

Tesis de Grado.  
Universidad de la República, Facultad de Ciencias.  
Licenciatura en Bioquímica, Julio 2012.

OPTIMIZACIÓN Y REFINAMIENTO DE LA  
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A  
PARTIR DE *Herbaspirillum Seropedicae* Z67.

Laura Carolina Fuentes Casullo.  
Tutor: Paul R. Gill.  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.  
Montevideo, Uruguay.

**Año 2012**





## *Agradecimientos*

*El hacer esta carrera me ha requerido mucho esfuerzo, voluntad y perseverancia. Este camino no lo hubiera podido transitar sin los verdaderos pilares de mi vida que me sostuvieron con fuerza, compartieron mis alegrías y mis tristezas ayudándome a madurar y crecer. Maestros, guías, personas que se involucraron en mi carrera, en mis decisiones, en mi aprendizaje y contribuyeron incondicionalmente con mis logros.*

*Agradezco al Dr. Paul R. Gill por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A la Dra. Silvia Batista por los consejos, el apoyo, la paciencia y el ánimo que me brindó. Por la atenta lectura de este trabajo y por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.*

*Agradezco también al Instituto Clemente Estable por permitirme llevar a cabo la pasantía en ese lugar y a la Facultad de Ingeniería, principalmente a Verónica Saravia por permitirme hacer uso de los aparatos del laboratorio de dicha facultad.*

*Gracias también a la colaboración financiera brindada por "Proyecto Estímulo de la Cultura Científica y Tecnológica" ANEP-PEDECIBA.*

*Gracias a mis queridos compañeros de laboratorio, que me apoyaron y me orientaron durante la pasantía.*

*A mi familia y amigos que me acompañaron a lo largo de toda la carrera, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. En particular a mis padres que siempre estuvieron atentos para saber cómo iba mi proceso. Gracias porque nunca dudaron y siempre me incentivaron a seguir adelante.*

*Por último quiero agradecer a los maestros y orientadores que han ido apareciendo en mi vida en los momentos que los necesitaba. Por hacerme sentir valiosa al ver en mí mis cualidades e incentivarlas. Por ayudarme a ver más allá de lo que parezco y enfocarme en quien soy. Por insistir en el lado humano. Junto a ustedes aprendí a valorar la diversidad, a ver más allá de lo que se aparenta. Aprendí a respetar y a dar lo mejor de mí en todo.*

*Gracias a todos.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 CLASIFICACIÓN DE PLÁSTICOS BIODEGRADABLES.....	2
1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS .....	3
1.2.1 Historia y Producción.....	5
1.2.2 Propiedades Químicas y Físicas.....	7
1.3 BIOSÍNTESIS DE PHAs.....	10
1.3.1 Síntesis de PHAs de cadena corta.....	10
1.3.2 Genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , <i>phaC</i> esenciales para la síntesis de PHAs.....	10
1.3.3 Formación de P(3HB-co-3HV) a partir de azúcares por la vía de metilmalonil-CoA.....	13
1.3.4 Síntesis de PHAs de cadena media.....	14
1.3.4.1 PHAs <sub>MCL</sub> a partir de ácidos grasos.....	14
1.3.4.2 PHAs <sub>MCL</sub> a partir de carbohidratos.....	14
1.3.5 Otras vías de producción de PHAs.....	15
1.4 FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GRÁNULOS.....	17
1.5 APLICACIONES.....	18
1.6 ORGANISMOS NATURALES PRODUCTORES DE PHAs.....	21
1.7 ORGANISMOS RECOMBINANTES PRODUCTORES DE PHAs.....	22
1.7.1 <i>Escherichia coli</i> .....	22
1.7.1.1 Síntesis de propionato: precursor de hidroxivalerato en <i>E.coli</i> .....	24
1.7.2. <i>Salmonella entérica</i> .....	26
1.7.2.1 Producción de P(3HB-co-3HV) por <i>Salmonella</i> .....	27
1.7.3 Producción de PHAs en organismos eucariotas.....	28
1.7.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
1.7.3.2 En células de insecto.....	29

1.7.3.3 Plantas.....	30
1.8 IMPORTANCIA DE LOS PHAs EN LA NATURALEZA.....	31
1.9 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHAs.....	32
1.10 INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO.....	33
1.10.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	34
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivos generales.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	39
4.2 Manipulación de DNA.....	40
4.2.1 Extracción de DNA plasmídico y genómico.....	40
4.2.2 Clonado del fragmento <i>sbm-ygfD-ygfG</i> .....	41
4.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	42
4.2.4 Ligación de DNA.....	42
4.3 Inserción del ADN.....	42
4.3.1 Preparación de células competentes.....	42
4.3.2 Transformación por choque térmico de células químicamente competentes de <i>E. coli</i> .....	43
4.3.3 Transformación por electroporación ( <i>H. seropedicae</i> ).....	44
4.4 Análisis mediante <i>Southern Blot</i> .....	44
4.5 Evaluación de la producción de PHAs por <i>H. seropedicae</i> .....	45
4.5.1 Masa seca celular.....	45
4.5.2 Cantidad y composición de los PHAs.....	46
4.6 Inoculación de las bacterias en las plantas de rabanito.....	47
4.7 Microscopía de fluorescencia.....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 Amplificación por PCR de los genes <i>sbm-ygfD-ygfG</i> .....	48
5.2 Construcción de <i>H. seropedicae</i> Z67 (pLF1).....	50

5.3 Verificación de la presencia del plásmido en <i>H. seropedicae</i> transformadas con el vector pLF1.....	52
5.4 Microscopía de fluorescencia.....	54
5.5 Masa seca celular y aislamiento de PHAs.....	55
5.6 Evaluación de la producción de PHAs por <i>H. seropedicae</i> .....	56
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
6.1 Clonación y transformación de bacterias.....	64
6.2 Verificación de la presencia del plásmido en las bacterias transformadas.....	65
6.3 Microscopía de fluorescencia.....	65
6.4 Evaluación de la producción de PHAs por <i>H. seropedicae</i> .....	67
6.5 Análisis por GC.....	68
6.5.1 Propanólisis a partir de MSC.....	68
6.5.2 Propanólisis a partir de los PHAs aislados.....	69
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
10.1 Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones.....	91
10.2 Anexo 2: Protocolo de aislamiento de ADN plasmídico.....	94
10.3 Anexo 3: Protocolo de purificación de PHAs.....	95
10.4 Anexo 4: Preservación de las cepas bacterianas.....	96

## ÍNDICE DE CUADROS E ILUSTRACIONES

### FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografía electrónica de <i>H. seropedicae</i> con gránulos de PHAs.....	4
Figura 2. Estructura general de los polihidroxiálcanoatos. Ejemplos de polihidroxiálcanoatos.....	7
Figura 3. Degradación de P(3HB-co-3HV) en lodos de depuración aeróbica.....	9
Figura 4. Vía "clásica" de biosíntesis de PHB.....	11
Figura 5. Genes principales involucrados en la biosíntesis de PHB en <i>R. eutropha</i> .....	11
Figura 6. Formación de acetoacetyl-CoA.....	12
Figura 7. Organización estructural de los gránulos de PHA y las interconexiones metabólicas entre las diferentes vías involucradas en la biosíntesis y catabolismo de los PHAs.....	16
Figura 8. Esbozo de una estrategia de ingeniería para la producción de alcoholes de cadena ramificada mayor de 2-ceto ácidos que se producen normalmente para la biosíntesis de aminoácidos.....	20
Figura 9. Operón que contiene los genes para la síntesis de propionato. Vía para la conversión de succinato a propionato en <i>E. coli</i> .....	25
Figura 10. Vía metabólica de síntesis de P(3HB-co-3HV) a partir de glicerol en <i>Salmonella</i> .....	27
Figura 11. Diseño de <i>Arabidopsis</i> para producir P(3HB-co-3HV).....	31
Figura 12. Microscopía Electrónica de <i>H. seropedicae</i> .....	35
Figura 13. Mapa del plásmido pHC60 con los genes y sitios de restricción.....	49
Figura 14. Región del genoma de <i>E. coli</i> 1655 amplificada mediante PCR.....	50
Figura 15. Fragmento amplificado a partir del ADN genómico de <i>E. coli</i> 1655.....	52
Figura 16. Cultivo de bacterias en medio sólido y líquido.....	53
Figura 17. Perfil electroforéticos de la digestión de ADN genómico y plasmídico con <i>EcoRI</i> . Resultado del <i>Southern Blot</i> .....	54
Figura 18. Planta de rabanito ( <i>R. sativus</i> ) a las 2 h de inoculadas con bacterias <i>H. seropedicae</i> portadoras del gen <i>gfp</i> vistas en microscopio 40X.....	55
Figura 19. Bacterias inoculadas en distintas condiciones en 150 mL de medio IGL.....	56
Figura 20. Cromatograma del copolímero.....	58
Figura 21. Curva de calibración de 3HV y 3HB.....	60

## TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1: Principales industrias productoras de polihidroxicanoatos a nivel global.....	6
Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos.....	40
Tabla 3. Valores obtenidos de MSC y PHA por gravimetría.....	57
Tabla 4. Resultados obtenidos de la estimación de la masa real afectada por propanólisis para el copolímero.....	60
Tabla 5. Valores obtenidos a partir del análisis mediante del GC-FID para las distintas muestras.....	61
Tabla 6. Cálculos realizados para 3HB y 3HV de las distintas muestras de peso celular seco.....	62
Tabla 7. Cálculos realizados para 3HB y 3HV a partir de los valores obtenidos del análisis de GC-FID para las distintas muestras de PHAs aisladas.....	63

## ABREVIACIONES

PHA: polihidroxicanoato

PHB: polihidroxiacetato

3HV: 3-hidroxiacetato

3HB: 3-hidroxiacetato

P(3HB-*co*-3HV): copolímero de 3HV y 3HB

HP: hidroxipropionato

4HB: 4-hidroxiacetato

3HO: 3-hidroxiacetato

3HD: 3-hidroxiacetato

3HH: 3-hidroxiacetato

3HHep: 3-hidroxiacetato

ICI: Imperial Chemical Industries

P(3HO-*co*-3HH): copolímero de 3-hidroxiacetato y 3-hidroxiacetato

P(4HB): poli 4-hidroxiacetato

P(3HB-*co*-4HB): copolímero de 3-hidroxiacetato y 4-hidroxiacetato

LB: Luria-Bertani

Tc: Tetraciclina

MSC: Masa celular seca

Km: Kanamicina

## RESUMEN

Los PHAs incluyen una amplia gama de poliésteres de hidroxiácidos, sintetizados por bacterias como reserva de carbono y poder reductor. Entre estos polímeros, el más estudiado ha sido el PHB formado por unidades de 3HB. La diversidad de posibles constituyentes determina que los materiales producidos puedan exhibir propiedades físicas y químicas variadas. La importancia de estos compuestos radica en sus propiedades termoplásticas y en ser biodegradables y biocompatibles.

*Herbaspirillum seropedicae* es un organismo productor de PHB. Esta es una bacteria diazótrofa, endófito de una amplia variedad de plantas. Acumula PHB cuando se cultiva en presencia de una amplia gama de fuentes carbonadas y posee la ruta clásica de síntesis de PHB. También acumula el copolímero P(3HB-co-3HV) al crecer en presencia de ácido nonanoico como única fuente de carbono. Este compuesto es más flexible y menos quebradizo en comparación al PHB.

Nuestra propuesta de trabajo de laboratorio se basó en el estudio de la producción de PHAs por *H. seropedicae*. Se trabajó con la cepa Z67 a la que se le transfirió el vector pLF1, derivado del vector pHC60, con el inserto correspondiente a parte del operón *sbm-ygfD-ygfG-ygfH* de *Escherichia coli*. Las proteínas codificadas por estos genes forman parte de una vía que sintetiza propionil-CoA. Este compuesto, junto con el acetil-CoA, son los precursores del HV, un tipo de monómero constituyente de los PHAs.

En los resultados obtenidos se observó una disminución de la cantidad de PHAs producido en la cepa conteniendo el plásmido. Esto puede deberse al gasto extra de energía que generaría la replicación y expresión de los genes contenidos en el plásmido. Por otro lado se determinó un contenido de PHB de un 48,6% respecto del peso seco total de la célula en las cepas salvajes a las 52 h de crecimiento. En cuanto a la producción de HV, esta fue baja o nula. Esto sugiere que tal vez los tres genes del operón no se expresaron a nivel de la transcripción de mRNA o a nivel de la traducción o que las actividades enzimáticas correspondientes eran bajas o nulas. También podría deberse a la degradación de propionato por el ciclo de ácido 2-metil cítrico o por la vía de los ácidos tricarbóxicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos sintéticos derivados del petróleo han sido producidos desde hace más de 100 años y éstos se han convertido en un material de uso cotidiano en la sociedad. Hoy en día son muy utilizados debido a su fácil moldeamiento y alta resistencia química. Sin embargo, suponen un problema ambiental, dado que su conformación y alto peso molecular dificulta su degradación (Singh y Sharma, 2008), permaneciendo en el ambiente por largos periodos de tiempo (100 años como mínimo) (Lastra et al., 2008). Además, la demanda de los plásticos se ha incrementado en los últimos años y sumado a los altos costos del petróleo, los cuales rondan los US\$ 96,93 por barril, ([www.opec.org](http://www.opec.org), consultado 10/07/2012) hacen que las investigaciones se enfoquen en la búsqueda de materiales alternativos con características similares a los productos petroquímicos y a la vez que no tengan un impacto tan negativo en el medio ambiente.

Millones de toneladas de residuos son producidos diariamente por las actividades humanas y los plásticos aportan un gran porcentaje de estos desechos. Según el PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), se lanzan al mar 6,4 toneladas de basura al año y este proceso sufre una tendencia ascendente. Se estima que en el Pacífico flota una isla de materia plástica de hasta 100 millones de toneladas. Las medidas tomadas para solucionar este problema engloban desde el reciclaje hasta la incineración de los residuos. Sin embargo, éstas alternativas no son muy viables debido a que los procesos son muy costosos, no abarcan todos los desechos y generan gases nocivos para el ambiente ([www.unep.org](http://www.unep.org), consultado 02/02/2012).

Asimismo, dado que el petróleo es una fuente no renovable, en un futuro cercano se limitará la posibilidad de obtener el plástico sintético. También cabe destacar el cambio climático producto de las emisiones de carbono que se han incrementado en los últimos años debido al uso de petróleo como combustible (Molina et al., 2009).

En este contexto, los biopolímeros, aparecen como una de las alternativas al uso de petróleo, dada su alta tasa de biodegradabilidad y generación a partir de sustancias naturales (Uihlein y Schebek. 2009). Un ejemplo de biopolímeros son los PHAs, materiales termoplásticos biodegradables, con un importante valor agregado. Son poliésteres producidos de manera intracelular por una amplia variedad de microorganismos (Madison y Huisman, 1999). Las propiedades físico-químicas de estos materiales dependen del microorganismo productor y de los nutrientes suministrados al mismo. Algunos microorganismos presentes en la naturaleza pueden degradarlos en compuestos más simples como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Ha y Cho, 2002).

### **1.1. CLASIFICACION DE PLASTICOS BIODEGRADABLES**

Los polímeros biodegradables son sintetizados a partir de biomasa, productos agrícolas y procesos biotecnológicos. Dependiendo de su estructura química, se clasifican en: ácidos nucleicos, poliamidas, polisacáridos, poliésteres, politioésteres, polianhídridos, poliisoprenoides y polifenoles (Steinbüchel, 2001).

Los plásticos biodegradables se pueden clasificar en tres grupos:

- Polímeros químicamente sintetizados: Son susceptibles a la acción de microorganismos pero no pueden ser usados con fines comerciales porque sus propiedades físicas no son las más adecuadas. Ej.: Ácido poliglicólico, poli(ε-caprolactona), alcohol polivinílico, etc. (Khanna y Sivrastava, 2004).
- Plásticos biodegradables a base de celulosa: Están compuestos principalmente por ésteres de celulosa, como acetato de celulosa y nitrocelulosa, y derivados del mismo, incluyendo celuloide (Khanna y Sivrastava, 2004).
- Plásticos biodegradables a base de almidón: En estos plásticos el almidón actúa como complemento, relleno y agente adherente para crear una mezcla entre

almidón y plástico (almidón-polietileno). Las bacterias del suelo degradan el almidón y también alteran la matriz del plástico. Ésta favorece la biodegradabilidad pero genera nuevos compuestos recalcitrantes que quedan en el ambiente durante largos periodos de tiempo. Además no son muy resistentes al agua y se hidrolizan muy fácilmente (Khanna y Sivrastava, 2004).

- Poli(ácido láctico) (*PLA*): Es un poliéster alifático translúcido derivado al 100% de materias primas renovables, producido a partir de glucosa y sacarosa (Khanna y Sivrastava, 2004).
- Polihidroxicanoatos: Son poliésteres alifáticos 100% biodegradables (Khanna y Sivrastava, 2004).

## 1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los PHAs constituyen una familia diversa de poliésteres, principalmente ácidos *R-3* hidroxialcanoicos, sintetizados por muchas bacterias gram-positivas y gram-negativas (Madison y Huisman, 1999). Éstas los sintetizan como material de reserva de carbono, energía y poder reductor, acumulándolos en forma de gránulos (carbonosomas) (Jendrosseck, 2009). Los PHAs se caracterizan por ser termoplásticos, biodegradables y biocompatibles. Son insolubles en agua, no tóxicos y suponen una alternativa ecológica a los plásticos derivados del petróleo (Galego et al., 2000). Los PHAs pueden ser degradados intracelularmente por las propias bacterias que los acumulan y también por otros microorganismos que pueden hidrolizar, fuera de la célula, el material aislado. Además de ser biodegradable, los PHA son reciclables como los termoplásticos petroquímicos (Madison y Huisman, 1999).

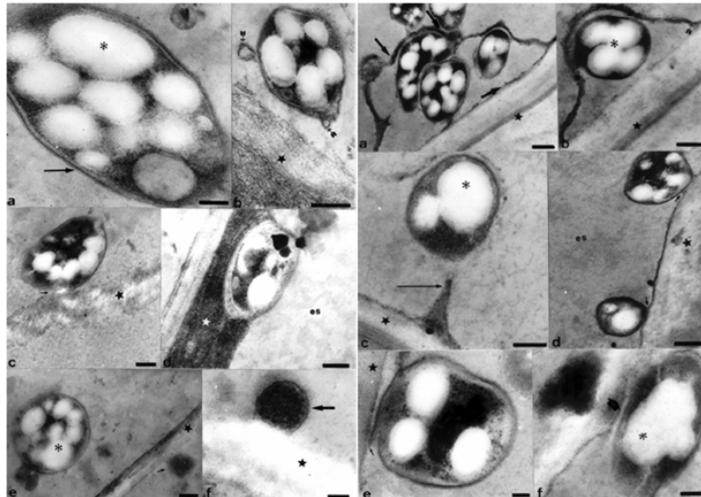


Figura 1. Micrografía electrónica de *H. seropedicae* con gránulos de PHAs (Gracinda da Silva et al., 2003)

En general, las bacterias lo producen y acumulan en condiciones desbalanceadas de crecimiento, cuando existe una limitación de nutrientes esenciales como N, S, O, P o Mg y un exceso de fuente de carbono (Suriyamongkol et al., 2007). En la figura 1, los asteriscos (\*) indican los gránulos donde se acumulan los PHAs. El primer PHA en ser descubierto, producido y caracterizado fue el PHB.

Además de ser una fuente de carbono para la célula, los PHAs también son fuente de energía para el proceso de enquistamiento (*Azotobacter* sp.), de esporulación (*Bacillus* sp.) y para la protección del complejo nitrogenasa en las bacterias fijadoras de nitrógeno, dado que los PHAs son compuestos oxidables. Además forman parte de la membrana citoplasmática de las bacterias (Almeida et al., 2004; Jendrossek, 2009).

### 1.2.1 Historia y Producción

Lemoigne fue el primer investigador en estudiar el PHB en 1926. Posteriormente, en 1972, Wallen y Rohdwedder confirmaron la presencia de otros monómeros como 3HV, 3HH y 3HHep, al extraer dichos compuestos con cloroformo (Wallen y Rohdwedder, 1974). Las investigaciones de los PHAs emergieron a causa de la crisis mundial del petróleo, en los años 70, que provocó un notable incremento del precio del combustible fósil. En ese contexto, surgieron las investigaciones sobre PHAs, y en 1976 se iniciaron los estudios para producir PHB. La empresa inglesa ICI estudió la síntesis de PHB en *Ralstonia eutropha*, y en 1981 patentaron la producción de un copolímero de cuatro y cinco carbonos, denominado hidroxibutirato e hidroxivalerato, el P(3HB-co-3HV). Este copolímero, conocido como BIOPOL<sup>®</sup>, era obtenido a partir de glucosa y ácido propiónico (Byrom, 1990). A pesar de su alto costo, el BIOPOL<sup>®</sup> fue utilizado en varias aplicaciones en algunos países como Alemania. A finales del siglo XX, el precio del petróleo disminuyó, y de la misma manera decayó el interés por los PHAs (Almeida et al., 2004). Un factor que influyó en el alto precio de BIOPOL<sup>®</sup> fue el ácido propiónico, precursor de propionil-CoA para la síntesis del 3HV. El ácido propiónico es caro de producir industrialmente y es más costoso que la glucosa (Williams y Martin, 2008).

Dada la crisis energética en estos últimos años, los plásticos obtenidos a partir de otras fuentes han tomado un nuevo impulso, ya que además del aumento constante en el precio del petróleo, se ha tomado conciencia de que las reservas se están agotando de manera alarmante. Ante esta perspectiva, los PHAs aparecen como una alternativa altamente prometedora (Almeida et al., 2004).

La ventaja de estos biopolímeros es que pueden degradarse hasta un 80% en sólo siete semanas en condiciones adecuadas y sin requerir condiciones de compostaje. Sin embargo, el proceso de elaboración es muy costoso. Se estima que producir un kilogramo de PHA por fermentación bacteriana cuesta 16 dólares, mientras que producir un kilogramo de plástico convencional cuesta sólo un dólar (Lee, 1996). Uno de los principales motivos de esta

diferencia es que las bacterias requieren fuentes externas de alimento, como la celulosa, propionato, glucosa, etcétera (Yamane, 1993). Frente a esta desventaja, las investigaciones se enfocan en el uso de desechos industriales o productos más baratos como fuente de alimento para las bacterias, así como también el diseño de microorganismos con la capacidad de producir PHAs de manera más eficiente (Grothe et al., 1999). Asimismo se han modificado organismos eucariotas para la producción de PHA pero sin grandes éxitos (Slater et al., 1999; Suriyamongkol et al., 2007). Actualmente no se ha resuelto el desarrollo de una estrategia de producción lo suficientemente rentable para competir con los plásticos derivados del petróleo. La Tabla 1 indica las principales industrias productoras de PHA hasta la fecha.

