

**Tesis de grado  
Licenciatura en Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de la República  
Julio 2011**

**ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE  
POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EN  
*Herbaspirillum seropedicae* Z69 A PARTIR  
DE AZUCARES PRESENTES EN LA  
HEMICELULOSA.**

**Ana Karen Malán Courdín**

**Tutora: Dra. Silvia Batista  
Co-tutora: MSc. Ana Inés Catalán**

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable  
Unidad de Microbiología Molecular

# AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi familia por el constante apoyo, tanto afectivo como económico, porque sin ellos no sería lo que soy hoy.

A mis compañeros de hogar, quienes siempre han estado conmigo y me han escuchado, aunque no entendían de lo que les estaba hablando e igualmente me decían: “¡¡Dale Karen!!”

A mi novio, quien hace tres años está a mi lado, siempre acompañándome, dándome aliento o simplemente estando ahí cada vez que lo necesité.

También quiero agradecer enormemente a Ana Inés y a Silvia por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio, por haber dedicado su tiempo para enseñarme y por haber confiado en mí y haberme integrado a su equipo de trabajo.

También quiero agradecer a toda la gente del laboratorio por estar siempre ahí, por ayudarme cada vez que lo necesité y por darme palabras de aliento y consuelo cuando fue necesario.

## RESUMEN

El poli-3-hidroxi-butirato (PHB) es un poliéster de origen bacteriano, sintetizado como reserva de carbono y poder reductor. Posee propiedades termoplásticas, es biodegradable y biocompatible. Se considera un material alternativo a los plásticos de origen petroquímico, al menos en algunas áreas de aplicación. Actualmente, la producción de este biopolímero es más costosa que la de los plásticos convencionales. El diseño de nuevas estrategias para que la producción sea amigable con el medio ambiente y sustentable económicamente se ha constituido en un verdadero desafío.

La fuente carbonada es lo que más contribuye al costo de producción; una de las alternativas es utilizar sustratos de bajo costo, como los subproductos industriales. La hemicelulosa es uno de los residuos agroindustriales más abundantes y está compuesto por distintos carbohidratos, como xilosa, arabinosa y glucosa.

En este trabajo se realizaron estudios de crecimiento y producción de PHB en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 utilizando 30 g/l de xilosa como única fuente de carbono y una mezcla de azúcares en una proporción similar a la encontrada en la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar. En ambos casos se lograron niveles de acumulación o contenido (porcentaje en relación al peso seco de las células) de PHB del 50% y 56% respectivamente. Estos valores son comparables a los obtenidos por otros microorganismos descritos en la bibliografía y sugieren que podría ser posible la utilización de hemicelulosa hidrolizada como sustrato alternativo en la producción de PHB.

Se desconoce cuáles son las rutas involucradas en el metabolismo de xilosa en *H. seropedicae*. A los efectos de contribuir a identificar las mismas, se buscaron en el genoma de la cepa SmR1, los genes que podrían codificar para las enzimas que participan en las vías de asimilación descritas en otros microorganismos. Se determinaron también las actividades de algunas enzimas en extractos celulares. Los resultados obtenidos sugieren que la xilosa se metabolizaría por la ruta de Weinberg. No se encontraron genes que codifiquen para la xilosa isomerasa, enzima clave de la ruta de la D-xilosa isomerasa, hallada comúnmente en bacterias. El conocimiento de las rutas implicadas en el catabolismo de xilosa en *H. seropedicae* puede ser usado para aumentar los niveles de producción de PHB, eventualmente mediante la sobreexpresión o represión de algunas enzimas.

# INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Polihidroxicanoatos.....	1
1.1.1 Propiedades físicas.....	2
1.1.2 Propiedades de los PHAs como material plástico.....	4
- Biodegradabilidad.....	4
- Biocompatibilidad.....	5
- Los PHAs se producen a partir de recursos renovables.....	5
1.1.3 Biosíntesis.....	6
1.1.4 Significado ecológico de los PHAs.....	8
1.1.5 Aplicaciones.....	9
1.1.6 Producción industrial de los PHAs.....	10
1.2 Sustratos de bajo costo para la producción de PHAs.....	11
1.2.1 Hemicelulosas.....	13
1.2.2 Producción de PHAs empleando hemicelulosa hidrolizada.....	14
1.2.3 Biorefinerías.....	15
1.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	17
1.3.1 Síntesis de PHAs en <i>H. seropedicae</i> .....	19
1.4 Catabolismo de xilosa en microorganismos.....	20
1.4.1 Ruta oxo-reductiva.....	20
1.4.2 Ruta de la D-xilosa isomerasa.....	21
1.4.3 Ruta de Weinberg y Dahms.....	22
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Bacteria y medios de cultivo.....	25

4.2	Perfiles de acumulación de PHB por <i>H. seropedicae</i> Z69 cultivada en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	25
4.3	Determinaciones analíticas.....	26
4.4	Identificación del polímero sintetizado a partir de xilosa, arabinosa y mezcla de los tres azúcares.....	28
4.5	Análisis del genoma de <i>H. seropedicae</i> .....	29
4.6	Medidas de actividades enzimáticas.....	29
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	Perfil de acumulación de PHB en <i>H. seropedicae</i> Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	32
5.2	Determinación de la estructura del polímero.....	38
5.3	Análisis del genoma de <i>H. seropedicae</i> .....	40
5.4	Medidas de actividades enzimáticas.....	45
6.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	46
6.1	Perfil de acumulación de PHB en <i>H. seropedicae</i> Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	46
6.1.1	Glucosa.....	46
6.1.2	Xilosa.....	48
6.1.3	Mezcla de fuentes de carbono con las proporciones encontradas en el bagazo de caña de azúcar.....	49
6.1.4	Comparación de las condiciones utilizadas.....	51
6.2	Determinación de la estructura del polímero.....	52
6.3	Análisis del genoma de <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	53
6.4	Medidas de actividades enzimáticas.....	56
7.	CONCLUSIONES.....	59
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

10. ANEXO.....	67
10.1 Medios de cultivo utilizados.....	67
- TY.....	67
- LGI.....	67
10.2 Purificación de polímero.....	68
10.3 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1:</b> Estructura general de los polihidroxialcanoatos.....	2
<b>Figura 2:</b> Degradación de P(3HB-co-3HV) en aguas residuales.....	4
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida de los PHAs.....	6
<b>Figura 4:</b> Ruta de biosíntesis de P(3HB-co-3HV) y de PHB.....	7
<b>Figura 5:</b> Microscopía electrónica de transmisión de células de <i>H. seropedicae</i> .....	17
<b>Figura 6:</b> Ruta involucrada en el metabolismo de L-Arabinosa en <i>H. seropedicae</i> .....	19
<b>Figura 7:</b> Ruta oxo-reductiva y ruta de la D-xilosa isomerasa.....	20
<b>Figura 8:</b> Organización del operón <i>xyl</i> en <i>E. coli</i> K12 y en diferentes especies de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i> .....	21
<b>Figura 9:</b> Ruta de Weinberg y de Dahms.....	23
<b>Figura 10:</b> Perfil de distintos parámetros determinados en el cultivo de <i>H. seropedicae</i> Z69 en medio LGI con 10 g/l de glucosa como única fuente de carbono.....	32
<b>Figura 11:</b> Perfil de distintos parámetros del cultivo de la cepa Z69 crecida en medio LGI y en presencia de 30 g/l de glucosa.....	33
<b>Figura 12:</b> Perfil de crecimiento y acumulación de PHB en <i>H. seropedicae</i> Z69 cultivada en medio LGI con 30 g/l de xilosa.....	34
<b>Figura 13:</b> Perfil de distintos parámetros a lo largo del crecimiento de la cepa Z69 cultivada en medio LGI con 30 g/l de xilosa y 50 mM de MES pH 7.0.....	35
<b>Figura 14:</b> Perfil de crecimiento y producción de PHB en <i>H. seropedicae</i> Z69 utilizando una mezcla de fuentes de carbono en proporciones similares a las descritas en la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar.....	36
<b>Figura 15:</b> Perfil de distintos parámetros a lo largo del crecimiento de la cepa Z69 cultivada en medio LGI con una mezcla de fuentes de carbono en proporciones	

similares a las descritas en la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar y  
50mM de *buffer* MES, pH 7.0.....37

**Figura 16:** Cromatogramas de los ésteres de metilo derivados de la metanólisis del  
polímero purificado de *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes  
de carbono.....39

**Figura 17:** Conjunto de genes presentes en *H. seropedicae* SmR1 ordenados de la  
misma manera que en el operón *xyl* de *Burkholderia* y *Pseudomonas*.....42

**Tabla 1:** Propiedades de diferentes PHAs y de plásticos convencionales derivados del  
petróleo.....3

**Tabla 2:** Precios en mercado de biopolímeros y polímeros convencionales.....11

**Tabla 3:** Efecto del costo del sustrato y rendimiento de PHB en el costo de  
producción.....12

**Tabla 4:** Comparación de xilanos de diferentes orígenes.....14

**Tabla 5:** Datos de producción de PHB a partir de biomasa lignocelulolítica o sus  
componentes en diferentes bacterias.....16

**Tabla 6:** Resultados obtenidos en los diferentes cultivos de *H. seropedicae* Z69 a las  
48 horas de incubación.....38

**Tabla 7:** Estructura del polímero que acumula *H. seropedicae* Z69 cuando crece con  
diferentes fuentes de carbono según determinaciones realizadas por GC-FID.....40

**Tabla 8:** Genes anotados en *H. seropedicae* SmR1 (GenBank).....41

**Tabla 9:** Resultados de la búsqueda de proteínas en *H. seropedicae* SmR1, a partir de  
secuencias de enzimas de la ruta de Weinberg presentes en otros microorganismos.....43

**Tabla 10:** Actividades enzimáticas medidas, expresadas como nmol de NADH  
formado/min. mg de proteínas en los extractos celulares preparados a partir de células  
crecidas en presencia de diferentes fuentes de carbono.....45

## **LISTA DE ABREVIACIONES**

MES: ácido 2-(*N*-morfolino)etanesulfónico

PHAs: polihidroxicanoatos

PHB: poli-3-hidroxibutirato

P(3HV): poli-3-hidroxivalerato

P(3HB-*co*-3HV): copolímero formado por 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato

P(3HO): poli-3-hidroxiocanoato

## **1- INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Polihidroxicanoatos**

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros constituidos por monómeros de hidroxiácidos unidos por enlaces éster. Su estructura general se muestra en la Figura 1. Estos compuestos son sintetizados naturalmente por diversos microorganismos como reserva de fuente de carbono, energía y poder reductor<sup>1</sup>. Se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos. En general, se sintetizan cuando hay exceso de fuente de carbono y su síntesis es óptima cuando algún nutriente esencial, como el nitrógeno, fósforo u oxígeno disuelto, es limitante para el crecimiento<sup>2</sup>. Los PHAs pueden ser consumidos por el organismo cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas<sup>3</sup>.

Las bacterias productoras de PHAs se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a las condiciones de cultivo que necesitan para la acumulación. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial. Algunas de las bacterias incluidas en este grupo son *Ralstonia metallidurans* (denominada anteriormente como *Ralstonia eutropha*), *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*<sup>3</sup>. El segundo grupo, representado por *Alcaligenes latus* y cepas recombinantes de *Escherichia coli*, incluye a los organismos que acumulan el polímero durante todo el crecimiento y no necesitan limitación de nutrientes<sup>3</sup>.

De acuerdo a su estructura química, los PHAs se pueden clasificar en dos grandes grupos. Los PHAs de cadena corta están compuestos por hidroxiácidos de 3 a 5 átomos de carbono. Dentro de este grupo se encuentra el poli-3-hidroxibutirato (PHB), el poli-3-hidroxivalerato (P(3HV)) y el copolímero P(3HB-co-3HV). El PHB fue el primer PHA en ser identificado y ha sido el más estudiado hasta el momento<sup>1</sup>. Cuando los hidroxiácidos componentes contienen más de 6 átomos de carbono, los polímeros se denominan PHAs de cadena media<sup>1</sup>.

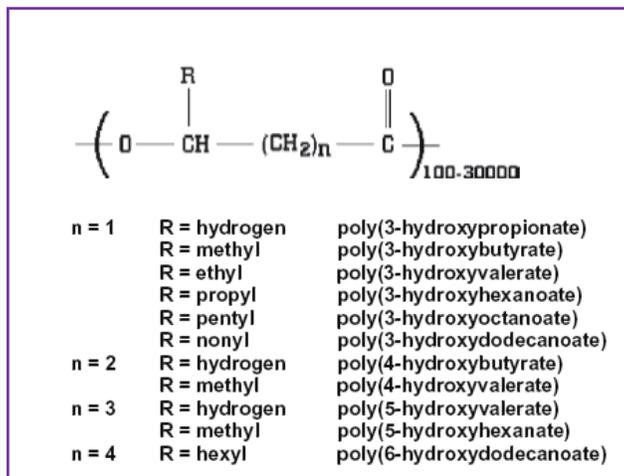


Figura 1: Estructura general de los polihidroxicanoatos. Extraído de Castilho et. al 2009<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Propiedades físicas

Los PHAs son insolubles en agua y presentan propiedades termoplásticas y/o elastoméricas<sup>2</sup>. Sus propiedades varían considerablemente dependiendo de la composición monomérica de los mismos. El largo de cadena de los monómeros que los constituyen influye en la hidrofobicidad del polímero, la temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea (Tg) y el grado de cristalinidad<sup>1</sup>.

Dentro de la célula, el PHB se presenta en un estado amorfo y fluido, pero luego de extraído se vuelve altamente cristalino. Esta alta cristalinidad lo vuelve poco flexible y quebradizo<sup>2,4</sup>. Su temperatura de fusión es de 175-180°C y se descompone a una temperatura muy cercana (200°C)<sup>2</sup>, lo que impone algunas limitantes a la hora de su procesamiento a nivel industrial<sup>4</sup>.

Las propiedades físicas del PHB se pueden mejorar cuando se incorporan unidades de 3-hidroxyvalerato. Esto hace que la temperatura de fusión descienda, brindando así más posibilidades para su procesamiento térmico sin que se degrade el polímero. Estas propiedades adquieren una gran importancia cuando se evalúan sus aplicaciones comerciales<sup>2,4</sup> (ver Tabla 1).

Los PHAs de cadena media, como por ejemplo el poli-3-hidroxiocetanoato (P(3HO)), poseen un menor nivel de cristalinidad y son más elásticos en comparación con el PHB y el P(3HB-co-3HV)<sup>4</sup>.

En la Tabla 1 se muestran las propiedades de diferentes PHAs y de polímeros derivados del petróleo utilizados convencionalmente.

**Tabla 1: Propiedades de diferentes PHAs y de plásticos convencionales derivados del petróleo.** Extraído de Castilho et. al 2009<sup>1</sup>.

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Porcentaje de elongación a la ruptura (%)
<b>PHB</b>	175- 180	3,5- 4,0	40	3-8
<b>P(3HB-co-3HV) (3 mol% HV)</b>	170	2,9	38	n.d.
<b>P(3HB-co-3HV) (20 mol% HV)</b>	145	1,2	32	50-100
<b>P(3HB-co-4HV) (3 mol% HV)</b>	166	n.d.	28	45
<b>P(3HB-co-4HV) (10 mol% HV)</b>	159	n.d.	24	242
<b>P(3HO)</b>	61	n.d.	6- 10	300- 450
<b>Polipropileno isotáctico (iPP)</b>	170-176	1,0- 1,7	29,3- 38,6	500- 900
<b>Polietileno de alta densidad (HDPE)</b>	112- 132	0,4- 1,0	17,9- 33,1	12-700
<b>Polietileno de baja densidad (LDPE)</b>	88- 100	0,05- 0,1	15,2- 78,6	150- 600
<b>Poliestireno (PS)</b>	80- 110	3,0-3,1	50	3- 4
<b>Nylon-6,6</b>	265	2,8	83	60

n.d.: datos no disponibles.

### **1.1.2 Propiedades de los PHAs como material plástico**

#### **- Biodegradabilidad**

Los PHAs pueden ser degradados a H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> (o metano en condiciones anaeróbicas) por una gran variedad de microorganismos en diversos ecosistemas. Estos microorganismos producen PHA-depolimerasas y PHA-hidrolasas extracelulares, que convierten el polímero en oligómeros y monómeros solubles en agua, que pueden ser consumidos como fuente de carbono por éstos u otros microorganismos<sup>1,3 4, 5</sup>.

La biodegradabilidad de los PHAs está influenciada por la cristalinidad y composición del polímero y la accesibilidad de las depolimerasas a su superficie<sup>6,7</sup>. También depende de las condiciones ambientales como temperatura, pH, presencia de nutrientes, humedad y microorganismos presentes<sup>8,9</sup>.

El P(3HB-co-3HV) se degrada más rápido que el PHB, debido a su menor cristalinidad<sup>8</sup>. Como ejemplo, en la Figura 2 se muestra el aspecto que van adquiriendo a lo largo del tiempo unas botellas elaboradas con el copolímero P(3HB-co-3HV), al ser sumergidas en aguas residuales. Al cabo de 10 semanas la biodegradación es completa<sup>4</sup>.



**Figura 2: Degradación de P(3HB-co-3HV) en aguas residuales.** Botellas de P(3HB-co-3HV) incubadas durante el verano (20°C de temperatura promedio) en aguas residuales en condiciones aeróbicas. De izquierda a derecha se muestra la degradación luego de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas. Extraído de Madison y Huisman; 1999<sup>4</sup>.

