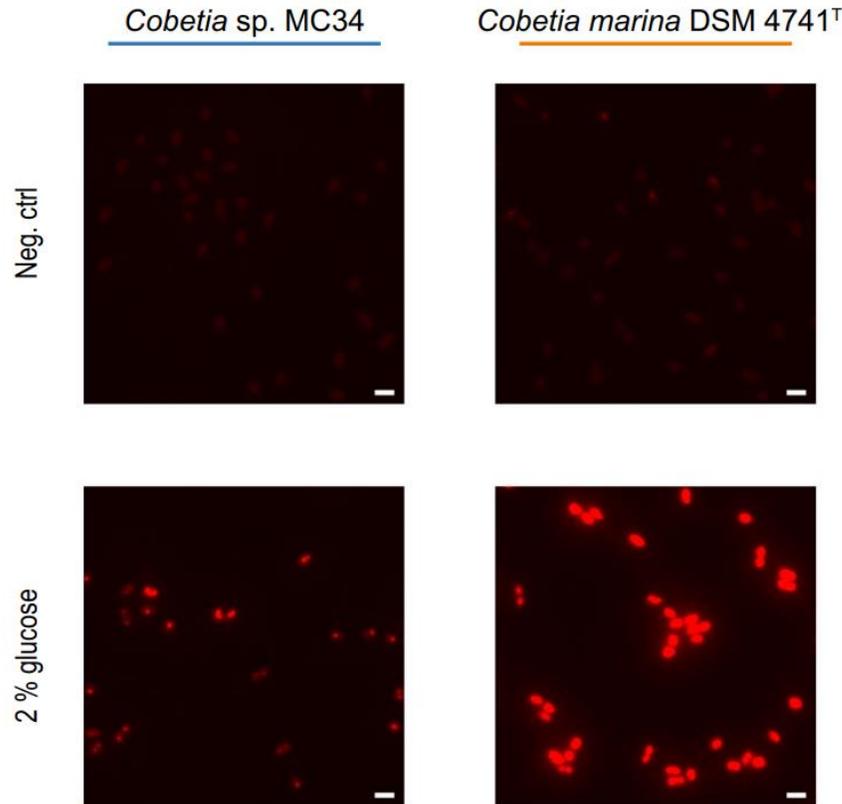


Figura 3 Microscopía de fluorescencia de células cultivadas en placas de agar MMY suplementadas con glucosa al 2 % y teñidas con rojo Nilo, en las que se puede observar la acumulación de inclusiones intracelulares después de 72 h de incubación a 14 °C, en contraste con los controles negativos. Las imágenes de las células se tomaron con un microscopio ZEISS Axio Observer 7 a 100X y la intensidad de fluorescencia normalizada a 1500 para todas las imágenes. La barra de escala muestra 2  $\mu\text{m}$  (Christensen et al., 2021).

### Identificación de PHA mediante cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es otro método utilizado para la identificación de PHA, donde después de hidrolizar el polímero se pueden identificar los monómeros que lo componen. Para la aplicación de esta técnica se puede utilizar tanto la biomasa seca como el PHA purificado (Abdallah et al., 2020).

### Nueva estrategia de ingeniería

Actualmente las herramientas de biología sintética permiten rediseñar genes y transformar organismos con fines útiles mediante su ingeniería para lograr nuevas habilidades. Los genes quiméricos son actores importantes de la biología sintética. Los cuales se forman mediante la combinación de porciones de dos o más secuencias codificantes para producir nuevos genes. En la literatura acerca de PHAs, solo en un estudio se ha reportado la fusión de segmentos de dos genes de PHA sintasa para la producción de PHAs (Matsumoto et al., 2009). Otra investigación reportó la posibilidad de acumular PHAs mediante la expresión de la enzima PHA sintasa fusionada con las enzimas PhaA y PhaB (Mullaney & Rehm, 2010). Sin embargo, hasta ahora, ninguna investigación ha estudiado la expresión de la fusión de genes de PHA sintasa con genes de metabolismo de oxidación de ácidos grasos en la producción de polímeros de



## **Hipótesis**

La expresión de un gen quimérico que codifica la fusión de la PHA sintasa (*phaC*) de *Pseudomonas putida* CA-3 y la enoil CoA hidratasa (*phaJ*) de *P. putida* permitirá la incorporación de monómeros de cadena media durante la acumulación de polihidroxialcanoato en la cepa mutante *Cupriavidus necator* (PHB-4).

## **Justificación:**

La búsqueda de nuevos plásticos biodegradables basados en PHAs, requiere la incorporación de monómeros de cadena media para ampliar su versatilidad. Esto impulsa el desarrollo de nuevas estrategias, incluyendo la expresión de enzimas quiméricas para producir y diseñar nuevos materiales.

## **Objetivo general**

Obtener un polímero con alta proporción de monómeros de longitud de cadena media mediante la expresión del gen quimérico de *phaJ<sub>P.putida</sub>* flanqueado por *phaC<sub>P. PutidaCA-3</sub>* en *Cupriavidus necator* PHB-4.

## **Objetivos particulares**

1. Diseñar un casete de genes de fusión apropiado para expresar la enzima quimérica.
2. Construir el plásmido de expresión.
3. Mediante electroporación, obtener la cepa modificada de *C. necator* PHB-4 con el plásmido que contiene el casete de fusión construido.
4. Expresar y determinar la producción de PHA en la cepa modificada de *C. necator* utilizando un aceite vegetal como sustrato.
5. Producir PHA usando la cepa de *C. necator* modificada y *C. necator* H16 nativa como control.
6. Cuantificar y caracterizar los PHA sintetizados a partir de la cepa de *C. necator* modificada y *C. necator* H16 nativa.

# Metodología

En esta sección se presenta toda la metodología aplicada durante la elaboración de este trabajo.

## 1. Resumen de la metodología utilizada

La metodología que se siguió durante el desarrollo del proyecto se resume en la Figura 5.

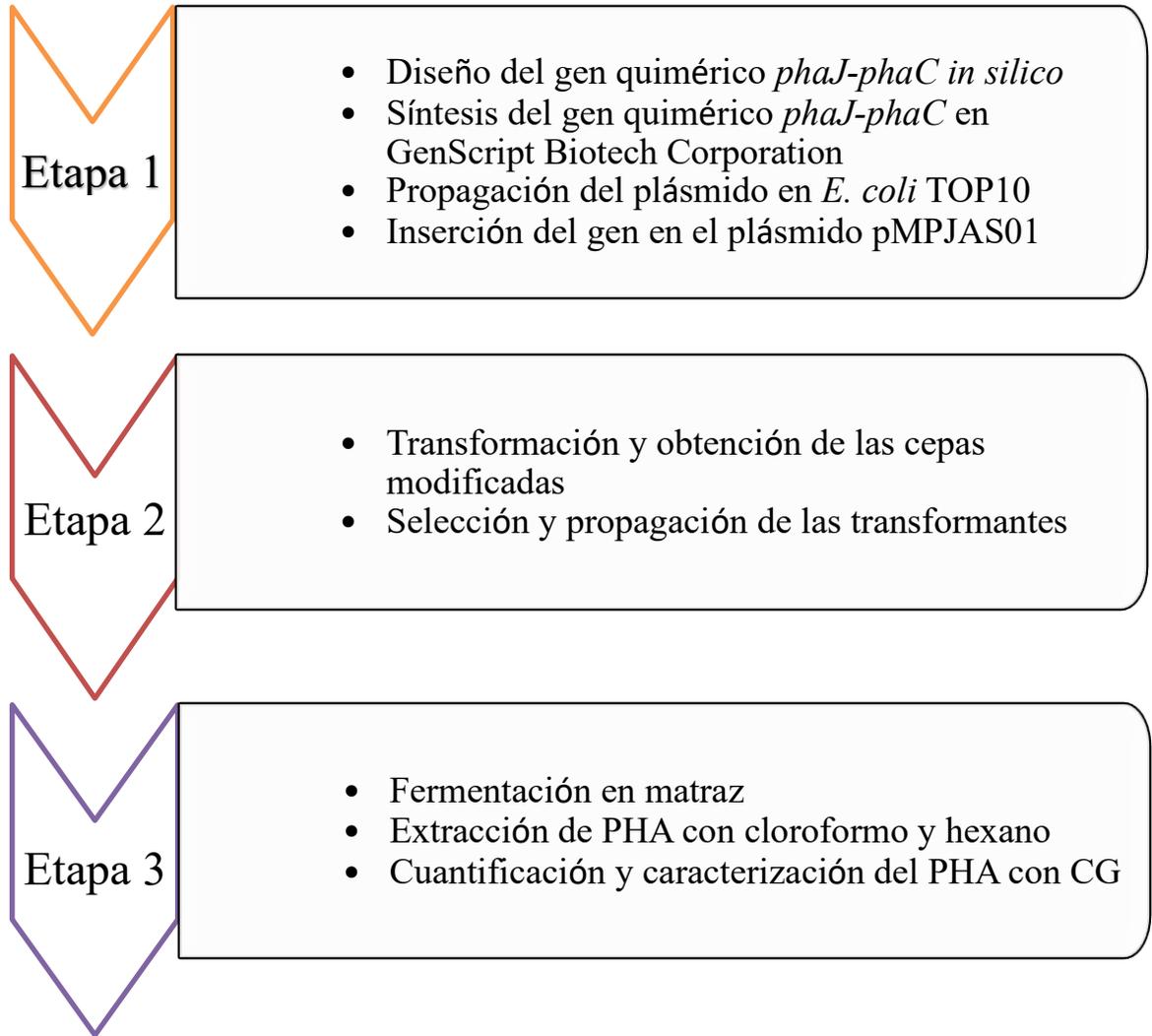


Figura 5 Resumen de la metodología del proyecto.

## 2. Plásmidos y cepas utilizadas

El plásmido pMPJAS01, utilizado en este proyecto (Fig. 6A), posee elementos como los genes de resistencia a kanamicina, cloranfenicol, el promotor pBAD para arabinosa optimizado para *C. necator* que fue construido en el trabajo de Rathinasabapathy et al., 2014. Durante el desarrollo del proyecto se utilizó kanamicina para la selección y arabinosa como inductor para la expresión del gen. El plásmido pUC94 (Fig. 6B) el cual se mandó a sintetizar en GeneScript, contiene el gen de resistencia a ampicilina, el cual se utilizó como gen de selección, contiene el fragmento de interés insertado (2193 pb) el cual se liberó con EcoRV.