Tabla 1. Principales industrias productoras de polihidroxialcanoatos a nivel global (modificado de Chen, 2010)

<b>Empresa</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Producto</b>	<b>Nombre comercial</b>
Metabolix/ADM	EE.UU.	PHB ; (3HO) P(3HB-co-3HV)	Mirel
PHB Industrial	Brasil	PHB P(3HB-co-3HV)	Biocycle
Zhejiang Tian An	China	P(3HB-co-3HV)	Ecogen
Biomer	Alemania	PHB	Biomer
Mitsubishi	Japón	PHB	Biogreen
P&G & Kaneka	EE.UU./ Japón	P(3HB-co-3HHx)	Nodax
Bio-on	Italia	PHAs	Minerv-PHA

## 1.2.3 Propiedades Químicas y Físicas

Los PHAs son poliésteres compuestos principalmente por unidades repetidas de (*R*)-3-hidroxiácidos, mayoritariamente lineales. El grupo carboxilo forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Madison y Huisman, 1999) (Fig. 2).

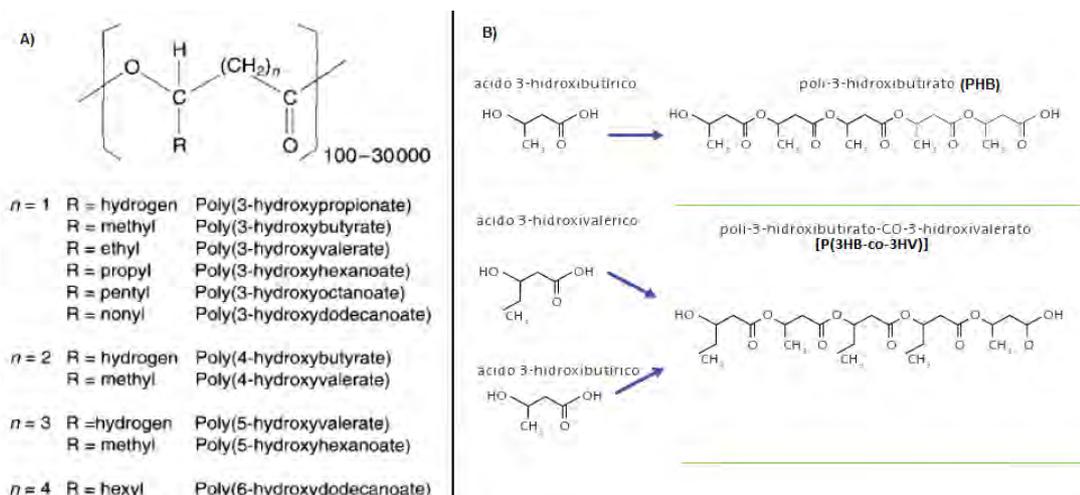


Figura 2. A) Estructura general de los polihidroxicanoatos (Lee, 1996). B) Ejemplos de polihidroxicanoatos (modificada de Segura et al., 2004).

Hasta el momento se han identificado más de 150 hidroxialcanoatos constituyentes de PHAs. Estos pueden ser saturados, insaturados, halogenados, con grupos aromáticos, etc. (Steinbüchel y Valentin, 1995; Park et al., 2005). Estos hidroxiácidos son incorporados como monómeros de la cadena del PHA, modificando sus propiedades físicas y favoreciendo así las nuevas aplicaciones de dicho compuesto en el ámbito tecnológico. Esta variabilidad

depende de factores como el tipo de sustrato que se suministra, la especificidad de la enzima involucrada en la polimerización y las diferentes rutas metabólicas implicadas en la formación de dichos monómeros (Madison y Huisman, 1999).

Dependiendo de la naturaleza del polímero, la masa molecular de los PHAs varía entre 50 kDa y 2000 kDa (Bengtsson et al., 2010). El PHB se encuentra dentro de la célula tanto en estado líquido como amorfo. Sin embargo, una vez que es extraído usando solventes orgánicos, el PHB pasa a un estado cristalino, rígido y quebradizo, confiriéndole poca resistencia. Además su punto de fusión se encuentra muy cerca del punto de degradación térmica (180°C y 200°C). Estas características hacen que el uso de PHB puro sea muy limitado (Kim y Lenz, 2001).

Dependiendo de la conformación de los monómeros, los PHAs se pueden clasificar en dos grandes grupos: PHAs de cadena corta (PHAs<sub>SCL</sub>), constituidos por monómeros de 3 a 5 carbonos; y PHAs de cadena media (PHAs<sub>MCL</sub>), conformados por monómeros que van desde 6 hasta 16 carbonos (Steinbüchel y Valentin, 1995). El PHB es el PHA más común y estudiado. Dependiendo del organismo se pueden obtener copolímeros de PHB por la adición de varios sustratos al medio, dando lugar a la formación de polímeros que contienen monómeros de 3HV o 3HB. El copolímero P(3HB-co-3HV) se caracteriza por tener menor rigidez y ser menos quebradizo que el PHB (Sudesh et al., 2000). El copolímero puede ser usado para preparar films con excelentes propiedades de barrera al agua y gases que hace recordar al propileno, pudiéndose procesar a una temperatura inferior. Estos tipos de polímeros forman parte de los PHAs<sub>SCL</sub>. Los PHAs<sub>MCL</sub> se sintetizan a partir de ácidos grasos u otras fuentes de carbono alifáticas (Brandl et al., 1998). Los PHAs<sub>MCL</sub> también se pueden sintetizar a partir de carbohidratos (Huijberts et al., 1992).

La mayoría de microorganismos sintetizan PHAs<sub>SCL</sub> que contienen mayoritariamente unidades 3HB. Entre los monómeros de cadena corta se incluyen además el 3HP, 4HB, 3HV, 4HV, y 5HV (Fig. 2) (Choi y Yoon 1994). En el caso de PHA<sub>MCL</sub>, la mayoría contienen 3HO y 3HD como principales monómeros (Madison y Huisman, 1999).

A diferencia de PHB y P(3HB-co-3HV), los PHAs<sub>MCL</sub> tienen un nivel mucho más bajo de cristalización y son más elásticos. Por lo tanto, los PHA<sub>MCL</sub> son necesarios para cubrir las necesidades que el PHB y sus copolímeros no abarcan (Gross et al., 1989).

Como se mencionó anteriormente, una característica importante de los PHAs es su biodegradabilidad (Fig. 3). Esto se debe a la presencia de microorganismos en la naturaleza con hidrolasas capaces de degradar los PHAs. Están las propias depolimerasas que expresan los organismos que los acumulan, como enzimas internas y otras que lo degradan como sustrato externo. Las actividades de estas enzimas varían dependiendo de la composición del polímero, sus formas físicas (amorphas o cristalinas), las dimensiones de la muestra, y, sobre todo, las condiciones ambientales. La tasa de degradación de PHA es típicamente del orden de unos pocos meses (en las aguas residuales) o años (en agua de mar) (Williams et al., 1996).

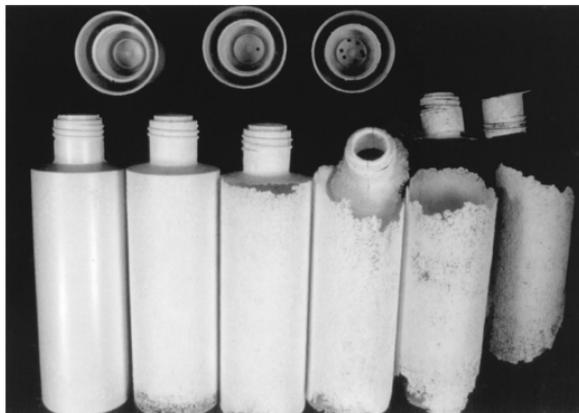


Figura 3. Degradación de P(3HB-co-3HV) en lodos de depuración aeróbica. Botellas de P(3HB-co-3HV) fueron incubadas durante el verano (20°C aprox.) en lodos de depuración aeróbica. Se muestra la degradación de las botellas que fueron tratadas por 1, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas (de izquierda a derecha) (Madison y Huisman, 1999)

## 1.3 BIOSÍNTESIS DE PHA

### 1.3.1 Síntesis de PHA de cadena corta

Las bacterias han desarrollado varias vías para la síntesis de PHA, dependiendo del nicho ecológico donde se desarrollen. También se ha visto que las condiciones de crecimiento influyen en la formación de PHAs (Madison y Huisman, 1999).

La vía clásica de síntesis de PHB implica la participación de tres enzimas codificadas por el operón *phaABC* (fig. 5). La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) para formar acetoacetil-CoA. Esta reacción es catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa codificada por el gen *phaA*. La segunda reacción comprende la reducción del acetoacetil-CoA a (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA por una acetoacetil-CoA deshidrogenasa NADPH-dependiente, codificada por el gen *phaB*. Luego, los monómeros de (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA son polimerizados en PHB por la PHB polimerasa, codificada por el gen *phaC* (Reemmer, 2005). La figura 4 indica la vía clásica de síntesis de PHB.

### 1.3.2 Genes *phaA*, *phaB*, *phaC* esenciales para la síntesis de PHAs

Aunque la producción de PHB la lleva a cabo un vasto número de procariontes, las investigaciones sobre los mecanismos de acción de las enzimas  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, y la PHB polimerasa se han centrado principalmente en dos productores naturales: *Zoogloea ramigera* y *Ralstonia eutropha* (Luengo et al., 2003). En la fig. 5 se representan los genes involucrados en la síntesis de PHB de *R. eutropha*.

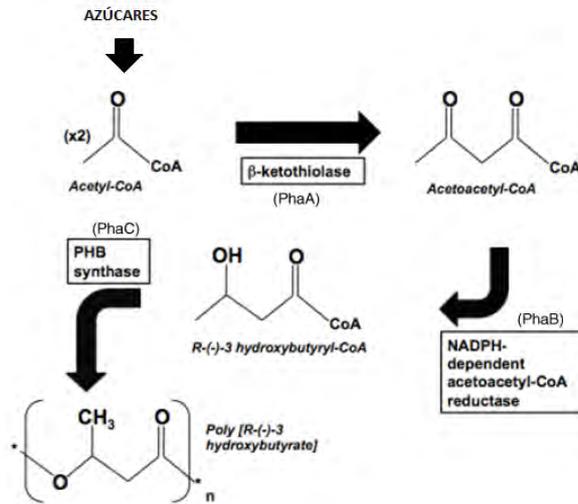


Figura 4. Vía “clásica” de biosíntesis de PHB (Modificado de Reemmer, 2009).

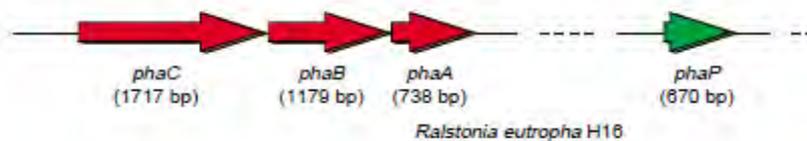


Figura 5. Genes principales involucrados en la biosíntesis de PHB en *R. eutropha* (de Luengo et al., 2003).

**Tiolasa de β-cetoacil-CoA:** La β-cetoacil-CoA tiolasa cataliza el primer paso en la formación de PHB. Esta proteína pertenece a una familia de enzimas implicadas en la escisión tiolítica de sustratos de acil-CoA. Estas β-cetoacil-CoA tiolasas se dividen en dos grupos basados en su especificidad por el sustrato. El primer grupo consiste en tiolasas con una especificidad amplia para β-cetoacil-CoA de 4 a 16 carbonos (Madison y Huisman, 1999). La segunda clase abarca las β-cetoacil-CoA

tiolases biosintéticas, con especificidad por sustratos de 3 a 5 carbonos de longitud de cadena (Masamune et al., 1989).

El mecanismo enzimático de la PhaA, que pertenece al segundo grupo de tiolases, consiste en dos semi-reacciones que dan lugar a la condensación de dos acetil-CoA formando acetoacetyl-CoA. En la primera reacción, una cisteína del sitio activo ataca una molécula del acetil-S-CoA para formar un intermediario acetil-S-enzima. En la segunda semireacción, una segunda cisteína desprotona otro acetil-CoA, resultando en un intermediario activado del acetil-CoA, que puede atacar el intermediario de la acetil-S-enzima y formar el acetoacetyl-CoA (Masamune et al., 1989). En la figura 6 se indica el esquema de la reacción.

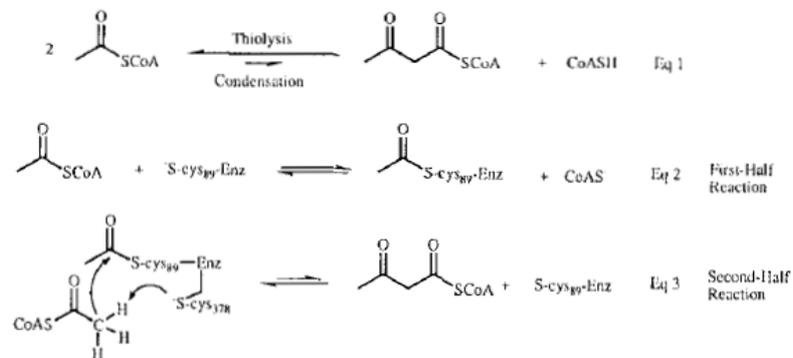


Figura 6. Formación de acetoacetyl-CoA (de Williams et al., 1992).

**Reductasa de Acetoacetyl-CoA:** La acetoacetyl-CoA reductasa es una (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa que cataliza el segundo paso de la síntesis de PHB, convirtiendo el acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA. La acetoacetyl-CoA reductasa está clasificada como una reductasa NADPH-dependiente (Madison y

Huisman, 1999). Aunque se han detectado acetoacetyl-CoA reductasas NADPH y NADH-dependiente en extractos de células de *R. eutropha*, solamente la primera está implicada en la síntesis de PHB (Haywood et al., 1988). Se cree que la disponibilidad de reducir equivalentes en la forma de NADPH es la fuerza impulsora para la formación de PHB (Madison y Huisman, 1999).

**PHB polimerasa:** La PHB polimerasa es la tercera enzima en la ruta biosintética para la producción de PHB. La primer secuencia *phaC* publicada fue de *R. eutropha* (Madison y Huisman, 1999).

La expresión de estos tres genes de *R. eutropha* en *Escherichia coli* resultó en la acumulación de PHB hasta niveles superiores al 78% respecto del peso seco de células (Hong et al., 2003). La PHB polimerasa es sólo un miembro de la familia de las polimerasas. Es interesante destacar que hay sólo 15 residuos totalmente conservados entre las 26 PHA polimerasas conocidas, muchas de las cuales llevan a cabo la formación de PHA de cadena corta (Madison y Huisman, 1999).

### **1.3.3 Formación de P(3HB-co-3HV) a partir de azúcares por la vía de metilmalonil-CoA.**

*Rhodococcus ruber* y *Nocardia corallina* acumulan PHAs que contienen monómeros de HV, incluso en ausencia de nutrientes que generen los típicos precursores de 3HV como el propionato. El monómero de 3HV deriva del acetyl-CoA y propionil-CoA. Este último es un producto de la vía del metilmalonil-CoA. En esta vía, el succinil-CoA se convierte en metilmalonil-CoA, que es descarboxilado a propionil-CoA (Madison y Huisman, 1999).

### 1.3.4 Síntesis de PHAs de cadena media

#### 1.3.4.1 PHAs<sub>MCL</sub> a partir de ácidos grasos.

El metabolismo de ácidos grasos representa una de las vías metabólicas más comunes para adicionar monómeros constituyentes de PHA (Sudesh et al., 2000). En la  $\beta$ -oxidación se generan intermediarios como enoil-CoA, 3-cetoacil-CoA y el (*S*)-3-hidroxiacil-CoA. Estos son precursores de los monómeros de PHA (Suriyamongkol et al., 2007).

Los ácidos grasos son degradados por la remoción de unidades de dos C como acetyl-CoA. El resto de la vía oxida acil-CoA a 3-cetoacil-CoAs vía intermediarios 3-hidroxiacil-CoA. La especificidad de sustrato de la polimerasa de PHAs<sub>MCL</sub> oscila entre monómeros de 6 y 14 carbonos de (*R*)-3-hidroxi-alcanoil-CoAs, con preferencia hacia monómeros de 8, 9 y 10 carbonos (Huisman et al., 1989). Aun no está determinado si el transporte de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación, para la síntesis de PHAs<sub>MCL</sub> es realizado por una epimerasa, 3-cetoacil reductasa o enoil-CoA hidratasa. La composición de estos polímeros está estrechamente relacionada con la fuente de carbono suministrada (Madison y Huisman, 1999). En la vía b de la figura 7 se muestra la producción de PHA obtenida a partir de ácidos grasos.

#### 1.3.4.2 PHAs<sub>MCL</sub> a partir de carbohidratos.

Una segunda ruta para la síntesis de PHAs<sub>MCL</sub> en bacterias es a través del uso de intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos de novo (Fig. 7 vías c, d). A diferencia de *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas fragii*, las cuales usan intermediarios de la  $\beta$ -oxidación, *P. aeruginosa* y *P. putida* producen PHAs<sub>MCL</sub> cuando crecen a partir de sustratos

no directamente relacionados con los ácidos grasos, es decir, cuando la bacteria es cultivada en un medio con fuentes carbonadas como glucosa, fructosa, glicolato, acetato, glicerol, etc. (Suriyamongkol et al., 2007). Además, tanto en *P. aeruginosa* como *P. putida*, la biosíntesis de ácidos grasos constituye la principal ruta de síntesis de 3-hidroxiacil-CoA cuando crecen a partir de fuentes de carbono como carbohidratos, acetato o etanol, que son metabolizadas vía acetyl-CoA (Rehm et al., 1998).

Algunas *Pseudomonas* spp. pueden incorporar monómeros tanto de cadena corta como de cadena media en una misma cadena de polímero. Esto se produce cuando estas cepas crecen en presencia de fuentes de carbonos no relacionadas. Las polimerasas que sintetizan estos PHA<sub>SCL</sub> y PHA<sub>MCL</sub> deben tener un amplio rango de sustratos (Steinbüchel, 1996). La figura 7 resume las interconexiones metabólicas entre las diferentes vías involucradas en la biosíntesis y catabolismo de los PHAs.

### 1.3.5 Otras vías de producción de PHAs

El PHB es sólo un tipo de PHA y no todas estas bacterias utilizan la misma vía para la biosíntesis del mismo. En mutantes de las enzimas tiolasa y reductasa de *Aeromonas caviae*, la bacteria emplea una enoil-CoA hidratasa para la formación del (*R*)-3-hidroxi monómero, ya sea a partir de crotonil-CoA o hexenoil-CoA. Otras bacterias sintetizan copoliésteres de P(3HB-co-3HV) a partir de azúcares, donde el 3HV deriva de la vía metilmalonil-CoA. *Methylobacterium rhodesenium* también utiliza las actividades de dos hidratasas para la síntesis de PHB (Mothes et al., 1995). Además, esta bacteria también expresa dos acetoacetyl-CoA reductasas constitutivas, una dependiente de NADH y otra dependiente de NADPH (Mothes et al., 1996).

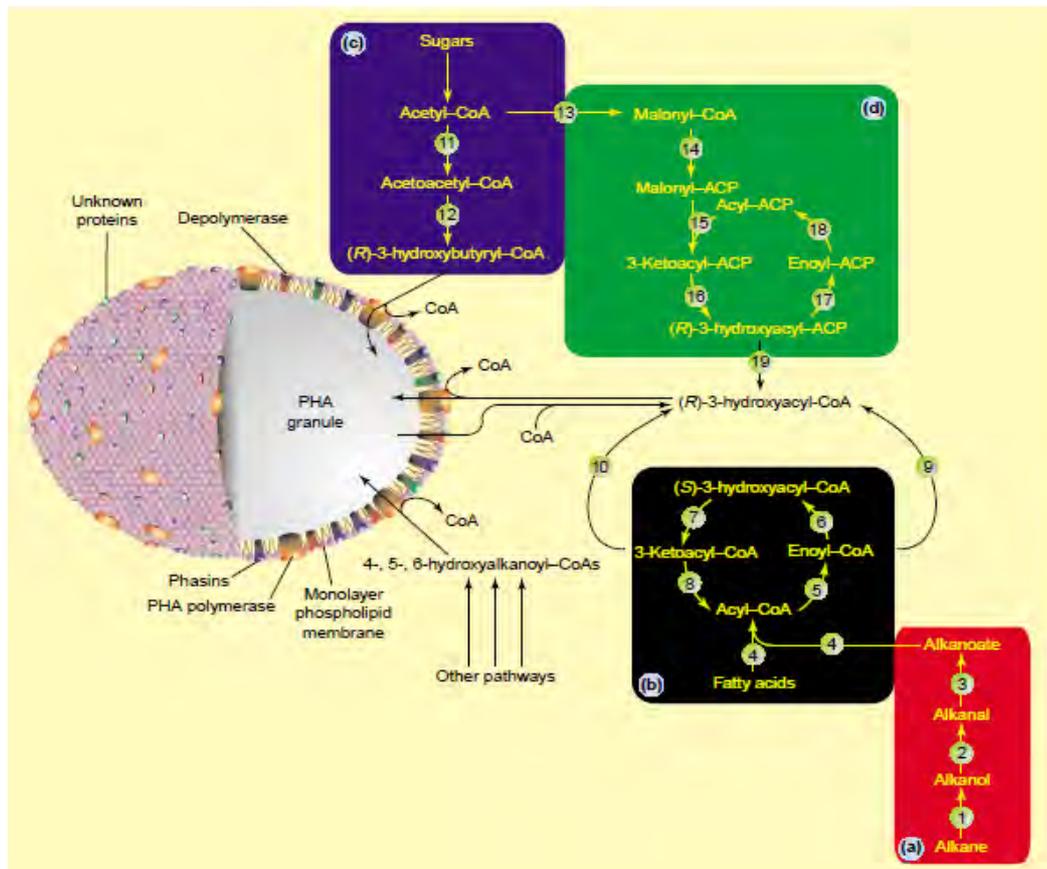


Figura 7. Organización estructural de los gránulos de PHA y las interconexiones metabólicas entre las diferentes vías involucradas en la biosíntesis y catabolismo de los PHAs. **(a)** vía oxidación de alcano. (1) Alcano 1-monooxigenasa, (2) alcohol deshidrogenasa, (3) aldehído deshidrogenasa. **(b)**  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. (4) acil-CoA ligasa, (5) acil-CoA deshidrogenasa, (6) enoil-CoA hidratasa, (7) 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, (8) 3-cetotilasa, (9) (*R*)-enoil-CoA hidratasa, (10) 3-cetoacil-CoA reductasa. **(c)** Biosíntesis a partir de carbohidratos. (11)  $\beta$ -cetotilasa, (12) NADPH-dependiente de acetoacetil-CoA reductasa. **(d)** Síntesis de novo de ácidos grasos. (13) acetil-CoA carboxilasa, (14) ACP-maloniltransferasa (15) 3-cetoacil-ACP sintasa, (16) 3-cetoacil-ACP reductasa, (17) 3-hidroxiacil-ACP reductasa, (18) enoil-ACP reductasa, (19) 3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilasa (Luengo et al., 2003).