**- Biocompatibilidad**

La propiedad de biocompatibilidad está determinada por la ausencia de compuestos tóxicos generados durante el proceso de degradación del polímero. Esto depende del tamaño y porosidad de la superficie del material<sup>1</sup> y de la pureza del mismo.

El PHB por sí sólo tiene aplicaciones limitadas en la medicina debido a su rigidez y fragilidad, pero esto deja de ser una limitación si se utiliza el copolímero P(3HB-co-3HV), que es menos rígido y cristalino. Choi et al. (2005) demostraron que la biocompatibilidad del P(3HB-co-3HV) se puede mejorar cuando se aumenta el porcentaje de 3HV en el copolímero<sup>10</sup>.

**- Los PHAs se producen a partir de recursos renovables**

Otra propiedad importante de estos materiales de origen biológico es la posibilidad de ser producidos a partir de recursos renovables, sin requerir combustibles fósiles. La generación de PHAs a nivel industrial utiliza, en general, productos derivados de vegetales como fuente de carbono. Debido a esto, su síntesis y biodegradación pueden ser compatibles con el ciclo del carbono como se muestra en la Figura 3<sup>11</sup>.

Analizando el ciclo de vida de los PHAs a nivel de producción (*cradle-to-gate*), se observa que el mismo no es más amigable con el medio ambiente que el de los plásticos convencionales, al menos en algunos aspectos. El proceso de producción de PHAs necesita comparativamente más energía y más agua. Sin embargo, al considerar que este proceso aún está sin optimizar y que los PHAs son biodegradables, el ciclo de vida completo, incluyendo las etapas industriales y de deposición (*cradle-to-grave*), es ciertamente más compatible con el medio ambiente<sup>11,12</sup>.

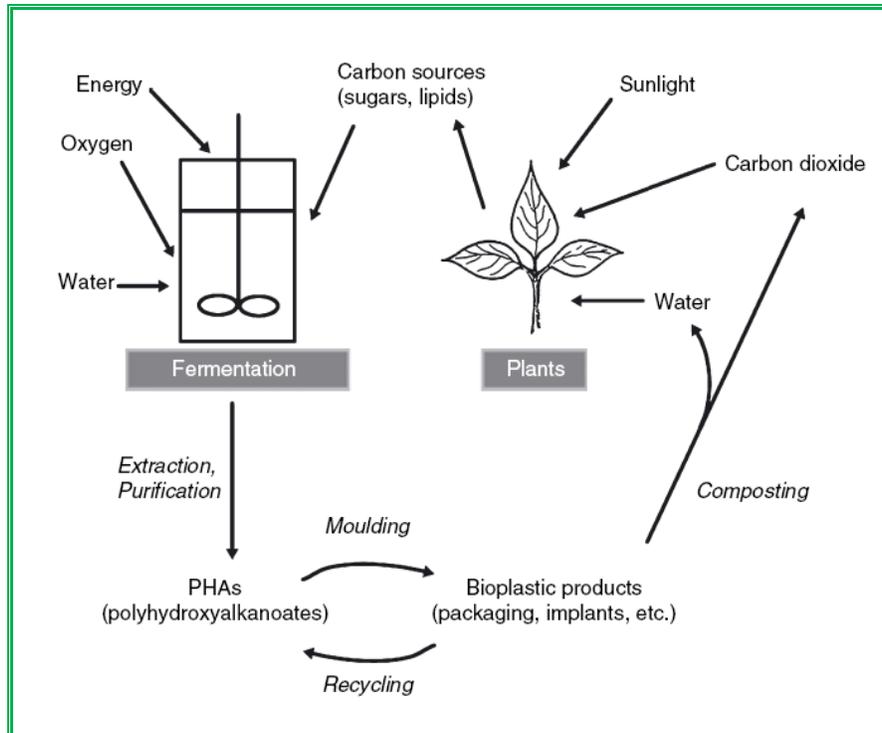


Figura 3: Ciclo de vida de los PHAs. Extraído de Verlinden et. el. (2007)<sup>11</sup>.

### 1.1.3 Biosíntesis

La composición monómerica de los PHAs depende del sustrato carbonado aportado al medio de cultivo, del metabolismo y especificidad de la enzima que polimeriza los monómeros (PHA sintasa), presentes en el microorganismo productor<sup>4</sup>.

Hasta el momento se han descrito cuatro rutas diferentes para la biosíntesis de PHAs<sup>4</sup>. En la Figura 4 se muestra la ruta clásica de síntesis de PHB que se encuentra en diversos microorganismos incluyendo *R. metallidurans* y *Herbaspirillum seropedicae*<sup>13</sup>. Esta ruta consiste en tres reacciones secuenciales y se puede expresar en bacterias cultivadas en presencia de diversas fuentes de carbono como carbohidratos y ácidos grasos que generen acetil-CoA como metabolito intermediario. Esta ruta se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por medio de la enzima  $\beta$ -cetotiolasa, formando una molécula de

acetoacetyl-CoA. En una segunda reacción, el acetoacetyl-CoA es reducido a 3-hidroxi-butiril-CoA por medio de la acetoacetyl-CoA reductasa (NADPH-dependiente). Finalmente, se lleva a cabo la polimerización de los monómeros 3-hidroxi-butiril-CoA, reacción catalizada por la PHB sintasa, produciendo PHB<sup>2,4, 13,14</sup>.

Cuando se incorpora ácido propiónico o ácido valérico en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono, algunos microorganismos pueden producir el copolímero P(3HB-co-3HV). En este caso, la condensación del propionil-CoA con acetyl-CoA es mediada por una 3-cetotiolasa, con diferente especificidad por el sustrato que la  $\beta$ -cetotiolasa involucrada en la ruta de síntesis de PHB. Luego el 3-cetovaleril-CoA es reducido a 3-hidroxi-valeril-CoA en una reacción catalizada por la misma enzima acetoacetyl-CoA reductasa de la ruta de síntesis del PHB. Finalmente, la reacción de polimerización es llevada a cabo por una PHA sintasa<sup>2, 15</sup>.

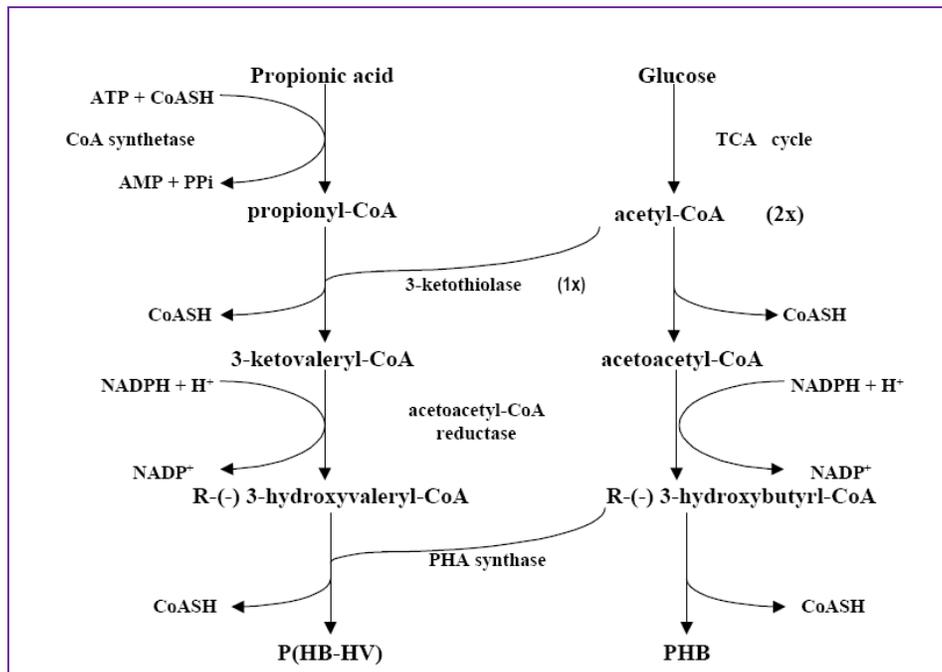


Figura 4: Ruta de biosíntesis de P(3HB-co-3HV) y de PHB. Extraído de Ojumu et. al. 2004<sup>9</sup>.

La síntesis de PHAs de cadena media puede obtener precursores de diferentes rutas metabólicas. La  $\beta$ -oxidación (ruta de degradación de ácidos grasos) y la ruta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos pueden proporcionar intermediarios que son polimerizados para generar PHAs de cadena media<sup>2</sup>.

#### **1.1.4 Significado ecológico de los PHAs**

Como se ha mencionado anteriormente, los PHAs constituyen una importante reserva de fuente de carbono y energía para los microorganismos. Una de las ventajas de acumular estos materiales de alto peso molecular es que se pueden almacenar grandes cantidades de carbono reducido sin afectar la presión osmótica de las células<sup>16</sup>.

Las reservas de PHAs parecen ser muy ventajosas para los microorganismos que viven en ambientes cambiantes y/o competitivos por las fuentes de carbono y energía, aumentando su supervivencia y tolerancia al estrés. Uno de estos ambientes es el suelo, muy variable en el tiempo y en el espacio en disponibilidad de nutrientes y propiedades físicas, químicas y biológicas. Se considera que las bacterias del suelo y de la rizósfera que pueden acumular PHAs se ven beneficiadas en cuanto a su establecimiento, proliferación y supervivencia<sup>17</sup>.

Durante el estado de *starvation* se ha observado que el hecho de poseer reservas de PHB puede retardar la degradación de ARN y proteínas<sup>16</sup>. También el PHB puede servir como fuente de carbono y energía para la formación de esporas en algunas especies de *Bacillus* y la formación de cistos en algunas especies de *Azotobacter*<sup>16,17</sup>

### **1.1.5 Aplicaciones**

Las perspectivas de uso de los PHAs no pretenden sustituir a los plásticos convencionales totalmente. Las aplicaciones más interesantes tienen en cuenta su biodegradabilidad, biocompatibilidad y la posibilidad de utilizar sustratos renovables en su producción.

#### Aplicaciones en medicina y farmacia<sup>18</sup>:

- Prótesis e implantes médicos
- Productos para cirugías
- Productos para implantes cardiovasculares
- Productos involucrados en la regeneración de tejidos
- Distribución de drogas (cápsulas que facilitan el transporte de diferentes drogas en el cuerpo)

#### Usos a nivel industrial<sup>3,18</sup>:

- Envoltorios para alimentos, cosméticos, etc<sup>19</sup>
- Productos convencionales: afeitadoras, utensilios, productos de higiene femeninos, etc.
- Precursores para síntesis química de compuestos ópticamente activos

#### Usos a nivel agropecuario<sup>3,18</sup>:

- Tutores y soportes para plantines de árboles o plantas
- Tubos de riego que se utilizan sólo una estación
- Materiales para la distribución más lenta de herbicidas, fertilizantes, etc. en el suelo
- Potencial suplemento alimenticio para animales

### **1.1.6 Producción industrial de PHAs**

La producción de PHAs no se ha expandido debido a los altos costos de producción, comparados con la industria de plásticos convencionales. El primer intento de producción industrial de PHB estuvo a cargo de la North–American Company W.R. Grace Co. en la década de 1950. En los años 70', Imperial Chemical Industries (ICI, UK) comenzó a producir PHAs bajo la marca comercial de Biopol. Años después, las patentes fueron vendidas a Zeneca, luego a Monsanto y ahora son propiedad de Metabolix Inc. (USA). Actualmente, esta compañía produce, bajo la marca comercial Mirel, 50.000 toneladas de PHAs por año<sup>1</sup>. La producción se desarrolla mediante fermentación microbiana a gran escala, a partir de azúcar como fuente de carbono ([www.mirelplastics.com](http://www.mirelplastics.com)).

La compañía alemana Biomer produce PHAs a pequeña escala<sup>1</sup>, utilizando la bacteria *A. latus* crecida en medio líquido con azúcar como fuente carbonada, para la elaboración de dispositivos médicos ([www.biomer.de](http://www.biomer.de)).

En América del Sur, la empresa brasilera Biocycle produce PHB a escala piloto, utilizando melaza como fuente de carbono. Esta compañía vende las escamas de plástico a otras empresas, que producen los productos finales de plástico biodegradable ([www.biocycle.com.br](http://www.biocycle.com.br)).

A nivel mundial existen varios esfuerzos dirigidos a mejorar la viabilidad económica de la producción de PHAs. Estos incluyen la instalación de plantas piloto incorporando nuevas estrategias fermentativas, la optimización de los procesos de recuperación del PHA, el uso de la tecnología del ADN recombinante e ingeniería metabólica, el acoplado del proceso de producción a otras industrias, la utilización de fuentes carbonadas más económicas, como los materiales de desecho de otras industrias y la búsqueda de nuevos organismos productores de PHAs<sup>1</sup>.

Sin embargo, la producción de plásticos biodegradables, en general, sigue siendo muy pequeña en comparación con la producción de plásticos de origen

petroquímico. En el año 2004, en Europa, la producción de plásticos biodegradables, de cualquier tipo, sólo representaba el 0,1% de los plásticos en general<sup>1</sup>. El bajo consumo de biopolímeros se debe, en parte, al alto costo de los mismos<sup>1</sup>. Los precios de algunos biopolímeros producidos por las empresas antes mencionadas y de los plásticos convencionales han sido revisados recientemente por Castilho et al. (2009)<sup>1</sup> y se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2: Precios en el mercado de biopolímeros y polímeros convencionales.** Extraído de Castilho et al. (2009)<sup>1</sup>.

<b>Polímero</b>	<b>Precio en el mercado</b>
<b>PHB de Biomer (Alemania)</b>	€12/kg
<b>P(3HB-co-3HV) de Metabolix (USA)</b>	€10-12/kg
<b>Polímero modificado de almidón de Novamont (Italia)</b>	€2,5-3,0/kg
<b>Acido poliláctico de Cargill Dow (USA)</b>	€2,2-3,4/kg
<b>Polipropileno (PP)</b>	€0,74/kg
<b>Polietileno de alta densidad (HDPE)</b>	€0,8/kg
<b>Polietileno de baja densidad</b>	€0,74/kg
<b>Cloruro de poliviniloe (PVC)</b>	€0,72/kg
<b>Poliestireno (PS)</b>	€0,70/kg
<b>Tereftalato de polietileno (PET)</b>	€0,81/kg

## **1.2 Sustratos de bajo costo para la producción de PHAs**

La evaluación del balance económico del proceso de producción de PHAs sugiere que el costo de la fuente carbonada es el factor que más influye en el costo final del PHA producido, llegando a contribuir en más del 50%<sup>20</sup>. Con el objetivo de bajar costos, se ha estudiado la producción de estos materiales utilizando diferentes sustratos carbonados<sup>1,21</sup>. En la Tabla 3 se resume el costo de distintos

sustratos, el rendimiento de producción del PHB por gramo de sustrato consumido y sus efectos en el costo final del producto.

**Tabla 3: Efecto del costo del sustrato y rendimiento de PHB en el costo de producción.** Tabla extraída y modificada de Reddy et al. 2003 <sup>21</sup>.

<b>Sustrato</b>	<b>Precio del sustrato (U\$\$ Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimiento PHB [g PHB (g sustrato<sup>-1</sup>) ]</b>	<b>Costo del Producto [U\$\$ (kg P(3HB))<sup>-1</sup>]</b>
Glucosa	0,493	0,38	1,30
Sacarosa	0,290	0,40	0,72
Metanol	0,180	0,43	0,42
Acido acético	0,595	0,38	1,56
Etanol	0,502	0,50	1,00
Melaza de caña	0,220	0,42	0,52
Suero de queso	0,071	0,33	0,22
Hemicelulosa hidrolizada	0,069	0,20	0,34

De acuerdo a los datos que se muestran en la Tabla 3, el PHB producido a partir de suero de queso es el que posee el menor costo de producción, seguido del PHB producido a partir de hemicelulosa hidrolizada. Estos valores se acercan a los precios de los plásticos convencionales que se mostraron en la Tabla 2, sugiriendo así que el proceso podría llegar a ser competitivo económicamente si se utilizan algunos de estos subproductos como fuente carbonada para la producción de PHB.

Estos sustratos poseen un precio de mercado muy bajo porque representan subproductos de otros procesos industriales y algunos de ellos son un verdadero problema, ya que son contaminantes. En consecuencia, la estrategia de utilizarlos para la producción de PHB resolvería dos problemas. Por un lado se soluciona la problemática de eliminación de desechos y además se estaría empleando una fuente carbonada de bajo costo para la producción de PHB, haciendo el proceso económicamente más competitivo. Esta estrategia permite también acoplar la producción de PHAs a una cadena industrial pre-existente, como por ejemplo, la producción de PHB asociada a la biorefinería industrial sucro-alcoholera establecida en Brasil (Biocycle).

### **1.2.1 Hemicelulosas**

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más común en la naturaleza, representa entre el 20 y 35% de la biomasa lignocelulolítica, que además contiene un 35-50% de celulosa y un 10-25 % de lignina<sup>22</sup>.

La biomasa lignocelulolítica es el conjunto de materia orgánica de origen vegetal que incluye leña, arbustos, residuos forestales y agrícolas, restos de poda y subproductos de industrias de transformación de la madera, entre otros. Es una de las fuentes renovables de energía con mayor disponibilidad en la naturaleza y representa una materia prima de bajo costo para la producción de biocombustibles, bioenergía y biomoléculas con valor agregado<sup>22,23</sup>.