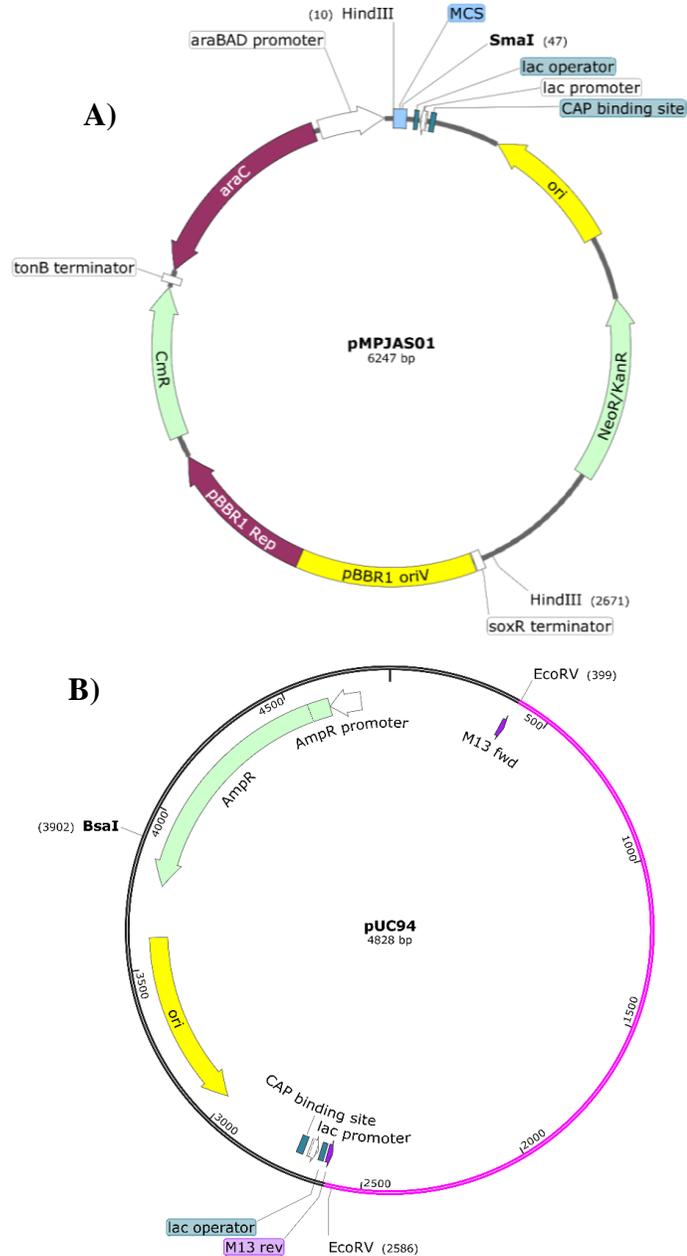


Figura 6 Esquema representativo de los plásmidos pMPJAS01 (A) y pUC94 (B) con los sitios de restricción más relevantes (elaborado en SnapGene 3.2.1).

Las cepas mutantes de *C. necator* que fueron utilizadas en este trabajo se encuentran en la Tabla 8. La cepa RE-2133 es una cepa mutante con producción reducida de los monómeros de 3-HB e incapaz de producir el polímero de forma natural, mientras que DSM-541 solo produce los monómeros de PHA.

**Tabla 8 Cepas mutantes de *C. necator* utilizadas en el trabajo.**

| <b>Cepas</b>                  | <b>Características</b>   | <b>Fuente</b>   |
|-------------------------------|--|---|
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | <ul style="list-style-type: none"> <li>F- <i>mcrA</i> <math>\Delta</math>(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <math>\Phi</math>80<i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math> <i>lacX74 recA1 araD139</i> <math>\Delta</math>(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>ThermoFisher Scientific</li> </ul> |
| <i>C. necator</i> DSM-541     | <i>C. necator</i> H16 $\Delta$ <i>phaC</i>   | Schlegel et al., 1970   |
| <i>C. necator</i> RE-2133     | <i>C. necator</i> H16 $\Delta$ <i>phaB1, phaB2, phaB3, y phaC1</i>   | Budde et al., 2011  |

Los equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto y sus características se listan a continuación:

Centrifuga: Eppendorf 5810R centrifuga refrigerada, Eppendorf, Twinsburg, OH, Rotor FA-45-6-30

Micro Centrifuga: MiniSpin, Eppendorf SE, Alemania

Incubadora: New Brunswick Innova 4300 incubadora agitadora, Marshall Scientific LLC.

### **3. Stock de glicerol y reactivación de las cepas de *E. coli* y *C. necator***

Las cepas de *E. coli* y *C. necator* se reactivaron a partir de un stock de glicerol conservado a -80°C, se tomaron 50  $\mu$ l del stock y se resuspendieron en 50 ml de medio LB (Apéndice 3), posteriormente se incubaron por una noche a 250rpm y 37°C (*E. coli*) y 30°C (*C. necator*) respectivamente, posteriormente se tomaron 5 ml del medio y se repartieron en tubos Eppendorf de 1.5 ml en alícuotas de 100  $\mu$ l y se le adicionaron 100  $\mu$ l de glicerol al 30% a cada alícuota, finalmente el stock de las cepas se almaceno a -80°C.

### **4. Transformación química por choque térmico**

Los plásmidos pMPJAS01 y pUC94 se propagaron con la técnica descrita a continuación, con el fin de obtener cantidades suficientes para su conservación y utilización en el proyecto.

Se prepararon cultivos de *E. coli* TOP10 inoculando 50  $\mu$ l del stock en 5 ml de medio SOB (Caldo super optimo, Apéndice 3) con 10 mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y después incubando durante la noche. En seguida se inocularon 500  $\mu$ l del cultivo en 50 ml de medio SOB complementado

con 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 mM. La densidad óptica (O.D) se midió a 600 nm periódicamente cada 30 min. Cuando la O.D. alcanza la Absorbancia de 0.5, las células se centrifugan a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se agregan 16 ml de amortiguador de transformación I (TFB-1) (Apéndice 1) al paquete celular y se mezcla suavemente. La suspensión se mantiene en hielo durante 15 min y se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 min. Se añaden 4 ml de TFB-2 (Apéndice 1) a las células sedimentadas y se colocan en hielo durante 20 min. La suspensión se distribuye en tubos Eppendorf de 1.5 ml en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , que se almacenaron a -80 °C. A los 200  $\mu\text{l}$  de las alícuotas, se le añaden aproximadamente 1-10  $\mu\text{g}$  del plásmido y se colocan en hielo durante 5-10 min. Luego, la mezcla se coloca en un baño de agua a 43 °C durante 90 segundos. Después del tratamiento, se mantiene en hielo durante 5 min. Posteriormente se le adicionan 800  $\mu\text{l}$  de SOB (Apéndice 3) y se incuba durante 1:20 h a 37 °C. Finalmente, se centrifugan las células a 12000 rpm durante 2 min en micro centrifuga, se descartan 900  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y la pastilla se resuspende en los 100  $\mu\text{l}$  restantes. Con el fin de ejercer presión de selección a las células, 100  $\mu\text{l}$  del resuspendido se siembra en placa de medio LB (Luria Bertani, Apéndice 3) con 2% de agar y Kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ó Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incuba a 37°C durante una noche.

## **5. Lisis de las células**

Una colonia de células transformantes se creció en 50 ml de medio LB adicionado con kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ó ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 37°C y 250 rpm durante una noche. Posteriormente se tomó una muestra del cultivo (1.5 ml) y se centrifugó a 12,000 rpm en la micro centrifuga por 30 segundos a 4 °C, posteriormente se retiró el sobrenadante mediante decantación procurando dejar la menor cantidad de medio de cultivo posible en el paquete celular. Las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de solución de lisis alcalina I (Apéndice 2) a 4°C, en seguida se adicionaron a la suspensión 200  $\mu\text{l}$  de solución de lisis alcalina II (Apéndice 2), el tubo se cerró y se mezcló el contenido volteando y regresando el tubo rápidamente cinco veces, luego el tubo se colocó en hielo. Después, se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de solución de lisis alcalina III (Apéndice 2) fría como el hielo, se cerró el tubo y mezcló girando el tubo varias veces, hasta tener una mezcla homogénea, el tubo se colocó en hielo durante 3-5 min, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo y agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C en la micro centrifuga, finalmente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo.

## **6. Recuperación del DNA plasmídico a pequeña escala**

Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitan adicionando 2 volúmenes de etanol (98%) que se mezclan mediante agitación, luego se incuba durante 30 min a -80 °C y se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se separó cuidadosamente, en seguida el tubo conteniendo el DNA plasmídico fue invertido sobre una toalla de papel para quitar todo el líquido posible. Al sólido se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, se mezcló invirtiendo el tubo dos veces, y para recuperar el DNA se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Después de remover el sobrenadante, el tubo se mantiene a temperatura ambiente hasta que todo el etanol se evaporó (5-10 min). Los ácidos nucleicos se disolvieron en 30  $\mu\text{l}$  de agua destilada (estéril) y se conservaron -80 °C.

## 7. Recuperación del DNA plasmídico a mediana escala

El plásmido final que se pretende construir requiere de una alta concentración del plásmido pMPJAS01 y del fragmento de interés (contenido en pUC94), por lo que se realizó una extracción de DNA a mediana escala.

Células transformadas con el plásmido que se desea purificar, se inocularon en 50 ml de medio LB (Apéndice 3) con kanamicina (50 µg/ml) ó ampicilina (100 µg/ml), se incubaron a 37°C durante 24 h, y el cultivo resultante se centrifugó en dos tubos de centrifuga limpios (50 ml) con tapa de rosca, durante 2 a 3 min a 7500 rpm. El sobrenadante se descartó y los tubos se colocaron invertidos sobre papel absorbente por unos 5 min, después se agregaron a cada tubo, 3 ml de solución de lisis alcalina I (Apéndice 2), y se agitaron hasta lograr la resuspensión completa del paquete celular. A cada tubo se agregan 6 ml de solución de lisis alcalina II (Apéndice 2), y se agitan por inversión hasta lograr la mezcla completa (y la lisis completa de las células) del contenido de los tubos, después se incuban en baño de hielo por 5 min. A cada tubo se agregan 6 ml de solución de lisis alcalina III (Apéndice 2), y se agitan por inversión (unas 50 veces), posteriormente se incuban en baño de hielo por 10 min, posteriormente se centrifugan en frío (de 4 a 10°C, con el rotor pre enfriado) por 10 min a 12,000 rpm, y el sobrenadante (aproximadamente 14 ml/tubo) se transfiere cuidadosamente a sendos tubos de centrifuga estériles, se añaden 12 ml de isopropanol a cada tubo, se agitan fuertemente, y en seguida se incuban a -20°C o en baño de hielo por lo menos 20 min, después, se centrifugan en frío por 20 ó 30 min a 7500 rpm, se descarta el sobrenadante y se colocan los tubos invertidos sobre un papel absorbente, durante unos 5 min para que se escurran bien, después, se agregan 1 ml de agua destilada estéril a cada tubo, se agitan para resuspender la pastilla, y se transfiere la solución (aproximadamente 530 µl/tubo) a cuatro tubos para microcentrifuga nuevos y estériles), después, se les agregan 5 µl de RNasa<sup>1</sup> (10 mg/ml) a cada tubo, se agitan y se incuban por 20 min a 37°C, en seguida se agregan 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 400 µl de fenol<sup>2</sup> a cada tubo, y se agitan en agitador orbital durante 5 min, luego, a cada tubo se les agregan 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitan fuerte y alternadamente por 5 min, se centrifugan por 5 min a 12000 rpm en micro centrifuga y se transfiere cuidadosamente la fase acuosa a tubos para microcentrifuga nuevos y estériles. Se hacen cuatro extracciones con éter saturado con agua, agregando de uno a dos volúmenes de éter a cada tubo, agitando fuertemente y dejando reposar hasta que se separen las fases (unos 30 s), se desecha la fase etérea (superior). Se agrega otra vez el éter, esto se repite tres veces más. Los tubos se incuban a 65°C por 5 a 10 min para eliminar la mayor cantidad de éter, posteriormente se agregan 100 µl de acetato de amonio 10 M (calentado a 80°C por 3 días a una semana con el frasco perfectamente cerrado), se mezclan bien y agregan 500 µl de isopropanol, en seguida se agitan fuertemente e incuban a -20 °C o en baño de hielo por lo menos durante 20 min. Después se centrifugan en micro centrifuga durante 15 a 30 min en frío, se descarta el sobrenadante y se agrega 1 ml/tubo de etanol al 70 %, se agitan fuertemente 1 ó 2 min, posteriormente se centrifugan en micro centrifuga por 5 min, se desecha el sobrenadante y se deja secar la pastilla

---

<sup>1</sup> Alternativamente, se puede añadir 500 µl de RNasa 10 mg/ml a 50 ml de la solución de lisis alcalina I y se elimina este paso.