#### 1.4 FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GRÁNULOS

En el proceso de formación de los gránulos tanto la PHA polimerasa como la lipasa actúan sobre los enlaces éster en la interfaz de una vesícula hidrofóbica y el agua. La diferencia entre estas enzimas es el sentido de la reacción que catalizan, ya sea hacia la formación o hidrólisis del enlace éster (Gerngross y Martin, 1995)

La PHB polimerasa está presente tanto en forma soluble como unida a gránulos, aunque la PHB polimerasa soluble parece ser menos activa. Dado que esta enzima exhibe mayor actividad al estar enlazada a los gránulos, se produce una acumulación óptima de PHB cuando hay más enzimas asociadas con el gránulo en crecimiento. Por otro lado, se encontró que la fasina, PhaP, es una proteína de unión a PHAs que determina el tamaño de los gránulos (Wieczorek et al., 1995). La concentración de PhaP está inversamente relacionada con el tamaño de los gránulos. Una sobreexpresión de PhaP da lugar a la formación de muchos pequeños gránulos de PHB, mientras que un mutante en el gen *phaP* genera un único gránulo de PHB. Asimismo PhaP es regulada por un gen *phaR* en *R. eutropha* (Pötter et al., 2002).

Los PHAs se acumulan en gránulos de diferentes tamaños. Ellos se encuentran rodeados por una monocapa fosfolipídica (Prieto et al., 1999). Se cree que la envoltura de monocapa fosfolipídica es necesaria para estabilizar el contacto de los PHAs con el agua del citoplasma. De esta manera se evita la transición del poliéster de un estado líquido amorfo a una forma cristalina más estable. Además se piensa que desempeña un papel como barrera protectora, evitando el daño celular causado por la interacción de PHAs con las estructuras internas celulares o con las proteínas citosólicas (Luengo et al., 2003).

## 1.5 APLICACIONES

Dado que los PHAs son poliésteres naturales termoplásticos, la mayoría de sus aplicaciones son como reemplazos de los polímeros sintéticos derivados del petróleo que se utilizan para empaque y recubrimiento (Galego et al., 2000). Los esfuerzos iniciales se centraron en la producción de artículos como botellas, recipientes para cosméticos, bolígrafos, palos de golf, entre otros. Los envases desechables biodegradables presentan una gran demanda. Sin embargo, los productos petroquímicos tienen una ventaja dada su excelente procesabilidad y bajo costo de producción. En este caso, el objetivo fundamental sería crear un mercado “ecológico”, donde la biodegradabilidad le confiera un valor agregado al producto terminado (Luengo et al., 2003).

Desde 1990 se comenzó a evaluar otras aplicaciones centradas en el área farmacéutica. Actualmente se están estudiando los PHAs en forma de microcápsulas para la liberación controlada de medicamentos (Galego et al., 2000). En el campo de la oncología, los PHAs también están siendo evaluados para su aplicación en diferentes tratamientos (Ré et al., 2005). Por ejemplo, se ha estudiado el uso de nanopartículas producidas a partir de P(3HB-co-3HH) como matriz de base para la producción de un agente nanoterapéutico para la terapia del cáncer (Kiliçay et al., 2011). Diversas investigaciones han comprobado que el PHB es biocompatible, dado que el *R*-3-hidroxi-butirato es un constituyente normal de la sangre en concentraciones entre 0.3 y 1.3 mM. Se ha visto que el PHB no produce alteraciones en los parámetros funcionales, bioquímicos y fisiológicos en los pacientes. Además presenta propiedades mecánicas iguales o aún mejores que los termoplásticos petroquímicos (Ré et al., 2005).

Las propiedades elastoméricas de los PHAs<sub>MCL</sub> ofrecen una amplia gama de aplicaciones en el campo de la medicina como precursor de moléculas con propiedades anti-reumáticas, analgésicas, radiopotenciadores y anti-tumorales. Se los usan también para producir biopelículas médicas y dispositivos especiales como soportes de fármacos, nuevos tipos de

suturas, soportes regenerativos de tejidos vasculares, etc. (Pouton y Akhtar, 1996; Zinn et al., 2001; Shishatskaya et al., 2000; Luengo et al., 2003).

A pesar que los PHAs se asocian comúnmente como alternativas potenciales a los plásticos petroquímicos, hay una gran diversidad de constituyentes de PHAs que proveen alternativas a otros productos derivados del petróleo. Uno de los intereses es el desarrollo de biocombustibles. Los alcoholes de cadena larga tienen mayor densidad y menor presión de vapor que el etanol y han sido considerados biocombustibles de próxima generación (Connor y Liao, 2009). La sobreexpresión de 2-cetoácidos en *E. coli* fue previamente desarrollada para la producción de alcoholes de cadena larga y ramificada (Atsumi et al., 2008).

La condensación de acetil-CoA con derivados de 2-cetobutirato, 2-cetoisovalerato, 2-cetovalerato, 2-ceto-3-metilvalerato o 2-ceto-4-metil-pentanoato da lugar a los constituyentes de PHAs: 3HV, 3-hidroxi-4-metilvalérico, 3-HH, 3-hidroxi-4-metilhexanoico y 3-hidroxi-5-metilhexanoico, respectivamente (Steinbüchel y Valentin, 1995). La figura 11 marca un ejemplo de la condensación de acetil-CoA con el CoA derivado del 2-cetobutirato (Slater et al., 1999). Estos cinco 3-hidroxiácidos pueden ser reducidos a su correspondiente aldehído y alcohol químicamente, bioquímicamente o biológicamente. Asimismo, la despolimerización de PHAs, seguida por la remoción del grupo hidroxilo y la reducción del ácido a alcohol resultaría en: 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-pentanol, 3-metil-1-pentanol and 4-methyl-1-pentanol respectivamente (Fig. 8, Atsumi et al., 2008).

Actualmente, la producción de PHAs está dirigida a ser competitiva a nivel de costos, usando los métodos de fermentación de bioingeniería convencionales, en comparación con el polipropileno y polietileno derivados del petróleo (Harding et al., 2007).

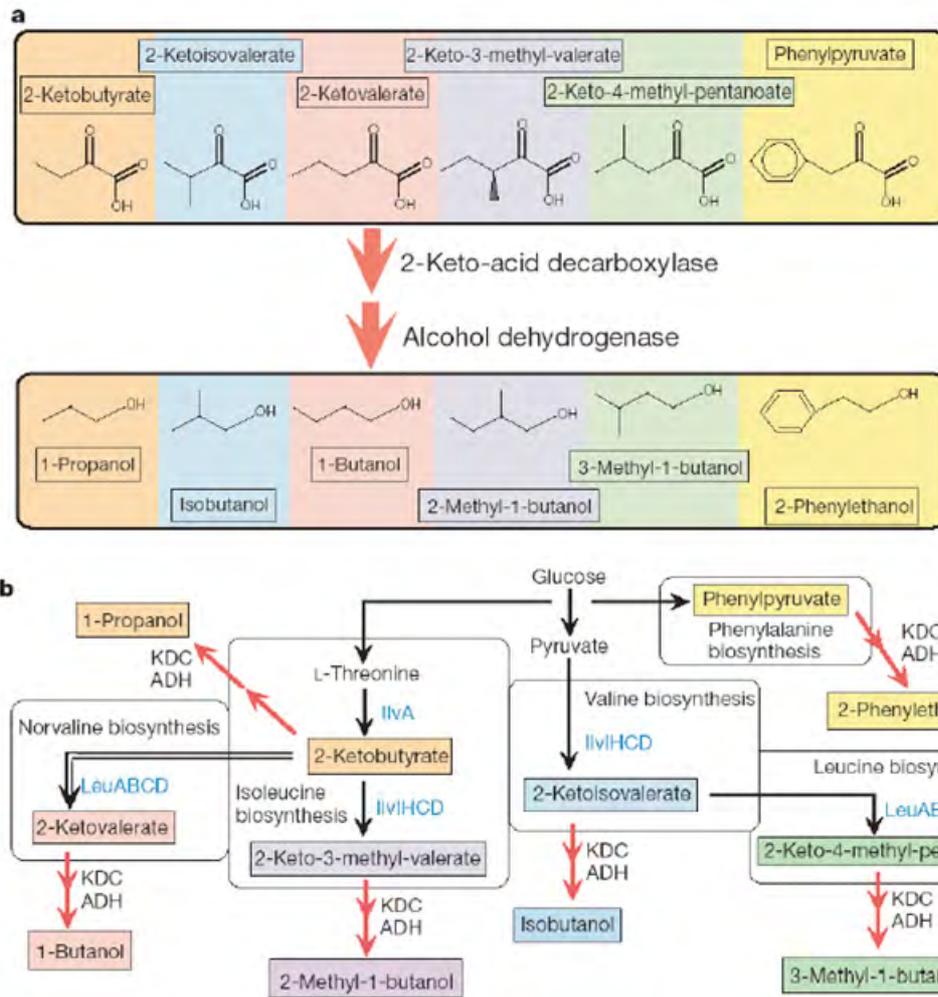


Figura 8. Esbozo de una estrategia de ingeniería para la producción de alcoholes de cadena ramificada mayor de 2-ceto ácidos que se producen normalmente para la biosíntesis de aminoácidos, (de Atsumi et al., 2008). La condensación de acetil-CoA con los derivados CoA de 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 2-ceto-3 metilvalerato o 2-ceto-4-metil-pentanoato puede dar lugar a la formación de PHA.

## 1.6 ORGANISMOS NATURALES PRODUCTORES DE PHA

El mayor esfuerzo dirigido a comercializar PHAs fue el de Imperial Chemical Industries, Ltd., en los años 70. Dado el bajo costo del metanol y la experiencia de ICI con las fermentaciones del metanol, se ensayaron bacterias metilotróficas como primera elección. Sin embargo, la cantidad de polímero producido por las células era insuficiente y su peso molecular era demasiado bajo como para tener aplicaciones comerciales. El segundo organismo de elección fue *Azotobacter*, dado que era una bacteria conocida como buena productora de PHB. Sin embargo, las cepas estudiadas eran inestables y secretaban polisacáridos. Obviamente, la formación de cualquier subproducto es indeseable y su presencia se debe mantener a un mínimo, dado que impacta directamente en el rendimiento del producto. El tercer organismo de elección fue *R. eutropha*, que produce PHB de alto peso molecular al crecer en presencia de fructosa como fuente de carbono. La acumulación de PHB por *R. eutropha* se da preferentemente bajo condiciones limitantes de nitrógeno o fosfato (Byrom, 1987).

Después del descubrimiento del P(3HO-co-3HH) (Fig. 2) producido por *P. oleovorans* al crecer en octano, el rango de los diferentes constituyentes de PHAs se expandió rápidamente y actualmente, cerca de 150 diferentes monómeros de PHAs han sido identificados (Park y Lee, 2005). La comparación de la cantidad de PHAs producido por diferentes organismos no es generalmente informativa, ya que esto depende de la diversidad de los PHAs, los organismos de producción, los sustratos y las condiciones de crecimiento que utilizan los diferentes laboratorios. Por lo tanto, los resultados se presentan generalmente en términos de "acumulación de PHA como el porcentaje de peso seco de la célula" y "porcentaje de determinado monómeros respecto al polímero total" (Madison y Huisman, 1999).

## 1.7 ORGANISMOS RECOMBINANTES PRODUCTORES DE PHAs

La síntesis de PHA requiere de la acción de unas pocas enzimas. Sin embargo, hay una gran cantidad de actividades metabólicas que influyen en la acumulación de PHA (Fig. 7). Para lograr una producción comercial exitosa de PHA es necesario optimizar al máximo las condiciones de fermentación y la eficiencia de formulación del producto en los procesamientos posteriores. Es deseable alcanzar altos niveles contenidos de PHA, así como una alta productividad en términos de gramo de producto obtenido por unidad de volumen y tiempo, y rendimiento por gramo de sustrato. Los productores naturales de PHAs a menudo tienen un largo tiempo de generación, una temperatura de crecimiento relativamente baja, a veces son difíciles de lisar y contienen vías para la degradación de PHA. Estas desventajas dificultan su uso en la producción industrial de los biopolímeros. *E. coli* no tiene la capacidad de sintetizar o degradar PHAs pero crece rápido, a una temperatura más alta y las bacterias son fáciles de lisar. El rápido crecimiento permite disminuir los tiempos de fermentación, mientras que la temperatura de crecimiento más alta le da un ahorro de costo asociado con el sistema de refrigeración del recipiente de fermentación. La facilidad para lisar la célula permite ahorrar costos durante la purificación de los gránulos de PHA (Suriyamongkol et al., 2007).

### 1.7.1 *Escherichia coli*

*E. coli* es el microorganismo mejor conocido. Se han expresado los genes *pha* de varias especies bacterianas en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos de producción del polímero (Zhang et al., 1994). Al no poseer enzimas que degraden los PHAs, permite la acumulación de polímero con un elevado peso molecular. Los genes que participan en la síntesis de PHB de *Azotobacter* (*phaB*, *phaA* y *phaC*) han sido clonados, caracterizados en el

laboratorio y transferidos a una cepa de *E. coli* adecuada para la producción del polímero (Slater et al., 1988; Schübert et al., 1988). También una variedad de otros polímeros, tales como P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), P(4HB), y P(3HO-co-3HH), han sido sintetizados por *E. coli* modificada por ingeniería genética (Schübert et al., 1988).

- PHB. Se vio que los gránulos de PHB podían producirse en cepas de *E. coli* conteniendo los genes de *R. eutropha* (Slater et al., 1992). A pesar que la cepa recombinante de *E. coli* era capaz de sintetizar gránulos de PHB, las células eran incapaces de acumular niveles equivalentes a los de los productores naturales al ser cultivados en un medio definido (Kim et al., 1992). Sin embargo, se reportó recientemente que *E. coli* podía acumular PHB hasta un 85,8% del peso seco celular, al ser cultivada en un medio mínimo con glucosa sin adicionar inductor (Kang et al., 2008).
- P(3HB-co-4HB) y P(4HB). P(4HB) fue producido en *E. coli* mediante la introducción del gen *hbcT* de *Clostridium kluyveri* y el gen *phaC* de *R. eutropha*. El gen *hbcT* codifica para una ácido 4-hidroxibutirico-CoA transferasa. El 4HB producido por esta enzima luego es incorporado a la cadena de PHA por la polimerasa PhaC de *R. eutropha*. El clon recombinante de *E. coli* produjo PHA conteniendo 4HB cuando creció en presencia de 4HB y glucosa. En ausencia de glucosa y en presencia de 4HB, se acumuló un copolímero de P(3HB-co-4HB) constituido por hasta un 72% de 3HB, aún en ausencia de los genes de *phbA* y *phbB*. Esto sugiere que *E. coli* contiene una vía desconocida que permite la conversión de 4HB a 3HB dando lugar a una fracción baja de 4HB (Hein et al., 1997). El P(3HB-co-4HB) ha sido estudiado por su potencial uso biomédico, dado que presenta propiedades particulares que los diferencia de otros PHAs (William y Martin, 2008).
- P(3HO-co-3HH). *E. coli* ha sido también diseñada para producir PHAs<sub>MLC</sub> mediante la adición de genes *phaC1* y *phaC2* de *P. aeruginosa* (Qi et al., 1997). Se presumió que esta cepa recombinante acumulaba intermediarios de la vía de la  $\beta$ -oxidación que podrían ser incorporados en PHA por las polimerasas. Las cepas recombinantes de *E. coli* acumularon PHA hasta un 21% del peso seco celular al ser cultivadas en caldo

LB conteniendo decanoato. El polímero contenía principalmente 3-hidroxi-decanoato (73%) y 3-hidroxi-octanoato (19.0%) (Langenbach, 1997).

- P(3HB-co-3HV). El diseño de *E. coli* para producir P(3HB-co-3HV) requirió alterar el metabolismo endógeno de la bacteria *E. coli* en vez de introducir un set especializado de genes. La fracción de 3HV en el copolímero era dependiente del porcentaje de propionato suplementado durante la fermentación (Yim et al., 1996). Recientemente Chen y col. (2011) diseñaron una bacteria recombinante de *E. coli* capaz de producir P(3HB-co-3HV) a través de la vía treonina desaminasa utilizando una fuentes de carbono no relacionada y sin la adición de propionato.

#### 1.7.1.1. Síntesis de propionato (precursor de hidroxivalerato) en *E. coli*

*E. coli* tiene la capacidad de sintetizar metionina a partir de homocisteína mediante dos posibles enzimas metionina sintasa, una dependiente de vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina)-(MetH) y otra independiente de la vitamina B<sub>12</sub> (MetE) (Foster et al., 1961, 1964; Guest et al., 1964). Por otro lado, *E. coli* no requiere cobalamina para crecer, aunque la utiliza cuando está disponible (Haller et al., 2000).

Se ha postulado la existencia de una vía cobalamina dependiente para *E. coli* que cataliza la conversión de succinato a propionato (Haller et al., 2000). Los genes asociados con esta vía se agrupan en un operón formado por cuatro ORFs: *sbm-ygfD-ygfG-ygfH* (actualmente cambio la nomenclatura a *scpA-argK-scpB-scpC*) (fig. 9, A). *Sbm* es una metilmalonil-CoA mutasa (MCM), dependiente de vitamina B<sub>12</sub> que cataliza la conversión de succinil-CoA a L-metilmalonil-CoA. Por otro lado, *YgfG* es una metilmalonil-CoA descarboxilasa, que cataliza la descarboxilación de metilmalonil-CoA a propionil-CoA. *YgfG* es una enzima miembro de la superfamilia crotonasa que catalizan la reacción que genera un intermediario anión enolato estable (figura 9, B). Dependiendo de la reacción, el intermediario es clivado en diferentes

tipos de productos vía racemización/epimerización, deshidratación, deaminación o cicloisomerización (Babbitt et al., 1996).

Finalmente, YgfH es una transferasa de propionil-CoA:succinato-CoA cuyo rol es transferir el CoA del producto de propionil-CoA a un succinato disponible, dando lugar a otro ciclo de descarboxilación de succinato a propionato (Haller et al., 2000).

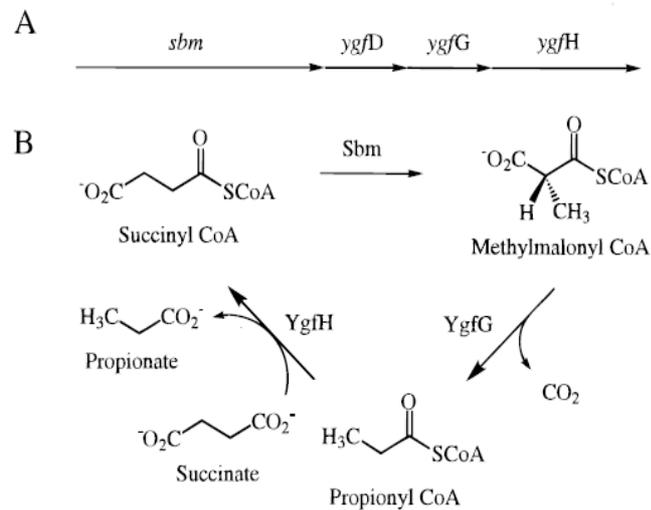


Figura 9. (A) Operón que contiene los genes para la síntesis de propionato. (B) Vía para la conversión de succinato a propionato en *E. coli* (Haller et al., 2000).

A la cuarta proteína, YgfD, no se le pudo asignar una función a pesar de que las investigaciones realizadas la sugieren como una posible quinasa/fosfatasa que estaría involucrada en la regulación de las otras enzimas (Haller et al., 2000). También se le ha asignado una función a ArgK, involucrada en la regulación del transporte de aminoácidos catiónicos (Celis et al., 1998).

Se pensaba que este operón, a pesar de ser funcional *in vitro*, no se expresaba *in vivo*. Esto se indicaba en la anotación del primer gen como “*sleeping beauty mutase*” (*sbm*) (Haller et al., 2000). Sin embargo, años después, Froese et al., demostraron que la proteína Sbm era expresada de forma endógena en células de *E. coli* y por lo tanto no era *sleeping*. También se observó que YgfD y Sbm interactuaban tanto *in vitro* como *in vivo*. Se demostró que YgfD se unía y clivaba GTP, y esta unión integral era fundamental para su interacción con Sbm. Asimismo, estos estudios revelaron la actividad funcional para YgfD, como el cuarto miembro del operón Sbm y que ambos interactuaban *in vivo*. En la discusión del artículo se indicaba que el operón *sbm* no parecía ser esencial para el crecimiento de la célula, al menos bajo las condiciones de cultivo usadas en el estudio (Froese et al., 2009).

Todas las enzimas producidas por este operón son suficientes para formar un ciclo metabólico por el cual *E. coli* puede catalizar la descarboxilación de succinato a propionato, a pesar de que el contexto metabólico de este ciclo es desconocido (Haller et al., 2000).

En síntesis, la enzima Sbm cataliza la conversión dependiente de B<sub>12</sub> de succinil-CoA a (2*R*)-metilmalonil-CoA. Luego una metilmalonil-CoA decarboxilasa (YgfG), cataliza la conversión de (2*R*)-metilmalonil-CoA a propionil-CoA. Esta actividad es biotina independiente. Finalmente, el propionil-CoA es regenera succinil-CoA por una propionil-CoA:succinil-CoA transferasa (YgfH) (Haller et al., 2000).

### **1.7.2 *Salmonella entérica***

También se han utilizado cepas de *Salmonella* como productores recombinantes del copolímero P(3HB-*co*-3HV). Aldor y col. (2002) utilizaron una cepa de *S. entérica* con una mutación en el gen *prpC* y la modificaron genéticamente para producir P(3HB-*co*-3HV). Se le insertó un plásmido que contenía el operón *phaBCA* de *Acinetobacter* para la síntesis de polihidroxialcanoatos y un segundo plásmido con los genes *sbm* y *ygfG* de *Escherichia coli* bajo un promotor independiente (ver fig. 10) (Aldor et al., 2002).