Las hemicelulosas son heteropolímeros de pentosas (xilosas, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos. Las hemicelulosas no son químicamente homogéneas, existen cuatro grupos: xilanos, mananos, mezclas ligadas a  $\beta$ -glucanos y xiloglucanos<sup>22</sup>.

Los xilanos son las hemicelulosas más abundantes, están compuestas por un esqueleto polimérico de unidades de  $\beta$ -D-xilanopiranosas unidas por enlace 1,4. Además de xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucurónico o su 4-O-metil éter, y ácido acético, ferúlico y *p*-cumárico. La frecuencia y composición de las ramificaciones depende de la fuente del xilano, como se muestra en la Tabla 4<sup>22</sup>.

La hemicelulosa constituye una fuente importante de moléculas como xilosa y xilo-oligosacáridos. Para que esos carbohidratos estén disponibles se deben realizar diversos tratamientos para fraccionar, solubilizar, hidrolizar y separar celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos incluyen el empleo de procesos mecánicos, químicos y enzimáticos<sup>22,25,26</sup>.

**Tabla 4: Comparación de xilanos de diferentes orígenes.** Construida a partir de datos tomados de Saha, 2003<sup>22</sup>. \* Datos de composición de jarabes generados por la hidrólisis química de la fracción hemicelulolítica (Martínez Jiménez y Gosset Lagarda, 2007)<sup>24</sup>.

	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Acido anhidourónico	Galactosa	Manosa	Ácido glucurónico
<b>Madera</b>	89,3%	1%	1,4%	8,3%			
<b>Arroz</b>	46%	44,9%	1,9%	1,1%	6,1%		
<b>Trigo</b>	65,8%	33,5%	0,3%		0,1%	0,1%	
<b>Fibra de algodón</b>	48-54%	33-35%			5-11%		3-6%
<b>Bagazo de caña de azúcar</b>	80%	5%	15%				

En la actualidad, la biomasa lignocelulolítica es utilizada principalmente para la obtención de biocombustibles (etanol y biodiesel), energía eléctrica, calor y vapor<sup>23</sup>. Sin embargo, la industria biotecnológica ofrece también oportunidades para la utilización alternativa de residuos agro-industriales. El bagazo de caña, mayor subproducto de la industria de la caña de azúcar, es un residuo utilizado en fermentaciones microbianas para la producción de compuestos con valor agregado como por ejemplo: xilitol, solventes, ácido láctico y PHAs<sup>22,27</sup>.

### **1.2.2 Producción de PHA empleando hemicelulosa hidrolizada**

El bajo costo y la alta disponibilidad de la hemicelulosa han promovido el desarrollo de trabajos de investigación sobre la producción de PHAs empleando tanto los azúcares constituyentes de la hemicelulosa (xilosa, arabinosa y glucosa), así como directamente el bagazo de caña de azúcar hidrolizado. En este tipo de trabajos se utilizan organismos descritos previamente como buenos productores

de PHB y se analiza su capacidad para crecer y transformar esta fuente de carbono en biopolímeros (ver Tabla 5).

Por otro lado, existen trabajos en los cuales se trata de aislar microorganismos de ambientes ricos en materia orgánica en descomposición, adaptados a la utilización de los azúcares constituyentes del material lignocelulolítico y estudiar su capacidad para producir PHAs<sup>28</sup>.

### **1.2.3 Biorefinerías**

El concepto de biorefinería ha surgido recientemente como un sistema integrado de conversión de biomasa en combustibles, energía y productos químicos, similar a la organización de la industria petroquímica<sup>27</sup>.

Estas biorefinerías serían capaces de producir varios productos derivados de la biomasa que podrían ser capaces de reemplazar a los productos de la industria del petróleo, entre ellos el plástico. Incluso se pueden generar productos que no pueden ser manufacturados en las refinerías convencionales<sup>31</sup>.

Si la producción de PHAs se diera dentro de una biorefinería, estando acoplada a la producción de biocombustibles y utilizando excedentes o residuos de dichas industrias, el proceso global sería económicamente más competitivo y más amigable con el medio ambiente. Los resultados generados a partir de un estudio sobre el impacto ambiental de las biorefinerías en comparación con una refinería convencional, estableció que una biorefinería modelo tiene un impacto ambiental total del orden de un 41% menor que el de una refinería convencional<sup>31</sup>.

Tabla 5: Datos de producción de PHB a partir de biomasa lignocelulolítica o sus componentes en diferentes bacterias.

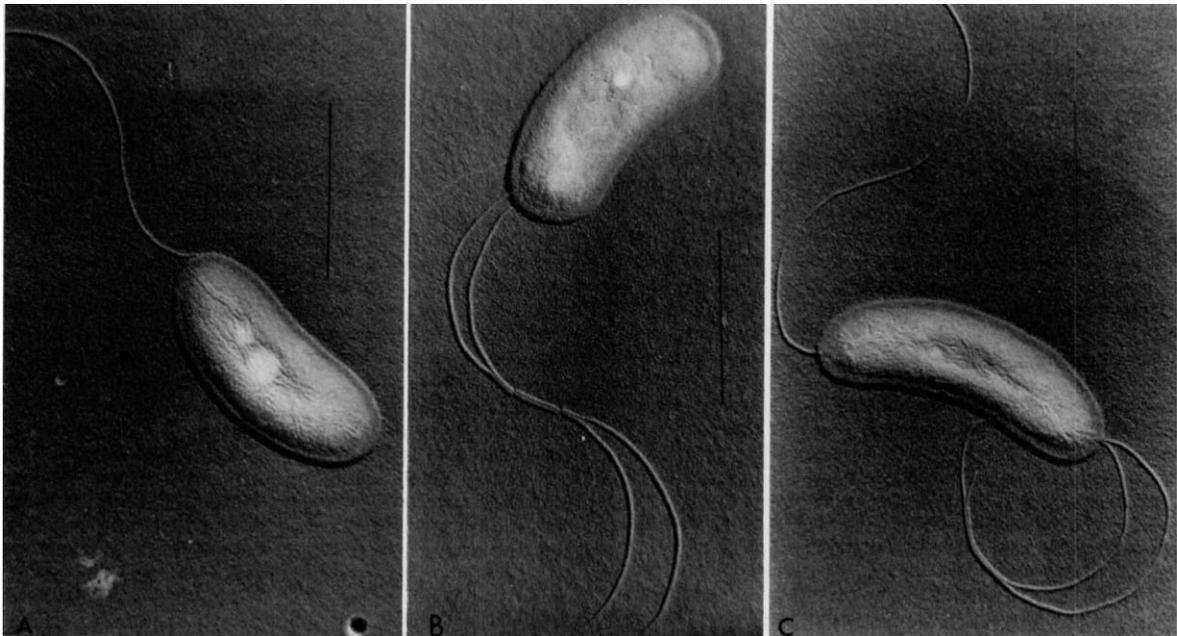
Cepas	Fuente de Carbono	Biomasa (g/l)	PHB(%)	Y <sub>PHB/teC</sub>	Referencia
<i>Escherichia coli</i> TGI (pSYL107)*	Xilosa	4,75	35,8	0,097	(Lee, 1999) <sup>29</sup>
<i>E. coli</i> TGI (pSYL107)*	Xilosa + CSH	3,76	64	0,188	(Lee, 1999) <sup>29</sup>
<i>E. coli</i> TGI (pSYL107)*	Xilosa + SH	5,95	74	0,226	(Lee, 1999) <sup>29</sup>
<i>Burkholderia sacchari</i> IPT 101	Bagazo de caña de azúcar	4,4	62	0,39	(L.F.Silva, M.K.Taciro, Ramos, J.M.Carter, J.G.C.Pradella, & Gomez, 2004) <sup>30</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 048	Bagazo de caña de azúcar	4,4	53	0,24	(L.F.Silva, M.K.Taciro, Ramos, J.M.Carter, J.G.C.Pradella, & Gomez, 2004) <sup>30</sup>
<i>B. sacchari</i> IPT 101*	Xilosa + glucosa	60	58	0,22	(L.F.Silva, M.K.Taciro, Ramos, J.M.Carter, J.G.C.Pradella, & Gomez, 2004) <sup>30</sup>
<i>B. cepacia</i> IPT 048*	Xilosa + glucosa	57	57	0,19	(L.F.Silva, M.K.Taciro, Ramos, J.M.Carter, J.G.C.Pradella, & Gomez, 2004) <sup>30</sup>
<i>Bacillus sp.</i> MA3.3	Glucosa	5,76	62	0,25	(Lopes, MSG et al., 2009) <sup>28</sup>
<i>B. sp.</i> MA3.3	Xilosa	5,54	64	0,24	(Lopes, MSG et al., 2009) <sup>28</sup>
<i>B. sp.</i> MA3.3	Xilosa + glucosa	3,86	38	0,14	(Lopes, MSG et al., 2009) <sup>28</sup>
<i>B. sp.</i> MA3.3	Xil+glu+arabinosa	3,99	39,8	0,11	(Lopes, MSG et al., 2009) <sup>28</sup>
<i>H. seropedicae</i> Z69	Glucosa	3.9	36	-	(Catalán, Ferreira, Gill, & Batista, 2007) <sup>13</sup>

\**E. coli* recombinante conteniendo el operón *phb* de *Ralstonia*  
 CSH (*cotton seed hydrolysate*): hidrolizado de semillas de algodón  
 SH (*soybean hydrolysate*): hidrolizado de soja

### 1.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Este género abarca bacterias Gram negativas, con forma de vibrio o helicoidal. Generalmente, las células poseen dos flagelos (aunque pueden tener de uno a tres) en uno o ambos polos, tal como se muestra en la Figura 5. El diámetro celular es de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  y el largo varía según el medio de cultivo desde 1,5 a 5  $\mu\text{m}$ <sup>32</sup>.

Las bacterias de la especie *H. seropedicae* crecen bien en un rango amplio de pH, desde 5,3 a 8,0. Su temperatura óptima de crecimiento es 34°C y no se observa crecimiento al ser incubadas a 22°C o a 38°C<sup>32</sup>. No crecen en presencia de NaCl a una concentración del 2% y no necesitan vitaminas u otros nutrientes o cofactores para su crecimiento. La cepa tipo de la especie es susceptible a varios antibióticos, como el cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, eritromicina y estreptomycinina, pero es resistente a la penicilina<sup>32</sup>.



**Figura 5: Microscopía electrónica de transmisión de células de *H. seropedicae* crecidas en medio sólido. A, B y C muestran uno, dos y tres flagelos en uno o los dos polos celulares. Las barras miden 1 $\mu\text{m}$ . Extraído de Baldani et. al 1986<sup>32</sup>**

Estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico bajo condiciones de microaerobiosis y crecen bien con  $N_2$  como única fuente de nitrógeno<sup>32</sup>. Son endófitas obligadas, pueden ser aisladas del interior de raíces, hojas y tallos, pero nunca se han aislado de muestras de suelo. Se localizan como células individuales o como microcolonias en el apoplasto de las hojas y raíces de caña de azúcar<sup>33</sup>. También pueden colonizar otras plantas, como arroz, maíz, sorgo, avena y otros cereales<sup>34,35</sup>. Además, son capaces de promover el crecimiento vegetal<sup>36</sup>.

Al ensayar *H. seropedicae*, se obtienen resultados positivos en las pruebas bioquímicas de catalasa, ureasa y oxidasa. Puede utilizar varios carbohidratos como glucosa, galactosa, xilosa y L-arabinosa, así como también manitol, sorbitol, xilitol y glicerol como únicas fuentes de carbono<sup>13,32</sup>. Utiliza ácidos orgánicos, como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato y el trans-aconitato, cuando se cultiva en presencia de amonio ( $NH_4^+$ ) o  $N_2$ <sup>32</sup>.

El metabolismo carbonado en *H. seropedicae* no ha sido estudiado en detalle. A partir de las determinaciones bioquímicas de actividades enzimáticas realizadas en nuestro laboratorio (Depto. de Bioquímica del IIBCE) y por análisis de secuencia del genoma<sup>37</sup>, se sabe que *H. seropedicae* emplea la ruta de Entner-Doudoroff y las pentosas fosfato para el catabolismo carbonado de algunos carbohidratos como la glucosa y no fermenta azúcares<sup>32</sup>.

Por otro lado, en lo que refiere al metabolismo de azúcares de 5 átomos de carbono, se sabe que la L-arabinosa se metaboliza siguiendo la ruta que se muestra en la Figura 6<sup>38</sup>. Esta ruta contiene intermediarios no fosforilados y se produce  $\alpha$ -cetoglutarato, un importante intermediario del ciclo de Krebs. Estos microorganismos son capaces de crecer en presencia de xilosa como única fuente de carbono, aunque las posibles vías metabólicas que participan no han sido descritas por el momento.

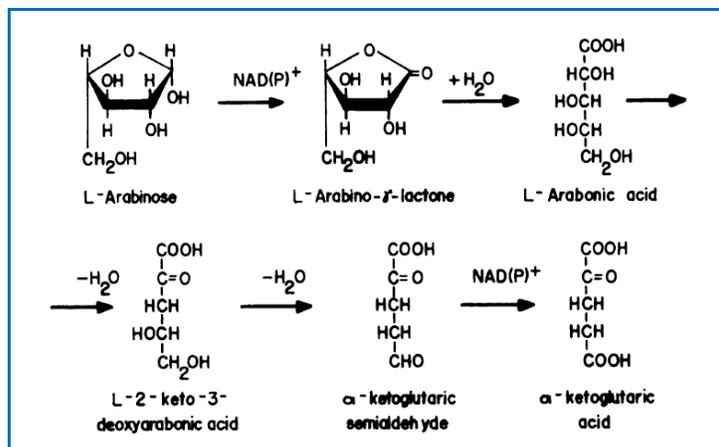


Figura 6: Ruta involucrada en el metabolismo de L-Arabinosa en *H. seropedicae*. Extraído de Mathias et al. (1989)<sup>38</sup>.

### 1.3.1 Síntesis de PHAs por *H. seropedicae* Z69

*H. seropedicae* acumula niveles significativos de PHB cuando se cultiva en presencia de glucosa como única fuente carbonada. Asimismo, es capaz de sintetizar PHB en presencia de un amplio rango de sustratos carbonados como galactosa, fructosa, xilosa, manitol y gluconato. Por otro lado, es capaz de acumular P(3HB-co-3HV) si se adiciona ácido nonanoico en el medio de cultivo como única fuente de carbono. Como se mencionó previamente, expresa la ruta clásica de síntesis de PHB al consumir glucosa como fuente de carbono<sup>13</sup> (Figura 4). Los estudios desarrollados en nuestro laboratorio permitieron optimizar el contenido de PHB acumulado por *H. seropedicae* cultivada en presencia de glucosa como única fuente de carbono desde un 40% hasta un 60%. La estrategia utilizada para la optimización del proceso incluyó la determinación de la relación óptima entre las cantidades de glucosa y nitrógeno mediante un diseño factorial con punto central. La relación molar de átomos de C/N óptima obtenida fue de 25 (Proyecto PDT 74-17)

## 1.4 Catabolismo de xilosa en microorganismos

Se han descrito cuatro rutas para el metabolismo de la xilosa en diversos microorganismos.

### 1.4.1 Ruta oxo-reductiva

La ruta oxo-reductiva se encuentra comúnmente en levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas. Esta ruta transforma la D-xilosa en xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa NAD(P)H dependiente (codificada por el gen *xy1/1*). Luego el xilitol es oxidado a D-xilulosa por la xilitol deshidrogenasa, que utiliza NAD<sup>+</sup> como cofactor (gen *xy1/2*). En el último paso, la D-xilulosa es fosforilada por la xilulosa quinasa, dando como producto final D-xilulosa-5-fosfato, que entra directamente en la vía de las pentosas fosfato<sup>39,40</sup>. En la Figura 7 se muestra un esquema de los pasos mencionados anteriormente.

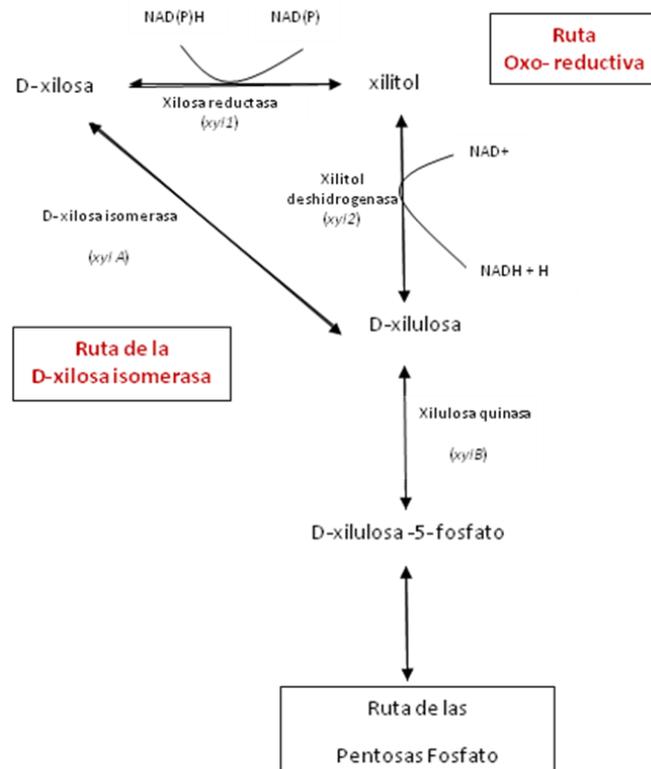


Figura 7: Ruta oxo-reductiva y ruta de la D-xilosa isomerasa<sup>39,40</sup>. Entre paréntesis se nombran los genes que codifican para dichas enzimas.