<sup>2</sup> Como recomendación, antes de abrir un tubo de microcentrifuga, especialmente si tiene bromuro de etidio o fenol, hay que centrifugar los tubos unos cinco segundos para que todo el líquido atrapado en la tapa baje al fondo del tubo y se evite la salpicadura de sustancias peligrosas.

a 65°C por unos 15 min. A la pastilla seca se le agregan 200 µl de agua destilada estéril, si no se resuspende fácilmente la pastilla, se incuban a 65°C unos minutos agitando hasta que la pastilla se disuelva. Los tubos con el plásmido extraído se almacenan en congelación a -80 °C.

## 8. Preparación de gel de electroforesis

Todos los materiales de DNA plasmídico se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La solución de agarosa se prepara en amortiguador de electroforesis (1X TAE o 0.5X TBE, apéndice 2) a una concentración adecuada de agarosa (1-1.4%) en un matraz Erlenmeyer. Los componentes en el matraz se calientan a temperatura de ebullición hasta que el agar se disuelva y se adiciona el agua que se evaporó en el proceso, se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 55 °C, posteriormente se adicionan 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, y se mezcla la solución lentamente. La solución caliente se vierte en el molde, y se deja enfriar entre 30 a 45 min. La solución fría se coloca en la cámara de electroforesis y se vierte el amortiguador de electroforesis hasta cubrir el gel completamente, procurando no pasar de un nivel de 1 mm por encima del gel. Para cargar una muestra de DNA que se quiera analizar, primero se mezcla la prueba con 0.2 volúmenes del amortiguador (azul de bromofenol) y luego se cargan en los pozos del gel de agarosa utilizando una micropipeta. Los electrodos de la cámara se conectan al equipo de electroforesis y se aplica un voltaje de entre 1-5 V/cm, cuando las muestras de DNA hayan migrado una distancia suficiente (3/4 partes del gel), se apaga el equipo y el gel se examina mediante luz ultravioleta para observar el DNA.

El aislamiento del plásmido y el análisis de restricción se realizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1-1.4%) con amortiguador TAE como regulador. El voltaje utilizado fue de 100-120 V, (Cleaver Scientific Ltd, MP-250V). El marcador de tamaño molecular “1 kb plus” se obtuvo de Invitrogen (10787-018).

## 9. Digestión con enzimas de restricción

Los plásmidos pMPJAS01, pUC94 (pUC-57 con el fragmento de interés) y P1P0 se restringieron con las enzimas mencionadas abajo, en las condiciones mostradas en la tabla 10. Cada enzima reconoce un sitio de restricción particular y cortará el DNA de doble cadena en dicho sitio.

El plásmido pMPJAS01 se restringió con SmaI (New England Biolabs, R0141S, 2000 unidades) a 25°C por 1 h, la enzima fue inactivada calentando a 65 °C por 15 min. El plásmido pUC94 se restringió con EcoRV (NEB, R0195S, 4000 unidades) y BsaI (NEB, R0535, 1000 unidades) a 37°C por 1 h, la enzima EcoRV fue inactivada calentando a 80 °C por 15 min, mientras que BsaI fue inactivada calentando a 65 °C por 15 min. El plásmido P1P0 se restringió con PstI (Fermentas, FD0614, 2500 unidades) y HindIII (NEB, R0104S, 10000 unidades) a 37°C por 1 h, las enzimas fueron inactivadas calentando a 80 °C durante 20 min.

Tabla 9 Características generales de las reacciones de restricción.

| Componentes                                    | Volumen |
|--|---------|
| DNA (~10 ng/µl)                                | 10 µl   |
| 10X amortiguador de reacción                   | 2 µl    |
| Enzima de restricción (20U/ µl, dilución 1:10) | 1U/µl   |

|                       |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| <b>Agua destilada</b> | <b>7 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>Volumen total</b>  | <b>20 <math>\mu</math>l</b> |

## 10. Tratamiento con la ligasa

El fragmento de interés (2193 pb) junto con el plásmido pMPJAS01 linealizado se ligaron con T4 DNA ligasa (NEB, M0202S, 20000 unidades), se realizaron reacciones de ligación en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) y  $Mg^{2+}$  (5 mM/ $\mu$ l  $MgCl_2$  0.5 mM/ $\mu$ l ATP), la enzima reconocerá el daño al ADN y ligará los fragmentos.

**Tabla 10 Características generales de una reacción de ligación.**

| <b>Componentes</b>                            | <b>Volumen</b>              |
|---|-----------------------------|
| <b>Vector DNA (~200 ng/<math>\mu</math>l)</b> | <b>1 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>DNA inserto (~50 ng/<math>\mu</math>l)</b> | <b>4 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>10X amortiguador de reacción</b>           | <b>2 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>Enzima ligasa (400U/<math>\mu</math>l)</b> | <b>1 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>Agua destilada</b>                         | <b>2 <math>\mu</math>l</b>  |
| <b>Volumen total</b>                          | <b>10 <math>\mu</math>l</b> |

## 11. Polimerización azarosa de fragmentos

La polimerización azarosa de fragmentos es una técnica, que consiste en una serie de digestiones con enzimas de restricción y ligaciones con DNA ligasa con el fin de obtener un plásmido específico. En primer lugar, se realizó la restricción del plásmido pMPJAS01 con SmaI para linealizarlo, paralelamente, el fragmento de interés se liberó del plásmido pUC94 utilizando EcoRV. Los productos de estas reacciones se ligaron en un tubo de reacción con la enzima T4 DNA ligasa. En seguida, el producto de la ligación se sometió a una última restricción con SmaI y BsaI simultáneamente con el fin de linealizar los plásmidos que contuvieran a pUC57 (pUC94 sin el fragmento de interés) y los plásmidos recircularizados de pMPJAS01. El producto obtenido se subclonó en *E. coli* TOP10 mediante transformación química por choque térmico y posteriormente se realizó una extracción de DNA plasmídico a pequeña escala a las clonas. La presencia y orientación del fragmento de interés insertado en el plásmido pMPJAS01 se comprobó mediante restricción con la enzima PstI y un análisis en gel de electroforesis, el plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés insertado en la orientación deseada se nombró como P1P0.

## 12. Preparación de células electro competentes.

Las cepas de *C. necator* mencionadas en la Tabla 8 fueron tratadas como se describe a continuación:

Una colonia tomada de un cultivo fresco de *C. necator* en medio LB (Apéndice 3) y agar al 2% adicionado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), se usó para inocular 50 ml de medio LB (Apéndice 3), el cual se incubó durante la noche a 250 rpm y 37°C. El cultivo anterior (5 ml) se usó para

inocular un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio LB (Apéndice 3), el cual se incubó en las condiciones descritas hasta una D.O. (600 nm) de 0.6 - 0.7. Las células del cultivo se separaron mediante centrifugación a 2,500 rpm y se lavaron tres veces, cada vez con un volumen equivalente de agua destilada MiliQ estéril helada. El paquete celular finalmente se resuspendió en 3ml de glicerol al 10% y fraccionó en tubos Eppendorf de 1.5 ml en alícuotas de 100  $\mu$ l, y se almacenaron a -80°C.

### 13. Transformación por electroporación

A la suspensión celular (100  $\mu$ l) descrita en la sección anterior, se le adicionaron 1-5  $\mu$ g del DNA plasmídico (PIP0), y se incubó durante 5 min en una cubeta de electroporación (0.1 cm de grosor). La electroporación se realizó a 1.8 kV, 25  $\mu$ F y 4.0 ms en un equipo de electroporación Gene Pulser II, equipado con un módulo “Pulser Controller Plus” (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA). A la suspensión celular electroporada se le agregaron 900  $\mu$ l de medio LB (Apéndice 3) estéril, se mezcló con micropipeta y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, en seguida se incubaron con agitación a 250 rpm durante 2 h y 30°C, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 2 minutos. Después de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio LB (Apéndice 3) estéril, y se sembraron (los 100  $\mu$ l) en una placa con medio LB y agar al 2% adicionado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Finalmente, el DNA plasmídico de las clonas se extrae y analiza mediante restricción con la enzima HindIII y se visualiza en gel de electroforesis. Las clonas de *C. necator* obtenidas se nombraron: DSM-541Z y RE-2133F.

### 14. Cultivo en matraz

En los cultivos de la cepa DSM-541 sin transformar (Cepa control) de *C. necator* mencionados a continuación no se utilizó ningún antibiótico ni se adiciono arabinosa.

Las cepas de *C. necator* transformantes DSM-541Z y RE-2133F obtenidas en la sección anterior y la cepa mutante DSM-541 sin transformar (Cepa control), se cultivaron por duplicado en 50 ml de medio LB adicionado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina a 30°C y 250 rpm durante 48 h. Después de las 48h se tomaron 5 ml para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio LB (Apéndice 3) adicionado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina y se dejaron incubando 24 h a 250rpm y 30°C. La biomasa de estos cultivos se recolectó mediante centrifugación a 7500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y posteriormente se resuspendieron en aproximadamente 10 ml de medio mínimo para inocular matraces Erlenmeyer de 1 L con 500 ml de medio mínimo adicionado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina y 15 g/l de fructosa. A las 18 h de incubación se adicionó 0.5% (w/v) de arabinosa. Después, a las 24 h y con una D.O. aproximada de 2.8 se adicionaron 4 ml de aceite de canola y 2 ml de ácido octanóico, los cultivos tuvieron una duración total de 144 h. El medio mínimo utilizado se compone de los siguientes elementos:

Por litro: 3.57 g  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 5.66 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de solución de elementos traza (0.3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.2 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 30 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 10 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , en solución de HCl 0.1 N) ajustado a pH de 7 (Flores-Sánchez et al., 2020).