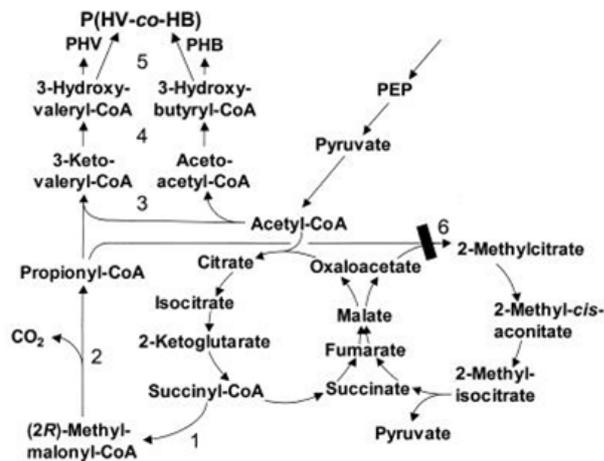


Figura 10. Vía metabólica de síntesis de P(3HB-co-3HV) a partir de glicerol en *Salmonella*. **1**, sleeping beauty mutase, SBM. **2**, metilmalonil-CoA descarboxilasa (YgfG). **3**,  $\beta$ -cetotilasa, PhaA/ 3-cetotilasa, BktB. **4**, acetoacetyl-CoA reductasa, PhaB. **5**, PHA sintasa, PhaC. **6**, 2-metilcitrato sintasa, PrpC. Se muestra el ciclo de Krebs (izquierda) y el ciclo del ácido 2-metilcitrato (derecha), que compiten por la acetil-CoA y propionil-CoA. El ciclo del 2-metilcitrato está bloqueado en el sistema de expresión descrito (de Aldor et al., 2002).

### 1.7.2.1 Producción de P (3HB-co-3HV) por *Salmonella*.

Aldor y col. (2002) estudiaron la producción de P(3HB-co-3HV) por *S. entérica*. Los precursores de este copolímero fueron acetil-CoA y propionil-CoA (Steinbuchel y Schlegel, 1991; Brämer et al., 2002).

Como se mencionó previamente, *E. coli* puede producir propionato a partir de compuestos orgánicos porque contiene el operón *sbm-ygfD-ygfG-ygfH*, que codifica para una vía que convierte el succinato en propionato (Fig.10). Aldor y col. (2002) insertaron parte de este operón en una cepa de *S. entérica*. Esta vía permitió generar propionil-CoA para la

producción de P(3HB-co-3HV) en la cepa recombinante. En la cepa de *Salmonella* se observó una variación en la fracción del monómero 3HV en el copolímero, al ajustar las concentraciones de cianocobalamina (precursor de la coenzima B<sub>12</sub>) en el medio. Al ensayar una concentración de cianocobalamina de 1 μM, se alcanzó una producción máxima de 3HV, representando el 16% del peso del copolímero. A esta concentración también se obtuvo un 45% de copolímero respecto al peso seco celular (Aldor et al., 2002).

Es interesante destacar que la producción de 3HV depende de la disponibilidad de propionato. El ciclo del ácido 2-metilcitríco (Fig. 10) es responsable del catabolismo de propionato en muchas bacterias gram-negativas cuando éste es consumido como única fuente de carbono. Se cree que este ciclo es una vía de detoxificación para el propionil-CoA (Horswill et al., 2001). La bacteria utilizada por Aldor y col. (2002) presentaba una mutación en el gen *prpC* para evitar el catabolismo de propionato por esta vía. La β-oxidación de ácidos grasos de cadena impar es otra vía de catabolismo del propionil-CoA, donde la propionil-CoA descarboxilasa transforma este sustrato a metilmalonil-CoA. Este último daría lugar a succinil-CoA ([www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)).

El ciclo de Krebs y el ciclo del ácido 2-metilcitríco compiten por los precursores de acetil-CoA y propionil-CoA, necesarios para la producción de P(3HB-co-3HV). La citrato sintasa condensa una molécula de acetil CoA y de oxalacetato para generar citrato dentro del ciclo de Krebs. Paralelamente, la 2-metilcitrato sintasa condensa una molécula de propionil-CoA y oxalacetato para sintetizar 2-metilcitrato para el ciclo del ácido 2-metilcitríco (Fig. 10) (Aldor et al., 2002).

### **1.7.3 Producción de PHA en organismos eucariotas**

En un esfuerzo por reducir los costos del PHB, se desarrollaron programas para la producción de PHB en vegetales. Los vegetales como canola, girasol o maíz, han sido

intensamente empleados para la producción comercial de aceites. Si uno fuera capaz de reemplazar el aceite acumulado por PHAs y alcanzar una acumulación del polímero de un 30% en las semillas, la producción de PHA por acre (0.405 hectáreas) podría ser de alrededor de 350 lb. La producción de 1 billón de lb de PHAs requeriría entonces un área de 2.5 millones de acres. Si bien se ha estudiado la producción de PHAs en plantas transgénicas durante 20 años, hoy en día no es viable dada la baja cantidad de PHB producido. Asimismo, varios estudios actuales han reportado la síntesis de PHAs en levaduras, células de insecto, y varias especies de plantas pero en muy bajas cantidades (Somleva et al., 2008).

#### **1.7.3.1 *Saccharomyces cerevisiae***

A diferencia de *E. coli*, donde la vía completa de síntesis de PHB debe ser introducida para que se acumule el polímero, en levaduras, el PHB fue producido por la expresión de sólo una parte de la vía biosintética. Los gránulos de PHB pudieron ser visualizados en células de *S. cerevisiae* cuando sólo el gen de la polimerasa de PHB de *R. eutropha* se introdujo en la célula. Sin embargo, el PHB fue acumulado alcanzando sólo un 0.5% del peso celular seco (Leaf et al., 1996).

#### **1.7.3.2 En células de insecto**

La expresión del gen *phbC* de *R. eutropha* en células de insecto fue inicialmente lograda en *Trichoplusia ni* (Gusano medidor del repollo) usando un sistema de baculovirus. La expresión de *phbC* fue exitosa. A pesar de que se logró producir PHB, solo 1 mg de PHB fue

aislado a partir de 1 litro de células, lo que correspondía a 0.16% de peso celular seco (Williams et al., 1996).

### 1.7.3.3 Plantas

A diferencia de las bacterias, las células eucariotas son altamente compartimentalizadas. Los genes *pha* deben estar dirigidos a los compartimentos de las células de las plantas donde la concentración de acetil-CoA es la más alta y de manera que el crecimiento de la planta no se vea limitado por los impactos negativos que resultan de la desviación de recursos hacia la producción de PHB (Dalton et al., 2011).

Se ha trabajado de forma considerable para sintetizar P(HB-co-HV) en plantas. Se pensó que esto podría producir grandes volúmenes de PHAs a bajo costo a partir de dióxido de carbono y luz solar (Snell et al., 2002). Sin embargo, cuando un grupo de investigación de Monsanto modificó semillas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*, el contenido del copolímero total alcanzó sólo el 3% con respecto al peso seco celular (Fig.11) (Slater et al., 1999), muy por debajo del orden de 15%, considerado suficiente para realizar la extracción y el procesamiento económico. La vía de succinil-CoA-propionil-CoA es probablemente inadecuada para las plantas transgénicas, porque estos organismos no sintetizan ni utilizan la vitamina B<sub>12</sub>. Otra desventaja es que la composición de copolímero es más difícil de controlar en plantas que en un sistema microbiano (Aldor et al., 2002).

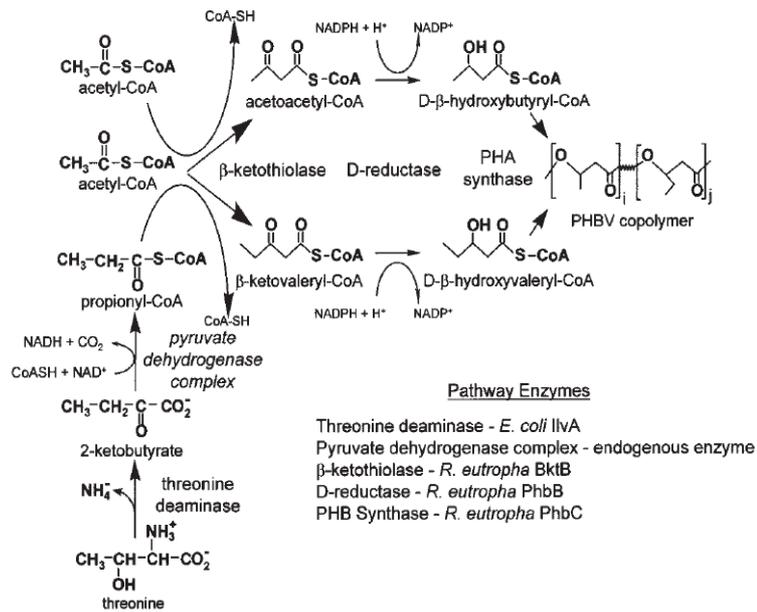


Figura 11. Diseño de *Arabidopsis* para producir P(3HB-co-3HV). El proyecto de ingeniería para la producción de 3HV, se muestra en la rama inferior y consiste en la condensación de acetil-CoA con el derivado CoA de 2-cetobutirato (Slater et al., 1999). La misma estrategia se desarrolló para la condensación de acetil-CoA con el correspondiente derivado de 2-ceto-3-metil-valeril-CoA y otros 2-cetoácidos discutidos anteriormente.

## 1.8 IMPORTANCIA DE LOS PHAs EN LA NATURALEZA

Además de material de almacenamiento de carbono y equivalentes reductores de bajo peso molecular, el PHB forma parte de las bacterias que tienen canales de calcio (Pavlov et al., 2005).

Se comprobó que las cepas bacterianas capaces de sintetizar el polímero de reserva tenían mayor supervivencia, y más capacidad de competir con otras bacterias autóctonas en ambientes naturales. Asimismo, la exposición al etanol o al estrés térmico, era resistida

mejor por los microorganismos que tenían la capacidad de degradar PHAs que por aquellos que, aunque disponían del polímero, eran incapaces de utilizarlo (López et al, 1995).

Ante condiciones adversas, las bacterias son capaces de responder con diversos mecanismos que les permiten hacer frente a dichas condiciones. Uno de estos mecanismos es la respuesta general a estrés que involucra un factor sigma ( $\sigma$ ) alternativo de la ARN polimerasa, denominado  $\sigma^S$ . Este factor es codificado por el gen *rpoS*, cuya función es controlar la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés (Watson et al., 2006).

El otro mecanismo de protección bacteriana ante ambientes hostiles involucra un aumento en la concentración intracelular de tetrafosfato de guanosina (ppGpp), una molécula que regula la expresión de varios genes, entre ellos el *rpoS*, que codifica para la síntesis de  $\sigma^S$  (Watson et al., 2006). Investigadores comprobaron que la degradación de PHA tenía algún efecto sobre estos mecanismos de repuesta al estrés en las bacterias. Al exponer cepas de *P. putida* a un ambiente en ausencia de fuente de carbono, se iniciaba la degradación del polímero. En esas condiciones, la cepa que tenía la capacidad de despolimerizar PHA aumentaba la cantidad de ppGpp y de  $\sigma^S$ . Estos resultados permitieron determinar que existe una relación entre la degradación de los PHAs y el mecanismo bacteriano de respuesta al estrés controlado por RpoS, que tal vez se encuentre mediado por ppGpp (Ruiz et al., 2004).

## 1.9 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHA

La regulación de la producción de PHA es compleja. A nivel fisiológico, se regula a través de la presencia de cofactores enzimáticos y la disponibilidad de metabolitos y a un nivel genético, a través de factores- $\sigma$  alternativos, la expresión de sistemas regulatorios de dos componentes y moléculas de autoinducción (Madison y Huisman, 1999).

Las mutaciones en el gen *phbH* en *R. eutropha* alteraron el tiempo de síntesis de PHB, sugiriendo un rol regulatorio de esta proteína sobre las enzimas que participan en la síntesis de PHB (Pries et al., 1991).

Muchas *Pseudomonas* son capaces de sintetizar PHAs por dos vías diferentes: a través de la biosíntesis de ácidos grasos cuando crecen a partir de gluconato o a través de la degradación de ácidos grasos, cuando crecen a partir de ácidos grasos como fuente de carbono. En *P. aeruginosa*, la vía del gluconato es estrictamente controlada por RpoN, la subunidad  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa, mientras que la vía de síntesis de los ácidos grasos es completamente independiente de  $\sigma^{54}$  (Timm y Steinbüchel, 1992). A diferencia de otros productores de PHA<sub>MSC</sub>, *P. putida* KT2442 sintetiza PHAs durante el crecimiento exponencial sobre los ácidos grasos (Huisman et al., 1992).

En las especies de *Rhizobium*, Bergersen y Turner (1992) postularon que el PHB juega un rol en la fisiología de los bacteroides en el nódulo (Bergersen y Turner, 1992). Se cree que cuando la bacteria esta colonizando la planta, los equivalentes de reducción son usados para la fijación de nitrógeno en simbiosis, pero también pueden ser usados para la formación de PHB. En el estado libre, como la nitrogenasa no es expresada, el PHB funciona como un reservorio de exceso de NAD(P)H cuando el ciclo de TCA no está completamente activo. Por lo tanto, la interacción planta-microorganismo estaría influyendo en la producción de PHAs (Madison y Huisman 1999).

### **1.10 INTERACCIÓN PLANTA-MOCROORGANISMO**

Las plantas no se encuentran aisladas sino en contacto con diversa variedad de microorganismos. En su entorno hay diversas bacterias, incluyendo aquellas que poseen mecanismos para la adaptación y colonización de las plantas (Preston et ál., 1998). En cuanto al tipo de colonización, se pueden clasificar en microorganismos endófitos (colonizan

el interior de las plantas), epífitas (colonizan el exterior de la plantas) y patógenos (los que causan enfermedades a las plantas) (Wagner y Lewis, 2000).

Las bacterias diazótrofes son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en una forma más asimilable como es el amonio. Estas bacterias son capaces de crecer en ausencia de fuentes externas de nitrógeno reducido. *Bradyrhizobium*, *Frankia* (en simbiosis) y *Azospirillum* (en vida libre) son ejemplos de estos microorganismos. La fijación puede verse interrumpida cuando hay otras fuentes de nitrógeno disponibles, y, en muchas especies, cuando hay alta cantidad de oxígeno presente (Postgate, 1998).

Se consideran endófitos a todos los microorganismos que habitan, al menos por un período de su ciclo de vida, el interior de un vegetal. Estas bacterias se alojan principalmente en los espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Bacon y White, 2000; Azevedo, 1998).

#### **1.10.1 *Herbaspirillum seropedicae***

*H. seropedicae* es una bacteria no patógena, endófito y diazótrofo. Las bacterias de esta especie tienen la capacidad de crecer en asociación con una serie de plantas de importancia agrícola. La bacteria no entra en las células vivas, es decir, al simplasto de la planta, pero puede colonizar rápidamente el apoplasto, especialmente raíces y rizósfera. Varios estudios han demostrado que la bacteria coloniza al azar como células aisladas o microcolonias el apoplasto (espacios intracelulares, entre la pared celular y el lumen del xilema) como lo mencionó James y Olivares (Gracinda da Silva et al., 2003; James y Olivares, 1998).

El género *Herbaspirillum* fue inicialmente definido por Baldani y cols. en 1986 (Baldani et al., 1996) y hasta el momento se han identificado varias especies incluyendo: *H. autotrophicum*, *H. chlorophenolicum*, *H. frisingense*, *H. hiltneri*, *H. huttiense*, *H. lusitanum*,

*H. putei*, *H. rhizosphaerae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, y un grupo de cepas caracterizadas a partir de aislamientos clínicos, que ha sido denominado grupo 1 EF a causa de su parentesco molecular y mayormente fisiológico. La especie *H. seropedicae* contiene  $\beta$ -proteobacterias gram negativas que miden entre 0.6-0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tienen entre 1 y 3 flagelos polares ubicados en uno o ambos polos, los que les permiten desplazarse (Bergey et al., 1994; Baldani et al., 1996) (Fig. 12).



Figura 12. Microscopía Electrónica de *H. seropedicae* (Baldani et al., 1996)

Como lo describieron originalmente, el microorganismo presenta una forma vibroide pero, dependiendo de las condiciones de cultivo, pueden tener una forma *spirillum*. La longitud de la célula depende del medio de cultivo y varía entre 1.5  $\mu\text{m}$  y 5.0  $\mu\text{m}$ . El organismo presenta respiración estricta y los azúcares son oxidados pero no fermentados. Estos organismos son oxidasa y ureasa positivo, pero la catalasa puede ser variable. Las fuentes de carbono favorables son sales de ácidos orgánicos como malato, piruvato, succinato y fumarato. Otras fuentes de carbono como glicerol, manitol, D-glucosa y sorbitol también son catabolizadas. Sin embargo, la sacarosa y la lactosa no pueden ser utilizadas. La cepa tipo es sensible a cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, tetraciclina, eritromicina y estreptomycin pero resistente a penicilina. La temperatura óptima de crecimiento es de 30–34°C y el pH óptimo es de 5.3–8.0 (Baldani et al., 1986; Baldani et al., 1996).

Estos organismos son difíciles de aislar de suelo no estéril y usualmente no producen enfermedad en las plantas con las que se asocian (Roncato-Maccari et al., 2002). La inoculación de algunos cultivos con bacterias de *Herbaspirillum* spp. puede promover el crecimiento vegetal. En algunos casos, estos efectos son atribuidos en parte a la fijación de nitrógeno por la bacteria y también a la producción de fitohormonas, como auxinas y giberelinas (Bergey et al., 1994).

Colonizan diversas plantas como caña de azúcar y maíz. Han sido encontradas en especies de la familia Gramineae como arroz (*Oryza officinalis*), *Sorghum bicolor*, *Miscanthus sinensis* y *Pennisetum purpureum* (Baldani et al., 1996). También se puede asociar con plantas dicotiledóneas y pueden ser aisladas de los nódulos de las raíces de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (Valverde et al., 2003), así como también de tallos de diferentes cultivares de banana y ananá (James et al., 2002).

Se ha demostrado que las bacterias del género *Herbaspirillum* tienen muchas características similares a las del género *Azospirillum*. Esto incluye la habilidad de crecer en medio semisólido malato NFb, comúnmente usado para el aislamiento y posterior identificación de organismos diazotrofos (Baldani et al., 1996).

Estudios previos sugieren que el endófito produce gránulos intracelulares de PHA durante su crecimiento en la planta (James y Olivares, 1998). Las observaciones fueron apoyadas por estudios bioquímicos que mostraron la presencia de PHA en el endófito cultivado *in vitro* (Catalán et al., 2007). El análisis por microscopía electrónica reveló que *H. seropedicae* y *H. rubrisubalbicans* estaban localizados en el xilema en las raíces de la caña de azúcar. En estudios del laboratorio se ha visto que *H. seropedicae* Z67 coloniza plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Raphanus sativus*. Esto indica que el endófito utiliza los productos de la fotosíntesis (tal vez la fotosíntesis primaria) para crecer y producir PHAs. De este modo, el CO<sub>2</sub> que es capturado por la planta podría usarse como posibles alternativas a los productos derivados del petróleo (Gracinda da Silva, 2003). El diseño de un sistema planta-microorganismo para producir PHAs podría ser, en un futuro, rentable y competir con los plásticos petroquímicos.

Catalán y col. (2007) demostraron que *H. seropedicae* Z69 es capaz de acumular hasta 36% de la biomasa como PHB cuando es cultivado en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo, el mayor contenido de PHB obtenido (36%) fue menor que lo que se informó anteriormente para la producción de PHB por *R. eutropha* y *A. latus*. Se vió también que la velocidad de acumulación de PHB se incrementaba una vez que el organismo ingresaba en la fase estacionaria de crecimiento. Cuando *H. seropedicae* se cultivó en ácido nonanoico como única fuente de carbono, acumuló P(3HB-co-3HV) con una abundancia relativa de 2:1 para los monómeros 3HB y 3HV, respectivamente. Sin embargo la biomasa era muy baja en estas condiciones y, por lo tanto, el ácido nonanoico no es una buena fuente de carbono (Catalán et al., 2007).

Catalán y col. mostraron que cuando *H. seropedicae* Z67 y Z78 crecían en presencia de ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, tales como el ácido nonanoico, se sintetizaba el copolímero P(3HB-co-3HV) (Catalán et al., 2007).

## 2. HIPÓTESIS

- La cepa de *H. seropedicae* Z67 conteniendo el operón trucado *sbm-ygfD-ygfG* de *E. coli* debería ser capaz de producir propionil-CoA, cuando es cultivada en presencia de glucosa como fuente de carbono.
- El propionil-CoA y acetil-CoA generados por la cepa Z67 conteniendo este operón podrían ser utilizados para la síntesis de 3-hidroxicincomato.
- La producción de 3-hidroxicincomato debería dar lugar a la producción de P(3HB-co-3HV).
- Dado que *H. seropedicae* coloniza una amplia variedad de plantas, asimismo podría colonizar plantas de rabanito.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos generales

- Producir el copolímero P(HB-co-HV) al cultivar *H. seropedicae* Z67 en presencia de glucosa como fuente de carbono. A largo plazo se pretende diseñar una bacteria capaz de producir copolímero cuando crece en asociación con plantas. La idea es que utilice los productos de la fotosíntesis, glucosa por ejemplo, como fuente de carbono.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Amplificar el operón *sbm-ygfD-ygfG* a partir del ADN cromosomal de la cepa de *E. coli* MG1655.
- Clonar el fragmento en el plásmido pHC60 mediante ligación de extremos cohesivos generados por corte con enzimas de restricción.
- Transferir dicho plásmido en bacterias competentes de *H. seropedicae* Z67 mediante electroporación.
- Verificar la presencia del plásmido en *H. seropedicae* Z67 por *Southern Blot*.
- Evaluar la expresión de PHA en *H. seropedicae* Z67 (cepa salvaje y recombinante) mediante gravimetría y GC.
- Evaluar la colonización de *H. seropedicae* Z67 en plantas de rabanito mediante microscopía de fluorescencia.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa Z67 de *H. seropedicae* fue amablemente proporcionada por la profesora J. Döbereiner (EMBRAPA-CNPBS-Seropedicae, RJ, Brasil). Se utilizó también una cepa mutante derivada de *H. seropedicae* Z67, denominada *fliF*, incapaz de formar estructuras flagelares. La cepa de *E. coli* MG1655 fue utilizada para aislar y clonar el operón truncado *sbm-ygfD-ygfG* (*scpA-argK-scpB*) sin el gen *ygfH* (*scpC*) (Aldor et al., 2002). También se utilizó la cepa *E. coli* TOP10 para la preparación de células competentes. El plásmido pHC60 fue utilizado como vector para el clonado del operón truncado. En la tabla 2 se indican los genotipos y fenotipos de cada cepa utilizada.