### 1.4.2 Ruta de la D-xilosa isomerasa

La ruta de la D-xilosa isomerasa transforma directamente la D-xilosa en D-xilulosa, participando la enzima D-xilosa isomerasa tal como se muestra en la Figura 7. Esta vía se encuentra presente en bacterias, aunque se ha descrito también en algunos hongos<sup>39,40</sup>.

Los genes que codifican para las enzimas de esta ruta en *E. coli* y en varias especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* se encuentran organizados en un operón, denominado operón *xyl*. En la figura 8 se muestra dicho operón, en donde el gen *xylA* codifica para la xilosa isomerasa y el gen *xylB* codifica para la xiluloquinasa. Este último se encuentra dentro del locus *xyl* en *E. coli* K12, mientras que en *Pseudomonas* y *Burkholderia* se encuentra en otras regiones del genoma, alejado del mismo. El sistema de transporte está representado por los genes *xylF* (proteína de unión a xilosa; *xylose-binding protein*), *xylG* (proteína de unión a ATP; *ATP-binding protein*) y *xylH* (transportador de membrana). El gen *xylR* está involucrado en la regulación de la transcripción<sup>41</sup>.

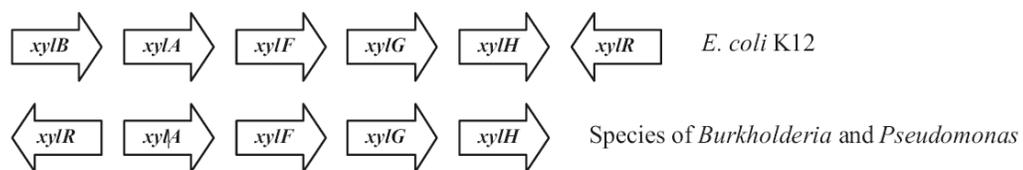


Figura 8: Organización del operón *xyl* en *E. coli* K12 y en diferentes especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Extraído de Lopes et al. 2009<sup>41</sup>

### **1.4.3 Rutas de Weinberg y Dahms**

La ruta de Weinberg y la ruta de Dahms han sido descritas en algunas bacterias<sup>39</sup> y arqueas<sup>42,43</sup>. En la Figura 9 se muestra un esquema de los pasos involucrados, en donde se observa la participación de una xilosa deshidrogenasa y otras enzimas, formando el intermediario 2-ceto-3-deoxi-xilonato, que luego puede generar  $\alpha$ -cetoglutarato en la vía de Weinberg o ser transformado en piruvato y glicolaldehído si sigue la ruta de Dahms<sup>39</sup>.

Los genes que codifican para las enzimas involucradas en estas rutas se encuentran dentro de un operón, denominado operón *xyl* y se transcriben en el siguiente orden: *xylX-xylA-xylB-xylC-xylD* (no se sabe cuál es la función del gen *xylX*, pero su mutación inhibe el crecimiento en xilosa de *Caulobacter crescentus*; los demás genes codifican para las enzimas que se muestran en la Figura 9)<sup>39</sup>.

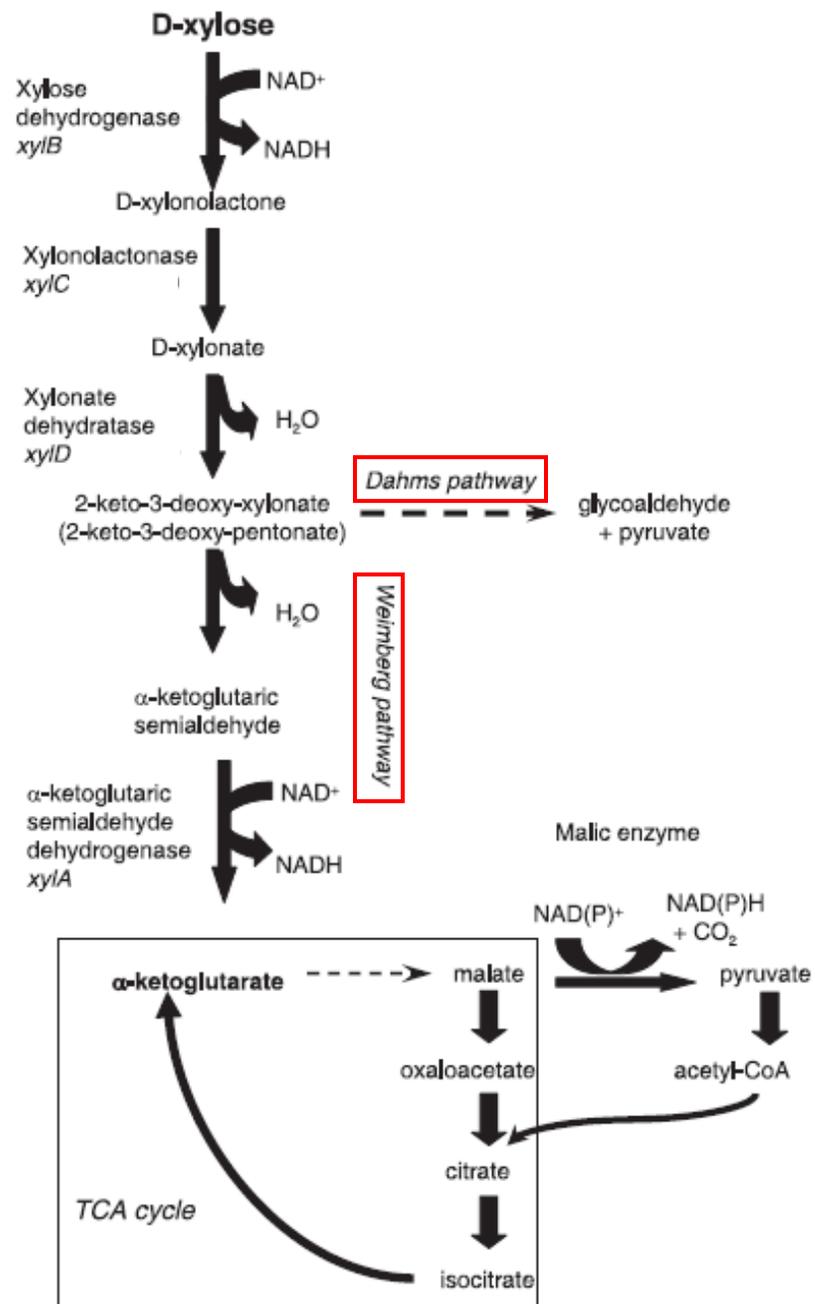


Figura 9: Ruta de Weinberg y de Dahms. Extraído de Stephens et al. 2007<sup>39</sup>

## **2- HIPÓTESIS**

- *H. seropedicae* Z69 es capaz de acumular PHB cuando crece en presencia de azúcares de cinco carbonos como xilosa y arabinosa.
- *H. seropedicae* metaboliza la xilosa mediante alguna de las rutas descritas previamente en otros microorganismos.
- El genotipo y fenotipo de *H. seropedicae* Z69 y SmR1 son similares. Estimamos que los genes candidatos, involucrados en el metabolismo de xilosa, presentes en SmR1, están presentes en Z69 y que ambas cepas presentan las mismas rutas para el catabolismo de xilosa.

## **3- OBJETIVOS**

- Analizar la producción de PHB por *H. seropedicae* Z69 cultivado en presencia de los carbohidratos presentes en la hemicelulosa hidrolizada.
- Identificar la(s) rutas involucradas en el metabolismo de la xilosa en *H. seropedicae* Z69.

### **3.1 Objetivos específicos**

- Determinar el perfil de crecimiento y niveles de PHB acumulado por *H. seropedicae* Z69 cultivado en presencia de glucosa, xilosa y una mezcla de xilosa, glucosa y arabinosa en proporciones similares a las encontradas en el bagazo de caña de azúcar hidrolizado.
- Estudio *in silico* del genoma de *H. seropedicae* SmR1 a los efectos de identificar potenciales genes que codifiquen para enzimas que participen en las rutas catabólicas de la xilosa.
- Identificar las rutas de catabolismo de xilosa que se expresan en *H. seropedicae* Z69 mediante la determinación de actividades enzimáticas en extractos celulares.

## **4- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Bacteria y medios de cultivo**

En este trabajo se empleó la cepa de *H. seropedicae* Z69. Un inóculo de esta cepa nos fue entregado amablemente por la Profesora J. Döbereiner (EMBRAPA-CNPBS-Seropédica, RJ, Brasil)<sup>32</sup> hace algunos años.

*H. seropedicae* se cultivó en caldo rico TY<sup>44</sup> y en medio definido LGI<sup>45</sup> (su composición se detalla en el anexo). El medio LGI líquido se utilizó para los ensayos de crecimiento, estudio del perfil de producción y purificación de PHB, así como para la preparación de los extractos celulares. Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio, el cual fue esterilizado por separado y adicionado al medio definido a una concentración final de 20 mM. Las diferentes fuentes de carbono empleadas fueron esterilizadas por separado y adicionadas al medio definido a las concentraciones indicadas en cada caso. Los cultivos en medio líquido se efectuaron con agitación orbital a 200 rpm y 30°C.

El medio sólido TY con 18 g/l de agar se utilizó para el mantenimiento de las cepas a 4°C y para la realización de los controles de contaminación. Las suspensiones celulares cultivadas en medio TY se almacenaron a -80°C en presencia de glicerol a una concentración final de 20% (p/v), como fuente de respaldo por períodos prolongados de hasta tres años.

### **4.2 Perfiles de acumulación de PHB por *H. seropedicae* Z69 cultivada en presencia de diferentes fuentes de carbono**

Los estudios de producción de PHB se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 L conteniendo 200 ml de medio líquido LGI, con las fuentes de carbono y los amortiguadores biológicos indicados a continuación:

- Condición 1 - 10 g/l de glucosa
- Condición 2 - 30 g/l de glucosa
- Condición 3 - 30 g/l de xilosa
- Condición 4 - 30 g/l de xilosa y 50 mM de buffer MES pH 7.0
- Condición 5 - 24 g/l de xilosa, 4.5 g/l de glucosa, 1,5 g/l de arabinosa
- Condición 6 - 24 g/l de xilosa, 4.5 g/l de glucosa, 1,5 g/l de arabinosa y 50 mM de MES pH 7.0

Para este ensayo, los inóculos consistieron en suspensiones celulares crecidas durante 24 horas en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 ml de medio LGI líquido y 10 g/l de la fuente de carbono a utilizarse en el ensayo correspondiente. Como pre-inóculo se utilizó un cultivo de *H. seropedicae* Z69 crecido durante 24 horas en un tubo con 5 ml de medio TY.

El ensayo de producción fue iniciado a partir de la inoculación del matraz de 2 L con 20 ml de una suspensión celular (inóculo), de manera de partir aproximadamente con una densidad óptica ( $DO_{620nm}$ ) de 0,5.

El matraz fue incubado a 30°C con agitación orbital a 200 rpm. Durante el período de incubación se tomaron muestras de forma aséptica a distintos tiempos, para las determinaciones de  $DO_{620nm}$ , biomasa celular, concentración de PHB, pH, concentración de glucosa (cuando corresponde), amonio y ácidos orgánicos excretados al medio (en algunos casos). Los ensayos fueron realizados por duplicado y los errores corresponden a la desviación estándar (S) de las medidas.

### **4.3 Determinaciones analíticas**

La medida de densidad óptica se realizó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) a una longitud de onda de 620nm, empleando medio LGI como blanco y realizando las diluciones adecuadas con agua en los casos necesarios.

La biomasa celular, definida como el peso seco celular, se determinó a partir de 1 ml de cultivo. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm. Los pellets se lavaron dos veces con el mismo volumen de agua destilada y fueron secados en estufa a 65°C por 48 horas o hasta peso constante.

La concentración de PHB se determinó mediante el peso seco del material polimérico extraído a partir de volúmenes de cultivo conocidos. Para ello, se tomaron muestras de 5 o 10 ml de cultivo bacteriano y se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm. Para la extracción del polímero, el *pellet* celular se sometió a lisis con igual volumen de hipoclorito de sodio 5% por 2 horas, a 37°C. El contenido celular liberado se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se lavó dos veces con agua destilada. Se determinó el PHB acumulado por unidad de volumen mediante el pesado del material luego de secado en estufa a 65°C hasta peso constante.

Los valores de biomasa y concentración de PHB fueron expresados en gramos de peso seco por litro de cultivo. La biomasa residual se calculó como la biomasa menos el valor de PHB acumulado. El contenido de PHB se define como el porcentaje en peso de PHB acumulado en las células secas totales y se calcula a partir de los datos de biomasa y concentración de PHB.

La concentración de glucosa en el cultivo fue determinada a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas usando el sensor Accutrend® (monitor de glucosa en sangre, Roche Diagnostics, Indianapolis; IN) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración de amonio se determinó utilizando un electrodo selectivo de iones amonio (Thermo Scientific Orion), siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de los sobrenadantes de las muestras extraídas del cultivo.

El pH se midió con pHmetro marca Oakton siguiendo las instrucciones del fabricante en los sobrenadantes de las muestras extraídas del cultivo.

La determinación de ácidos orgánicos volátiles en los sobrenadantes de cultivos se realizó en un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) marca Waters (Waters Associates, Milford, SA), equipado con una columna C18 y un detector de arreglo de diodos: 210-500nm (canal derivado: 210nm). Se utilizó, como fase móvil en la bomba A: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5% pH=2,0 y en la bomba B: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10%, acetonitrilo 90%. El flujo se estableció en 1 ml/min, la temperatura del horno y del inyector fue de 30°C y 25°C, respectivamente. El tiempo total de corrida fue de 20 minutos con 1 minuto de espera entre cada corrida. La presión de corrida usada fue de 1800 psi. Se utilizaron ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido valérico, y ácido isovalérico como estándares a una concentración de 0,5 µg/ml. Se inyectaron 20 µl de cada solución estándar y 100 µl de cada muestra.

#### **4.4 Identificación del polímero sintetizado a partir de la xilosa, arabinosa y mezcla de los 3 carbohidratos**

El material polimérico sintetizado por Z69 cultivada en presencia de glucosa, xilosa, arabinosa y una mezcla de estos azúcares se purificó (según anexo) para su análisis por cromatografía gaseosa (GC-FID).

El análisis cromatográfico de los PHAs requiere la hidrólisis del polímero y la derivatización de sus hidroxiacidos a los correspondientes ésteres de metilo. El método mencionado incluye la metanólisis en medio ácido del polímero purificado<sup>13</sup>.

El análisis de los metil ésteres derivados de los hidroxiacidos se realizó mediante la inyección de 1 µl de las muestras en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con una columna HP-5. Se utilizó N<sub>2</sub> como gas de corrida a un flujo de 2 ml min<sup>-1</sup>. La separación cromatográfica fue monitoreada mediante el empleo de un detector de ionización de llama (FID). El programa de temperatura utilizado durante la corrida consistió de un período inicial de 2 minutos a 80°C,

seguido de un incremento de  $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta alcanzar  $140^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual se mantuvo durante 2 minutos. Para la identificación de los hidroximetil ésteres se utilizó como estándar externo el 3-hidroxivalerato de metilo y el 3-hidroxibutirato de metilo obtenidos por hidrólisis y metanólisis del P(3HB-co-3HV) comercializado por Sigma- Aldrich Co.

#### **4.5 Análisis del genoma de *H. seropedicae***

El genoma de *H. seropedicae* SmR1 está disponible en el banco de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el número de acceso NC\_014323.

En primer lugar se buscaron genes que estuviesen anotados en el genoma de SmR1 como participantes del metabolismo de xilosa. En segundo lugar se buscaron secuencias de enzimas involucradas en el metabolismo de xilosa de otros microorganismos. Estas secuencias fueron comparadas con el genoma de la cepa SmR1 usando el programa blastp del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). La *query sequence* corresponde a la secuencia de la enzima conocida y se utilizó como banco de datos el genoma de *H. seropedicae* SmR1.

#### **4.6 Medidas de actividades enzimáticas**

Las actividades enzimáticas fueron determinadas a partir de extractos celulares de *H. seropedicae* Z69 cultivada en matraces Erlenmeyer de 2 L conteniendo 200 ml de medio líquido LGI en las siguientes condiciones:

- Condición 1 - 30 g/l de xilosa y 50 mM de *buffer* MES pH 7.0 por 48 horas
- Condición 2 - 30 g/l de glucosa por 48 horas
- Condición 3 - 10 g/l de xilosa por 32 horas
- Condición 4 - 10 g/l de xilitol por 32 horas

Los matraces fueron inoculados con un cultivo de *H. seropedicae* crecido durante 24 hrs en medio TY. Se incubaron a 30 °C con agitación orbital de 200rpm por 48 o 32 hrs según lo señalado anteriormente. Las células fueron recolectadas por centrifugación y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7,6. Aproximadamente 3 g del *pellet* húmedo se resuspendió en 4 ml de la misma solución.