## 15. Microscopia de fluorescencia

Muestras (1 ml) de las cepas de *C. necator* transformantes DSM-541Z y RE-2133F y la cepa mutante DSM-541 sin transformar (Cepa control) cultivadas en el medio mínimo descrito en la sección anterior se tomaron para visualizar la acumulación del polímero. Cada muestra (1 ml), se centrifugo en micro centrifuga a 12000 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 300 µl de agua y hexano (2:1). Después, la suspensión se centrifugo en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendio en 200 µl de agua estéril. Las células se incubaron durante 10 minutos en obscuridad total con 12.2 ng/ml de Rojo Nilo, y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Microscopio Vertical Nikon, ECLIPSE Ci – S), con un haz de luz ultravioleta en una gama de 576-644 nm.

## 16. Recolección de biomasa y eliminación del aceite residual

Los cultivos obtenidos en la sección 14 (Cultivos de *C. necator* transformantes DSM-541Z y RE-2133F y la cepa mutante DSM-541 sin transformar) se vertieron y centrifugaron en tubos falcón de 50 ml a 7500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante las células se resuspendieron en una mezcla de 30 ml (2:1) de agua:hexano, esto se realizó por duplicado, posteriormente las células se resuspendieron en 10 ml de agua estéril, y se colocaron en caja Petri de vidrio, se colocaron en un horno a 60 °C durante 48 h para evaporar toda el agua, una vez secas las células se pesaron y registro su peso seco.

## 17. Extracción del polímero

La totalidad de las células secas obtenidas en la sección anterior (Células de *C. necator* transformantes DSM-541Z y RE-2133F y la cepa mutante DSM-541 sin transformar) se resuspendieron en cloroformo (50 ml/ g de células) y se calentaron hasta ebullición con agitación constante durante 50 min. Los restos celulares se separaron por filtración y el cloroformo restante (aprox. 20 ml) se vertió en una placa Petri. El cloroformo con el polímero disuelto se transfirió a un matraz de 250 ml. La precipitación del polímero se llevó a cabo por goteo en un vaso de precipitados con hexano frio (4°C), las fibras precipitadas del polímero fueron concentradas mediante centrifugación a 600 rpm durante 5 minutos y se dejaron en placa Petri hasta evaporar los solventes.

## 18. Cromatografía de gases

El polímero obtenido de la sección anterior de las cepas de *C. necator* utilizadas, contenido en tubos Hach, se disolvió cada uno en 2 ml de cloroformo, luego se adicionaron 2 ml de propanol HCl (20% v/v) y 200 µl de ácido benzoico, se cerraron los tubos herméticamente, y se calentó hasta 100 °C durante 2.5 h. Luego se dejó enfriar hasta una temperatura de 25 °C y se le adicionaron 2 ml de agua estéril para limpiar las impurezas de las muestras, se recuperó la fase orgánica de cada muestra y se llevaron a cromatografía de gases: Gas Chromatograph SRI 8610C, marca: SRI® con la columna empacada (CHROMOSORB W-AW 80/100) se opera isotérmicamente a 171 °C durante 16 min con un Detector de Flama Ionizante (FID).

## Resultados y discusión

La siguiente sección del documento presenta todos los resultados y su respectiva discusión de la metodología ya descrita anteriormente en el mismo orden.

### 1. Plásmido y gen *in silico*

El fragmento que se diseñó y que se sintetizó en GenScript se muestra en la Figura 7. El fragmento posee sitios de restricción EcoRV en sus extremos, los cuales se utilizaron para liberar el fragmento del plásmido que lo contenía (pUC94). El fragmento contiene la secuencia de Shine-Dalgarno (AGGAGG) para regular la iniciación de la traducción, el gen de interés, compuesto por la *phaJ*, un enlazador de ocho glicinas y serinas el cual es altamente flexible, lo que propicia la interacción y correcto plegamiento de las enzimas a la vez que las mantiene juntas, el gen *phaC* y por último dos codones de paro para garantizar el fin de la traducción, en total, el fragmento de interés tiene 2193 pb.

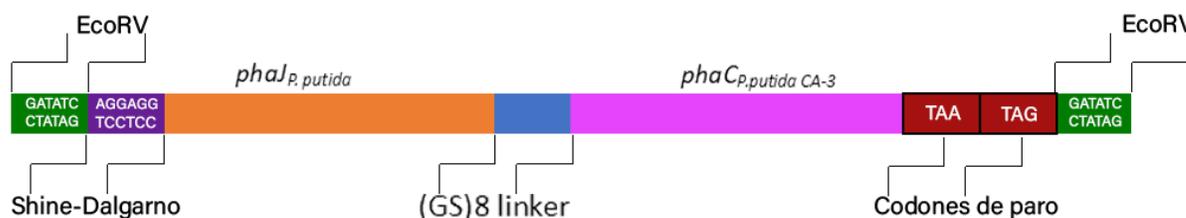


Figura 7 Representación gráfica del fragmento que se mandó a sintetizar en GenScript, con todos sus elementos.

La construcción del plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés insertado se nombró como P1P0 (Figura 8). La figura muestra el plásmido final con el fragmento insertado en la orientación adecuada, el cual posee los genes de resistencia a kanamicina y a cloranfenicol, los cuales fueron utilizados como marcadores de selección, así como el promotor pBAD, inductor que se utilizó con una concentración de 0.5% w/v de arabinosa.

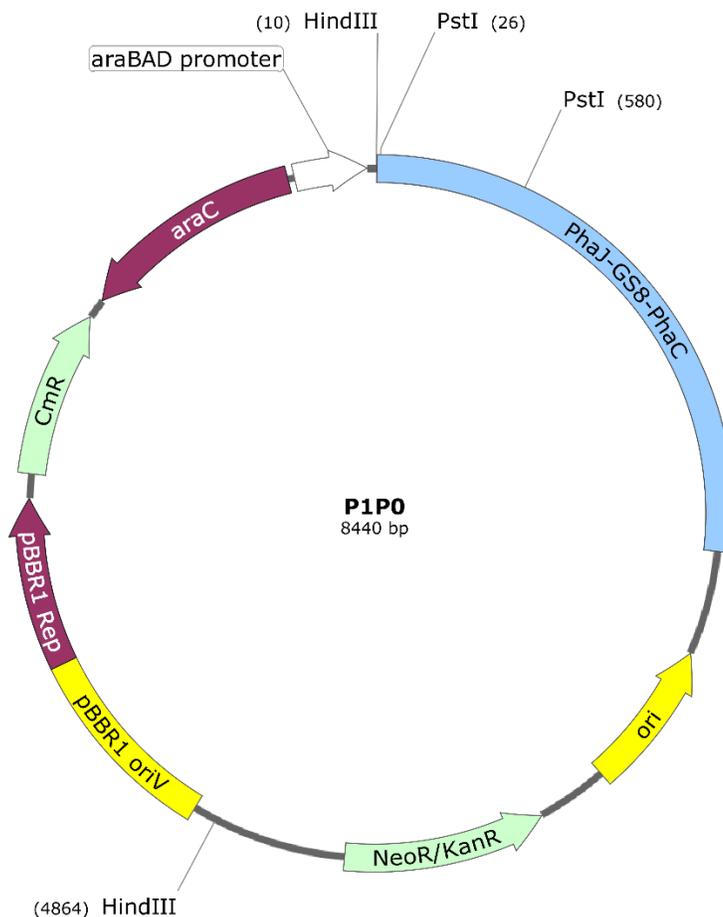


Figura 8 Plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés insertado in silico (elaborado en SnapGene 3.2.1).

La proteína quimérica se modeló para ver su conformación y analizar si los dominios de las enzimas se bloquean o se encuentran libres una vez que se pliega la proteína. Como se puede ver en la Figura 9, tanto PhaJ como PhaC, sugieren una separación adecuada que no interfiere una en la otra, además el enlazador altamente flexible que poseen asegura que se puedan mover e interactuar con otras moléculas de ser necesario, teniendo así espacio suficiente para poder interactuar con el medio, este modelo sugirió que la enzima quimérica sería funcional y se plegaría correctamente.

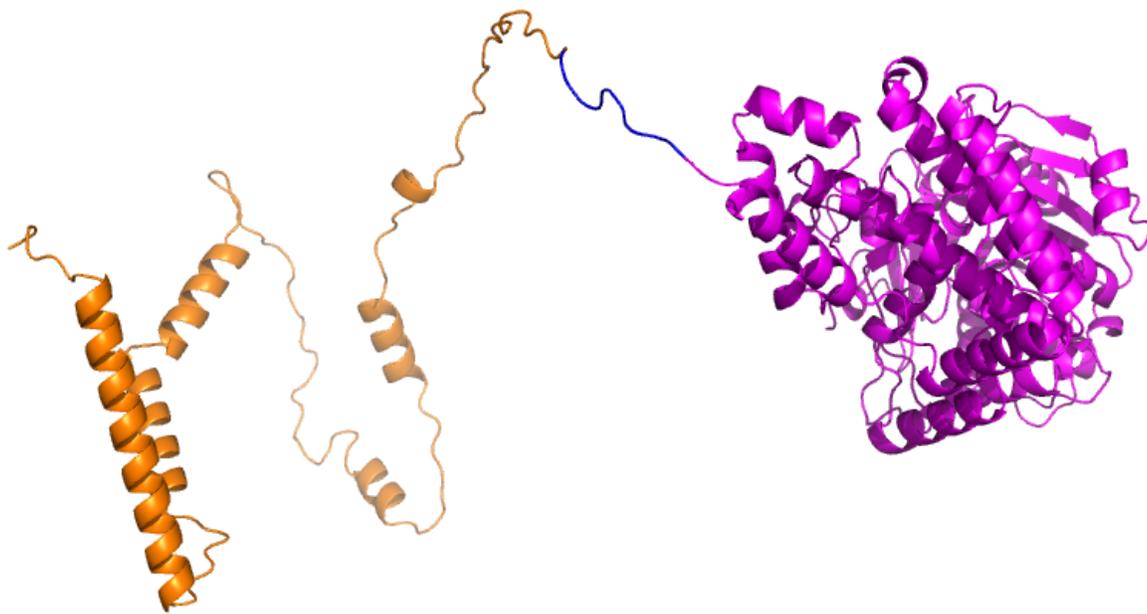


Figura 9 Modelado *de novo* en el software de tr-Rosetta visualizado con PyMol (Schrodinger, versión 2.5), en color naranja se observa la proteína PhaJ, en color azul el enlazador GS8 y en color magenta la proteína de PhaC.

## 2. Resumen de la construcción del plásmido

La construcción del plásmido se resume en la Figura 10, la cual se puede dividir en dos etapas, la digestión enzimática y la ligación del fragmento de interés con el plásmido pMPJAS01 que se explican más detalladamente a continuación.

