

SIGUIENDO LA PISTA

Caracterización de los poli-3-hidroxicanoatos (bioplásticos) acumulados por bacterias recombinantes que expresan independientemente los genes *phaC1* y *phaC2* de *Pseudomonas putida* U

Ángel Sandoval, Joaquín Rodríguez*, Mario Arcos* y Sagrario Rivas.

*Alumnos de Tercer Ciclo

Departamento de Biología Molecular, Área Bioquímica, Universidad de León

Pseudomonas putida U es una cepa bacteriana que posee capacidad de acumular intracelularmente biopolímeros plásticos, debido a la existencia de un sistema de polimerización-despolimerización (codificado en el *locus pha*) integrado principalmente por dos polimerasas, PhaC1 y PhaC2. Mediante varios estudios *in vivo* realizados en este trabajo se ha puesto de manifiesto la diferente especificidad de sustrato de ambas polimerasas, lo que puede contribuir a la síntesis de nuevos bioplásticos (PHAs) con características diferentes a los que se obtienen actualmente.

Palabras clave: PHAs, biopolímeros, *Pseudomonas*.

Introducción

Las células, tanto eucariotas como procariontes, pueden acumular en su interior una serie de biopolímeros entre los que cabe destacar los ácidos nucleicos, las proteínas, los polisacáridos, polifosfatos, poliisoprenoides (gomas naturales), polifenoles (ligninas) y otros compuestos orgánicos (cutina). Además, existe una amplia variedad de microorganismos capaces de acumular intracelularmente **polihidroxicanoatos (PHAs)**. Entre ellos podemos citar heterótrofos aeróbicos (*Pseudomonas*) o anaeróbicos (*Azotobacter*); metilótrofos (*Methylocystis*), fotótrofos aeróbicos y anaeróbicos (*Rhodospirillum*, *Chromatium*) e incluso arqueobacterias tales como *Halobacterium*.

En función de la longitud de la cadena carbonada del grupo R, se puede establecer una clasificación sencilla de los polihidroxicanoatos. Según este criterio, definiríamos como polihidroxicanoatos de cadena corta (*short-chain-length-PHAs*, scl-PHAs) aquellos en los que el grupo R es un grupo metilo o etilo (polihidroxibutirato o polihidroxivalerato) y como polihidroxicanoatos de cadena media (*medium-chain-length-PHAs*, mcl-PHAs) aquellos en los que el grupo R varía desde propilo (polihidroxihexanoato) hasta nonilo (polihidroxidodecanoato).

Los PHAs aparecen en el interior celular como cuerpos de inclusión discretos localizados en el citoplasma de la célula bacteriana. Este tipo de polímeros posee una

serie de características físico-químicas y de propiedades que recuerdan a las de los plásticos de origen petroquímico, por lo que usualmente se les denomina bioplásticos.

Pseudomonas putida U es una cepa bacteriana Gram- que posee la capacidad de acumular intracelularmente biopolímeros plásticos constituidos por monómeros de 3-OH-n-alcanoatos o bien de 3-OH-n-fenilalcanoatos cuando se cultiva en un medio químicamente definido (medio mínimo - MM -) (Martínez-Blanco y col., 1990) suplementado con n-alcanoatos o n-fenilalcanoatos (con una longitud de cadena alifática entre seis y diez átomos de carbono). Estos compuestos, que actúan como material de reserva, aparecen como gránulos electroclaros cuando se observan al microscopio electrónico de transmisión. En *P. putida* U tres genes (*phaC1*, *phaZ* y *phaC2*) incluidos en el *locus pha*. (**Fig. 1**) están implicados en la síntesis y en la movilización de estos polímeros.

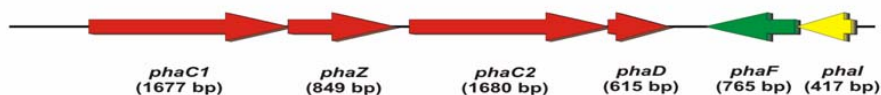
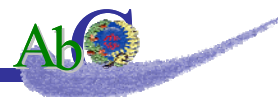


Fig. 1. Organización del *locus pha* en *Pseudomonas putida* U. *phaC*, gen que codifica la polimerasa I (*PhaC1*); *phaZ*, gen que codifica la despolimerasa (*PhaZ*); *phaC2* gen que codifica la polimerasa II (*PhaC2*); *phaD*, *phaF*, *phaI*, genes que codifican las proteínas *PhaD* y las dos fasinas (*PhaF* y *PhaI*).