Los extractos celulares fueron obtenidos con una prensa French Press Aminco. Se utilizó una presión de trabajo de 13.000 psi. La suspensión obtenida se centrifugó a 20.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se fraccionaron en varias alícuotas y las mismas se guardaron a -20°C hasta efectuar las determinaciones enzimáticas correspondientes. Antes de realizar los ensayos, cada extracto fue diluido al medio con igual volumen de la solución amortiguadora mencionada anteriormente.

La actividad enzimática de xilosa deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición del NADH por aumento de la absorbancia a 340nm cada 15 segundos durante 2 minutos. Los ensayos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo, con un volumen final de 500 µl, en donde se adicionó 447,5 µl de *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH 7.6, 10 µl del extracto celular, 40 µl de NAD<sup>+</sup> 50 mM y 2,5 µl de xilosa 1 M. La reacción comenzó a cuantificarse luego del agregado de la xilosa. Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido, independientemente de la presencia de xilosa (ensayo blanco sin xilosa)<sup>39</sup>.

La actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición de NADH por medidas de absorbancia a 340nm cada 15 segundos durante 2 minutos. Se utilizó un volumen final de reacción de 0,5 ml en donde se adicionó 320 µl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.5, 50 µl de MgCl<sub>2</sub> 0,2 M, 10 µl de extracto celular, 20 µl de NAD<sup>+</sup> 50 mM y 100 µl de xilitol 100 mM. La reacción comenzó a cuantificarse luego del agregado del xilitol<sup>46</sup>. Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido independientemente de la presencia de xilitol (actividad basal del extracto celular).

Las actividades enzimáticas se estimaron a partir de las curvas de absorbancia versus tiempo, calculando la pendiente de la parte lineal de cada curva. Las medidas se realizaron por triplicado y los errores corresponden a la desviación estándar de los valores de actividad obtenidos en medidas independientes.

La determinación de proteínas en cada extracto celular se realizó por el método de Lowry y utilizando seroalbúmina bovina (BSA) para la curva de calibración (ver anexo)<sup>47</sup>.

## 5- RESULTADOS

### 5.1 Perfil de acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes de carbono

El perfil de acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 fue analizado en cultivos en lote en medio mínimo LGI, en presencia de glucosa, xilosa y una mezcla de glucosa-xilosa-arabinosa como únicas fuentes de carbono. En todos los ensayos se mantuvo la relación atómica C/N de 25, menos en el ensayo que se muestra en la Figura 10, en donde se utilizó una relación molar C/N= 8,25 (correspondiente a 10 g/l de glucosa como única fuente de carbono). En este último ensayo, *H. seropedicae* Z69 no acumuló polímero en cantidades importantes, alcanzando un contenido de PHB del orden del 19% a las 24 horas de incubación. A su vez, se observa que en ese momento la glucosa alcanzó concentraciones muy bajas en el medio de cultivo, mientras que el amonio mantuvo una concentración apreciable, por lo que consideramos que el cultivo no se encontraba en las condiciones óptimas de acumulación de polímero. Este ensayo confirmó los resultados obtenidos previamente en el marco del proyecto PDT 74/17. Por lo tanto, en los perfiles de producción posteriores se utilizó una relación molar atómica C/N=25, para que el nitrógeno fuese un nutriente limitante, mientras aún hubiese fuente carbonada disponible en el medio de cultivo.

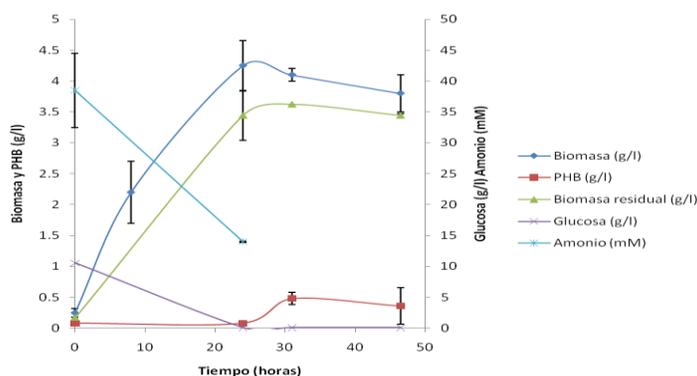
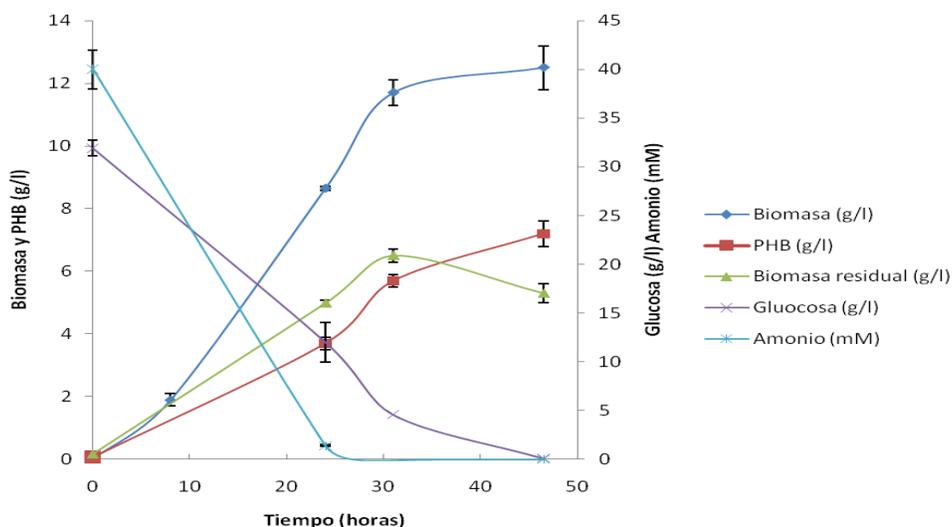


Figura 10: Perfil de distintos parámetros determinados en el cultivo de *H. seropedicae* Z69 en medio LGI con 10 g/l de glucosa como única fuente de carbono.

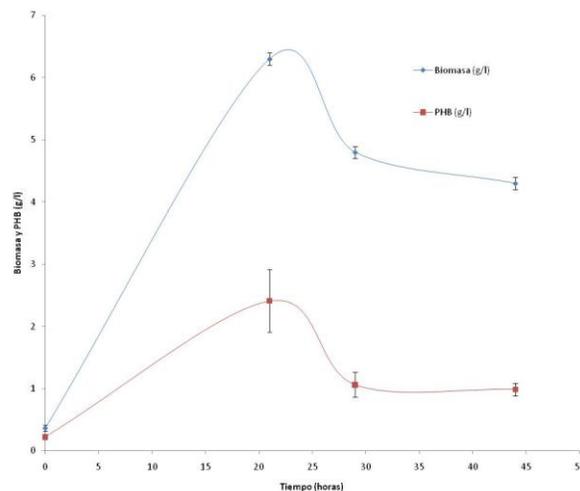
En la Figura 11 se muestra el perfil de crecimiento (biomasa expresado como g/l) y de concentración de PHB determinado en un cultivo de la cepa *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de glucosa 30 g/l como única fuente de carbono. A las 48 horas se determinó la máxima concentración de PHB (7,2 g/l). En ese momento, el contenido fue del orden de 58%, dado que la biomasa alcanzó un valor de 12,5 g/l (ver Tabla 6). La biomasa residual disminuyó luego de las 30 horas, lo que coincidió con el aumento del contenido de PHB.

Los perfiles de consumo de la fuente de carbono y nitrógeno se muestran en la Figura 11. A las 24 horas de cultivo no se detectó amonio en el sobrenadante de las muestras extraídas, lo que coincide con el aumento del porcentaje de PHB determinado. La concentración de glucosa dejó de ser detectable (menor a 0,1 g/l) a las 48 horas de incubación.



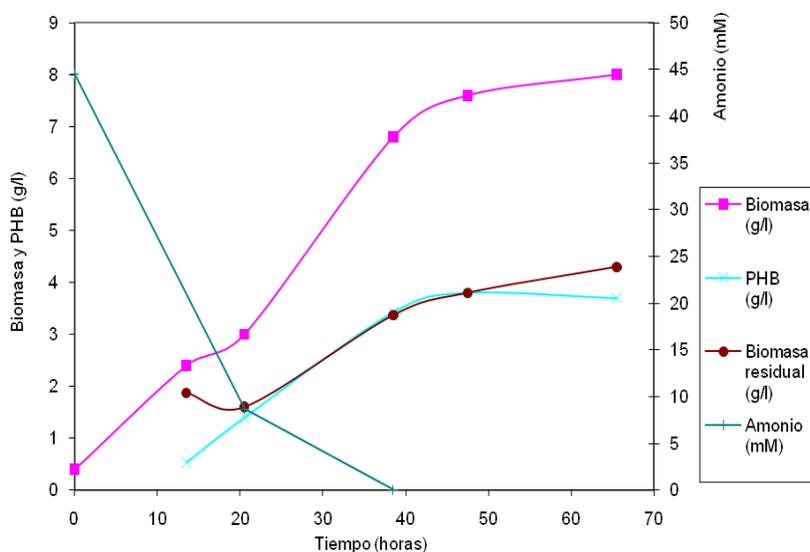
**Figura 11: Perfil de distintos parámetros del cultivo de la cepa Z69 crecida en medio LGI y en presencia de 30 g/l de glucosa.** A las 48 hs se obtuvo el máximo de biomasa (12,5 g/l) y concentración de PHB (7,2g/l), lo que representa un 58% de acumulación de PHB.

Cuando se determinó el perfil de crecimiento y acumulación de PHB de *H. seropedicae* Z69 crecida con 30 g/l de xilosa como única fuente de carbono, se observó una marcada disminución del pH del medio de cultivo, llegando a un valor de 4.2 a las 25 horas de incubación. Este aumento de la acidez probablemente promovió la muerte de las células, dado que la biomasa comenzó a disminuir a partir de ese momento. No se determinó la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono en el medio (ver Figura 12). Por este motivo, el perfil de acumulación de PHB de las células cultivadas con 30 g/l de xilosa se repitió, incorporando *buffer* MES 50 mM en el medio de cultivo ajustado a pH 7.0.



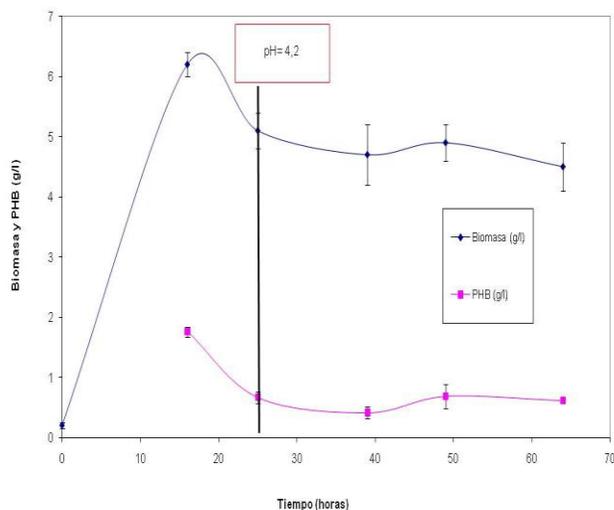
**Figura 12: Perfil de crecimiento y acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 cultivada en medio LGI con 30 g/l de xilosa.** Luego de las 21 horas el crecimiento celular disminuyó y se observa, además, una disminución del pH del medio de cultivo, llegando a 4,2 a las 25 horas de incubación.

En la Figura 13 se muestra el perfil de crecimiento de *H. seropedicae* Z69 y acumulación de PHB cuando las células se cultivaron en medio LGI con 30 g/l de xilosa como única fuente de carbono y 50 mM de *buffer* MES a pH 7.0. El porcentaje máximo de acumulación de PHB fue del 50%, determinado a las 48 horas de cultivo. En ese momento, el valor de biomasa fue de 7,6 g/l y la concentración de PHB de 3,8 g/l (ver Tabla 6). El amonio dejó de ser detectable antes de las 40 horas, coincidiendo con la entrada del cultivo en la fase estacionaria de crecimiento.



**Figura 13: Perfil de distintos parámetros a lo largo del crecimiento de la cepa Z69 cultivada en medio LGI con 30 g/l de xilosa y 50 mM de MES pH 7.0.** El porcentaje máximo de acumulación fue del 50% y se obtuvo a las 48 hs de incubación. En ese momento se alcanzó una biomasa de 7,6 g/l y una concentración de PHB de 3,8 g/l.

En la Figura 14 se muestra el perfil de crecimiento, expresado como biomasa y la concentración de PHB de *H. seropedicae* Z69 cultivada en medio LGI y en presencia de una mezcla de carbohidratos como fuente de carbono. Las proporciones son similares a las descritas para la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar<sup>24</sup>: 24 g/l de xilosa, 4,5 g/l de glucosa y 1,5 g/l de arabinosa. En este ensayo, al igual que en el ensayo con 30 g/l de xilosa, el pH disminuyó a 4.2 a las 25 horas con la consiguiente muerte celular del cultivo.



**Figura 14:** Perfil de crecimiento y producción de PHB en *H. seropedicae* Z69 utilizando una mezcla de fuentes de carbono en proporciones similares a las descritas en la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar<sup>24</sup>. A las 25 horas se observa una disminución del pH a 4,2 asociado a una presumible muerte celular.

Por este motivo, el ensayo se repitió bajo las mismas condiciones y utilizando *buffer* MES 50 mM, pH 7.0 (ver Figura 15). En este cultivo, a las 48 horas de incubación la biomasa alcanzó un valor de 8,9 g/l y 5,0 g/l de concentración de PHB, lo que corresponde a un porcentaje de acumulación máximo de PHB del 56% (ver Tabla 6). Cuando la concentración de amonio se tornó limitante, luego de las 24 horas, se detectó un aumento en la cantidad de PHB acumulado.

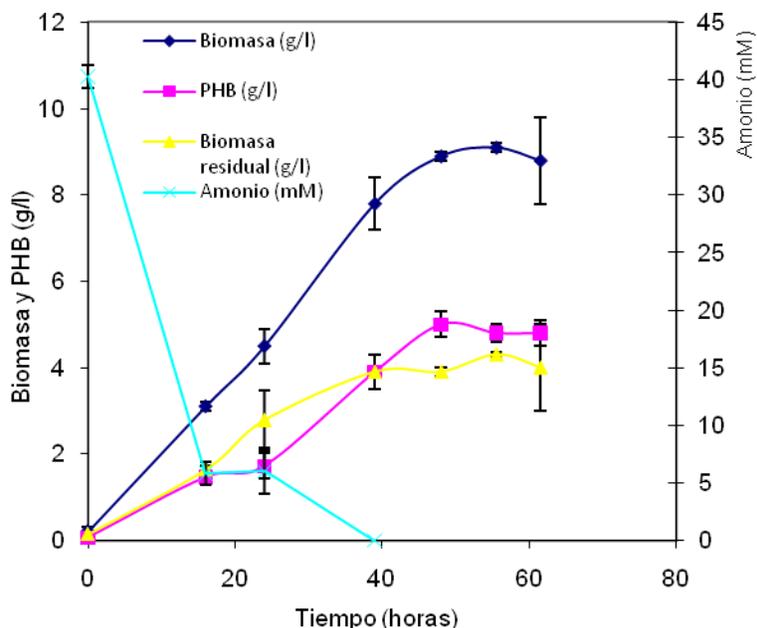


Figura 15: Perfil de distintos parámetros a lo largo del crecimiento de la cepa Z69 cultivada en medio LGI con una mezcla de fuentes de carbono en proporciones similares a las descritas en la hemicelulosa del bagazo de caña<sup>24</sup> y 50mM de *buffer* MES, pH 7.0.

Los sobrenadantes de estos dos últimos ensayos fueron analizados por HPLC a los efectos de determinar la presencia de ácidos orgánicos que pudiesen estar involucrados en la acidificación del medio de cultivo. En los sobrenadantes del cultivo realizado en presencia de xilosa, glucosa y arabinosa, y sin amortiguar el pH con *buffer* MES, se detectó ácido propiónico, alcanzando una concentración de 871,1  $\mu\text{g/ml}$  a las 16 horas de cultivo. En el cultivo que mantuvo el pH amortiguado con MES, el ácido propiónico llegó a una concentración de 12,6  $\mu\text{g/ml}$  a las 39 horas y de 6,1  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de incubación (no se muestran los cromatogramas).