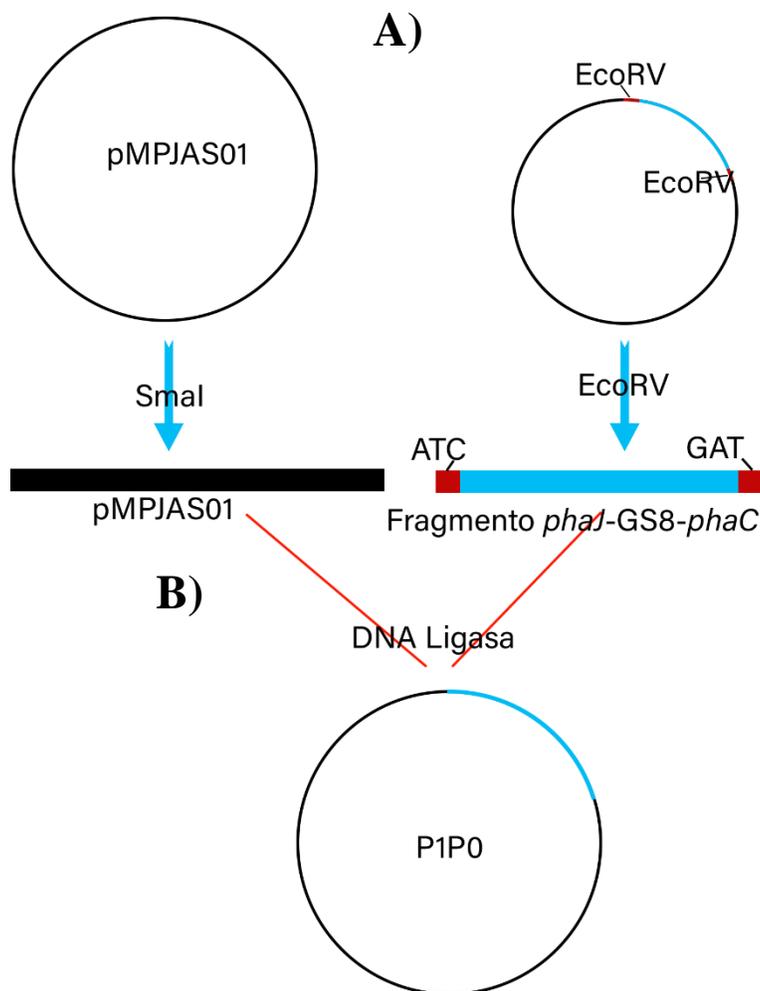


Figura 10 Esquema representativo del proceso de construcción del plásmido pMPJAS01-JGS8C, dividido en dos etapas marcadas como A y B.

### 3. Preparación del plásmido pMPJAS01 y del fragmento de interés

Los plásmidos pUC94 y pMPJAS01, subclonados en *E. coli* TOP10, se restringieron con SmaI y EcoRV respectivamente para comprobar la identidad del plásmido y el fragmento de interés. El análisis de restricción de los plásmidos en gel de electroforesis se muestra en la Figura 11. En el carril 2 se observa el plásmido pMPJAS01 circular, de 6247 pb. En los carriles 3 y 4 se observa el plásmido pMPJAS01 linealizado con SmaI. En el carril 5 se encuentra pUC94 circular de 4832 pb. En los carriles 6 y 7 se encuentra el fragmento de interés de 2193 pb liberado (banda inferior) y el plásmido pUC57 linealizado (banda superior), esto confirma que el plásmido pUC94 efectivamente contiene el fragmento de interés con los sitios de restricción para EcoRV.

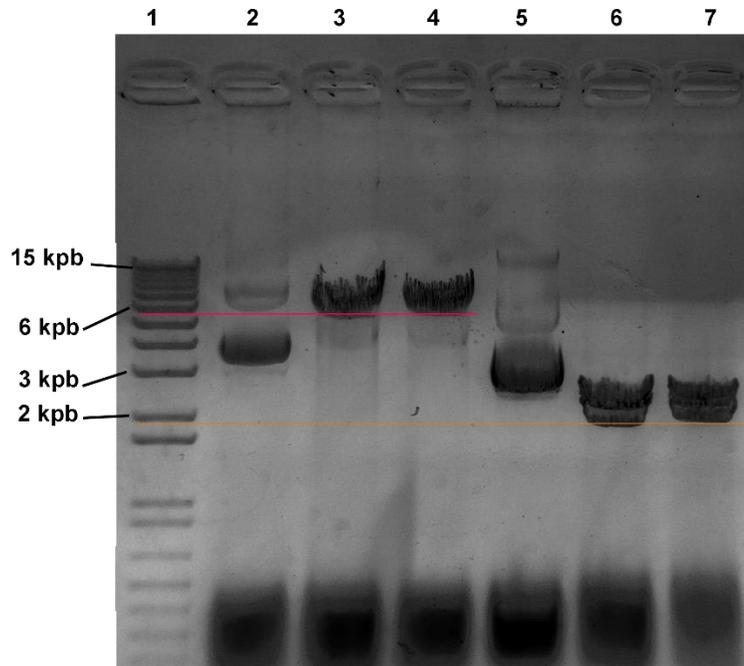


Figura 11 Gel de electroforesis que muestra los productos de restricción enzimática de diferentes plásmidos, 1) Marcador molecular 1Kb DNA plus (NEB), 2) Plásmido pMPJAS01, 3) y 4) pMPJAS01 linealizado con SmaI, 5) pUC94 con el fragmento de interés, 6) y 7) pUC57 linealizado y el fragmento liberado con EcoRV.

#### 4. A): Transformación y comprobación del plásmido P1P0

El plásmido P1P0 subclonado en *E. coli* TOP10 se verifico tomando 1  $\mu$ l de las muestras de DNA extraído en la sección 11 de metodología, se realizó un análisis en gel de electroforesis las clonas, observado en la Figura 12, donde las bandas con un tamaño molecular aproximado de 8440 pb se seleccionaron para su posterior análisis de restricción.

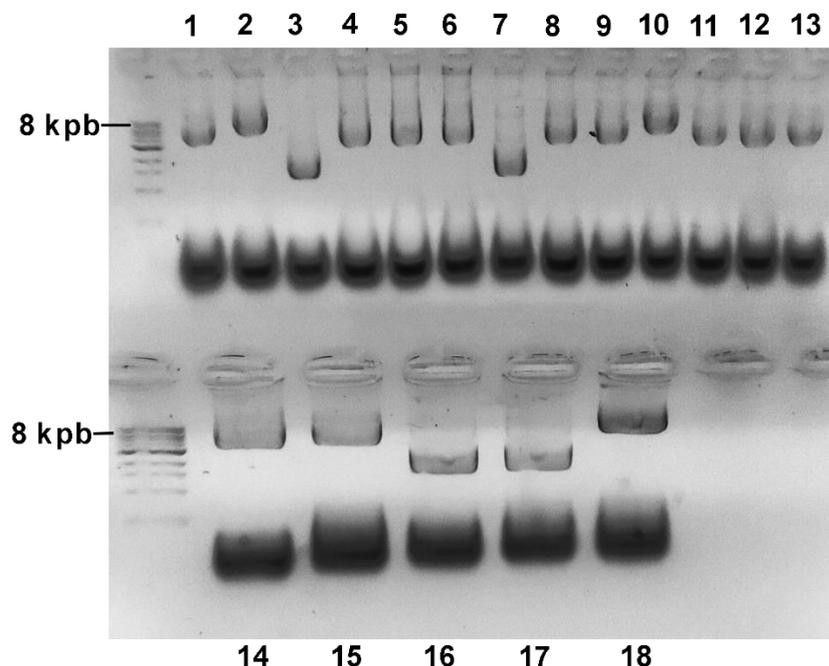


Figura 12 Gel de electroforesis del DNA extraído de las clonas de *E. coli* TOP10, el carril izquierdo es el marcador de tamaño molecular, los carriles del 1 al 18 es el DNA extraído de las clonas seleccionadas.

Las muestras seleccionadas de DNA plasmídico fueron 2, 10 y 18 (8440 pb) las cuales se restringieron (1  $\mu$ l) con la enzima PstI con el fin de comprobar la identidad del plásmido P1P0 y la orientación del fragmento de interés insertado.

## 5. Comprobación de la orientación

La orientación del fragmento insertado en pMPJAS01 se comprobó mediante restricción con PstI, del DNA plasmídico de las clonas seleccionadas en la sección anterior. Cuando el fragmento de interés se inserta con la orientación adecuada se espera que la restricción produzca dos bandas, de 7886 pb y 554 pb, en un gel de electroforesis. En contraste, una orientación no adecuada produce dos bandas; de 6847 pb y 1593 pb, esto se explica gráficamente en la Figura 13.

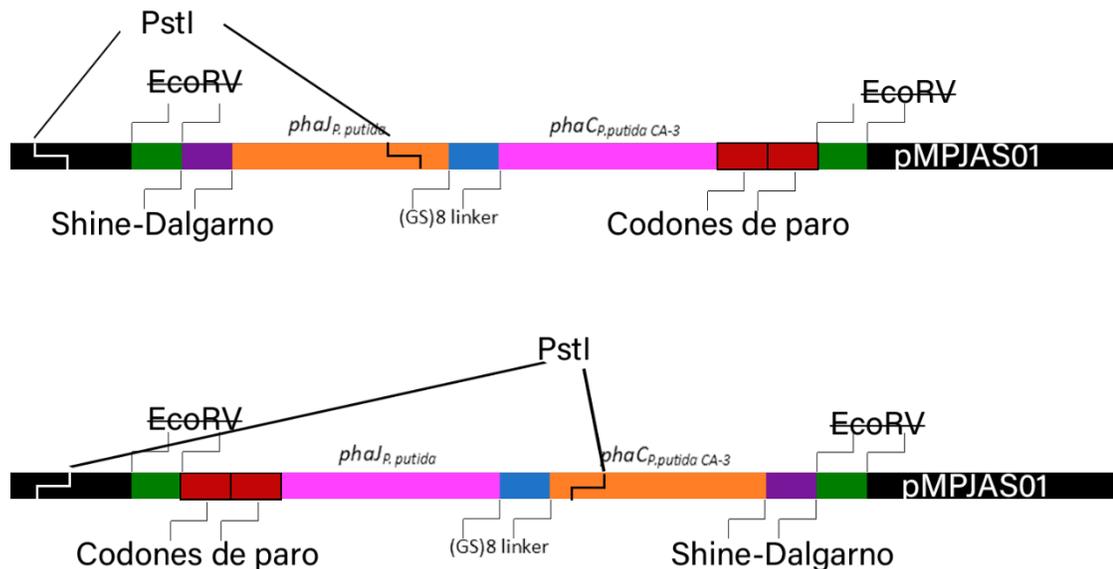


Figura 13 Representación gráfica de las posibles orientaciones del fragmento de interés insertado en pMPJAS01 que se pueden presentar.