El medio LB sólido y líquido suplementado con ampicilina (Anexo 1) se usó para el crecimiento, mantenimiento y aislamiento de las cepas de *E. coli*. El medio LB sólido con tetraciclina 10 µg/mL se usó para aislar las colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pHC60 y pLF1. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en condiciones aeróbicas a 30°C, pH 7. Las cepas de *H. seropedicae* se cultivaron en placas con medio TY sólido y líquido (Anexo 1) para el crecimiento, mantenimiento y aislamiento de las colonias. *H. seropedicae fliF* se cultivó en medio TY con Km (10 µg/mL). La cepa salvaje y recombinante fueron cultivadas en medio definido LGI (Anexo 1) para determinar la producción y caracterización de los PHAs acumulados. Las cepas de *H. seropedicae* fueron cultivadas a 30°C, pH 5.8 (Anexo 1). En el caso de la cepa recombinante se cultivo en presencia de tetraciclina (10 µg/mL). En el anexo 4 se indica como fueron preservadas las cepas bacterianas.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	Tc <sup>r</sup> , <i>recA</i> , <i>recX</i>	Baldani et al., 1996
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67 <i>fliF</i>	Tc <sup>r</sup> , <i>recA</i> , <i>recX</i> , miniTn5 ( <i>Kan<sup>r</sup>gfp</i> ), <i>fliF</i> <sup>-</sup>	Rodríguez-Bessolo et al. Resultados no publicados
<i>Escherichia coli</i> MG1655	F, λ, <i>rph-1</i> , <i>Fnr</i> <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup>	Durfee et al., 2008
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15 galK16</i> <i>rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup></i>	Blattner et al., 1997
Plásmido		
pHC60	RK2, Tc <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>R</sup></i> , <i>lacZ</i> , <i>ϕlac</i> , MCS ( <i>gfp</i> )	Chen and Winans, 1991
pLF1	Vector derivado de pHC60 en donde se eliminó el gen <i>gfp</i> . y contiene en el sitio, MCS el operón ( <i>sbm-ygfD-ygfG</i> )	Este estudio

## 4.2 Manipulación de DNA

### 4.2.1 Extracción de DNA plasmídico y genómico

Se utilizó el método de Birboim y col. (1979), con algunas modificaciones (Anexo 2), para extraer el ADN plasmídico de *E. coli* MG1655. Para la extracción de ADN genómico de *E. coli* y *H. seropedicae* se utilizó el protocolo estándar de JGI (<http://www.jgi.doe.gov/>). Se tomó un inóculo de *E. coli* y *H. seropedicae* a partir de una suspensión stock mantenida a -80°C con glicerol 20%. Estos inóculos se plaquearon en LB sólido con ampicilina (para *E. coli*) y TY

sólido respectivamente. Luego se tomó una colonia aislada y se cultivó en medio LB líquido con ampicilina y TY líquido para la extracción de los ácidos nucleicos.

#### 4.2.2 Clonado del fragmento *sbm-ygfD-ygfG*.

Para la reacción de PCR se diseñaron dos juegos de cebadores, los cuales se diseñaron en base a los elaborados por Aldor y col. (2002) con algunas modificaciones. Para diseñarlos se utilizó el programa Primer Premier™. El primer juego de cebadores consistió en el *forward* 5'-TGAAGTATTGACTTAACGCC-3' y el *reverse* 5'-GTGGCATTAGCGGCTTT-3', diseñados para generar un producto de 4,4 kb. El segundo juego de cebadores incluyó la adición de sitios de restricción para las enzimas *Xba*I y *Sac*I para permitir la ligación con el plásmido. Estos eran *forward* 5'- GCTCTAGACAAATAATGTCTAACGTGCAGGAG -3' y el *reverse* 5'- GCGAGCTCTTAATGACCAACGAAATTAGGTTTAC -3', diseñados para obtener un producto de 3,9 kb. El programa del termociclador fue similar al aplicado por Aldor y col. (2002). El fragmento 3,9 kb luego fue digerido con *Xba*I y *Sac*I y purificado a partir de gel de agarosa utilizando el Kit de ISOLATE PCR and Gel Kit (Bioline, London, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido pHC60 también fue digerido con las mismas enzimas y purificado a partir de gel de agarosa con el kit mencionado anteriormente.

Se usó aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico y de ADN amplificado para realizar la digestión y posterior ligación. Se utilizaron las enzimas de restricción *Xba*I y *Sac*I en un volumen final de 40 µL junto con el buffer correspondiente a cada enzima, según las recomendaciones del fabricante (Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Alemania). Las reacciones de digestión se llevaron a cabo a 37°C durante aproximadamente 4 h.

### **4.2.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Las electroforesis fueron realizadas en geles de agarosa (1%) teñido con GoodView (Fermentas, NY, US) (0,5 g/mL) en buffer de corrida TAE 1X (Anexo 1) a 90 V, por 1 hora, utilizando como marcador de peso molecular 1 µl de Gene Ruler™ Plus DNA Ladder de 1 Kb (Fermentas, NY, US). Los perfiles de corrida de los ADNs fueron observados bajo luz UV de un transiluminador (Fotodyne, New Berlin, WI, USA).

### **4.2.4 Ligación de DNA**

Las reacciones de ligación fueron preparadas en un volumen final de 15 µL utilizando la enzima T<sub>4</sub> DNA ligasa (Fermentas, NY, US) junto con el buffer suministrado con la enzima por el fabricante. Las reacciones de ligación se incubaron durante 4 h a 14°C. La relación molar inserto:vector fue 5:1. Las concentraciones del vector y el inserto se habían estimado anteriormente mediante la intensidad de banda en una corrida electroforética en gel de agarosa.

## **4.3 Inserción del ADN**

### **4.3.1 Preparación de células competentes**

Para la preparación de células competentes químicamente se utilizó el protocolo de Cohen y col. (1972) con algunas modificaciones. Las cepas de *E. coli* TOP10 fueron sembradas en 5

mL de caldo LB toda la noche. Este cultivo se usó para inocular 250 mL de medio LB líquido. Este frasco se incubó en agitador rotatorio a 37°C hasta lograr una D.O entre 0,3 y 0,5 medida a 600nm. El cultivo fue centrifugado en tubos estériles por 15 min, a 5000 rpm y a una temperatura de 4°C. El "pellet" obtenido fue lavado dos veces en CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Se resuspendió el "pellet" de células en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Las células se mantuvieron durante 1h en baño de hielo y nuevamente se centrifugaron en las mismas condiciones. El "pellet" obtenido fue nuevamente resuspendido en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y glicerol 20% (w/v) y posteriormente fue fraccionado en alícuotas de 100 µL cada una y guardadas a -80°C (Cohen et al., 1972).

Para la preparación de células de *H. seropedicae* Z67 salvaje y mutante *flIF* electrocompetentes, se partió de una suspensión *stock* mantenida en glicerol 20% a -80°C. Esta suspensión se usó como inóculo para sembrar placas de medio TY. En el caso de la cepa *flIF* se sembró en presencia de Kanamicina (Km). Luego se picó una colonia y se sembró en 5 mL de caldo TY, el cual, luego de crecido, fue usado para inocular 250 mL de medio TY. Este medio se incubó con agitación a 30°C por 2 h 30 min aproximadamente. Luego el medio se centrifugó a 6000 min<sup>-1</sup> por 6 minutos. El "pellet" obtenido se lavó tres veces con glicerol 10% para extraer todos los iones. Luego se colocaron alícuotas de 200 µL de la suspensión de células en microtubos de 1.5 mL y los mismos se conservaron en el freezer a -80°C (Fiedler y Wirth, 1988).

#### **4.3.2 Transformación por choque térmico de células químicamente competentes de *E. coli***

Para cada 200 µL de la suspensión de células competentes se adicionaron 10 µL de ADN (aproximadamente 50 ng). La mezcla fue colocada en baño de hielo durante 40 min y luego sometida a choque térmico a 42°C por 90 seg. La mezcla se colocó inmediatamente en hielo para ser enfriada. Posteriormente se adicionaron a cada mezcla 1mL de medio LB y se incubaron por 1h a 37°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron y se descartó el

sobrenadante. El "pellet" se resuspendió en 200 µL de agua destilada y se extendió en placas con medio agar LB con Tc. Las placas se incubaron a 30°C por 24h o hasta la visualización de colonias aisladas.

#### **4.3.3 Transformación por electroporación (*H. seropedicae*)**

Para realizar las transformaciones por electroporación fueron utilizados 200 µL de una suspensión de células electrocompetentes de *H. seropedicae* y 2 µL de las reacciones de ligación del vector con el inserto. Esta mezcla fue transferida a celdas de electroporación de 0,1 cm de cámara. La suspensión de células fue sometida a pulsos de 1,8 kV/cm, capacitancia de 24 F y resistencia de 200 Ω e inmediatamente se agregó 1 mL de medio TY. La suspensión final se transfirió a tubos de microfuga, los cuales fueron incubados por 2h a 30°C. Finalmente se colocaron alícuotas de la suspensión en placas con medio TY con Tc mediante rastrillado. Volúmenes de 200 µL fueron distribuidos uniformemente sobre toda la superficie del medio y las 4 o 5 placas sembradas se incubaron a 30°C por 24h o hasta la visualización de colonias aisladas.

#### **4.4 Análisis mediante *Southern Blot***

Se llevó a cabo la digestión de los ADN genómico de *H. seropedicae* conteniendo pLF1 y pH60 con las enzimas *SacI*, *XbaI* y se les sometió a electroforesis en gel de agarosa durante toda la noche a 20 V. El plásmido pH60 con el inserto (operón *sbm-ygfD-ygfG*) se utilizó como control positivo y como control negativo se utilizó la cepa salvaje Z67 (WT). Como sonda se usó el operón *sbm-ygfD-ygfG*, amplificado a partir del ADN genómico de *E. coli*,

marcado con biotina. Se utilizó el sistema NEBlot™ Phototope Kit (Biolabs, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **4.5 Evaluación de la producción de PHAs por *H. seropedicae***

Las células a las que se transfirió el vector con el inserto (pLFI) (Tabla 2) y el vector sin inserto (pHC60) fueron analizadas para evaluar la producción de PHAs. Se utilizó la cepa salvaje Z67 como control. Las bacterias se cultivaron en LGI líquido (Anexo 1) por 48 h. Se le adicionó cobalamina 1 µg/mL (B<sub>12</sub>) al medio de cultivo ya que esta vitamina es requerida como cofactor de la enzima Sbm (Aldor et al., 2002). Una vez transcurrida la incubación, se procedió a tomar una alícuota del cultivo para medir la masa seca celular (biomasa) y el resto se utilizó para aislar el PHA. El método de aislamiento se indica en el Anexo 3. Se determinó masa seca celular, cantidad y composición de PHAs.

##### **4.5.1 Masa seca celular**

La biomasa fue determinada por gravimetría después de centrifugar 25 mL del cultivo a 6000 rpm por 15 min a 10°C. Posteriormente se lavaron las células dos veces con agua destilada. Las células se colocaron en microtubos de 1.5 mL y se llevaron al horno a secar a 100°C por 24 h. Después del secado a 100°C, los tubos se colocaron durante 20 min aproximadamente en un desecador a temperatura ambiente, para luego pesarlos en una balanza analítica. Se determinó la masa seca celular (MSC) por la siguiente ecuación:

$$MSC = [(MMC - MT)/VOL ]$$

MMC = peso del tubo y células después del secado (mg)

MT = peso de los tubos (mg)

VOL = volumen de la suspensión centrifugada (mL)

Cabe aclarar que los tubos de 1.5 mL fueron previamente secados y pesados antes de colocar las células.

Se calculó también el contenido de PHA como porcentaje de PHAs producido en relación al MSC:

Contenido de PHA =  $m_{\text{PHA}} / \text{VOL}_{\text{PHA}} / \text{MSC} / \text{VOL}_{\text{MSC}}$

$m_{\text{PHA}}$ : masa de PHA obtenida (mg)

$\text{VOL}_{\text{PHA}}$ : Volumen de cultivo a partir del cual se aisló PHA (mL)

MSC: peso seco celular (mg)

$\text{VOL}_{\text{MSC}}$ : Volumen de la suspensión centrifugada (mL)

#### 4.5.2 Cantidad y composición de los PHAs

La cantidad y composición de PHA fueron determinadas mediante cromatografía de gases (GC-FID) de los propil-ésteres derivados. Los análisis se llevaron a cabo en la Facultad de Ingeniería. Se aplicó el método de Riis y Mai (1988) con algunas modificaciones, el cual involucra una propanólisis del PHA contenido en las muestras de células secas. Se mezclaron 5 mg de muestra de polímero (o 10 a 15 mg de células), 2 mL de 1,2-dicloroetano (DCE), 2 mL de una mezcla propanol: HCl (4:1) y 200  $\mu\text{L}$  de estándar interno (solución de 0,1000 g de ácido benzoico en 10 mL de propanol). Los tubos fueron cerrados fuertemente, agitados y sometidos a propanólisis por 2 h a 120°C, con agitación periódica para hidrolizar el polímero y convertir los monómeros a sus correspondientes propil-ésteres. Después de enfriar, se agregó 1 mL de agua destilada a cada tubo. Se agitó en vortex por 1-3 min. Después se centrifugó para separar la fase acuosa (superior) de la fase orgánica (inferior). Se tomó la fase orgánica para ser analizada. La misma fue secada con

una punta de espátula de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Se centrifugó nuevamente el tubo para sedimentar el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. Se realizó el análisis de los propil-ésteres derivados de los hidroxiaácidos mediante la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de la muestra en un cromatógrafo de Shimadzu corp. serie GC-14B equipado con una columna de Agilent Technologies (DB- WAX; 30 m de alto; 0,25 mm de diámetro; 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor del film) y un sistema de detección de Ionización de llama (FID). El análisis fue llevado a cabo bajo las siguientes condiciones.

Gas de arrastre: Hidrógeno (Presión: 50 KiloPascal)

Temperatura del inyector: 200°C; Temperatura del detector: 250°C; Programa de temperatura: la corrida se inició a 80°C, la cual fue mantenida por 2 min, se aumentó 35°C/min hasta 160°C y se mantuvo esta temperatura durante 5 min. Luego se aumentó 35°C/min hasta 220°C y se mantuvo durante 2 min. Se utilizó ácido benzoico como patrón interno.

Los propil-ésteres de butirato y valerato fueron utilizados como estándares para determinar la presencia de éstos en las muestras. Se utilizaron dos estándares, uno correspondiente al co-polímero P(3HB-co- 3HV) con un porcentaje de HV del 12% (SIGMA-ALDRICH). El otro estándar utilizado corresponde al PHB (código 070845/1) (Fluka, Gillingham, UK).

#### **4.6 Inoculación de las bacterias en las plantas de rabanito.**

Las semillas de *Raphanus sativus* (rabanito) fueron obtenidas de Fundación Logros (Montevideo, Uruguay). Las mismas se descontaminaron con un lavado en hipoclorito 50% por 1 min, ocho lavados de agua destilada estéril, un lavado con etanol 70% durante 30 seg y ocho lavados mas de agua destilada estéril. Se sembraron las semillas de rabanito (previamente descontaminadas) en una placa con agar-agua 12%. A las 48 h se procedió a

inocular las semillas germinadas con las bacterias a ensayar. Para ello, las bacterias se cultivaron *overnight* en 5 mL de caldo TY. Se centrifugó 3 mL del cultivo durante 5 min a 6000 rpm y se resuspendieron las células en 1 mL de agua destilada. Luego ese volumen se utilizó para inocular las plántulas en la placa con agar-agua.

#### **4.7 Microscopía de fluorescencia.**

La microscopía de fluorescencia de *H. seropedicae* marcada con GFP (pHC60, Cheng y Walker, 1998) se hizo con un microscopio Olympus IX81 invertido motorizado (Center Valley, PA). Se tomó una muestra de la raíz de la plántula de rabanito inoculada con bacterias (previamente crecidas en medio TY *overnight*) y se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada. La muestra se examinó con luz transmitida y microscopía de fluorescencia para visualizar las bacterias marcadas con GFP.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Amplificación por PCR de los genes *sbm-ygfD-ygfG***

Inicialmente se procedió a clonar el operón truncado *sbm-ygfD-ygfG* a partir del ADN genómico aislado de *E. coli*. La región *sbm-ygfD-ygfG* contiene los genes necesarios para la síntesis de propionil-CoA a partir de succinil-CoA utilizando glucosa como fuente de carbono. El plásmido utilizado como vector fue el pHC60, derivado de pSW213 (Chen y Winans, 1991). El mismo contiene un gen que codifica para una proteína verde fluorescente GFP (GFP-S65Y) (Heim et al., 1995). Además contiene una secuencia estabilizadora RK2 y un

gen de resistencia a Tc (Tc<sup>r</sup>) (tabla 2, figura 13). Al plásmido pHC60 se le extrajo la región *gfp* y se clonó el fragmento amplificado en su lugar. Esto se realizó mediante la digestión separada del plásmido y el inserto con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI* (generan extremos cohesivos) y posterior ligación. La digestión con estas enzimas eliminó el gen *gfp* ligado en el sitio *XhoI* del vector. Se realizó la extracción del gen *gfp*, dado que la expresión de esta proteína consume energía, que podría ser utilizada para la síntesis del polímero o formación de biomasa. La figura 14 indica la región amplificada del genoma de *E. coli*.

Inicialmente se amplificó un fragmento de 4,4 kb. Posteriormente, este amplicón se lo usó como templado para amplificar un fragmento interno de 3,9 kb, de acuerdo a lo indicado en Materiales y métodos. Éste último fragmento contenía los sitios de restricción para las enzimas *SacI* y *XbaI*, para facilitar la ligación entre el fragmento amplificado y el plásmido pHC60 digerido con la enzima. Este fragmento digerido y purificado fue ligado con el vector. La relación molar inserto:vector fue 5:1.

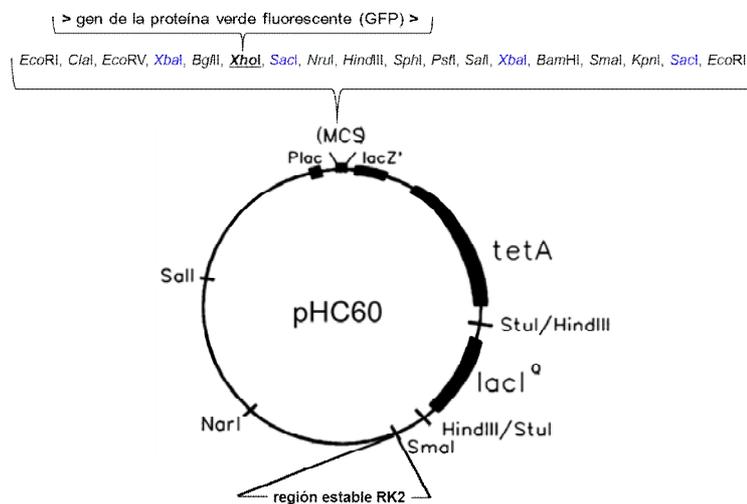


Figura 13. Mapa del plásmido pHC60 con los genes y sitios de restricción. La flecha negra indica la ubicación del gen *gfp*. Imagen tomada y modificada de Chen y Winans, 1991.

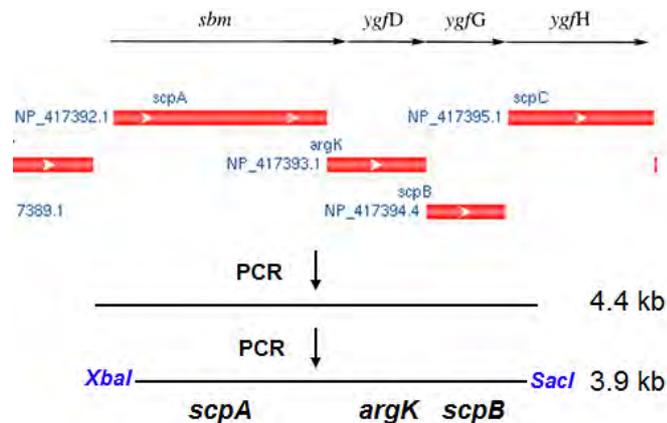


Figura 14. Región del genoma de *E. coli* 1655 amplificada mediante PCR. Parte del operón *sbm* (*scpA*) fue amplificado por PCR. Primero se amplificó un fragmento de 4,4 kb el cual fue usado como templado para amplificar un fragmento de 3,9 kb. Este último tenía sitios de restricción en los extremos para las enzimas *XbaI* y *SacI*.

## 5.2 Construcción de *H. seropedicae* Z67 (pLF1)

La mezcla de reacción de ligación se usó para transformar células de *E. coli* químicamente competentes. Las células transformadas se sembraron en placas con medio LB y tetraciclina, donde sólo crecieron, supuestamente, aquellas colonias que tenían el plásmido.

A partir de los clones seleccionados se realizaron *minipreps* para verificar la presencia del plásmido deseado. Al analizar los productos de la miniprep por electroforesis en gel de agarosa, en algunos clones se visualizó una banda intensa del tamaño esperado, correspondiente al plásmido, al cual denominamos pLF1. Por electroporación se transfirió la construcción deseada a células electrocompetentes de *H. seropedicae* Z67 y del mutante *fliF*. La suspensión de células transformadas se extendió en placas con medio TY y

antibiótico (Tc). Se seleccionaron cuatro colonias y las mismas fueron reaisladas. En presencia de tetraciclina presumimos que sólo crecieron en los medios selectivos aquellas colonias de *H. seropedicae* que contenían el plásmido aunque algunas podrían crecer de manera espontánea. También se transformó *H. seropedicae* con el plásmido pHc60 sin el inserto. Esto se realizó para posteriormente evaluar la influencia del vector sólo en la producción de PHAs.

En la figura 15 se indica el perfil electroforético obtenido a partir de los productos de amplificación del operón de *E. coli* y de la miniprep del vector pHc60. Se obtuvieron colonias transformantes a partir de la cepa WT. Sin embargo, el mutante *fliF* no pudo ser transformado. Asimismo, se transformó la cepa salvaje Z67 con pHc60.

La cepa *fliF* tiene una mutación en un gen que codifica para una proteína del flagelo bacteriano. La misma es detectada en la planta como un PAMP y se cree que la mutación en esta proteína puede favorecer la colonización de la planta hospedera por parte del microorganismo (Gómez y Boller, 2002). Asimismo, la bacteria no móvil, al gastar menos energía, podría acumular mayor cantidad de PHB. Por estas razones, esperábamos que el usar un mutante *fliF* nos permitiese obtener un rendimiento mayor en la producción de PHB, así como una mayor biomasa de bacterias asociadas con la planta hospedero.