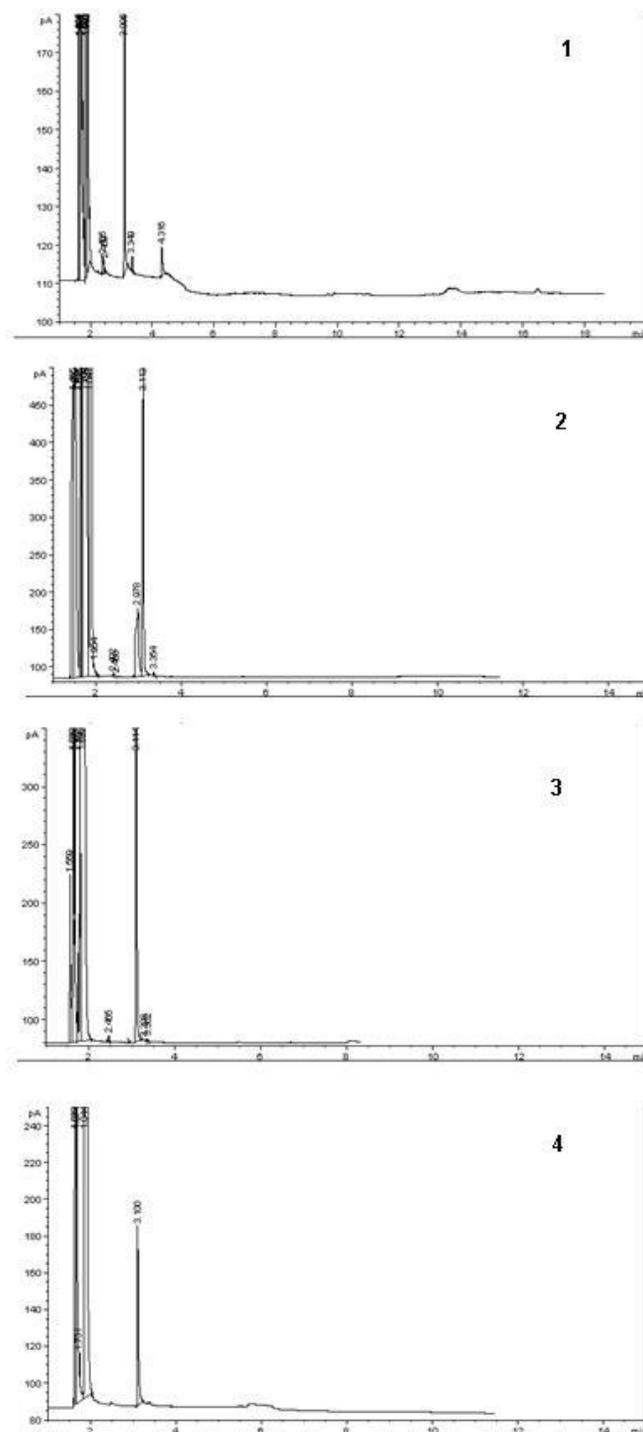
**Tabla 6: Resultados obtenidos en los diferentes cultivos de *H. seropedicae* Z69 a las 48 horas de incubación.** La velocidad de crecimiento fue calculada como la pendiente de la fase exponencial de crecimiento del cultivo, utilizando los valores de biomasa residual. La productividad se calculó como la concentración máxima de PHB dividido el tiempo que llevó acumularlo. \*Datos obtenidos a las 24 horas donde se considera que se alcanzó el máximo de acumulación de polímero.

Fuente de carbono	Biomasa (g/l)	PHB (g/l)	%PHB	Productividad (g de PHB/l.h)	Velocidad de crecimiento (g.l de biomasa residual/h)
<b>Glucosa 10g/l</b>	4,3*±0,4	0,81*±0.01	19*±2	0,03*	0,14
<b>Glucosa 30g/l</b>	12,5±0.7	7,2±0.4	58±6	0,15	0,2
<b>Xilosa 30g/l</b>	7,6	3,8	50	0,08	0,06
<b>Xilosa 24g/l Glucosa 4,5 g/l Arabinosa 1,5g/l</b>	8,9±0,1	5,0±0,3	56±4	0,10	0,1

## 5.2 Determinación de la estructura del polímero

Se analizaron por cromatografía gaseosa los metilésteres derivados del material polimérico acumulado por *H. seropedicae* Z69 cultivada en medio LGI y en presencia de glucosa, xilosa, arabinosa y una mezcla de estos azúcares.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7. A partir de cada una de las muestras se obtuvieron los cromatogramas correspondientes (mostrados en la Figura 16), con un único pico de elución cuyo tiempo de retención corresponde al tiempo de retención del metiléster del ácido 3-hidroxi-butírico utilizado como estándar.



**Figura 16:** Cromatogramas de los ésteres de metilo derivados de la metanólisis del polímero purificado de *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes de carbono. 1- Estándar de P(3HB-co-3HV); 2- Glucosa 30 g/l; 3- Xilosa 30 g/l; 4- Arabinosa 30g/l. En todos los casos se observa a los 3,1 minutos el pico de elución del 3-hidroxibutirato de metilo; en el estándar se observa, además, el pico de elución del 3-hidrovalerato de metilo a los 4,5 minutos.

Tabla 7: Estructura del polímero que acumula *H. seropedicae* Z69 cuando crece con diferentes fuentes de carbono según determinaciones realizadas por GC-FID.

Fuente de carbono	Polímero
Glucosa 30 g/l	PHB
Xilosa 30 g/l	PHB
Arabinosa 30 g/l	PHB
Glucosa 24 g/l; xilosa 4,5 g/l; arabinosa 1,5 g/l	PHB

### 5.3 Análisis del genoma de *H. seropedicae* SmR1

La secuencia del genoma de *H. seropedicae* SmR1 se hizo pública recientemente (GENOPAR). Esta cepa es una derivada espontánea, resistente a estreptomicina, de la cepa Z78. Los genotipos de las cepas Z78 y Z69 se presume que son muy similares en virtud de los estudios previamente desarrollados por Soares-Ramos *et al.* (2003)<sup>48</sup>.

Además, ambos organismos presentan fenotipos muy similares en lo que refiere al crecimiento en presencia de distintas fuentes carbonadas, y una alta similitud en las secuencias nucleotídicas de algunos genes que fueron analizados en nuestro laboratorio previamente. Por lo tanto, asumimos que los genomas presentan una organización similar y relativamente conservada, especialmente en lo que refiere al metabolismo carbonado y en particular el de xilosa.

Se efectuó una búsqueda de genes (marcos de lectura abiertos) anotados en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 que tuviesen una función asignada en el metabolismo de la xilosa. En la Tabla 8 se muestran los genes encontrados en base a la identidad asignada por GENOPAR. Estos codifican para enzimas involucradas en el segundo y tercer paso de la ruta oxo-reductiva (xilitol deshidrogenasa y xilulosa quinasa, respectivamente). El primer paso de esta ruta está dado por la enzima xilosa reductasa cuyo gen, *xy1*, no está anotado como tal.

Para confirmar la ausencia del gen que codifica para la xilosa reductasa se procedió a buscar secuencias de enzimas descritas en otros microorganismos y utilizando el programa Blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) se compararon con el genoma de *H. seropedicae* SmR1 (usado como base de datos traducido). Las enzimas usadas como *Query Sequence* fueron las siguientes (entre paréntesis se muestra el número de acceso del GenBank): xilosa reductasa de *Neurospora crassa* OR74A (AAW66609.1), D-xilosa reductasa NAD(P)H-dependiente de *Aspergillus oryzae* RIB40 (ACX46083.1) y xilosa reductasa de *Candida shehatae* (ABK35120.1). No se encontraron regiones del genoma de *H. seropedicae* SmR1 que presentaran una alta similitud (*score* mayor a 200) con estas secuencias. En el último caso (ABK35120.1), se halló una secuencia, con un *score* de 90,9%, que codifica para una aldo-ceto reductasa.

Tabla 8: Genes anotados en *H. seropedicae* SmR1 (GenBank)

Enzima	Nombre del Gen	Nº de acceso GenBank	Comentarios
D-xilulosa reductasa = xilitol deshidrogenasa	<i>Hsero_3396</i>	YP_003776785	Corresponde a la ruta oxo-reductiva
D-xilulosa quinasa	<i>xyIB</i>	YP_003776788	Cercano al gen que codifica para la xilitol deshidrogenasa. Corresponde a la ruta oxo-reductiva y de la xilosa isomerasa
pentulosa y hexulosa quinasa	<i>xyIB</i>	YP_003773879.1	Adyacente al gen <i>dalD</i> , que codifica para la D-arabinitol-4-deshidrogenasa

En la Figura 17 se muestra un ordenamiento de genes anotados en SmR1, que presentan la misma organización que la de los genes del operón *xyI* de varias especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas*<sup>41</sup>. Estos genes codifican para diferentes

enzimas: *xylR* (proteína reguladora de la transcripción del operón xilosa de la familia AraC), *xylF* (proteína periplasmática del sistema de transporte ABC de D-xilosa), *xylG* (ATPasa transportador del tipo ABC de D-xilosa), *xylH* (transportador del tipo ABC, permeasa de D-xilosa).

A diferencia de *E. coli*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*, *H. seropedicae* SmR1 no contiene un gen anotado como *xylA* en esta región del genoma, y en ninguna otra. A su vez, no se pudo encontrar ningún marco de lectura abierto (traducido) de *H. seropedicae* SmR1 que presente similitud con las secuencias de xilosa isomerasa descritas en otros microorganismos. Para ello se usó el programa Blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), como base de datos el genoma de SmR1, y como *Query Sequences* las secuencias de las siguientes enzimas (entre paréntesis se incluye el número de acceso al GenBank): xilosa isomerasa de *Burkholderia ambifaria* MEX-5 (ZP\_02905676.1); xilosa isomerasa de *B. ambifaria* IOP40-10 (ZP\_02888396.1); xilosa isomerasa de *B. graminis* C4D1M (ZP\_02882351.1); xilosa isomerasa de *Sinorhizobium meliloti* AK83 (ZP\_07599027.1); xilosa isomerasa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304 (ACI56678.1).



Figura 17: Conjunto de genes presentes en *H. seropedicae* SmR1 ordenados de la misma manera que en el operón *xyl* de *Burkholderia* y *Pseudomonas*<sup>41</sup>. Extraído del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Por último, se procedió a buscar genes candidatos a estar involucrados en la ruta de Weinberg. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos al comparar las secuencias de enzimas de la ruta de Weinberg de otros microorganismos con el genoma de *H. seropedicae* SmR1, usando el programa Blastp. Se eligieron las secuencias que presentaron un *score* >200%, salvo una excepción, en donde no se encontraron secuencias con más de 200% de *score*.

**Tabla 9: Resultados de la búsqueda de proteínas en *H. seropedicae* SmR1, a partir de secuencias de enzimas de la ruta de Weinberg presentes en otros microorganismos.** Para la búsqueda se usó el programa Blastp y como banco de datos el genoma de SmR1. Se presentan los resultados que exhibieron un score más alto. Entre paréntesis se encuentran los códigos de acceso a las secuencias en el GenBank.

Enzima problema ( <i>Query</i> ) del microorganismo indicado	Enzima anotada en <i>H. seropedicae</i>	Máximo score	<i>Query coverage</i> (porcentaje de la secuencia problema que presenta la similitud indicada)	E -value	% de identidad	Nombre y comentarios del gen encontrado en <i>H. seropedicae</i> SmR1
D- xilosa deshidrogenasa de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 (YP_556561.1)	Deshidrogenasa de cadena corta (YP_003777871.1)	335	94%	3e-93	60% de 254 aminoácidos	Gen <i>fabG</i> (está a continuación del ordenamiento de genes similar a los del operón <i>xyl</i> , ver Figura 17)
D- xilosa deshidrogenasa de <i>B. xenovorans</i> LB400 (YP_556561.1)	Oxidoreductasa deshidrogenasa (YP_003774466.1)	231	94%	6e-62	49% de 253 aminoácidos	Gen <i>Hsero_1041</i>
D-xilosa deshidrogenasa de <i>Caulobacter crescentus</i> (ACL94329.1)	Deshidrogenasa de cadena corta (YP_003777871.1)	321	99%	3e-89	75% de 252 aa	Gen <i>fabG</i> (está a continuación del ordenamiento de genes similar a los del operón <i>xyl</i> , ver Figura 17)
D-xilosa deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (ACL94329.1)	Oxidoreductasa deshidrogenasa (YP_003774466.1)	239	98%	1e-64	69% de 250 aa	Gen <i>Hsero_1041</i>
Xilonolactonasa de <i>C. crescentus</i> AAK22805	Gluconolactonasa YP_003777265.1	172	98%	3e-44	37% de 296 aa	Gen <i>Hsero_3879</i>
Xilonolactonasa de <i>C. crescentus</i> AAK22805	Gluconolactonasa YP_003774469.1	148	95%	4e-37	36% de 283 aa	Gen <i>Hsero_1044</i>
Xilonato deshidratasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22804)	Dihydroxiácido deshidratasa/fosfo gluconato deshidratasa YP_003777872.1	957	98%	0.0	76% de 590 aa	Gen <i>Hsero_4498</i> . Se encuentra cercano al ordenamiento de genes similar al operón <i>xyl</i> (ver Figura 17)
Xilonato deshidratasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22804)	Dihydroxiácido deshidratasa/fosfo gluconato deshidratasa YP_003774465.1	425	98%	7e-120	42% de 592aa	Gen <i>Hsero_1040</i>
Xilonato deshidratasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22804)	dihydroxiácido deshidratasa/fosfo gluconato deshidratasa YP_003776724.1	411	97%	8e-116	41% de 586 aa	Gen <i>ilvD</i>

Enzima problema (Query) del microorganismo indicado	Enzima anotada en <i>H. seropedicae</i>	Máximo score	Query coverage (porcentaje de la secuencia problema que presenta la similitud indicada)	E-value	% de identidad	Nombre y comentarios del gen encontrado en <i>H. seropedicae</i> SmR1
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD YP_003775661.1	238	97%	9e-64	34% de 477aa	Gen Hsero_2254
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD YP_003777323.1	236	88%	2e-63	35% de 424aa	Gen Hsero_3944
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP YP_003774550.1	236	85%	4e-63	36% de 416aa	Gen <i>gabD2</i>
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD+ YP_003775313.1	230	98%	2e-61	34% de 487aa	Gen <i>exaC</i>
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	benzaldehído deshidrogenasa YP_003777958.1	228	97%	9e-61	33% de 468aa	Gen Hsero_4584
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD YP_003774447.1	228	94%	1e-60	34% de 450aa	Gen Hsero_1022
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	metilmalonil-semialdehído deshidrogenasa YP_003776463.1	226	97%	4e-60	31% de 471aa	Gen <i>mmsA</i>
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD YP_003776917.1	217	97%	2e-57	36% de 475aa	Gen Hsero_3530
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD YP_003774385.1	211	97%	1e-55	34% de 469aa	Gen Hsero_0960
Aldehído deshidrogenasa de <i>C. crescentus</i> (AAK22807)	metilmalonil-semialdehído deshidrogenasa YP_003778167.1	202	99%	7e-53	30% de 485aa	Gen Hsero_4798

En la Tabla 9 se observa que todas las secuencias de enzimas implicadas en la ruta de Weinberg en otros microorganismos alinearon con marcos de lecturas abiertos (traducidos) del genoma de *H. seropedicae* SmR1.

#### 5.4 Medida de las actividades enzimáticas

De acuerdo a los resultados obtenidos al analizar el genoma de *H. seropedicae* SmR1 y a fin de determinar cuáles son las rutas expresadas, se procedió a determinar las actividades de las enzimas xilosa deshidrogenasa (enzima involucrada en las vías de Weinberg y Dahms) y xilitol deshidrogenasa (involucrada en la ruta oxo-reductiva).

En la Tabla 10 se muestran las actividades medidas para dichas enzimas en extractos celulares preparados a partir de cultivos de *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso.

Tabla 10: Actividades enzimáticas medidas, expresadas como nmol de NADH formado/min. mg de proteínas en los extractos celulares preparados a partir de células crecidas en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Enzima	Fuente de carbono empleada en el cultivo			
	Xilosa 10 g/l	Xilosa 30 g/l	Glucosa 30 g/l	Xilitol 10 g/l
Xilosa deshidrogenasa	29±8	30,4±0,6	16±2	0
Xilitol deshidrogenasa	0	3±2	0	47±4

## **6- DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En este trabajo se estudió la producción del polímero PHB en *H. seropedicae* Z69 al ser cultivada en medio definido LGI y en presencia de los carbohidratos constituyentes de la hemicelulosa. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: glucosa, xilosa y una mezcla de azúcares (xilosa, glucosa, arabinosa) a una concentración similar a la presente en el bagazo de caña hidrolizado<sup>24</sup>. A su vez, a los efectos de identificar las rutas involucradas en el catabolismo de xilosa, se realizó el análisis *in silico* del genoma de *H. seropedicae* SmR1 y se determinaron las actividades de algunas enzimas candidatas a participar en el metabolismo de xilosa.

### **6.1 Perfil de acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 crecida en presencia de diferentes fuentes de carbono**

Se realizaron estudios del perfil de producción de PHB y crecimiento de Z69 utilizando diferentes fuentes de carbono y manteniendo constante la concentración de fuente de carbono total en 30 g/l y la relación molar de átomos C/N=25, salvo en la condición 1 donde se utilizó 10 g/l de glucosa (Figuras 10 a 15).

#### **6.1.1 Glucosa**

En la Figura 10 se muestra el perfil de acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 cuando se cultivó en presencia de 10 g/l de glucosa y en la Figura 11 se muestra un ensayo realizado con 30 g/l de glucosa como fuente de carbono en el medio LGI. En estos ensayos cambió la relación molar de átomos de C/N, siendo para el primer caso igual a 8,25 y 25 para el segundo caso.

Las células cultivadas en presencia de 10 g/l de glucosa no presentaron un aumento significativo en el contenido de PHB celular. El aumento de la concentración de PHB se debió al aumento en el número de células, pero si se

observa la biomasa residual, ésta no disminuyó y presentó un perfil similar al del crecimiento celular, por lo que el contenido celular de PHB no aumentó. A su vez, la glucosa se agotó a las 24 horas, cuando se mantenía una concentración de 14 mM de amonio en el medio de cultivo. El cultivo no se encontraba en las condiciones de acumulación de PHB, en donde se requiere un exceso de fuente de carbono y limitación de nitrógeno<sup>18</sup>. En este caso, fue limitante del crecimiento y de la acumulación de PHB la fuente de carbono y no la fuente de nitrógeno.