La restricción del DNA plasmídico, con la enzima PstI, de las clonas seleccionadas en la sección cuatro se muestra en la Figura 14. En el carril 18, se observan dos bandas de 7900 pb y 500 pb aproximadamente, que demuestran que la clona contiene el plásmido P1P0 (pMPJAS01 con el fragmento insertado) de 8440 pb, con el fragmento insertado en la orientación adecuada. Dicho DNA plasmídico fue subclonado en *E. coli* TOP10 y posteriormente se realizó una extracción de DNA plasmídico a mediana escala para utilizarlo en el proceso de transformación de las cepas mutantes de *C. necator* DSM-541 y RE-2133, descrito en la sección 12 y 13 de la metodología.

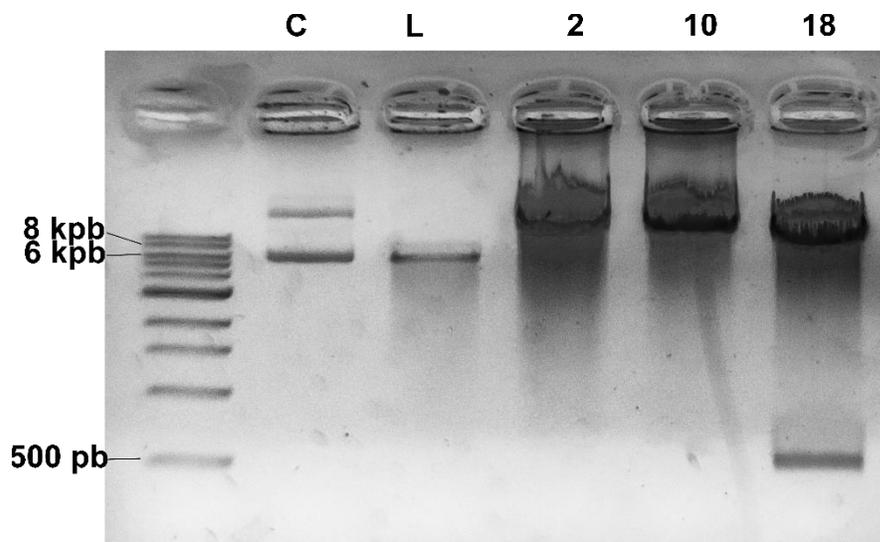


Figura 14 Gel de electroforesis de las muestras de DNA plasmídico extraído, el carril izquierdo es el marcador de tamaño molecular, los carriles C y L son el plásmido pMPJAS01 circular y lineal. Los carriles 2, 10 y 18 muestran el DNA extraído de las clonas seleccionadas en la sección cuatro restringido con PstI.

## 6. Transformación de *C. necator* DSM-541 y SE-2133

Las cepas mutantes de *C. necator* DSM-541 y RE-2133 fueron transformadas con el DNA plasmídico obtenido en la sección anterior, las clonas se seleccionaron usando kanamicina (50 µg/ml). Posteriormente para verificar la presencia del plásmido P1P0 se hizo una extracción de DNA plasmídico a pequeña escala, descrita en la sección 6 de metodología. El DNA plasmídico se analizó en gel de electroforesis como se puede observar en la Figura 15. En la cual el DNA plasmídico extraído fue comparado con P1P0, localizado en el último carril, para seleccionar las clonas cuyo extracto tuviera un patrón de bandeo similar o igual a este. Por último, el DNA plasmídico seleccionado se restringió con HindIII para comprobar la identidad del plásmido P1P0.

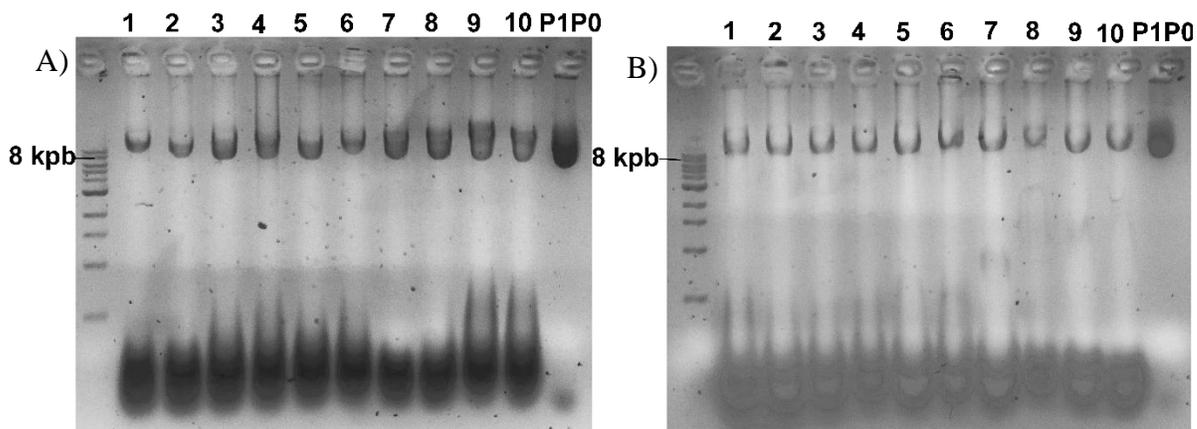


Figura 15 Gel de electroforesis del DNA plasmídico extraído de las clonas de *C. necator* DSM-541 (A) y RE-2133 (B), el carril izquierdo muestra el marcador de tamaño molecular, en los carriles del 1 al 10 aparece el DNA plasmídico extraído de las clonas seleccionadas y en los carriles P1P0 se observa el plásmido pMPJAS01 con el fragmento de interés.

El análisis de restricción anteriormente mencionado con la enzima HindIII, se encuentra en la Figura 16, donde en los carriles del 1 al 9 se observan dos bandas de 4854 pb y 3586 pb, lo que confirma que esas clonas contienen el plásmido P1P0. Finalmente, las clonas transformantes de *C. necator* fueron nombradas DSM-541Z y RE-2133F.

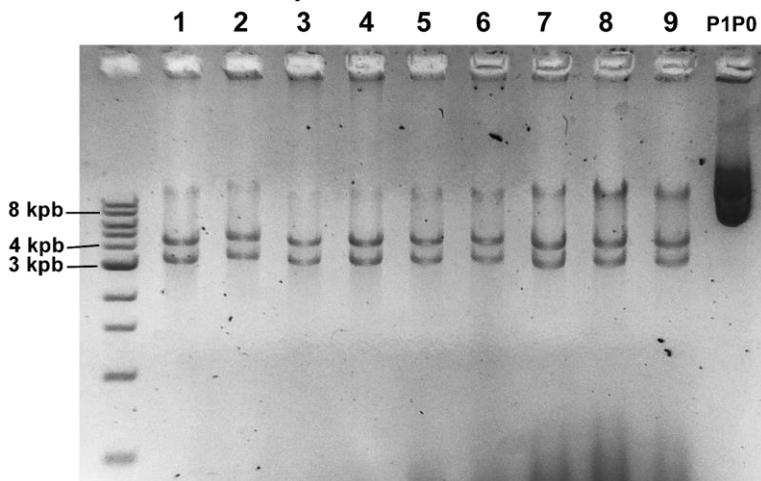


Figura 16 Gel de electroforesis del DNA restringido con HindIII de las clonas de *C. necator* DMS-541 (1-4) y RE2133 (5-9). El carril izquierdo muestra el marcador de tamaño molecular, en los carriles del 1 al 18 se observa el DNA extraído de las clonas seleccionadas.

## 7. Biomasa final en peso seco

Los cultivos en matraz de las cepas DSM-541Z, RE-2133F (cepas mutantes transformadas) y DSM-541 (cepa mutante sin transformar, utilizada como control), descritos en la sección 14 de metodología, se procesaron como describe la sección 16 de misma, obteniendo 727 mg/l de biomasa en peso seco para la cepa DSM-541Z, 1002 mg/l para la cepa RE2133F y 700 mg/l para la cepa control DSM-541.

## 8. Microscopia de fluorescencia

De los cultivos en matraz de las cepas DSM-541Z, RE2133F y DSM541 descritos anteriormente, se tomaron muestras de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se realizó el tratamiento descrito (sección 15 de metodología) y se procedió a observar las muestras en microscopia de fluorescencia. El método de microscopía de fluorescencia se empleó ya que es un método rápido y efectivo, utilizado ampliamente para la identificación de PHAs en diversos microorganismos (Christensen et al., 2021; Legat et al., 2010; Spiekermann et al., 1999).

La cepa mutante de *C. necator* DSM-541, utilizada como control se encuentra en la Figura 17A, donde se observa una única célula fluorescente. La fluorescencia observada es homogénea en toda la célula, presentando la misma intensidad, por lo que la adherencia del fluorocromo Rojo Nilo a los lípidos de la membrana celular, dio lugar a la fluorescencia. La Figura 17B muestra una fotografía obtenida por microscopía de fluorescencia de la cepa mutante transformada DSM-541Z de *C. necator*. Con flechas amarillas se destacan algunas de las células que contienen gránulos de PHA en su interior, los cuales se distinguen por tener una fluorescencia y un color rojo más intenso en comparación con el resto de la célula. Lo anterior se puede apreciar mejor comparando con la Figura 17A, los puntos de rojo intenso que se aprecian en la figura 17B son gránulos con PHA en su interior a los cuales se adhiere preferencialmente el Rojo Nilo. Las figuras 17C y D muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de las cepas mutantes transformadas DSM-541Z y RE-2133F respectivamente. Los gránulos de PHA, se indican con flechas amarillas. Al comparar con las células de la figura 17A se pueden distinguir de manera clara los gránulos de PHA.

Con los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia podemos afirmar que *C. necator* se transformó con el plásmido que contiene el gen quimérico, y que este se expresó de manera correcta. Así mismo, considerando que obtuvimos gránulos de polímero podemos suponer que las dos enzimas que conforman la enzima quimérica se plegaron correctamente, por lo que, la PHA sintasa es funcional. Sin embargo, en un futuro, es necesario confirmar la funcionalidad de la PhaJ mediante ensayos de actividad enzimática como describe Fiedler et al., 2002.