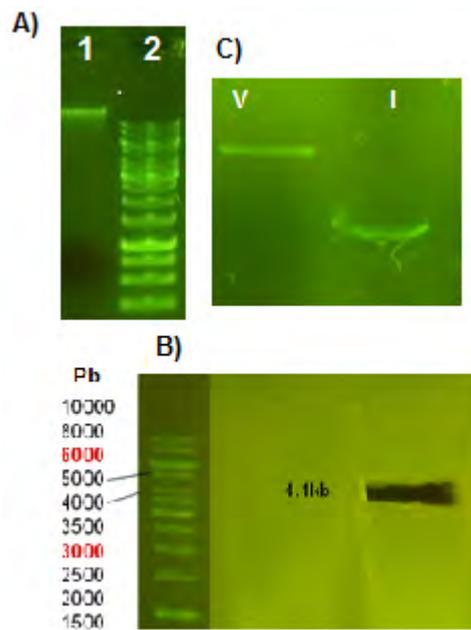


Figura 15. **(A)** Fragmento amplificado a partir del ADN genómico de *E. coli* 1655 indicado en el carril 1. El carril 2 corresponde al marcador de peso molecular (Fermentas, NY, US). El operón fue amplificado por PCR. **(B)** Fragmento de 4.4 kb amplificado por PCR. **(C)** fragmento 3.9 kb y el plásmido pHC60. El carril **v**) vector lineal pHC60 al que se le extrajo el gen *gfp* mediante corte con *Xba*I y *Sac*I e **I**) inserto digerido con *Xba*I y *Sac*I. El plásmido lineal (**v**) fue purificado a partir de gel de agarosa y ligado al fragmento (**I**) de 3.9 kb para formar pLF1.

### 5.3 Verificación de la presencia del plásmido en *H. seropedicae* transformadas con el vector pLF1.

La cepa Z67 fue transformada con el plásmido pHC60 y pLF1. Las colonias seleccionadas en medio TY con Tc fueron capaces de crecer en medio TY líquido y sólido en presencia de Tc pero no así la cepa salvaje. Los resultados se pueden observar en la figura 15. En el caso de la siembra en placa de TY con Tc, se pueden observar las colonias de *H. seropedicae* Z67

(pHC60) y Z67 (pLF1). No se observaron colonias al sembrar la cepa salvaje. En el caso de los cultivos en medio líquido se observó turbidez en los matraces sembrados con *H. seropedicae* Z67 con los plásmidos pLF1 y pHC60. No se visualizó turbidez en el matraz inoculado con la cepa Z67 salvaje (figura 16). Posteriormente se procedió a verificar la presencia del plásmido mediante *Southern Blot*. Los resultados obtenidos se indican en la figura 17.

Se puede observar la presencia del inserto tanto en la cepa Z67 pLF1 como en el control positivo. Hubo también digestión del plásmido en las cepas Z67 pLF1, Z67 pHC60 y en el control positivo, pudiéndose observar dos bandas.

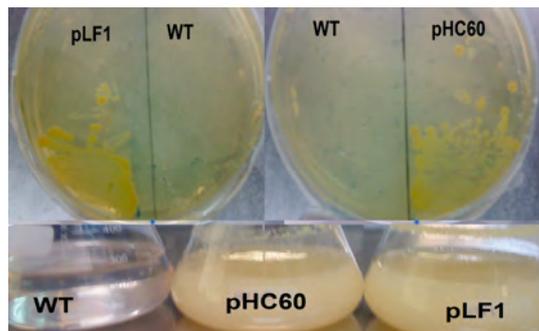


Figura 16. Cultivo de bacterias en medio sólido y líquido. Las placas con medio TY con agar y Tc<sub>10</sub>. Los matraces contenían medio LGI con Tc<sub>10</sub> y cobalamina.

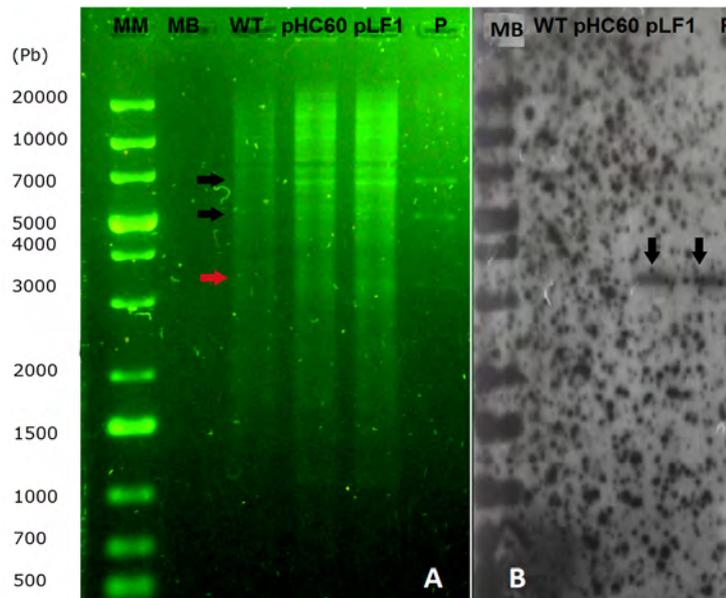


Figura 17. **A)** Perfil electroforéticos de la digestión de ADN genómico y plasmídico con *EcoRI*. Las flechas negras indican los fragmentos correspondiente a la digestión del ADN plasmídico y la flecha roja indica el inserto liberado del mismo. **B)** Resultado del *Southern Blot*, las flechas indican la unión de la sonda compuesta por el inserto *sbm* completo. MM (Marcador Molecular) MB (Marcador pre-biotinilado cuyos tamaños de fragmentos se indican al costado de la figura A pero se visualizan en la figura B, WT (ADN genómico de la cepa salvaje Z67), pHC60 (ADN genómico de la cepa Z67 (pHC60), pLF1 (ADN genómico de la cepa Z67 con el plásmido pHC60 y el inserto), P (plásmido, control positivo).

#### 5.4 Microscopía de fluorescencia

Se sembraron plantas de rabanito inoculadas con *H. seropedicae* Z67 conteniendo el plásmido pHC60 con el gen *gfp*. A los 30 min de inoculadas, se podían ver las bacterias dentro de las raíces de las plantas pero no presentaban movilidad. Sin embargo, a las dos horas de inoculación, las bacterias se observaban muy activas dentro de las raíces. La figura

18 indica la colonización de las bacterias en las plantas de rabanito. Previamente se habían realizado los controles positivos y negativos. Como control positivo se utilizaron raíces de *Arabidopsis* dado que en estudios anteriores se había verificado que era colonizada por *H. seropedicae*. Como control negativo se utilizaron raíces secas y se observó que no había colonización.

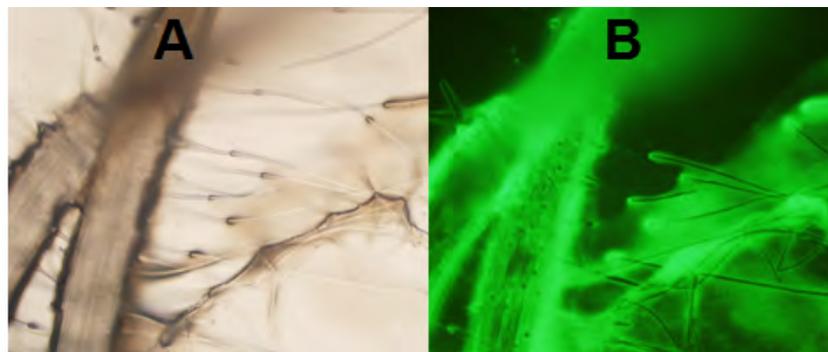


Figura 18. Planta de rabanito (*R. sativus*) a las 2 h de inoculadas con bacterias *H. seropedicae* portadoras del gen *gfp* vistas en microscopio 40X de A) campo claro, y B) fluorescencia.

### 5.5 Masa seca celular y aislamiento de PHAs.

Se determinó el contenido y la composición de los PHAs de las bacterias Z67 (WT) y Z67 (pLF1). Se variaron las concentraciones de cobalamina en el medio para ver como influía en la producción de los PHAs y también se tomaron muestras a distintas horas. Asimismo, se determinó la concentración de PHAs en el cultivo de la cepa Z67 (pHC60) para determinar si el plásmido influía en la producción de los mismos. La figura 19 muestra los cultivos bacterianos a las 52 h de inoculadas en distintas condiciones.

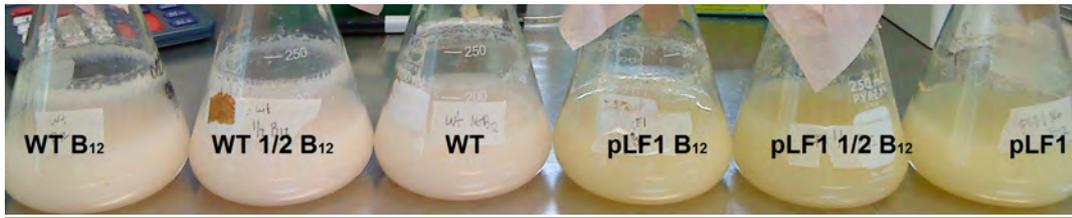


Figura 19. Bacterias inoculadas en distintas condiciones en 150 mL de medio LGI. B<sub>12</sub> hace referencia a que se adicionaron 150  $\mu$ L de la vitamina de concentración stock 1mM siendo la concentración final en el medio de 1  $\mu$ M.  $\frac{1}{2}$  B<sub>12</sub> hace referencia a una concentración de vitamina en el cultivo de 0,5  $\mu$ M. El nombre solo indica que no se adicionó vitaminas al medio.

## 5.6 Evaluación de la producción de PHAs por *H. seropedicae*

Se examinaron varias muestras colectadas y se procedió a medir la masa por gravimetría tanto de los PHAs como de la MSC. Si bien los resultados obtenidos contienen grandes errores sistemáticos y aleatorios, este ensayo nos permitió tener un valor aproximado de la cantidad de PHA obtenido por volumen de cultivo celular. Los resultados se indican en la Tabla 3. Los valores marcados con \* indica que los PHAs fueron aislados a partir de MSC obtenido de un volumen de medio de cultivo de 250mL. En la muestra pH60 del 24/2 se aisló PHA a partir de una MSC de 0,0559g, mientras que la muestra de pLF1 del 24/2 se aisló PHA a partir de una MSC de 0,0520g.

Tabla 3. Valores obtenidos de MSC y PHA por gravimetría. En la muestra pHc60 del 24/2 se aisló PHA a partir de una MSC de 0,0559 g, mientras que la muestra de pLF1 del 24/2 se aisló PHA a partir de una MSC de 0,0520 g. Los valores obtenidos los días 24/2 y 5/3 corresponden a cultivos de 44 h mientras que las muestras del 9/3 corresponden a cultivos de 52 h.

Muestras	Masa (g)	Volumen (mL)	MSC (g/L)	Masa PHA (g)	Volumen (mL)	PHAs (g/L)	PHA/MSC (%)
Z67 pHc60 24/2 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,32	250	1,28	0,02*	-----	-----	-----
Z67 pLF1 24/2 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,34	250	1,36	0,02*	-----	-----	-----
Z67 WT 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,06	25	2,40	0,17	200	0,85	35,4
Z67 pHc60 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,06	25	2,40	0,17	200	0,85	35,4
Z67 pLF1 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,05	25	2,00	0,18	200	0,9	45,0
Z67 WT 9/3 sin B <sub>12</sub>	0,10	10	10,0	0,18	100	1,8	18,0
Z67 WT 9/3 0,5 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,09	10	9,00	0,14	100	1,4	15,6
Z67 WT 9/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,10	10	10,0	0,11	100	1,1	11,0
Z67 pLF1 9/3 sin B <sub>12</sub>	0,06	10	6,00	0,04	100	0,4	6,7
Z67 pLF1 9/3 0,5 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,08	10	8,00	0,08	100	0,8	10,0
Z67 pLF1 9/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,10	10	10,0	0,06	100	0,6	6,0

A partir de los MSC se tomaron muestras para hacer la propanólisis y poder cuantificar y caracterizar los PHAs por GC. La figura 20 indica el cromatograma del estándar de copolímero

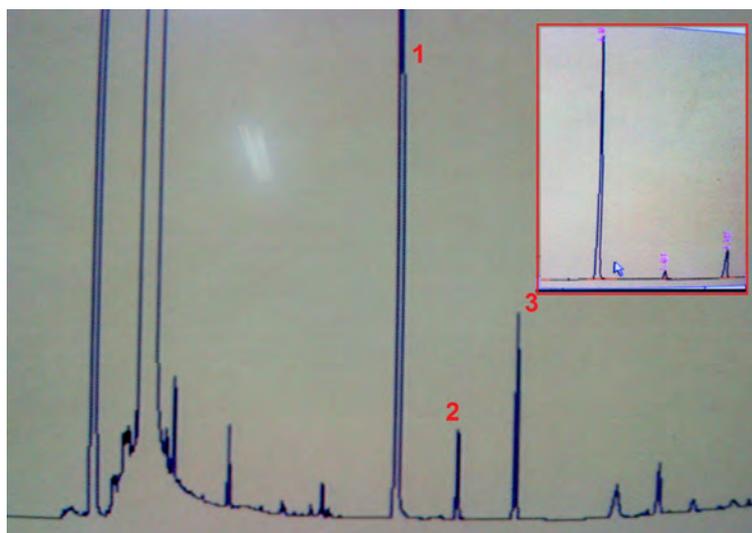


Figura 20. Cromatograma del copolímero. El número **1** corresponde al pico de 3HB de propilo (monómero de 3HB derivatizado) (Tiempo: 6.470, Área 133676), el número **2** corresponde al pico de 3HV de propilo (monómero de HV derivatizado) (Tiempo: 7.179, Área 16923) y el número **3** corresponde al ácido benzoico derivatizado (Tiempo: 8.306, Área 12012). Se le realizó propanólisis a 0.0340 g de estándar de copolímero.

En la propanólisis del estándar de copolímero P(HB-co-HV) se observó que éste no se disolvía y por lo tanto hidrolizaba completamente. Al suponer que la relación entre 3HV y 3HB se mantenía en la fracción disuelta (12% w/w del copolímero estándar es 3HV), se procedió a utilizar otro estándar de PHB puro. Este último se disolvió completamente. Con los datos obtenidos para el estándar de PHB puro se procedió a hacer una curva de calibración y su regresión lineal. La ecuación obtenida (Fig. 20) se utilizó para estimar la masa "real" de 3HB que se disolvió en el copolímero y sabiendo la relación 3HB:3HV (12% de HV), determinar la masa "real" de 3HV que se disolvió y sufrió propanólisis. Una vez obtenidos los valores, se realizó la curva de calibración para 3HV y se procesaron las muestras. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 4. La figura 21 muestra las curvas de calibración para el PHB puro y 3HV del copolímero estándar.

Ejemplo de procesamiento de datos de los estándares:

Del análisis de regresión lineal de HB puro se obtuvo la siguiente ecuación:  $y=361,25x+0,4533$ . X corresponde a la masa de 3HB e Y a la relación de áreas de 3HB/Ac Benzoico

Del copolímero se obtuvo un área de 3HB/Ac Benz 11,13, correspondiente a una masa de copolímero pesada de 0.0340 g. Dado que el copolímero no se disolvió completamente, el 3HB detectado era sólo parte del presente en el copolímero. Entonces se utilizó la ecuación previa para calcular la masa verdadera de copolímero que fue afectada por la propanólisis.  $X=(y-0.4533)/361.25$ . Dado que  $y= 11,13$ , se obtuvo un  $x$  de 0.030, correspondiente a la masa del 3HB del copolímero afectada por la propanólisis. Suponiendo que en la fracción hidrolizada, la proporción entre HV y HB se mantuvo, se calculó la masa de 3HV del copolímero que fue afectada por la propanólisis. De ese modo, la masa de 3HB disuelto fue 0.030 g correspondiente al 88% del copolímero y el restante 12% sería 3HV. Por lo tanto, la masa de 3HV=  $(\text{masa}_{\text{HB}} \times 12)/88 = 0.0041$  g. Con las masas obtenidas para 3HV y las áreas correspondientes a 3HV, se realizó una curva de calibración para el mismo (Fig. 20). Los valores se indican en la tabla 4.

Una vez obtenidas las curvas de calibración se procedió a determinar los valores a partir de las muestras. Las muestras se midieron por duplicado. Los resultados se indican en la tabla 5 y 6. Los PHAs purificados a partir de las cepas Z67 (pLF1) y Z67 (pHC60) presentaban contaminación en todos los cultivos. Estos contaminantes se trataron de extraer generando una pérdida de masa que estaría afectando los resultados de la Tabla 5.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la estimación de la masa real afectada por propanólisis para el copolímero. La masa de 3HB "real" corresponde a la masa de 3HB contenida en el copolímero que se disolvió. A partir de la misma se calculó el "3HV real" contenido en el polímero que se disolvió. El % perdido corresponde a la masa del copolímero estándar que no se disolvió (ver figura 20).

Estándares	Masa (g)	Masa HB "real"	% Perdido	HV real (g)
Copolímero	0,0340	0,0297	0,85	0,0041
Copolímero	0,0581	0,0470	8,04	0,0064
Copolímero	0,1130	0,0870	12,55	0,0119
Copolímero	0,0915	0,0706	12,29	0,0096
Copolímero	0,0940	0,0779	5,79	0,0106
PHB puro	0,0032	-----	-----	-----
PHB puro	0,0198	-----	-----	-----
PHB puro	0,0513	-----	-----	-----
PHB puro	0,0788	-----	-----	-----
PHB puro	0,0986	-----	-----	-----

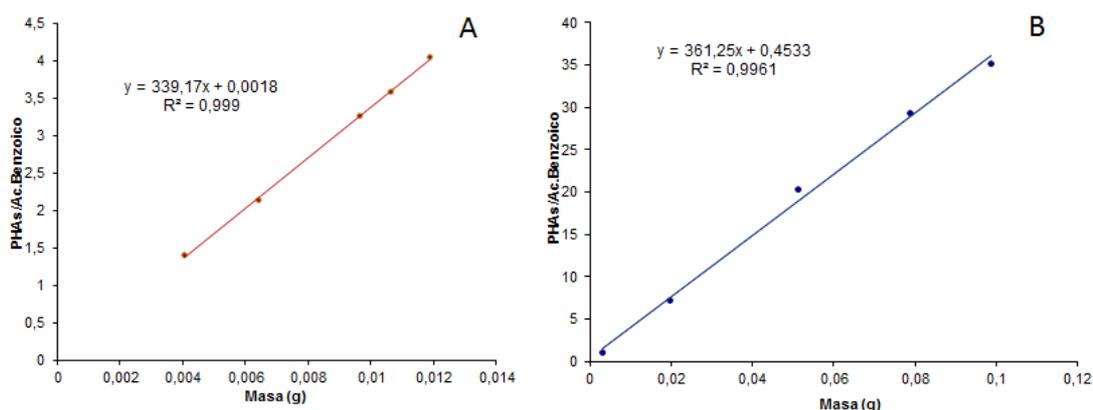


Figura 21. Curva de calibración de 3HV (A) y 3HB (B). La curva de calibración de 3HV se hizo a partir de la masa 3HV "real" calculado. En el caso de PHB, la curva es masa pesada del estándar PHB polímero vs. el cociente de 3HB de propilo/ Benzoato de propilo. En el caso de 3HV no corresponde al copolímero pesado, sino a la fracción calculada de 3HV en el copolímero.

Tabla 5. Valores obtenidos a partir del análisis mediante del GC-FID para las distintas muestras. El Ac. Benzoico fue utilizado como patrón interno. El valor de masa corresponde a la masa pesada que se sometió a propanólisis. La masa de HB y HV se calculó a partir de los estándares de PHB y copolímero.

Muestras	Masa (g)	HB		HV		Ac. Benzoico		HB/ AcB	HV/ AcB	Masa HB	Masa HV
		Tiempo	Área	Tiempo	Área	Tiempo	Área				
Z67pLF1 24/2 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0652	6,467	110053	7,407	3681	8,307	17050	6,45	0,22	0,01661	0,000631
Z67pHC60 24/2 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,1221	6,493	196721	7,474	5746	8,311	15703	12,53	0,37	0,03342	0,001074
Z67 pLF1 5/3 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0113	6,451	9889	Muy Bajo	Muy bajo	8,300	12401	0,80	-----	0,00095	-----
Z67pHC60 5/3 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0095	6,468	8537	Muy Bajo	Muy bajo	8,314	11372	0,75	-----	0,00082	-----
Z67WT 5/3 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0125	6,467	17508	Muy Bajo	Muy bajo	8,314	11870	1,47	-----	0,00283	-----
Z67pLF1 9/3 sin $\text{B}_{12}$	0,0192	6,516	32269	7,452	1005	8,351	15726	2,05	0,06	0,00443	0,000183
Z67pLF1 9/3 0.5 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0174	6,465	23364	7,23	1135	8,327	15840	1,48	0,07	0,00283	0,000206
Z67pLF1 9/3 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0194	6,461	40584	7,412	1185	8,313	15936	2,55	0,07	0,00579	0,000214
Z67WT 9/3 sin $\text{B}_{12}$	0,0266	6,476	71178	7,404	1407	8,33	16990	4,19	0,08	0,01034	0,000239
Z67 WT 9/3 0.5 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0286	6,529	82015	7,457	1295	8,354	15140	5,42	0,09	0,01374	0,000247
Z67 WT 9/3 1 $\mu\text{M B}_{12}$	0,0253	6,475	65242	7,416	1181	8,315	13317	4,90	0,09	0,01231	0,000256

En todas las muestras de la tabla 6 se puede observar que la mayor parte de PHAs acumulados estaban compuestos por 3HB. Las mayores cantidades de 3HB se obtuvieron de polímeros acumulados en la cepa salvaje. En cambio, la mayor cantidad relativa de 3HV se obtuvo en la cepa Z67 (pLF1), aunque no alcanzó un valor significativo. En algunos casos, el 3HV no se pudo detectar. Por otro lado, también se observó la presencia de picos con el mismo tiempo de retención de 3HV aún en la cepa salvaje en ausencia de vitaminas.

También se procedió a realizar propanólisis de los PHAs aislados. La tabla 7 indica los resultados obtenidos.

Tabla 6. Cálculos realizados para 3HB y 3HV de las distintas muestras de peso celular seco. La masa de HB y HV se calculó a partir de la curva de calibración obtenida para los estándares de PHB y copolímero.