Cuando se analizaron los cultivos en LGI con 30 g/l de glucosa, se observó una importante acumulación de PHB, alcanzando una concentración de 7,2 g/l a las 48 horas y una biomasa de 12,5 g/l, lo que corresponde a un porcentaje de acumulación del 58% (ver Tabla 6). El aumento del contenido intracelular de PHB se puede apreciar en la curva de biomasa residual, que disminuyó a medida que el contenido de PHB aumentó (en la fase estacionaria de crecimiento del cultivo). En este ensayo, además, se demuestra que en *H. seropedicae* Z69 la síntesis de PHB es dependiente de la entrada del cultivo en la fase estacionaria de crecimiento. En otros microorganismos, la síntesis de PHB está ligada al crecimiento y lo acumulan sin importar la fase de crecimiento en la que se encuentre<sup>3</sup>.

La concentración de amonio disminuyó a valores limitantes para el crecimiento a partir de las 25 horas, simultáneo con el inicio de la fase estacionaria. A partir de ese momento aumentó la concentración de PHB en el cultivo. En esta fase, las concentraciones de glucosa y amonio en el sobrenadante fueron aparentemente propicias para incrementar la acumulación del polímero intracelular, sin incremento de la biomasa.

### **6.1.2 Xilosa**

Cuando se analizó el perfil de crecimiento y acumulación de PHB por la cepa Z69 cultivada en presencia de 30 g/l de xilosa como fuente de carbono (Figura 12) se observó una marcada disminución del pH del medio de cultivo, lo que probablemente promovió la muerte celular. La disminución del pH del medio es debida, posiblemente, a los metabolitos generados por *H. seropedicae* Z69 al consumir xilosa, ya que en los ensayos realizados con 30 g/l de glucosa bajo las mismas condiciones esto no ocurrió.

Para poder realizar el ensayo de producción de PHB sin disminución del pH, se agregó *buffer* MES, ajustado a pH=7.0, a una concentración de 50 mM al medio de cultivo. En la Figura 13 se visualiza el perfil de crecimiento y acumulación de PHB en *H. seropedicae* Z69 cuando se utilizó 30 g/l de xilosa como única fuente de carbono y 50 mM de *buffer* MES, pH=7.0. De esta manera, se obtuvo el máximo de acumulación de PHB a las 48 horas de incubación. En ese momento, se alcanzó un valor de 7,6 g/l de biomasa y 3,8 g/l de concentración de PHB, que corresponden a un contenido del orden de 50% de PHB (ver Tabla 6). Nuevamente, los resultados sugieren que cuando se agotó el amonio en el sobrenadante, el cultivo entró en fase estacionaria, deteniendo el aumento de biomasa y alcanzando un valor máximo de acumulación de PHB. Si se observa la curva de biomasa residual, la misma no aumentó de forma paralela a la de biomasa, indicando que la biomasa no aumentó solo por la división celular, sino también por el aumento de contenido intracelular del polímero PHB. En ese momento del cultivo se alcanzaron las condiciones propicias para la acumulación de PHB: limitante de amonio y exceso de xilosa. La xilosa remanente en el medio no se pudo medir por no disponer de los equipos adecuados. Hubiese sido interesante contar con este dato para poder calcular el rendimiento de fuente carbona y ver su consumo a lo largo del tiempo.

### **6.1.3 Mezcla de fuentes de carbono en proporciones similares a las del bagazo de caña de azúcar**

Cuando se analizó el perfil de acumulación de PHB y crecimiento por Z69 utilizando una mezcla de fuentes de carbono que reflejara la composición presente en la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar<sup>24</sup> (24 g/l de xilosa, 4,5 g/l de glucosa y 1,5 g/l de arabinosa), el pH disminuyó a 4.2 a las 25 horas, con la consiguiente disminución de biomasa y presumible muerte celular (ver Figura 14), similar a lo ocurrido en el cultivo con 30 g/l de xilosa. Intentando establecer las causas de la disminución del pH, se analizó la presencia de ácidos orgánicos en el sobrenadante del cultivo mediante HPLC. Se detectó la presencia de ácido propiónico, el cual podría contribuir a disminuir el pH del medio. Este ácido parece ser producido y excretado en mayor concentración por *H. seropedicae* Z69 cuando es cultivado con xilosa como fuente de carbono, ya que en los cultivos desarrollados con glucosa no se observó una disminución del pH tan pronunciada.

No está claro si este ácido se produjo como subproducto de alguna vía del metabolismo de xilosa o por un metabolismo fermentativo. Baldani et al. (1986)<sup>32</sup> describieron a *H. seropedicae* como una bacteria que no fermenta azúcares en las condiciones ensayadas en su laboratorio. Quizás la alta concentración de xilosa, bajo las condiciones de cultivo utilizadas en nuestro caso, haya promovido la expresión de un metabolismo fermentativo en este organismo.

En los cultivos realizados bajo las mismas condiciones, pero amortiguado con MES, se detectó la presencia de ácido propiónico en los sobrenadantes, pero con una concentración considerablemente menor. Este resultado no era el esperado por nosotros inicialmente. Existen varias razones que podrían explicar este comportamiento. El microorganismo, al excretar propiónico, acidifica el medio. Esta acidificación induciría un cambio metabólico, que promovería la excreción de mayor cantidad de ácido o una eventual lisis del organismo y liberación de su contenido celular, incluyendo este ácido en cuestión. Debemos destacar que los resultados obtenidos en este ensayo deben ser considerados con precaución, ya

que la identidad de los compuestos eluidos se basó en la comparación de los tiempos de retención de los mismos con los de soluciones estándar incluidas en la corrida cromatográfica. Además, se usó un detector UV de HPLC, con baja especificidad para el análisis de sobrenadante de cultivo de composición compleja, por lo que el uso de un detector de índice de refracción o MS hubiese sido más adecuado.

En la Figura 15 se muestra el perfil de crecimiento y acumulación de PHB por *H. seropedicae* Z69 en medio LGI y utilizando la mezcla de fuentes de carbono de 24 g/l de xilosa, 4,5 g/l de glucosa y 1,5 g/l de arabinosa y *buffer* MES 50 mM, pH=7.0 para eliminar la variable del pH. Este ensayo tenía como objetivo analizar el crecimiento y producción de PHB en condiciones de cultivo semejantes a las que podrían generarse al emplear hidrolizado de bagazo de caña como fuente de carbono. Se mantuvo la relación molar de átomos C/N de 25 utilizada en los cultivos anteriores.

El máximo de acumulación de PHB se alcanzó a las 48 horas de incubación. En ese momento se obtuvo una biomasa de 8,9 g/l y una concentración de PHB de 5,0 g/l. El contenido fue de 56% (ver Tabla 6).

Antes de las 48 horas de incubación, la concentración de amonio en el sobrenadante alcanzó valores muy bajos, lo que coincide con la entrada en fase estacionaria de crecimiento y la máxima acumulación de PHB. Nuevamente se observa que la biomasa residual no siguió el mismo comportamiento que la biomasa, mostrando que el aumento de biomasa se debió a la acumulación de PHB y no al aumento en el número de células presentes.

No se pudo determinar la concentración de cada una de las fuentes carbonadas. Hubiese sido interesante poder determinar el perfil de variación de concentración de cada carbohidrato, para poder inferir el ordenamiento y períodos de tiempo en el que se consumía cada uno. También se podría haber estimado el rendimiento de consumo de la fuente carbonada.

#### **6.1.4 Comparación de las condiciones utilizadas**

Los perfiles de crecimiento y producción de PHB obtenidos en cultivos con 30 g/l de fuente carbonada fueron realizados bajo las mismas condiciones y manteniendo constante la relación atómica C/N, de modo que, los resultados dependen exclusivamente de la fuente de carbono utilizada y son comparables en los tres casos.

El perfil realizado con 30 g/l de glucosa fue el que tuvo mayor producción de PHB. Cabe destacar que estas condiciones habían sido optimizadas en trabajos previos en nuestro laboratorio (Proyecto PDT 74-17), por lo que era de esperar que con este ensayo se obtuvieran los mejores resultados. El perfil realizado en presencia de 30 g/l de xilosa obtuvo el menor porcentaje de acumulación de PHB y productividad (ver Tabla 6). El ensayo que incluyó la mezcla de fuentes carbonadas debería ser similar al ensayo con xilosa, debido a que la xilosa representó el 80% en peso de la fuente carbonada presente en el medio. Sin embargo, alcanzó valores de biomasa, acumulación de PHB y productividad intermedios entre los otros dos ensayos (ver Tabla 6), por lo que el hecho de incluir varias fuentes carbonadas en el medio de cultivo al mismo tiempo, quizás le permitiría optimizar el uso de recursos y así acumular más PHB en comparación con los cultivos con xilosa como única fuente de carbono.

Analizando las velocidades de crecimiento que se muestran en la Tabla 6, se observa que el cultivo con 30 g/l de glucosa presentó la mayor velocidad de crecimiento. Sin embargo, los tres cultivos que emplearon 30 g/l de fuente carbonada alcanzaron contenidos de PHB comparables. El cultivo con 30 g/l de glucosa incrementó rápidamente su biomasa y luego entró en la etapa de acumulación de PHB sin aumento del número de células (ver Figura 11). Además, a las 24 horas de cultivo, la biomasa obtenida en esta condición fue la mayor. Los demás cultivos incrementaron su biomasa y alcanzaron contenidos de PHB semejantes pero los valores absolutos de biomasa, concentración de PHB y velocidad de crecimiento fueron menores. No se determinó la concentración de

xilosa y de los azúcares de la mezcla de las fuentes de carbono en el sobrenadante, lo que hubiese contribuido al análisis de los resultados, ya que no se sabe si a las 48 horas se había consumido toda la fuente carbonada del medio de cultivo. Si esto ocurre, se podría pensar que el metabolismo es menos eficiente y que genera menos biomasa con la misma cantidad de carbono. Si aún quedara fuente de carbono remanente en el medio a las 48 horas se podría pensar que *H. seropedicae* Z69 crece más lento con xilosa y que podría llegar a aumentar su biomasa y PHB si se continua con el cultivo.

Los resultados obtenidos en estos tres ensayos son relativamente comparables entre sí y se llegó a valores de acumulación de PHB similares a los valores descritos en la literatura que se resumen en la Tabla 5.

Estos resultados indican que la cepa Z69 es capaz de crecer y acumular PHB en presencia de los azúcares que componen la hemicelulosa hidrolizada. Esto sugiere que sería posible utilizar hemicelulosa hidrolizada como sustrato carbonado de bajo costo para la producción de PHB. Sin embargo, aún sería necesario realizar ensayos con el subproducto industrial y deberían optimizarse las condiciones de cultivo usando este sustrato carbonado. De este modo, la producción de PHB se podría acoplar a la industria sucroalcoholera y utilizar el bagazo de caña para generar productos con alto valor agregado.

## **6.2 Determinación de la estructura del polímero**

Se analizaron mediante GC-FID, los metilésteres derivados de los monómeros constituyentes del polímero purificado acumulado por *H. seropedicae* Z69 crecido en medio LGI con diferentes fuentes de carbono. Los cromatogramas se compararon con un estándar de P(3HB-co-3HV) hidrolizado y derivatizado, usado como estándar. En todos los casos, los metiléstres eran derivados de 3-hidroxiбутирато, lo que corresponde al monómero del PHB. Este resultado

demuestra que *H. seropedicae* acumula el homopolímero PHB cuando se crece con las fuentes de carbono mencionadas anteriormente.

La composición determinada era de esperar, ya que los cultivos se realizaron en presencia de carbohidratos como fuente de carbono. El acetil-CoA es un intermediario del metabolismo de glucosa, arabinosa y también se sintetiza como intermediario en cualquiera de las rutas del metabolismo de xilosa que puedan expresarse. Como se mencionó anteriormente, la ruta clásica de síntesis de PHB descrita en muchos microorganismos y presente en *H. seropedicae*, comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para generar acetoacetil-CoA<sup>13</sup>.

## **6.2 Análisis del genoma de *H. seropedicae* SmR1**

Analizando el genoma de *H. seropedicae* SmR1, se identificó un conjunto de genes (*xyIFGH* y *xyIR*), mostrados en la Figura 17, que presentaron una similitud y organización similar a la del operón *xyl* de *Burkholderia* y *Pseudomonas*<sup>41</sup>. En este operón, comúnmente se encuentra el gen *xylA*, que codifica para la xilosa isomerasa. Sin embargo, en este caso, no se encontró dicho gen. Al utilizar el programa Blastp y como banco de datos el genoma de la cepa SmR1, no se lograron identificar secuencias similares a las de la enzima xilosa isomerasa de otros microorganismos. Se podría pensar, entonces, que el gen que codifica para esta enzima no está presente en *H. seropedicae* y que, por lo tanto, la xilosa no se metabolizaría por la ruta de la xilosa isomerasa.

Para analizar la potencial presencia de la ruta oxo-reductiva, se procedió a buscar secuencias de la enzima xilosa reductasa de otros microorganismos, las cuales se compararon con el genoma de *H. seropedicae* SmR1, mediante el programa Blastp. No se encontraron genes con similitud importante a la xilosa reductasa (*score* mayor a 200) en el genoma de SmR1. En este caso se utilizaron las secuencias de las enzimas nombradas en la sección 5.3, dado que las mismas habían sido caracterizadas y hay trabajos publicados que describen su función en

el metabolismo de xilosa. En general, todos los genes bacterianos a los que se le asigna la función de codificar para la D-xilosa reductasa han sido identificados en base a su similitud con otras secuencias conocidas. Es así que estos genes estarían potencialmente involucrados en el metabolismo de la xilosa, dado que no se han desarrollado los estudios bioquímicos y genéticos correspondientes. Por ello, esas secuencias no se utilizaron en los estudios *in silico*. Debe destacarse que las *Query Sequence* utilizadas en este estudio son enzimas de origen eucariota, por lo que este resultado no es definitivo para descartar la presencia de la enzima xilosa reductasa y mucho menos de la ruta oxo-reductiva, ya que, además, están anotados en el genoma los genes que codifican para las demás enzimas de la ruta. Para estudiar la presencia o ausencia de la xilosa reductasa se podrían realizar mutantes al azar y secuenciar las regiones mutadas de aquellos clones que no crezcan en xilosa y si crezcan en xilitol.

El potencial gen que codifica para la enzima D-xilulosa quinasa (tercera enzima de esta ruta) está anotado en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 como gen *xyIB*, y también está anotado un gen, cercano al anterior, que codificaría para la D-xilulosa reductasa, también denominada xilitol deshidrogenasa (segunda enzima implicada en esta ruta).

Existen dos genes *xyIB* anotados en el genoma de *H. seropedicae* SmR1, uno codificaría para la D-xilulosa quinasa y el otro para una (pentulosa y hexulosa) quinasa. Dentro del genoma de la cepa SmR1, precediendo el gen *xyIB* que codificaría para la (pentulosa y hexulosa) quinasa, está ubicado un gen denominado *dalD*, que codificaría para la D-arabinitol 4-deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión de D-xilulosa en D-arabitol. En las cercanías del gen *xyIB*, que codifica para la D-xilulosa quinasa, se encuentra un gen que codifica para la enzima xilitol deshidrogenasa, por lo que es de suponer que este último gen *xyIB* sea el que esté involucrado en el metabolismo del xilitol, intermediario de la ruta oxo-reductiva y fuente de carbono en la que *H. seropedicae* Z69 crece bien.

Para estudiar la potencial presencia de la vía de Weinberg, se utilizaron las secuencias de las enzimas de esta ruta publicadas en *Caulobacter crescentus*<sup>39</sup> y se compararon con el genoma de *H. seropedicae* utilizando el programa Blastp. Todas las secuencias exhibieron similitud, con valores significativos, con regiones específicas dentro del genoma de *H. seropedicae* SmR1. Además, las regiones encontradas están anotadas como genes que codifican para enzimas con funciones similares a las descritas en *C. crescentus*, aunque poseen denominaciones más generales o están asociadas con otros sustratos. A la luz de estos resultados, se podría suponer que *H. seropedicae* catabolizaría la xilosa por la vía de Weinberg, pero aún se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Para estudiar la presencia de genes que pudieran codificar para la enzima xilosa deshidrogenada (primera enzima de las rutas de Weinberg y Dahms), se utilizaron dos secuencias de enzimas de *C. crescentus* y de *B. xenovorans* LB400. Ambas secuencias exhibieron alta similitud con dos genes anotados del genoma de *H. seropedicae* SmR1 (más de 200 puntos de *score*). Uno de esos genes es el gen *fabG*, que se encuentra a continuación del ordenamiento de genes similar al encontrado en el operón *xyl* descrito en *Burkholderia* y *Pseudomonas*. La ubicación de este gen sugiere que el mismo puede estar involucrado en el metabolismo de la xilosa, e incluso podría llegar a formar parte del operón *xyl*, pero es necesario realizar más estudios al respecto. Para determinar si el gen *fabG* codifica para la xilosa deshidrogenasa se podría diseñar una mutación dirigida hacia el gen *fabG* y estudiar el fenotipo del mutante *knock out* con respecto al uso de xilosa como fuente carbonada y determinar por actividad enzimática la ausencia de la xilosa deshidrogenasa. Para estudiar si el mismo pertenece al operón *xyl* se podría mutar (por *knock out*) la zona del promotor del operón y determinar si esto influye en la expresión de la enzima xilosa deshidrogenasa mediante actividades enzimáticas, además sería interesante observar el comportamiento del mutante con respecto al crecimiento en xilosa. En caso de confirmar las dos hipótesis anteriores sería interesante ver qué sucede

cuando se cambia el promotor por uno más fuerte y poder realizar estudios de expresión en donde se introduce un gen reportero al comienzo del operón.