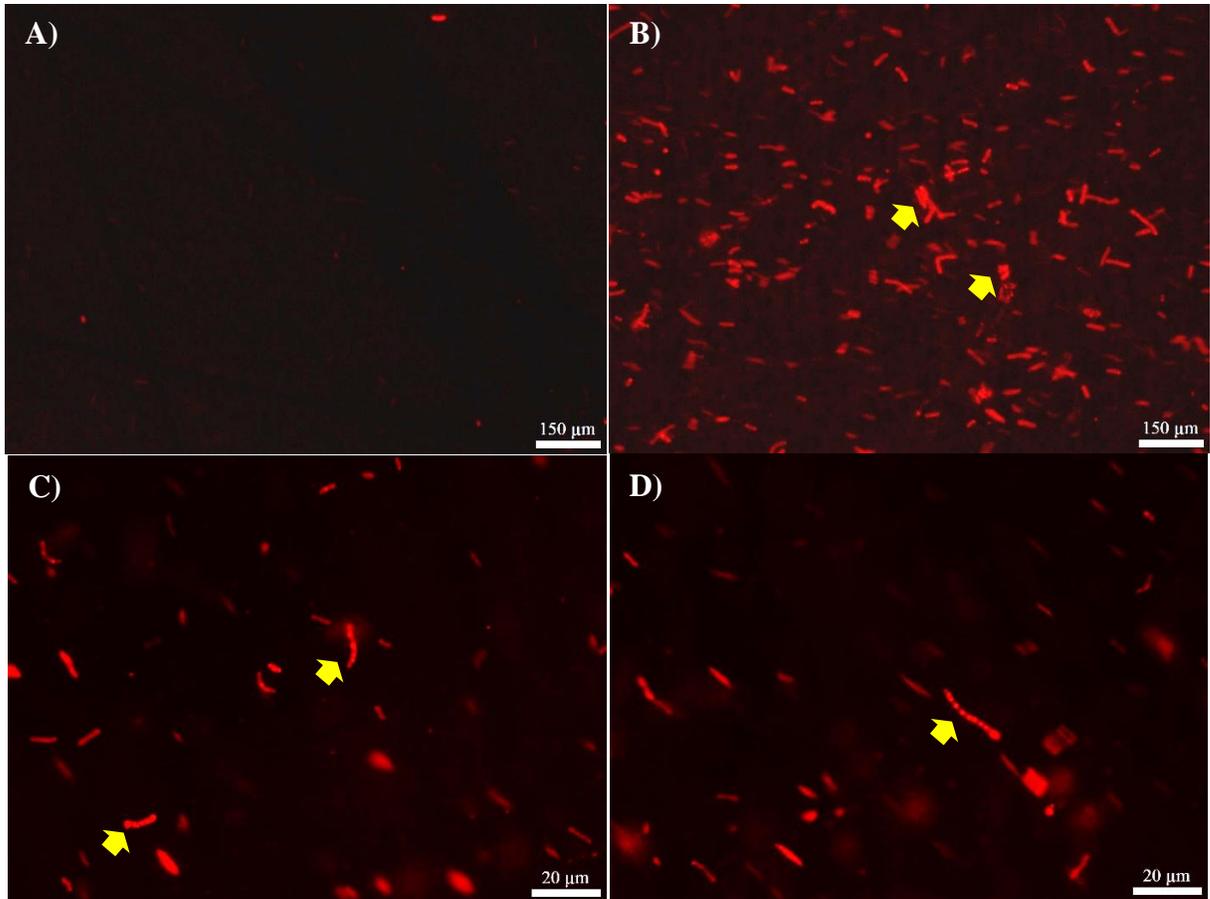


Figura 17 Células de *C. necator* teñidas con rojo Nilo, las imágenes A-D de fluorescencia se obtuvieron a 300ms de tiempo de exposición 12 ng/ml de RN. A) Cepa DSM 541, B) y C) Cepa DSM-541Z, D) Cepa RE-2133F, las flechas amarillas indican los gránulos de PHA.

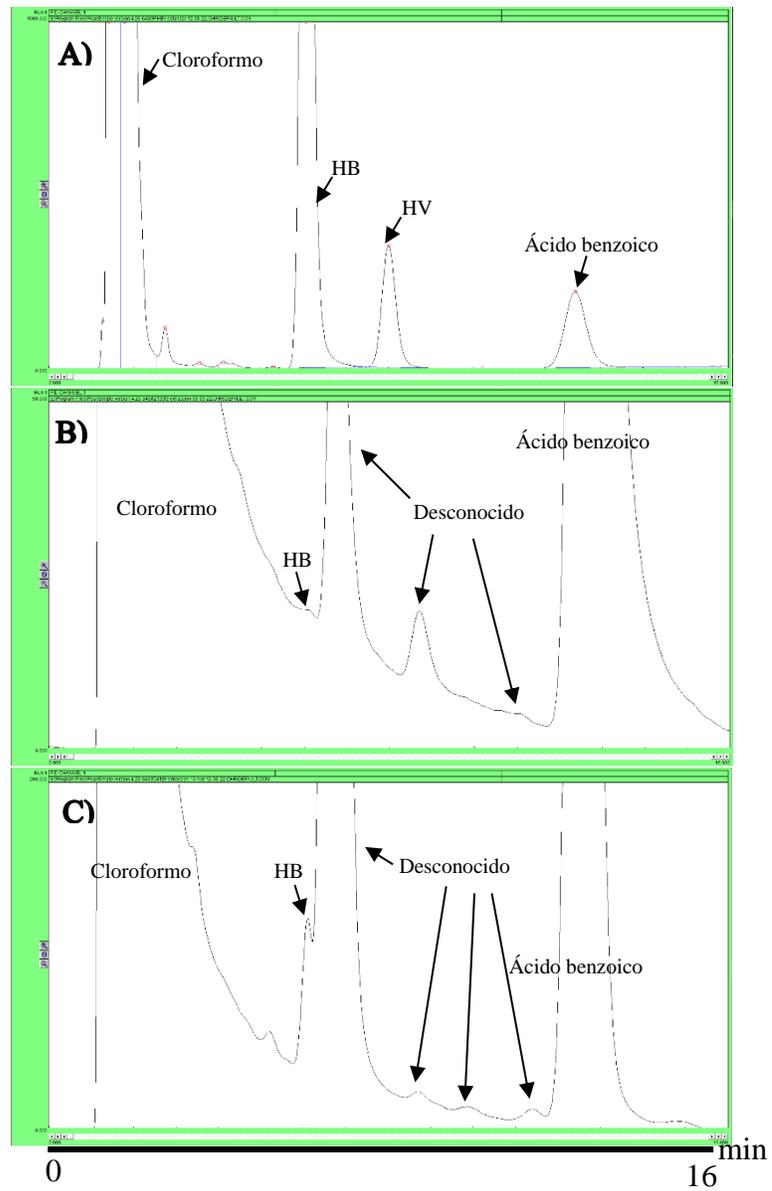
## 9. Extracción y purificación del polímero

La biomasa obtenida de los cultivos en matraz de las cepas DSM-541Z, RE2133F y DSM-541 (control) de *C. necator*, mencionada en la sección siete, se utilizó en su totalidad para el proceso de extracción y purificación del polímero descrito en la sección 17 de metodología. La extracción y purificación del polímero, no dio los resultados esperados, ya que no se obtuvo una película del polímero purificado como se ha reportado en los trabajos de Araceli et al., 2022; Rathinasabapathy et al., 2014. En lugar de una película, se obtuvieron pequeñas y frágiles fibras del polímero purificado, las cuales se recolectaron mediante centrifugación (~2000rpm) y se concentraron evaporando los solventes.

Para la cepa mutante DSM-541 sin transformar de *C. necator* no se obtuvo ningún polímero.

## 10. Cromatografía de gases

La totalidad del polímero extraído de las cepas DSM-541Z y RE-2133F se propanolizó de acuerdo con lo descrito en la sección 16 de metodología. Los cromatogramas de los polímeros obtenidos se observan en la Figura 18. En flechas negras se indica la señal perteneciente al derivado de hidroxibutirato (HB) y el derivado de hidroxivalerato (HV) formados después de la propanólisis. Dichas señales se encuentran presentes en el control positivo (Figura 18A), el cual es HB e HV puros, también las señales de HB se encuentran presentes en la Figura 18B y C. Esto confirma la presencia del PHA en los gránulos provenientes de las cepas mutantes transformadas. Debido a que la cantidad de polímero presente es tan baja en estas cepas, fue necesario cambiar la escala de visualización de los cromatogramas en las Figuras 18B y C para lograr observar las señales, la presencia de estas señales reafirma la expresión y funcionalidad de la enzima quimérica. Por otra parte, también se observan otras señales, marcadas con flechas, pertenecientes a compuestos desconocidos. Estas señales se localizan entre la señal del HB y del ácido benzoico, lamentablemente al no contar con más estándares de mcl no es posible determinar la naturaleza de las señales.



**Figura 18** Cromatogramas obtenidos después de la propanólisis de A) Estándar de polihidroxi-butirato-valerato (PHB-V), B) Polímero purificado de la cepa DSM-541Z y C) Polímero purificado de la cepa RE2133F, marcado con flechas negras etiquetadas se encuentran las señales de los compuestos conocidos y sin etiquetar los compuestos desconocidos en el cromatograma.

## Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis y objetivos planteados se logró expresar la enzima quimérica funcional resultante de fusionar *phaC*<sub>P. putida CA-3</sub> y *phaJ*<sub>P. putida</sub>, en dos cepas mutantes de *C. necator* (DSM-541 y RE-2133).

El análisis de las cepas mutantes transformantes DSM-541Z y RE-2133F de *C. necator* en microscopía de fluorescencia. Nos lleva a la conclusión de que la enzima quimérica se expresó de forma exitosa y funcional, generando gránulos de PHA en las cepas mutantes transformadas, también la presencia de gránulos de PHA en el interior de la célula demuestra la integridad y funcionalidad de la PHA sintasa.

La incorporación de mcl al PHA sintetizado, y el grado en que la enzima quimérica favorece la incorporación de mcl al producto, como se había planteado en la hipótesis y objetivos, no se logró analizar debido a la baja cantidad de polímero obtenido.

La cromatografía de gases realizada reafirma la presencia de HB y por lo tanto de PHA acumulado en las cepas mutantes transformadas DSM-541Z y RE-2133F de *C. necator*. La presencia de señales desconocidas y sugiere la incorporación de otros monómeros desconocidos por el momento al PHA obtenido.

## Observaciones, recomendaciones y perspectivas a futuro

Durante la realización del proyecto se lograron identificar varios puntos que se pueden mejorar y optimizar, lo más importante es lograr obtener polímero suficiente para realizar la caracterización mecánica del mismo, para lo cual se requiere analizar y optimizar la producción de biomasa de las cepas mutantes transformadas DSM-541Z y RE-2133F de *C. necator* y el desarrollo de una nueva estrategia de cultivo más apta para las cepas utilizadas.

En el futuro se planea caracterizar las cepas mutantes transformadas DSM-541 y RE-2133 de *C. necator*. También se propone realizar fermentaciones a nivel biorreactor para obtener cantidades suficientes de PHA para los estudios de caracterización de las propiedades mecánicas del polímero.

La identificación del polímero se plantea realizar en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, técnica en la cual no es necesario el uso de estándares de monómeros de PHA.