Muestras	Masa 3HV/Masa HB	Masa HB/Masa celular	Masa HV/Masa celular
Z67 pLF1 24/2 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,038	0,255	0,010
Z67 pHC60 24/2 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,032	0,274	0,009
Z67 pLF1 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	-----	0,084	-----
Z67 pHC60 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	-----	0,087	-----
Z67 WT 5/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	-----	0,226	-----
Z67 pLF1 9/3 sin B <sub>12</sub>	0,041	0,230	0,010
Z67 pLF1 9/3 0.5 $\mu$ M B <sub>12</sub>	<b>0,073</b>	0,163	<b>0,012</b>
Z67 pLF1 9/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,037	0,299	0,011
Z67 WT 9/3 sin B <sub>12</sub>	0,023	0,389	0,009
Z67 WT 9/3 0.5 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,018	0,480	0,009
Z67 WT 9/3 1 $\mu$ M B <sub>12</sub>	0,021	<b>0,486</b>	0,010

En la tabla 7 se puede observar que la mayor cantidad de 3HV fue producido por la cepa Z67 (pLF1). También en esta cepa se observó una disminución de la producción de copolímero. En las muestras del 5/3 se observa que Z67 (pHC60) produjo más cantidad de HV que Z67 (pLF1) y asimismo presentó la menor producción de PHB. En todos los casos, se observa que la cantidad de HV y la cantidad de HB no llegaron al 100%, lo que implica que pueda haber otros tipos de PHAs que no se estén detectando. En muchas muestras no se pudieron detectar picos con el mismo tiempo de retención de 3HV o estos picos apenas eran observables. Las medidas se hicieron por duplicado y se observó que el error de determinación es de 3HB no fue mayor que la cantidad de HV que se determinó. Esto

permite comparar los datos obtenidos. Cabe destacar que la gravimetría de PHA puede presentar contaminantes adentro y no es lo mejor comparar medidas que se obtuvieron por distintos métodos. De todos modos, estos datos nos permiten hacer una estimación de los contenidos y composición de PHAs en las cepas analizadas.

Tabla 7. Cálculos realizados para 3HB y 3HV a partir de los valores obtenidos del análisis de GC-FID para las distintas muestras de PHAs aisladas. Los espacios con guiones indican que el HV no se detectó y por lo tanto no se realizó el cálculo. La masa de PHA corresponde a la masa pesada de PHA que se sometió a propanólisis.

Muestras de PHA	Relación		
	MasaHV/MasaPHB	MasaHB/Masa PHA	MasaHV/Masa PHA
Z67 WT 5/3 1µM B <sub>12</sub>	0,006	0,670	0,00426
Z67 pHC60 5/3 1µM B <sub>12</sub>	<b>0,019</b>	0,411	0,00792
Z67 pLF1 5/3 1µM B <sub>12</sub>	0,015	0,449	0,007
Z67 WT sin B <sub>12</sub> 9/3	-----	<b>0,929</b>	-----
Z67 WT 0.5µM B <sub>12</sub> 9/3	0,007	0,846	0,006
Z67 WT 1µM B <sub>12</sub> 9/3	-----	0,864	-----
Z67 pLF1 sin B <sub>12</sub> 9/3	-----	0,761	-----
Z67 pLF1 0.5µM B <sub>12</sub> 9/3	-----	0,794	-----
Z67 pLF1 1µM B <sub>12</sub> 9/3	<b>0,013</b>	0,789	0,011

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Clonación y transformación de bacterias

Se amplificó el operón de *E. coli* que codifica para una vía que sintetiza propionil-CoA a partir de succinil-CoA. El mismo se insertó en el plásmido pHC60 que contiene el gen de resistencia a tetraciclina. Como organismos hospederos se utilizó la cepa de *H. seropedicae* Z67 y una cepa mutante para el gen *fliF* derivada de Z67. Esta última no contiene flagelo, siendo incapaz de moverse, pegarse a superficies y de formar biofilms (Rodríguez-Bessolo et al., resultados no publicados). Los clones transformados de la cepa salvaje Z67 y *fliF* se seleccionaron en medio TY con Tc. Se obtuvieron numerosas colonias y se seleccionó una de ellas para los estudios posteriores. La cepa Z67 WT fue transformada exitosamente. Sin embargo, no se obtuvieron resultados con la bacteria mutante *fliF*. La cepa *fliF* fue obtenida mediante inserción del transposón miniTn5. La construcción de estos mutantes se describió y caracterizó anteriormente por Rosconi y col. (2006). El mini-transposón confiere resistencia a kanamicina, contiene el gen *uidA* sin promotor, un *oriV* que funciona como origen de replicación en *E. coli* y dos copias en tándem de un gen que codifica para la proteína GFP. Este último gen parece no expresarse en la cepa mutante o quizás mediante un proceso de recombinación hubo un reordenamiento de los genes resultando en la pérdida de expresión del gen (Tang et al., 1999).

Estos genes podrían estar interfiriendo en la replicación del plásmido. Asimismo el transposón puede que sea incompatible con el plásmido pHC60. En trabajos anteriores hubo problemas para transformar el mutante *fliC* con pHC60 dado que también presenta el transposón mini Tn5. El transposón mini Tn5 presenta un origen de replicación *oriV* de otro plásmido que podría conferir incompatibilidad con el plásmido pHC60 (Tang et al., 1999).

Más experimentos tendría que hacerse para verificar esto. Sin embargo, pLF1 pudo ser introducido en la cepa tipo salvaje, pero no en la cepa *fliF* y este miniTn5 es muy parecido a muchos otros, excepto por el origen de replicación (Wang et al., 2008). En este caso se

podría evaluar el uso de otro plásmido que fuera compatible con la cepa mutante *flIF* o usar otro mutante.

## 6.2 Verificación de la presencia del plásmido en las bacterias transformadas

El plásmido pHC60 contiene el gen que otorga resistencia a tetraciclina. En la figura 16 se muestra que la cepa salvaje Z67 no creció en medio TY en presencia del antibiótico, a diferencia de la cepa con el plásmido pHC60 y pLF1. Se verificó la presencia del inserto en la cepa Z67 (pLF1) mediante *Southern blot*. En la placa revelada se observan muchas zonas oscuras, pudiendo deberse a un mal lavado de la membrana. De todos modos, este ensayo permitió detectar la presencia del inserto. El tamaño de los fragmentos obtenidos (marcados con flechas en la figura 17) eran los esperados para la digestión del genoma de Z67 (pLF1), con *EcoRI*. No detectamos digestión del inserto, ya que éste no contiene sitios de restricción para *EcoRI*.

## 6.3 Microscopía de fluorescencia

Se cultivó una cepa de *H. seropedicae* Z67 conteniendo el gen *gfp* en el plásmido pHC60. El mismo codifica para una proteína verde fluorescente que permite visualizar las bacterias mediante microscopía de fluorescencia. La construcción de la cepa marcada con GFP se llevó a cabo mediante la transformación de las células con el vector pHC60 (Cheng y Walker 1998) utilizando un MicroPulser Bio-Rad (Hercules, CA). La cepa se incubó en medio TY por 24 horas. Luego se tomó 1 mL del cultivo y se colocó en las raíces de las plántulas de rabanito. Las mismas crecieron a partir de semillas colocadas en placas con agar-agua. A las

2 h de inoculada la planta con la bacteria, ésta ya estaba colonizando las raíces y los tallos. Se comprobó, en efecto, la compatibilidad de la bacteria con plantas de rabanito. Esto daría lugar a posteriores investigaciones para evaluar la producción de PHA por *H. seropedicae* en asociación con plantas de rabanito. Se podrían reducir los costos de producción, ya que la bacteria utilizaría los carbohidratos producidos por las plantas (proveniente de la fotosíntesis) como fuente de carbono y energía. Se eligió trabajar con la planta de rabanito dado su fácil cultivo y crecimiento. Además en trabajos previos se había probado trabajar con plantas de zanahoria pero no se obtuvieron los mismos resultados ya que su crecimiento es más lento en comparación a las plantas de rabanito.

En el presente trabajo se utilizó la cepa *H. seropedicae* Z67, dado que coloniza una amplia variedad de plantas. Esto sería favorable para el diseño de un sistema planta-microorganismo para la producción de PHA como se mencionó anteriormente. Si bien su genoma no ha sido secuenciado en su totalidad, este es muy similar a la cepa de *H. seropedicae* SmR1 que ha sido secuenciado (James et al, 2002; Gyaneshwar et al, 2002).

No se evaluó la estabilidad del plásmido en la cepa Z67 (pLF1), algo necesario en caso de que se usara esta cepa para inocular plantas. El empleo de antibiótico no es económicamente viable en términos de producción, por lo que sería necesario realizar este estudio de estabilidad. El mismo se puede hacer mediante repiques seriados a partir de una única colonia y determinar el número de células viables (UFC) en los subcultivos, al ser sembrados en placas con medio TY en presencia de antibiótico. Cabe destacar que el plásmido pHC60 presenta una región estable RK2 que evita que se pierda el plásmido con facilidad. Otra alternativa sería generar luego cepas recombinantes con los genes insertos en el cromosoma.

#### 6.4 Evaluación de la producción de PHAs por *H. seropedicae*

Este polímero se trató de purificar y esto último generó una pérdida de material que probablemente afectó los resultados. La baja concentración de PHA obtenida probablemente se debió a pérdidas en el proceso de purificación de PHA. La biomasa de Z67 (WT) sin B<sub>12</sub> 9/3 fue la más alta de todos los ensayos realizados (10g/L), así como también su concentración de PHA (1,8 g/L) (Tabla 3). Sin embargo, la cantidad de 3HB no fue la más alta en comparación a la biomasa obtenida (Tabla 6, 38,9%). En la cepa Z67 (pLF1) 1 μM B<sub>12</sub> 9/3 se obtuvo una alta biomasa pero una menor concentración de PHA (Tabla 3). Esto puede deberse a que la expresión del plásmido requiere energía extra, limitando la producción de PHAs.

Otro factor que podría haber afectado los resultados son las condiciones y el tiempo de incubación de los cultivos. En las últimas muestras se obtuvo una MSC por volumen de 10 g/L (muestras de 9/3). Éstas fueron obtenidas a partir de cultivos incubados durante 52 horas. Se tendría que haber determinado la concentración de glucosa y amonio en el medio para ver si se habían consumido completamente. Esto es importante para determinar la fase de crecimiento de la bacteria y la disponibilidad de un exceso de glucosa en el medio, necesaria para la producción de PHAs. Las muestras del 24/2 y del 5/3 fueron obtenidas a partir de cultivos que tuvieron aproximadamente 44 horas de incubación. Los cultivos con mayor biomasa dieron lugar a un incremento del contenido de PHAs. Estos resultados indican la importancia de efectuar un seguimiento de las condiciones del cultivo, incluyendo la determinación de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno en el medio. Como se informó en la literatura, hay varios factores que influyen en la producción de PHA y el tipo de PHA acumulado. Se necesitan efectuar más estudios con el fin de observar como varía la producción de PHA en *H. seropedicae* Z67 (pLF1) al variar parámetros tales como el pH, temperatura, fuente de C y energía, suministro de vitaminas, etc. Con el fin de mejorar el rendimiento, deberían determinarse las condiciones óptimas de crecimiento y acumulación de PHA, evitando al mismo tiempo utilizar fuentes de carbono y energía costosas. En este caso hubiera sido adecuado realizar una curva de

crecimiento para determinar en qué momento se ingresaba a la fase estacionaria, así como las concentraciones de las fuentes de C y N. Una vez determinadas estas condiciones, se deberían reproducir los cultivos en las mismas condiciones, dado que sólo los cultivos en la misma situación fisiológica serían comparables.

## **6.5 Análisis por GC**

### **6.5.1 Propanólisis a partir de MSC**

Se colectaron las células secas y se las sometió a propanólisis para su posterior análisis mediante GC-FID. Del análisis cromatográfico de los propil-ésteres se observó, en la cepa salvaje, la mayor producción de 3HB (con un tiempo de retención de 6,7 min) y la mayor cantidad de PHAs total. Se observaron picos que eluyeron en el tiempo de retención que correspondía al 3HV derivatizado (7,4 min) pero con un área muy baja, por fuera del rango de la curva de calibración. Si el material eluído fuera 3HV de propilo, la cantidad no fue significativa y no varió muchos entre las diferentes cepas. En cuanto a la relación de 3HV/3HB, se observa que ésta fue máxima en la cepa Z67 (pLF1) cultivada en medio LGI con 0,5  $\mu\text{M}$  B<sub>12</sub>. En este cultivo fue también máxima la cantidad de 3HV derivatizado (Tabla 5). A mayores valores de vitamina B<sub>12</sub> no siempre se observó un aumento en la producción de los 3HV. Esto también se ha observado en las investigaciones de Aldor y col. (2002). En ese trabajo, el aumento de la producción de 3HV, al adicionar vitamina B<sub>12</sub>, fue consistente con la actividad de la metilmalonil-CoA mutasa, dependiente de vitamina B<sub>12</sub>.

En algunas muestras no se detectaron picos que hubiesen eluído en el tiempo de retención correspondiente al 3HV de propilo. Esto puede deberse a la baja masa de MSC o PHA aislado, empleados para la propanólisis. En la propanólisis de los PHAs se observó la máxima producción de 3HB en la cepa salvaje, alcanzando valores de hasta el 93% de los PHAs totales. La máxima producción de 3HV se obtuvo a partir de la cepa Z67 (pLF1)

cultivada en presencia de B<sub>12</sub>. Esta cepa generó una biomasa de 10 g/L con una concentración 3HB de 0,299 por MSC y una concentración de 3HV de 0,011 por MSC. En la cepa Z67 WT se observó un incremento de la producción de PHB en presencia de vitamina B<sub>12</sub>. La presencia de este cofactor parecería influir en la producción de los PHAs (Tabla 6). Sin embargo, se requiere más investigación para determinar el efecto de la vitamina en la producción de PHAs por *H. seropedicae*.

En uno de los proyectos desarrollados previamente en el laboratorio (Proyecto PDT 74-17), se logró incrementar la cantidad de PHB acumulada por *H. seropedicae* Z69 al ser cultivada en medio LGI glucosa, desde un 40% hasta un 60% en relación a la biomasa. Este aumento del contenido se obtuvo variando la cantidad de glucosa y nitrógeno administrado al medio. En tal estudio, se determinó que la relación atómica C/N de 25 era óptima para la acumulación de polímero. En dichos trabajos se observó que al agotarse el amonio, la bacteria entraba en fase estacionaria, deteniendo el aumento de biomasa. En nuestro caso, se trabajó con una relación C/N de 14.1, Si bien no era la óptima, esto permitió alcanzar una producción de PHB de hasta 48,6 % en presencia de B<sub>12</sub> (Tabla 6).

### **6.5.2 Propanólisis a partir de los PHAs aislados**

Para desarrollar este análisis se tomaron muestras de los PHAs aislados y se las sometió a propanólisis. En este caso se obtuvo un resultado no esperado, ya que en las muestras del 5/3, la cepa Z67 (pHC60) produjo más cantidad de 3HV que Z67 (pLF1) (Tabla 7). Este último resultado obtenido indica que si bien la bacteria Z67 (pLF1) contenía el plásmido con el inserto, la expresión de éste probablemente era baja o nula.

Asimismo, Catalán et al. (2007) indicaron que *H. seropedicae* produjo únicamente PHB cuando se utilizaba glucosa como fuente de carbono. Por otro lado, hay claras variaciones en la producción de PHA entre las diferentes cepas analizadas, como Z67 (WT), Z67 (pHC60)

y Z67(pLF1). Esto último estaría indicando que el plásmido en sí podría haber influido en la producción de PHAs. Por otro lado, quizás el operón se expresaba y propionil-CoA se producía por la expresión del plásmido pLF1. Sin embargo, este propionil-CoA pudo ser degradado por la vía metil citrato. Como se mencionó en la introducción, la 2-metilcitrato sintasa condensa una molécula de propionil-CoA y otra de oxalacetato para sintetizar 2-metilcitrato, ingresando así al ciclo del ácido 2-metilcitrato, consumiendo así el propionil-CoA (ver figura 10). Para evitar esto habría que generar una mutación en la vía. Aldor y col. (2002) utilizaron, por ejemplo, una cepa de *Salmonella* mutada en esta vía (gen *prpC*, figura 10).

Otra explicación de la baja expresión de pLF1 podría radicar en la abundancia de isoaceptores de ARN de transferencia. Los organismos generalmente tienen preferencia por el uso de determinados codones. El uso de codones preferenciales varía entre los organismos (Anderson y Kurland, 1990). En este caso puede que la bacteria tenga preferencia por el uso de determinados codones que no se encuentren en el operón y que esto estuviera afectando la traducción de las enzimas. Para verificarlo, habría que identificar los codones que componen el operón y compararlos con los codones comúnmente utilizados por *H. seropedicae*.

Cabe destacar que únicamente se detectó 3HB y 3HV mediante GC-FID, dado que no se contaba con un GC con detector de espectrómetro de masa. Si hubo producción de otro tipo de PHA, el mismo no se detectó. En la tabla 7, en ninguno de los casos se observa que la suma entre HV/PHAs y HB/PHAs sea 1. Esto también podría estar indicando la producción de otros PHAs.

Además, sería conveniente determinar el perfil térmico de las muestras de PHA para verificar la presencia de 3HV formando un copolímero. Para ver si está presente el copolímero, se podría medir la temperatura de fusión de los polímeros. El PHB tiene un punto de fusión a 167 °C pero la presencia del copolímero P(3HB-co-3HV) marcaría una temperatura menor, que va a depender de cuanto 3HV contenga el copolímero.

De acuerdo con los resultados presentados en una tesis grado efectuada en nuestro laboratorio, en *H. seropedicae* Z69, la síntesis de PHB era dependiente de la entrada del cultivo en la fase estacionaria (Malán, 2011). En otros microorganismos, la síntesis de PHB esta ligada al crecimiento y lo acumulan sin importar la fase en la que se encuentre (Khanna y Sivrastava, 2005). En el mismo proyecto, también se observó que, en las condiciones ensayadas, a partir de las 25 horas de crecimiento se iniciaba la fase estacionaria, dando lugar a una disminución de la concentración de amonio, tornándose limitante para el crecimiento. Además, en las mismas condiciones que las nuestras, se obtuvo un contenido de 19% de PHB. Sin embargo, al aumentar la concentración de glucosa a 30 g/L, se obtuvo una mayor producción de PHB (Malán, 2011). Como se mencionó anteriormente, en *H. seropedicae* se expresa la ruta clásica de síntesis de PHB, que involucra la unión de dos moléculas de acetil-CoA para dar lugar a acetoacetil-CoA y su posterior reducción hidroxibutiril-CoA (Catalán et al., 2007).

Catalán y col. (2007) indicaron que después de las 63 horas de un cultivo en *batch*, la cantidad de PHB que generaba *H. seropedicae* era de 1,4 g/L. En estas condiciones se alcanzaba una biomasa total de 3,9 g/L al ser cultivada en presencia de 50 mM de glucosa y 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En este proyecto se llegaron a valores de biomasa de 10 g/L y una cantidad de PHB de hasta 1,8 g/L a las 52 horas de crecimiento, al emplear 55 mM de glucosa y 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Catalán y col. llegaron a valores de PHB de 36%. En este proyecto se observa que la cepa salvaje, cultivada en medio LGI sin  $\text{B}_{12}$  el valor alcanzado de PHB fue del 38,9 %, mientras que la cepa suplementada con  $\text{B}_{12}$  alcanzó valores de PHB de hasta 48,6 %. Los resultados parecen indicar que  $\text{B}_{12}$  estaría influyendo en la producción de PHA. Deberían efectuarse más estudios para determinar el efecto de la vitamina  $\text{B}_{12}$  en la producción de PHB. Los resultados podrían estar indicando la presencia de alguna enzima dependiente de  $\text{B}_{12}$  en el genoma de la bacteria, que estaría influyendo en la producción de PHB.

En el caso de que *H. seropedicae* produjera PHV al ser cultivada en presencia de glucosa, éste no sería totalmente dependiente de la presencia de la vitamina  $\text{B}_{12}$ , ya que se observa la producción en la cepa salvaje sin  $\text{B}_{12}$ . Catalán y col. (2007) en ningún momento detectaron producción de copolímero en la cepa salvaje al ser cultivada en presencia de

glucosa como única fuente de carbono. Esto también podría deberse a que la cantidad de 3HV producida es tan pequeña que fue indetectable en el análisis mediante GC-FID. Asimismo, ellos emplearon la metanólisis como método de derivatización, mientras que en este proyecto se realizó propanólisis. Tal vez estos métodos para producir ésteres presentan diferente sensibilidad que podría explicar las variaciones en los resultados obtenidos.

Como se mencionó en la introducción, se ha visto que Sbm se expresaba de manera funcional *in vitro* pero no *in vivo*, dada su ubicación en un presunto operón sin promotor. Posteriormente, Froese y col. (2009) demostraron que había expresión endógena de Sbm y YgfD en *E. coli*. Por lo tanto, en este trabajo sería también necesario evaluar la expresión de dichos genes realizando un *Northern Blot*. También se podría utilizar anticuerpos anti-Sbm y anti-YgfD para capturar proteínas de un lisado de *H. seropedicae* con el inserto. Asimismo, se le podría realizar las mismas pruebas a la cepa salvaje para descartar la presencia de enzimas similares a Sbm y YgfD.

También se había observado que Sbm era funcional cuando se sobre-expresaba en *E. coli* en un medio que contenía vitamina B<sub>12</sub> (Dayem et al., 2002). Por lo tanto, se puede especular que bajo condiciones de crecimiento estándar, la expresión de Sbm debería ser muy baja para generar una vía funcional y esto podría explicar la producción baja o nula de 3HV. Se podría evaluar la actividad metil malonil-CoA mutasa mediante ensayos de actividad enzimática y determinar parámetros cinéticos para esta enzima utilizando succinato como sustrato (Froese et al., 2009).

Catalán y col. (2007) determinaron la producción de P(3HB-co-3HV) a partir de *H. seropedicae* utilizando ácido nonanoico, un ácido graso, como fuente de carbono y energía. Como nunca se determinó la ruta de síntesis implicada en la producción de 3HV en *H. seropedicae*, sería necesario el aislamiento y estudio de mutantes en los genes que codifican para las enzimas que se presume están involucradas en la  $\beta$  oxidación.