La última enzima de la ruta de Weinberg de *C. crescentus* presentó similitud con 10 regiones distintas del genoma de *H. seropedicae* SmR1. Este resultado es un poco desalentador, pero no hay que olvidarse que la actividad de la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa fue detectada mediante ensayos bioquímicos en *H. seropedicae* Z69 y Z78 por Mathias et al. (1989)<sup>38</sup>. Esta enzima fue determinada en el metabolismo de la arabinosa<sup>38</sup>, que es análogo a la ruta de Weinberg e incluso en los últimos pasos estarían implicados los mismos intermediarios.

Luego de analizar las posibles rutas presentes en *H. seropedicae* para el catabolismo de la xilosa, se decidió realizar las medidas de actividad de algunas enzimas para determinar cuáles rutas se expresan.

## **6.2 Medida de actividades enzimáticas.**

Se determinaron las actividades de las enzimas xilosa deshidrogenasa y xilitol deshidrogenasa en extractos celulares de *H. seropedicae* Z69 crecida en xilosa, glucosa o xilitol como fuentes únicas de carbono.

La xilosa deshidrogenasa es la primera enzima involucrada en las vías de Weinberg y Dahms. La actividad de esta enzima pudo ser detectada en los extractos celulares preparados a partir de células crecidas en xilosa y en glucosa (ver Tabla 10). Esto indica que la enzima está presente en *H. seropedicae* Z69 cultivada en ambas condiciones, y sugiere que la xilosa se metaboliza por la ruta de Weinberg o la de Dahms. El valor de actividad específica de esta enzima para los extractos crecidos con xilosa es comparable a los descritos en la literatura<sup>39</sup>.

Se ha establecido previamente que la xilosa deshidrogenasa puede utilizar glucosa como sustrato<sup>42</sup>, por lo que no es sorprendente que esta enzima esté activa en los extractos celulares crecidos con glucosa como única fuente carbonada. A su vez, Johnsen y Schönheit (2004)<sup>42</sup> detectaron actividad xilosa deshidrogenasa en el arquea *Haloarcula marismortui* cuando fue cultivada en presencia de glucosa, siendo esta actividad menor que la determinada cuando la arquea creció en presencia de xilosa.

En los perfiles de crecimiento realizados utilizando una mezcla de azúcares (xilosa, glucosa y arabinosa) (Figura 15) no se observó una alteración en el crecimiento debido a la adaptación del metabolismo bacteriano al cambiar de fuente de carbono. Esto podría deberse a que la xilosa deshidrogenasa y las enzimas del metabolismo de la xilosa no estén reprimidas por la presencia de glucosa en el medio.

En *H. seropedicae* Z69, la arabinosa se metaboliza por una vía análoga a la de Weinberg (ver Figura 6)<sup>38</sup>. En trabajos realizados con otros microorganismos, se ha observado que la arabinosa deshidrogenasa puede utilizar xilosa, galactosa o talosa como sustratos, aunque con menor eficiencia<sup>49</sup>. De este modo, la actividad xilosa deshidrogenasa y arabinosa deshidrogenasa de *H. seropedicae* Z69 podrían estar presentes en la misma proteína y actuar indistintamente con estos azúcares, aunque esto debería confirmarse mediante el análisis de fenotipos de mutantes.

Las actividades específicas de la enzima xilosa deshidrogenasa medida en los extractos celulares preparados a partir de cultivos crecidos con 30 g/l de xilosa y en 10 g/l de xilosa son comparables (ver Tabla 10). Esto sugiere que la concentración de xilosa no afecta la actividad de esta enzima. A su vez, esta presentó una actividad menor en los extractos celulares preparados a partir de cultivos crecidos en presencia de glucosa, sugiriendo que es activada por la presencia de xilosa en el medio de cultivo. No se detectó su actividad en los extractos celulares preparados a partir de cultivos crecidos en presencia de xilitol,

lo que apoya aún más la hipótesis anterior y además sugiere que el xilitol se podría metabolizar por una ruta diferente.

La enzima xilitol deshidrogenasa es la segunda enzima que actúa en la ruta oxo-reductiva. Su actividad sólo pudo ser detectada en los extractos celulares crecidos con xilitol, sugiriendo que el xilitol se metaboliza por esta ruta. Posiblemente la xilosa no se metabolice por la ruta oxo-reductiva, a través del xilitol, ya que no se pudo detectar la actividad de esta enzima en ninguno de los extractos crecidos en xilosa. Estos resultados estarían sugiriendo que la enzima xilosa reductasa (que transforma xilosa en xilitol) no se encuentra en *H. seropedicae* y agregaría credibilidad a los resultados obtenidos usando el programa Blastp y las *Query Sequences* de xilosa reductasas de microorganismos eucariotas de la sección 5.3 en donde no se encontraron genes que codifiquen para la xilosa reductasa en *H. seropedicae*.

La ruta oxo-reductiva se encuentra en levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas<sup>40,39</sup>, por lo que no es de esperar que la xilosa se metabolice por esta vía, pero lo que sí parece sorprendente es que exista la enzima xilitol deshidrogenasa, perteneciente a eucariotas, en *H. seropedicae* Z69.

## 7- CONCLUSIONES

- Cuando *H. seropedicae* Z69 es cultivada en presencia de la mezcla de fuentes de carbono (xilosa, glucosa, arabinosa) o en xilosa, produce PHB con un contenido similar al obtenido en cultivos con glucosa como única fuente de carbono (Tabla 6). En estas condiciones, Z69 produce PHB en cantidades comparables a las descritas para otros microorganismos en la bibliografía (Tabla 5). Estos resultados sugieren que sería posible utilizar hemicelulosa hidrolizada como sustrato carbonado para la producción de PHB.
- A partir del análisis de secuencias del genoma de la cepa SmR1 se puede inferir que *H. seropedicae* no metaboliza la xilosa por la ruta de la xilosa isomerasa, ya que no se identificó un gen que codifique para esta enzima. Tampoco utilizaría la ruta oxo-reductiva para metabolizar la xilosa porque no se logró identificar un gen que codifique para la xilosa reductasa, la primera enzima de esta ruta. Sin embargo posee el gen *xyIB*, por lo que podría eventualmente utilizar la ruta oxo-reductiva, a partir del segundo paso para metabolizar el xilitol.
- El análisis *in silico* sugiere que *H. seropedicae* metaboliza la xilosa por la ruta de Weinberg, ya que se encontraron secuencias en su genoma que presentaron una alta similitud con las secuencias de estas enzimas presentes en otras bacterias descritas previamente.
- Los ensayos bioquímicos permitieron detectar actividad xilosa deshidrogenasa en extractos de *H. seropedicae* Z69 crecidos en xilosa como única fuente de carbono. Esto sugiere la presencia de la ruta de Weinberg o la de Dahms. Esta enzima posee una actividad basal en los extractos preparados a partir de cultivos crecidos con glucosa como fuente de carbono y no fue detectada en extractos crecidos con xilitol, sugiriendo que es activada por la presencia de xilosa en el medio de cultivo.
- No se encontró actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa en el extracto de *H. seropedicae* Z69 crecida en xilosa como única fuente de carbono, lo

que estaría sugiriendo que la xilosa no se metaboliza a través del xilitol por la ruta oxo-reductiva.

## **8- PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Realizar perfiles de crecimiento y acumulación de PHB de *H. seropedicae* Z69 utilizando como fuente de carbono el hidrolizado del bagazo de caña.
- Optimizar la producción de PHB utilizando el hidrolizado de bagazo de caña
- Obtener clones mutantes, generados al azar, seleccionados en base a un fenotipo de no crecimiento o crecimiento reducido en presencia de xilosa como única fuente de carbono. Identificación de los genes mutados mediante análisis de secuencia de las regiones mutadas para poder determinar la/s ruta/s metabólicas activas por las que se metaboliza la xilosa en *H. seropedicae* Z69.
- Descifrar el mapa metabólico de *H. seropedicae* Z69 involucrado en el metabolismo de xilosa. Esto nos permitirá definir las rutas a sobre-expresar o reprimir, para dirigir el metabolismo a un crecimiento y acumulación de PHB óptimos.
- Obtener clones mutantes, generados al azar, que no acidifiquen el medio en presencia de xilosa 30 g/l como única fuente de carbono. Identificación de los genes mutados mediante análisis de secuencia de las regiones mutadas. Esto nos ayudará a identificar la/s ruta/s involucradas en la síntesis y difusión de ácidos orgánicos al cultivar la cepa Z69 en presencia de xilosa. Estudiar la producción de PHB por estos clones mutantes no acidificantes.
- Mediante técnicas de ADN recombinante sobre-expresar la vía de síntesis de PHB o promover la inhibición de algunas etapas involucradas en la síntesis-difusión de ácidos orgánicos. Analizar los clones recombinantes derivados en lo que refiere al fenotipo de producción de PHB y crecimiento. Estas modificaciones genéticas podrían contribuir a mantener el pH del medio e incrementar el contenido de PHB.

## 9- BIBLIOGRAFÍA

1. Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2009;100(23):5996-6009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>.
2. Thakor N, Trivedi U, Patel KC. Microbiological and biotechnological aspects of biodegradable plastics: Poly(hydroxyalkanoates). *Indian Journal of Biotechnology*. 2006;5:137-147.
3. Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005;40:607-619.
4. Madison LL, Huisman GW. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999;63(1):21-53.
5. Gilmore DF, Antoun S, Lenz RW, et al. The fate of "biodegradable" plastics in municipal leaf compost. *Journal of Industrial Microbiology*. 1992;10:199-206.
6. Wang Y, Mo W, Yao H, et al. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer Degradation and Stability*. 2004;85(2):815-821. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004000825> [Accessed August 25, 2010].
7. Tokiwa Y, Calabia AEBP. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters. *Journal of Polymers and the Environment*. 2007:259-267.
8. Mergaert J, Webb A, Anderson C, Wouters A, Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59(10):3233-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182442&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
9. Ojumu TV, Yu J, Solomon BO. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 2004;3(1):18-24.
10. Choi GG, Kim HW, Kim YB, Rhee YH. Biocompatibility of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Copolyesters Produced by *Alcaligenes* sp. MT-16. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2005;10:540- 545.
11. Verlinden R a J, Hill DJ, Kenward M a, Williams CD, Radecka I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;102(6):1437-

49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578408> [Accessed August 20, 2010].
12. Harding KG, Dennis JS, Blottnitz H von, Harrison STL. Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-beta-hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology*. 2007;130:57-66.
13. Catalán AI, Ferreira F, Gill PR, Batista S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1352- 1357.
14. Khanna S, Srivastava AK. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 2005;40:2173-2182.
15. Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganism and plants- A review. *Biotechnology Advances*. 2007;25:148-175.
16. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 1990;54(4):450-72. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
17. Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, Castro-Sowinski S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 2005;31(2):55-67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986831> [Accessed August 27, 2010].
18. Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010;13(3):321-326. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>.
19. Bucci DZ, Tavares LBB, Sell I. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*. 2005;24:564-571.
20. Choi J-il, Lee SY. Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*. 1997;17:335- 342.
21. Reddy SCK, Ghai R, Kalia VC, Rashmi. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003;87(2):137-146.

22. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology*. 2003;279-291.
23. Resquin F, Rachid C, Carrasco L, Vázquez D. Biomasa: Fuente de Energía Renovable para la Matriz Energética del Uruguay. *Revista INIA*. 2011;24:41- 46.
24. Martínez Jiménez A, Gosset Lagarda G. Ingeniería metabólica de bacterias. *Biotecnología*. 2007;14:373- 384.
25. Boussarsar H, Rogé B, Mathlouthi M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*. 2009;100(24):6537- 6542.
26. Brienzo M, Siqueira A, Milagres A. Search por optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;46:199- 204.
27. Snell KD, Peoples OP. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2009;3:456-467.
28. Lopez M, Rocha RCS, Zanotto S, Gómez J, Silva L. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25:1751-1756.
29. Lee SY, Choi J-il, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999;25:31-36.
30. Silva L, Tarcio M, Michelin Ramos M, et al. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2004;31:245- 254.
31. Uihlein A, Schbec L. Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: An assessment. *Biomass and Bioenergy*. 2009;33:793- 802.
32. Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Dobereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986;36:86-93.
33. Silva LGD, Miguens FC, Olivares FL. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2003;34:69-71. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822003000500023&lng=en&nrm=iso&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000500023&lng=en&nrm=iso&tling=en).

34. Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. 2004;36(8):1229-1244. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704001221> [Accessed August 30, 2010].
35. Baldani JI, Caruso L, Baldani VL, Goi SR, Döbereiner J. Recent advances en BFN with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 1997;29:911- 922.
36. Muthukumarasamy R, Govindarajan M, Vadivelu M, Revathi G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological research*. 2006;161(3):238-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765840>.
37. Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R, et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genetics*. 2011;7(5):e1002064. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002064> [Accessed May 19, 2011].
38. Mathias AL, Rigo LU, Funayama S, Pedrosa FO. L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(9):5206-5209. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=210343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
39. Stephens C, Christen B, Fuchs T, et al. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(5):2181-2185. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2010].
40. Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006;17(3):320-326. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713243>.
41. Lopes MSG, Gomez JGC, Silva LF. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009;55:1012-1015.
42. Johnsen U, Schönheit P. Novel Xylose Dehydrogenase in the Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;186(18):6198-6207.

43. Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, et al. D-Xylose Degradation Pathway in the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(40):27290- 27303.
44. Beringer J. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*. 1974;84:188- 198.
45. Cavalcante VA, Döbereiner J. A new acid- tolerant nitrogen fixing bacteria associated with sugarcane. *Plant Soil*. 1988;108:451- 456.
46. Jin Y-S, Jeffries TW. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*. 2004;6(3):229-38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256213> [Accessed August 30, 2010].
47. Lowry O, Rosebrough M, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-275.
48. Soares-Ramos JRL, Ramos HJO, Cruz LM, et al. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*. 2003;26(4):537-543. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572003000400019&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572003000400019&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
49. Watanabe S, Kodaki T, Kodak T, Makino K. Cloning, expression, and characterization of bacterial L-arabinose 1-dehydrogenase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(5):2612-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16326697>.

## 10- ANEXO

### 10.1 Medios de cultivo utilizados

- **TY (Tripton- Extracto de Levadura)<sup>44</sup>**

Triptona..... 5g/l

Extracto de Levadura..... 3g/l

CaCl<sub>2</sub>.....49,5mg/ml

Agar.....18g/l

H<sub>2</sub>O.....c.s.p. 1 litro

- **LGI<sup>45</sup>**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Anhidro.....11,9 g/l

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Anhidro..... 2,13 g/l

MgSO<sub>4</sub>.....0,1 g/l

CaCl<sub>2</sub>..... 15 mg/l

FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O..... 10 mg/l

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O..... 2 mg/l

H<sub>2</sub>O.....c.s.p. 1 litro

Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH.

## 10.2 Purificación de polímero

- Se centrifugó el cultivo crecido hasta fase estacionaria para coleccionar las células.
- Se resuspendió el *pellet* celular en igual volumen de hipoclorito de sodio (5%, p/v).
- Se incubó la suspensión durante 2 horas a 37°C.
- Luego de las 2 horas, se centrifugó la suspensión a 10.000 rpm por 10 minutos.
- Se lavó el *pellet* dos veces con agua desionizada.
- Se lavó el *pellet* una vez más con 2 ml de metanol.
- Se resuspendió el *pellet* en 2-3 ml de cloroformo caliente para obtener una disolución más completa y en menor volumen de solvente.
- Se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
- Se agregó 4 volúmenes de metanol frío y se incubó durante toda la noche a 4°C para promover la precipitación del polímero.
- Se centrifugó y secó el *pellet* bajo flujo de N<sub>2</sub> gaseoso.

### 10.3 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry<sup>47</sup>

**Reactivo A:** 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en NaOH 0,1 N

**Reactivo B:** 1% CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

1% Tartrato de sodio y potasio

**Reactivo C:** 50 ml de reactivo A

1 ml de reactivo B

**Reactivo E:** reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (dilución ½)

#### **Procedimiento:**

- Se preparó una curva de calibración utilizando una solución *stock* de seroalbúmina bovina (BSA) 1 mg/ml. En cada tubo se agregó 20; 50; 70 y 100 µl de BSA 1 mg/ml y se completó hasta un volumen de 200 µl con H<sub>2</sub>O.
- Se agregó 2 ml de reactivo C a cada tubo.
- Se incubó durante 10 minutos y se agregó 0,2 ml de reactivo E.
- Se incubó 30 minutos en la oscuridad.
- Se midió la absorbancia a 750nm.
- A cada muestra se le realizó el mismo tratamiento, incluyendo varias diluciones para asegurarse que las medidas se podían interpolar a partir de la curva de calibración.