## Referencias

- Abdallah, M. Ben, Karray, F., & Sayadi, S. (2020). Production of polyhydroxyalkanoates by two halophilic archaeal isolates from Chott El Jerid using inexpensive carbon sources. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010109>
- Amara, A. A., & Moawad, A. H. (2011). PhaC Synthases and PHA Depolymerases: The Enzymes that Produce and Degrade Plastic. *IIUM Engineering Journal*, 12(4). <https://doi.org/10.31436/iiumej.v12i4.171>
- Araceli, F. S., Juliana A, R., Berenice, V. P., Fermin, P. G., & Bruce A, R. (2022). High amounts of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates subunits can be accumulated in recombinant *Cupriavidus necator* with wild-type synthase. *Journal of Biotechnology*, 349(March), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.03.011>
- Arikawa, H., & Matsumoto, K. (2016). Evaluation of gene expression cassettes and production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with a fine modulated monomer composition by using it in *Cupriavidus necator*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0583-7>
- Bi, C., Su, P., Müller, J., Yeh, Y. C., Chhabra, S. R., Beller, H. R., Singer, S. W., & Hillson, N. J. (2013). Development of a broad-host synthetic biology toolbox for *Ralstonia eutropha* and its application to engineering hydrocarbon biofuel production. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-107>
- Borrero-de Acuña, J. M., Bielecka, A., Häussler, S., Schobert, M., Jahn, M., Wittmann, C., Jahn, D., & Poblete-Castro, I. (2014). Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-88>
- Brigham, C. J., Budde, C. F., Holder, J. W., Zeng, Q., Mahan, A. E., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2010). Elucidation of  $\beta$ -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression. *Journal of Bacteriology*, 192(20), 5454–5464. <https://doi.org/10.1128/JB.00493-10>
- Budde, C. F., Riedel, S. L., Willis, L. B., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2011). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2847–2854. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-10>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Christensen, M., Jablonski, P., Altermark, B., Irgum, K., & Hansen, H. (2021). High natural PHA production from acetate in *Cobetia sp.* MC34 and *Cobetia marina* DSM 4741T and in silico analyses of the genus specific PhaC2 polymerase variant. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01713-0>
- Chuah, J. A., Tomizawa, S., Yamada, M., Tsuge, T., Doi, Y., Sudesh, K., & Numata, K. (2013). Characterization of site-specific mutations in a short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase: *In vivo* and *in vitro* studies of enzymatic activity and substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3813–3821. <https://doi.org/10.1128/AEM.00564-13>
- Dartiailh, C., Blunt, W., Sharma, P. K., Liu, S., & Cicek, N. (2021). The Thermal and Mechanical Properties of Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoates Produced by *Pseudomonas*

- putida* LS46 on Various Substrates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.617489>
- dos Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 269–298. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.10>
- Fiedler, S., Steinbüchel, A., & Rehm, B. H. (2002b). The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes phaJ from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Archives of Microbiology*, 178(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0444-0>
- Flores-Sánchez, A., Rathinasabapathy, A., López-Cuellar, M. del R., Vergara-Porras, B., & Pérez-Guevara, F. (2020a). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from vegetable oil under the co-expression of fadE and phaJ genes in *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1600–1607. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.275>
- Fukui, T., Ohsawa, K., Mifune, J., Orita, I., & Nakamura, S. (2011). Evaluation of promoters for gene expression in polyhydroxyalkanoate-producing *Cupriavidus necator* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1527–1536. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3100-2>
- Guamán, L. P., Barba-Ostria, C., Zhang, F., Oliveira-Filho, E. R., Gomez, J. G. C., & Silva, L. F. (2018). Engineering xylose metabolism for production of polyhydroxybutyrate in the non-model bacterium *Burkholderia sacchari*. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0924-9>
- Han, J., Qiu, Y. Z., Liu, D. C., & Chen, G. Q. (2004). Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. *FEMS Microbiology Letters*, 239(1), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.044>
- Jung, H. R., Jeon, J. M., Yi, D. H., Song, H. S., Yang, S. Y., Choi, T. R., Bhatia, S. K., Yoon, J. J., Kim, Y. G., Brigham, C. J., & Yang, Y. H. (2019). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.091>
- Kutralam-Muniasamy, G., & Pérez-Guevara, F. (2018). Genome characteristics dictate poly-R-(3)-hydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2460-5>
- Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G., & Stan-Lotter, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1119–1127. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2611-6>
- Matsumoto, K., Takase, K., Yamamoto, Y., Doi, Y., & Taguchi, S. (2009). Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *ralstonia eutropha* and *aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *escherichia coli*. *Biomacromolecules*, 10(4), 682–685. <https://doi.org/10.1021/bm801386j>
- Napathorn, S. C., Visetkoop, S., Pinyakong, O., Okano, K., & Honda, K. (2021). Polyhydroxybutyrate (PHB) Production Using an Arabinose-Inducible Expression System in Comparison with Cold Shock Inducible Expression System in *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.661096>
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel,

- A., Friedrich, B., & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–1262. <https://doi.org/10.1038/nbt1244>
- Rathinasabapathy, A., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., & Pérez-Guevara, F. (2014a). A feeding strategy for incorporation of canola derived medium-chain-length monomers into the PHA produced by wild-type *Cupriavidus necator*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1409–1416. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1563-2>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126(September 2017), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Reddy, M. V., Watanabe, A., Onodera, R., Mawatari, Y., Tsukiori, Y., Watanabe, A., Kudou, M., & Chang, Y. C. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using single or mixture of fatty acids with *Bacillus* sp. CYR1: Identification of PHA synthesis genes. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100483. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100483>
- Riedel, S. L., Lu, J., Stahl, U., & Brigham, C. J. (2014). Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: Relevance for the biotechnological production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1469–1483. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5430-8>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). Protocol 20: Dephosphorylation of Plasmid DNA. In *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (pp. 1.93-1.97).
- Sato, S., Kanazawa, H., & Tsuge, T. (2011). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(3), 951–959. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3150-5>
- Schlegel, H. G., Lafferty, R., & Krauss, I. (1970). The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Archiv Für Mikrobiologie*, 71(3), 283–294. <https://doi.org/10.1007/BF00410161>
- Sharma, P. K., Fu, J., Spicer, V., Krokhin, O. V., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. B. (2016). Global changes in the proteome of *Cupriavidus necator* H16 during poly-(3-hydroxybutyrate) synthesis from various biodiesel by-product substrates. *AMB Express*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0206-z>
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., & Foglia, T. A. (2002). Synthesis of poly(hydroxyalkanoates) by *Escherichia coli* expressing mutated and chimeric PHA synthase genes. *Biotechnology Letters*, 24(12), 1011–1016. <https://doi.org/10.1023/A:1015685229489>
- Spiekermann, P., Rehm, B., Kalscheuer, R. et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171, 73–80 (1999). <https://doi.org/10.1007/s002030050681>
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S., & Manandhar, P. (2019). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 62–68. <https://doi.org/10.3126/njb.v6i1.22339>
- Valdés, J., Kutralam-Muniasamy, G., Vergara-Porras, B., Marsch, R., Pérez-Guevara, F., & López-Cuellar, M. R. (2018a). Heterologous expression of phaC2 gene and poly-3-hydroxyalkanoate production by recombinant *Cupriavidus necator* strains using canola oil as carbon source. *New Biotechnology*, 40(August 2017), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.001>

- Valdés, J., Kutralam-Muniasamy, G., Vergara-Porras, B., Marsch, R., Pérez-Guevara, F., & López-Cuellar, M. R. (2018b). Heterologous expression of phaC2 gene and poly-3-hydroxyalkanoate production by recombinant *Cupriavidus necator* strains using canola oil as carbon source. *New Biotechnology*, 40(August 2017), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.001>
- Venkateswar Reddy, M., Mawatari, Y., Onodera, R., Nakamura, Y., Yajima, Y., & Chang, Y. C. (2017). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas pseudoflava*: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii*. *Bioresource Technology*, 234, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.008>
- Ward, P. G., De Roo, G., & O'Connor, K. E. (2005). Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2046–2052. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). *One-Step Versus Two-Step Real-Time PCR*. 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Ikuya, Y., Hisako, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Yabuuchi. *Microbiol.Immunol*, 39(11), 897–904 <https://doi.org/10.1007/BF00410161>.
- Zhong, Z. W., Song, B., & Huang, C. X. (2009). Environmental impacts of three polyhydroxyalkanoate (pha) manufacturing processes. *Materials and Manufacturing Processes*, 24(5), 519–523. <https://doi.org/10.1080/10426910902740120>

# Apéndices

## Soluciones y amortiguadores

Las soluciones y amortiguadores descritas a continuación fueron preparadas conforme Sambrook, J., E. F. Fritsch, 1989.

### Apéndice 1: Soluciones para amortiguadores de transformación

- TFB-1  
30 mM de acetato de potasio  
100 mM de cloruro de rubidio  
10 mM de CaCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15% de glicerol  
Ajustar pH a 5.8 con ácido acético  
Filtrar y almacenar a 4 °C
- TFB-2  
10 mM MOPS (ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico)  
70 mM de CaCl<sub>2</sub>  
10 mM de cloruro de rubidio  
15% glicerol  
Ajustar pH a 6.5 con KOH  
Filtrar y almacenar a 4 °C

### Apéndice 2: Amortiguadores y soluciones de lisis celular

- Solución de lisis alcalina I  
50mM de glucosa  
25 mM Tris-Cl (pH 8)  
10mM EDTA (pH 8)  
Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min 15 libras de presión.
- Solución de lisis alcalina II  
0.2 N NaOH  
1% (w/v) SDS
- Solución de lisis alcalina III  
acetato de potasio 5M: 60 ml  
Ácido acético anhídrido: 11.5 ml  
Agua: 28.5 ml
- Buffer Tris/EDTA (TE)  
100mM trisaminometano (Tris)-Cl  
10mM EDTA  
Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min 15 libras de presión.
- Buffer Tris-Cl (1M)  
Disolver 121.1g de la base Tris en 800ml de agua, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado (aproximadamente 42ml), esterilizar.

- Buffer Sodium Chloride-Tris-EDTA (STE)  
10mM Tris-CL  
0.1 M NaCl  
100 mM EDTA
- Tris-Borato-EDTA(TBE) 5x  
54g de Tris  
27.5g de ácido bórico  
20ml de EDTA 0.5M pH 8
- Antibiótico de selección (Kanamicina) a una concentración de 50 µg/ml y Ampicilina a una concentración de 100 µg/ml
- Etanol 98%
- Fenol: cloroformo (1:1 v/v)
- Glicerol (10% v/v)
- Rojo Nilo 0.5 mg/ml disuelto en acetona, almacenado en frasco ámbar oscuro

### Apéndice 3: Medios de cultivo y agarosa

- Medio Luria-Bertani (LB)  
Por litro:  
10g de triptona  
5g de extracto de levadura  
10g de NaCl
- Caldo super optimo (SOC o SOB)  
Por litro:  
20g de triptona  
5g de extracto de levadura  
0.5g de NaCl
- Tabla de concentración de agarosa en gel.

**Tabla 11 Gama de separación en gel a diferentes concentraciones de Agarosa** (Sambrook, J., E. F. Fritsch, 1989)

| Concentración de agarosa en gel (% w/v) | Gama de separación de moléculas lineales de DNA (kb) |
|---|--|
| 0.3                                     | 5-60   |
| 0.6                                     | 1-20   |
| 0.7                                     | 0.8-10   |
| 0.9                                     | 0.5-7  |
| 1.2                                     | 0.4-6  |
| 1.5                                     | 0.2-3  |
| 2                                       | 0.1-2  |