Para buscar optimizar la producción de PHAs, Slater y col. (1999) diseñaron un sistema de producción de P(HB-co-HV) en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. A la misma se le insertó

la vía de desaminación de treonina de *E. coli* para la producción de propionil-CoA que da lugar a HV. Sin embargo, la producción de copolímero fue muy baja. A diferencia de las plantas transgénicas, la fermentación clásica ha sido muy exitosa (Aldor et al., 2002). El problema es el alto costo la producción de P(HB-co-HV) y que la adición de propionato no es económicamente rentable (Slater et al., 1999). Por otro lado, el agregado de cofactores (por ejemplo vitamina B<sub>12</sub>) también es costoso (Chen et al., 2011). Como alternativa, Chen y col. (2011) diseñaron una cepa de *E. coli* recombinante para producir P(HB-co-HV). La misma alcanzó una producción de copolímero con hasta un 17,5% de 3HV respecto al total del copolímero a partir de una fuente de carbono no relacionada. El 3HV se sintetizó a través de la vía treonina desaminasa al igual que *Arabidopsis*, dado que esta ruta de síntesis no implica el agregado de cofactores. Se observó que el paso limitante para la formación de propionil-CoA era la desaminación de la treonina. Además, para inhibir el catabolismo endógeno de propionil-CoA, se mutó la vía de ciclo ácido metil-cítrico mediante la eliminación del gen *prpC*, al igual que Aldor y col. y la vía de los ácidos tricarbóxicos, mediante la delección del gen *ygfH* (*scpC*). Inesperadamente, la supresión del gen *prpC* no generó un aumento significativo de la fracción 3HV. Sin embargo la supresión del gen *ygfH* aumentó significativamente la fracción 3HV en el copolímero. Esto indicó que la propionil-CoA en *E. coli* se desvía preferentemente al ciclo de Krebs en lugar del ciclo ácido metil-cítrico (Chen et al., 2011). En este trabajo, el operón insertado en *H. seropedicae* no contenía el gen *ygfH*. Sin embargo, se realizó una búsqueda en un banco de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se encontró un gen de *H. seropedicae* (0039), con secuencia similar a *ygfH*. Por lo tanto, puede que este gen esté en *H. seropedicae* Z67 y codifique para una enzima que catabolice el propionil-CoA vía ácidos tricarbóxicos, evitando la síntesis de hidroxivaleril-CoA. Para verificar esto se podría diseñar cebadores para amplificar la región de este gen a partir del genoma de *H. seropedicae* Z67 y en el caso de obtener un producto, se podría secuenciar. En caso de tener verificado que *H. seropedicae* Z67 presenta dicho gen, se podrían hacer mutaciones y ver como afecta esto la producción de copolímero.

## 7. CONCLUSIONES

- Se logró transformar la cepa Z67 con el plásmido pLF1. Sin embargo, no se logró obtener clones transformados a partir de la cepa mutante *fliF*, por una posible incompatibilidad entre el transposón mini Tn5 y el vector original pHC60, del cual deriva pLF1. La presencia del plásmido en Z67 fue verificada por *Southern blot*.
- *H. seropedicae* Z67 colonizó plantas de rabanito 2h después de inoculada la bacteria en las raíces de la planta.
- Hubo producción de 3HB en las cepas Z67 WT, Z67 (pHC60), Z67 (pLF1), alcanzando un contenido del orden de 48,6% de la masa seca celular en la cepa salvaje Z67 crecida en medio LGI con glucosa 55 mM y 20 mM de amonio y en presencia de 1  $\mu$ M de vitamina B<sub>12</sub>.
- El contenido de 3HV en el polímero purificado fue muy bajo. La baja concentración de HV puede deberse a la baja expresión del plásmido o catabolismo del propionato por la vía 2 metil citrato o vía ácidos tricarbóxicos.
- Del análisis por GC-FID se observó en la cepa Z67 y Z67 (pLF1), "picos" que eluyeron con tiempos de retención que correspondían al 3HV.
- La vitamina B<sub>12</sub> parece influir en la síntesis de PHAs en la cepa salvaje y la cepa pLF1.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar la expresión de las enzimas del operón truncado *sbm-ygfD-ygfG* en *H. seropedicae* Z67 (pLF1) mediante *Northern Blot*, *Western Blot* o medida de la actividad enzimática.
- Determinar la síntesis de otros monómeros además de 3HB y 3HV mediante GC con detector de espectrómetro de masa, a partir de células cultivadas en medio LGI con glucosa como fuente de carbono en las cepas estudiadas.
- Mutar la vía 2 metil citrato (responsable del catabolismo de propionato) y observar si hay una mejora o cambio en la composición de PHAs.
- Verificar la presencia del gen *ygfH* en *H. seropedicae*, que podría estar influyendo en el catabolismo de propionato.
- Determinar la producción de PHAs a partir de *H. seropedicae* Z67 y Z67 (pLF1) durante su asociación con plantas de rabanito.
- Estudiar la estabilidad del plásmido en la bacteria.
- Determinar si la vitamina B<sub>12</sub> ejerce un efecto en la producción de PHAs tanto en la cepa salvaje Z67 como en Z67 (pLF1) y Z67 (PH60)
- Realizar un perfil térmico de las muestras de PHAs para verificar la presencia de 3HV y en el caso que haya, establecer que el mismo esté formando el copolímero con 3HB y determinar el porcentaje de composición de 3HV en el mismo.
- Dado que no se pudo transformar el mutante *fliF* con el plásmido pLF1, se debería generar un mutante *fliF* mediante un *knock-out* y luego transformarlo con el plásmido pLF1, de modo de analizar el efecto de su expresión en la producción de PHAs.



## 9. REFERENCIAS

Aldor IS, Kim SW, Jones Prather KL and Keasling JD (2002). Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* SerovarTyphimurium. Appl Environ Microbiol 68: 3848–3854.

Almeida A, Ruiz J, Lopez N, Pettinari J, (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. Revista QuimicaViva. Abril, 3 (3). Disponible en <<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v3n3/pettinari.pdf>> [Consulta Febrero de 2012].

Anderson AJ, Dawes EA, (1990). Ocurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polihidroxyalkanoates. Microbiol Rev, 54(4): 450-472.

Anderson GE and Km-land CG. (1990) An Extreme Codon Preference Strategy: Codon Reassignment. Ann Rev Microbiol, 54: 198.

Atsumi S, Hanai T and Liao JC (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. Nature 451: 86-89.

Azevedo, JL. (1998). Microorganismos endofiticos. In: Ecologia Microbiana. Melo IS and Azevedo JL. (eds.). Editora EMBRAPA, Jaguariuna, São Paulo, Brazil. 117-137.

Babbitt PC, Hasson M, Wedekind JE, Palmer DRJ, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, and Gerlt JA (1996). The Enolase Superfamily: A General Strategy for Enzyme-Catalyzed Abstraction of the R-Protons of Carboxylic Acids. Biochem 35: 16489-16501.

Bacon CW, White JF, Jr (Eds.) (2000) Microbial Endophytes. Marcel Dekker, NY: 487.

Baldani VLD, Alvarez AMDEB, Baldani JI and Dobereiner J (1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of the field-grown wheat and sorghum. *Plant Soil*, 90: 35-46.

Baldani JI, Pot B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FJ, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, and Döbereiner J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubricubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J Syst Bacteriol* 46: 802-810.

Bengtsson S, Pisco AR, Johansson P, Lemos PC, Reis MA (2010). Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *JBiotechnol*, Jun, 147(3-4):172-9.

Bergersen, FJ and Turner GL. (1992) Supply of O<sub>2</sub> regulates O<sub>2</sub> demand during utilization of reserves of poly-β-hydroxybutyrate in N<sub>2</sub>-fixing soybean bacteroids. *Proc R Soc London Ser B*, 249:143–148.

Bergey DH, Holt JG, (Ed), Krieg NR (Ed), Sneath PHA (Ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Published. Ninth edition (1994), Lippincott Williams & Wilkins.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, and Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, Sep; 277 (5331): 1453-62.

Brämer CO, Silva LF, Gomez JG, Pierfert H, and Steinbuchel A. 2002. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101T and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Appl Environ. Microbiol* 68: 271-279.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, and Fuller RC. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Env Microbiol*, 54:1977–1982.

Byrom D. (1990) Industrial production of polymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: Novel biodegradable microbial polymers. Ed E.A. Dawes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 113-117.

Catalán AI, Ferreira F, Gill PR, Batista S. (2001) Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enz and Microb Tech*, 40 (5): 1352-1357.

Celis RT, Leadlay PF, Roy I, Hansen A. (1998) Phosphorylation of the periplasmic binding protein in two transport systems for arginine incorporation in *Escherichia coli* K-12 is unrelated to the function of the transport system. *J Bacteriol* 180: 4828-4833.

Chen CY and Winans SC. (1991) Controlled Expression of the Transcriptional Activator Gene *virG* in *Agrobacterium tumefaciens* by Using the *Escherichia coli lac* Promoter. *J Bacteriol*, 173(3): 1139-1144.

Chen GQ. (2010) Industrial production of PHA. *Microbiol Monographs*, 14: 121-132. DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5\_6

Chen Q, Wang Q, Wei G, Liang Q and Qi Q. (2011) Production in *Escherichia coli* Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with Differing Monomer of Compositions from Unrelated Carbon Sources. *Appl Environ Microbiol* 77(14):4886

Cheng HP, Walker GC. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of the infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180: 5183–5191.

Choi MH, and Yoon SC. (1994) Polyester biosynthesis characteristics of *Pseudomonas citronellolis* grown on various carbon sources, including 3-methyl-branched substrates. Appl Environ Microbiol 60:3245–3254.

Cohen SN, Chang ACY and Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110-2118.

Connor MR and Liao JC. (2009) Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts. Curr Opin Biotechnol 20: 307-315.

Dalton DA, Ma C, Shrestha S, Kitin P, and Strauss SH. (2011) Tradeoffs between biomass growth and inducible biosynthesis of polyhydroxybutyrate in transgenic poplar. Plant Biotechnol J: 1-9. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00585.x

Dayem LC, Carney JR, Santi DV, Pfeifer BA, Khosla C and Kealey JT. (2002) Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochem 41:5193–201.

Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, and Blattner FR (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. J Bacteriol Apr: 190(7): 2597-606.

Fiedler S, Wirth R. (1988) Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. Anal Biochem Apr, 170(1):38-44.

Froese DS, Dobson CM, White AP, Wua X, Padovani D, Banerjee R, Haller T, Gerlt JA, Surette MG and Gravela RA (2009). *Sleeping beauty mutase (sbm)* is expressed and interacts with *ygfd* in *Escherichia coli*. Microbiol Research 164: 1-8.

Foster MA, Jones KM and Woods DD. (1961) The purification and properties of a factor containing vitamin B<sub>12</sub> concerned in the synthesis of methionine by *Escherichia coli*. *Biochem J* 80:519–31.

Foster MA, Tejerina G, Guest J R and Woods DD (1964). Two enzymic mechanisms for the methylation of homocysteine by extracts of *Escherichia coli*. *Biochem J* (92): 476–88.

Galego N, Rozsa C, Sánchez R, Fung J, Vázquez A and Santo TJ. (2000) Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymering Testing* 19: 485-492.

Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D and Espín G (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6:7 doi: 10.1186/1475-2859-6-7.

Gerngross TU, and Martin DP. 1995. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(2)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6279-6283.

Gómez L and Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* 7(6): 251-256.

Gracinda da Silva L, Costa MF and Lopes OF (2003). *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Brazil J Microbiol* 34: 69-71.

Gross, RA, DeMello C, Lenz RW, Brandl H, and Fuller RC (1989). Biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromol* 22:1106–1115.

Grothe E, Moo-Young M, Chisti Y (1999). Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enz and Microb Tech* 25:132-141.

Guest JR, Friedman S, Foster MA, Tejerina G, Woods DD. (1964) Transfer of the methyl group from N5-methyl tetrahydrofolates to homocysteine in *Escherichia coli*. *Biochem J* 92:497–504.

Gyaneshwar P, Naresh KG and Parekh LJ. (1998) Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J Microbiol Biotech.* 14:669-673.

Ha CS and Cho WJ. (2002) Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Prog Polym Science.* 27:759-809.

Haller T, Buckel T, Retey J and Gerlt JA (2000). Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. *Biochem* 39:4622–9.

Harding KG, Dennis JS, Von Blottnitz H and Harrison STL (2007). Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *J Biotech* 130: 57-66.

Haywood GW, Anderson AJ, Chu L and Dawes EA. (1988) The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett* 52:259–264.

Heim R, Cubitt, AB and Tsien, RY. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.

Hein S, Söhling B, Gottschalk G and Steinbüchel A. (1997) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 153:411–418.

Hong SH, Park SJ, Moon SY, Park JP, Lee SY. (2003) In silico prediction and validation of the importance of the Entner–Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotech and Bioeng*, 83(7): 854-863.

Horswill AR, Dudding AR, and Escalante-Semerena JC. (2001) Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem* 276: 19094-19101.

Huijberts GNM, Eggink G, De Waard P, Huisman GH and Witholt B (1992). *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* 58:536–544.

Huisman, GW, De Leeuw O, Eggink G and Witholt B. (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonas. *Appl Environ Microbiol* 55:1949–1954.

James EK and Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other *Graminaceous* plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17:77-119.

James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PP, Olivares FL and Ladha JK (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 894-906.

Jendrossek D. (2009) Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *J Bacteriol* May 191 (10): 3195-3202.

Kang Z, Wang Q, Zhang H and Qi Q. (2008) Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Appl Microbiol Biotech* 79: 203-208.

Khanna S and Sivrastava A. (2004) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem* 40: 607-619.

Khanna S and Sivrastava A. (2005a) Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem* 40, 2173–2182.

Kiliçay E, Demirbilek M, Türk M, Güven E, Hazer B and Denkbaz EB. (2011) Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Europ J Pharmac Sci* 44, 310–320.

Kim BS, Lee SY and Chang HN. (1992) Production of poly- $\beta$ hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotech Lett* 14: 811–816.

Kim Y and Lenz R. (2001) Polyesters from microorganism. SCHEPER, Th (Ed). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin. (71): 52-74.

Langenbach S, Rehm BHA and Steinbüchel A. (1997) Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 150:303–309.

Lastra JAS, Carmona ML y Mendoza SL (2008) Tendencias del cambio climático global y los eventos extremos asociados. *Ra Ximhai* 4 (3): 625-633.

Leaf TA, Peterson MS, Stoup SK, Somers D, and Srienc F (1996). *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiol* 142: 1169–1180.

Lee SY (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotech* 14: 431-438.

López, NI, Floccari ME, SA, García AF, and MBS (1995). Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiol Ecol* 16: 95-112.

Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera EL. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiol* 6: 251–260.

Madison LL and Huisman GW (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21-53.

Malán AK. (2011) Estudio de la producción de PHB en *Herbaspirillumseropedicae* Z69 a partir de azúcares presentes en hemicelulosa. Tesis de Grado, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Universidad de la Republica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

Masamune S, Palmer MAJ, Gamboni R, Thompson S, Davis JT, Williams SF, Peoples OP, Sinskey AJ, and Walsh CT. (1989) BioClaisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramigera*. Active site cysteine residues. *J Am Chem Soc* 111: 1879–1881.

Masamune S, Walsh CT, Sinskey AJ, and Peoples OP. (1989) Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by  $\beta$ -ketoacylthiolase. *Pure Appl Chem* 61:303–312.

Molina M, Zaelke D, Sarma KM, Andersen SO, Ramanathan V, and Kaniaru D. (2009) Reducing abrupt climate change risk using the Montreal Protocol and other regulatory actions to complement cuts in CO<sub>2</sub> emissions. *PNAS*, Oct (12): 1-6. Disponible en <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902568106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902568106)>

Mothes G, and Babel W. (1995) *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 possesses two stereospecific crotonyl-CoA hydratases. *Can J Microbiol* 41(1):68–72.

Mothes G, Rivera IS, and Babel W. (1996) Competition between  $\beta$ -ketothiolase and citrate synthase during poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*. *Arch Microbiol* 166:405–410.

Park SJ, Choi JI and Lee SY (2005) Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enz Microb Tech* 36: 579-588.

Pavlov E, Zakharian E, Bladen C, Diao CTM, Grimby C, Reusch RN, French R and Large A. (2005) Voltage-Dependent Channel, Isolated from Mitochondria by Water-Free Chloroform Extraction *Biophys J* April, 88(4): 2614–2625.

Postgate, J (1998). Nitrogen Fixation, 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge UK.

Pötter M, Madkour MH, Mayer F and Steinbüchel A. (2002) Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol Aug*, 148(8): 2413-2426.

Pouton CW and Akhtar S. (1996) Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 18: 133–162.

Preston G., Haubold B, Rainey P. (1998) Bacterial genomics and adaptation to life plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbioses. *Curr Op in Microbiol* 1: 589-597.

Pries A, Priefert H, Krüger N, and Steinbüchel A. (1991) Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 5843–5853

Qi Q, Rehm BHA and Steinbüchel A. (1997) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of *PhaC1* and *PhaC2*. *FEMS Microbiol Lett* 157:155–162.

Ré MI, Rodrigues MFA, Silva ES, Castro IM, Simioni AR, Pelisson MMM, Neltrame M, Tedesco AC (2005). New PHB/PHPE microspheres obtained from *Burkholderia cepacia* as biodegradable drug delivery systems for photodynamic therapy. *MinBiotec* 18: 39.

Reemmer J. (2005) Advances in the synthesis and extraction of biodegradable polyhydroxyalkanoates in plant systems – A review. *MG basic Biotechn.* 5 (1). Disponible en <<http://ejournal.vudat.msu.edu/index.php/mmg445/article/viewArticle/383/349>>

Rehm BHA, Kruger N and Steinbüchel A. (1998) A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J Biol Chem* 273: 24044-51.

Remmer J. (2009) Advances in the synthesis and extraction of biodegradable polyhydroxyalkanoates in plant systems – A review. *MMG 445 Basic Biotech* 5: 44-49.

Riis V and Mai W. (1988) Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J Chromatogr* 445: 285- 289.

Roncato-Maccari, LDB., Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Rigo RU, Steffens MBR, and Souza EM. (2002) Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses the *nifH* gene in diverse gramineous plants. In: J. Vanderleyden (Ed.) Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes. Katholieke Universiteit Leuven and Centre of Microbial and Plant Genetics. Leuven, Belgium. 91.

Rosconi F, Souza EM, Pedrosa FO, Platero RA, González C, González M, Batista S, Gill PR and Fabiano ER. (2006) Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol Lett* May, 258(2): 214-9.

Ruiz J, López N and Méndez BS. 2004. *rpoS* gene expression in carbon starved cultures of the polyhydroxyalkanoate accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* 48: 396–400.

Sambrook, J, Fritsh EF and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schübert P, Steinbüchel A, and Schlegel HG. (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for the synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli* J Bacteriol. 170:5837–5847.

Segura D, Noguez R, Espín G. (2004) Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. Biotecnología, 31: 361-371. Disponible en <[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_31.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf)> [Consulta Febrero de 2012].

Shishatskaya EI, Volova TG and Popova TG. (2002) Study of Biological Properties of polyhydroxyalkanoates in a Long-term Experiment *in vivo*. Biomed Eng 36(4): 218-222.

Singh B and Sharma N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. Polymer Degradation and Stability 93: 561-584. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391007003539>.

Slater S, Gallaher T, and Dennis D. (1992) Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. Appl Environ Microbiol 58: 1089–1094.

Snell KD, and Peoples OP. (2002) Polyhydroxyalkanoate polymers and their production in transgenic plants. Metab. Eng 4: 29-40.

Soares-Ramos JRL, Ramos HJO, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Rigo LU, and Souza EM. (2003) Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. Gen Molec Biol 26:537–543.

Somleva MN, Snell KD, Beaulieu JJ, Peoples OP, Garrison BR and Patterson NA. (2008) Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop. Plant Biotechnol J. 6: 663–678.

Steinbüchel A. (1996) PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In: Rehm HJ, Reed G, Roehr M. (Ed.) Products of primary metabolism, John and Sons, 405 - 464.

Steinbüchel A. (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromol Biosc* Vol 1-24.

Steinbüchel A, and Schlegel HG. (1991) Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* 5: 523-542.

Steinbüchel A and Valentin HE. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett* , 128: 219-228.

Sudesh K, Abe H and Doi Y (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*, 25:1503- 1555.

Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M and Shah S. (2007). Biotechnological Approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants- A review. *Biotech Adv* 25: 148-175.

Tang X, Lu BF and Pan SQ (1999). A bifunctional transposon mini-Tn5gfp-km which can be used to select for promoter fusions and report gene expression levels in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microb Lett* 179 (1): 37-42.

Timm A, and Steinbüchel A. (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J Biochem* 209: 15-30.

Uihlein A and Schebek L. (2009) "Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: An assessment" *Biom and Bioen.* 793- 802.

Valverde A., Velázquez E., Gutiérrez C., Cervantes E., Ventosa A. & Igual J.-M. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1979–1983.

Wagner BL, Lewis LC, 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl and Env Microbiol* 66: 3468–3473.

Wallen LL. and Rohwedder WK. (1974) Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ Sci and Tech* 8 (6), 576-579.

Wang Z, Jin L, Yuan Z, Wegrzyn G and Wegrzyn A. (2009) Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria. *Plasmid* Jan 61(1): 47-51.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R (2006). *Biología Molecular del Gen* 5ª ed. Editorial Médica Panamericana Cap. 12 y 16.

Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A and Mayer F. (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 177: 2425-2435.

Williams MD, Rahn JA, and Sherman DH. (1996) Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eukaryotic fatty acid synthase. *Appl Environ Microbiol* 62: 2540–2546.

Williams S and Martin D. (2008) Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. *Tepha Inc*, 91-103.

Williams SF and Peoples OP. (1996) Biodegradable plastics from plants. *Chemtech* 26: 38–44.

Yamane T. (1993) Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotech and Bioeng* 41:165-170.

Yim KS, Lee SY and Chang HN. (1996) Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng* 49:495–503.

Zhang H, Obias V, Gonyer K, Dennis DE. (1994) Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl Environ Microbiol* 60: 1198–205.

Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS y Liao JC (2008) Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20653-20658.

Zinn M, Witholt B, Egli T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Delivery Rev* 53: 5-21.

#### **Sitios web consultados:**

OPEC Basket Price. Documento en línea disponible en OPEC (Organization of the Petroleum Exporting Countries) [http://www.opec.org/opec\\_web/en/data\\_graphs/40.htm](http://www.opec.org/opec_web/en/data_graphs/40.htm) [Consultado el 10 de julio de 2012].

Plastic Ocean Report. Documento en línea disponible en United Nations Environment Programme (UNEP) [http://www.unep.org/regionalseas/marinelitter/publications/docs/plastic\\_ocean\\_report.pdf](http://www.unep.org/regionalseas/marinelitter/publications/docs/plastic_ocean_report.pdf) [Consultado 2 de febrero de 2012].

Oxidation of odd-numbered chain fatty acid, from Propionyl-CoA to Succinyl-CoA. Disponible en BioCarta Charting Pathways of Life. <http://www.biocarta.com/pathfiles/odnumberchainPathway.asp> [Consultado 10 de julio de 2012].

Isolation of DNA Protocol. Documento en línea disponible en DOE Joint Genome Institute. <http://www.jgi.doe.gov/> [Consultado Mayo de 2011].