La capacidad biosintética de PHAs en *P. putida* U se debe a la existencia de un sistema de polimerización-despolimerización (codificado en el *locus pha*) integrado por dos polimerasas, *PhaC1* y *PhaC2*, y una despolimerasa, *PhaZ* (García y col., 1999). Además está implicada una acil-CoA sintetasa, dos rutas de oxidación (Olivera y col., 2001a,b), así como otros elementos (*phaF* y *phaI*) que codifican proteínas que juegan un papel importante en la regulación (*PhaD*) y en la correcta formación y almacenamiento intracelular de los gránulos de polímero plástico (*PhaF* y *PhaI*).

A la vista de los escasos resultados obtenidos mediante otras estrategias para establecer el papel que llevan a cabo *in vivo* cada una de esas enzimas (*PhaC1* y *PhaC2*), nosotros abordamos el estudio de su especificidad de sustrato utilizando una estrategia experimental diferente a la seguida por otros grupos y que implicaba los siguientes pasos: a) diseño de una cepa de *P. putida* U manipulada genéticamente en la



que se ha delecionado el *cluster pha* entero (*P. putida* U Δpha); b) amplificación mediante PCR de los genes (*phaC1* y *phaC2*) que codifican cada una de las polimerasas y clonación en un plásmido replicativo en *P. putida* U (pBBR1MCS-3); c) transformación de *P. putida* U Δpha con esas construcciones y d) análisis de los PHAs acumulados por esas cepas recombinantes cuando se cultivan en diferentes medios (MM) suplementados con diferentes ácidos n-alcanoicos y n-aril-alcanoicos.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas: *Pseudomonas putida* U (Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester, U.K.); *Escherichia coli* DH10B (cepa utilizada en experimentos de transformación), *Escherichia coli* pRK600 (Herrero y col., 1990; cepa empleada como *helper* (ayudante) en experimentos de conjugación triparental); *Pseudomonas putida* U Δpha (cepa derivada de *P. putida* U a la que le ha sido eliminado mediante delección el *locus pha* de polimerización-despolimerización (*phaC1* - *phaZ* - *phaC2* - *phaD* - *phaF* - *phaI*).

Vectores: pGEM[®]-T Easy (Promega; se utiliza para la clonación directa de los productos obtenidos mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)); pJQ200KS (Quandt y col., 1993; vector suicida que permite delección génica); pBBR1MCS-3 (Kovach y col., 1995; posee capacidad de replicarse autónomamente en multitud de cepas bacterianas, incluidas *E. coli*, *P. fluorescens* y *P. putida* y se utiliza habitualmente para la expresión heteróloga de genes en *trans* en *P. putida* U; de aquí en adelante se nombrará como pMC).

Medios de cultivo: medio Luria Bertani (LB) (Miller, 1972); medio SOC (Hanahan, 1983); medio mínimo (MM) de *Pseudomonas* (Martínez-Blanco y col., 1990).

Obtención de mutantes (*Pseudomonas putida* U Δpha) mediante delección: La delección del *locus pha* implica un proceso de doble recombinación que tiene lugar a través de dos fragmentos adyacentes al gen que se quiere delecionar, clonados en el vector integrativo pJQ200KS, y posterior selección del mutante por expresión del gen letal *sacB* (Donnenberg & Kaper, 1991; Quandt & Hynes, 1993; Sandoval y col., 2007). La posición y extensión de la delección se confirma en los mutantes obtenidos mediante PCR.

Obtención de las construcciones pBBR1MCS-3-*phaC1* y pBBR1MCS-3-*phaC2*: Los genes *phaC1* y *phaC2* fueron amplificados mediante PCR. Los fragmentos así obtenidos se clonaron en el vector pBBR1MCS-3 (pMC) (Kovach y col., 1995; Sandoval y col., 2007). Este plásmido, pMC, es replicativo en *Pseudomonas* y por tanto, nos permite llevar a cabo un análisis “*in vivo*” de la expresión de *phaC1* y de *phaC2* en *P. putida* U Δ *pha*. Estas dos construcciones (pMC-*phaC1* y pMC-*phaC2*) se transfirieron mediante conjugación triparental a *P. putida* U Δ *pha* y de este modo se obtuvieron dos cepas recombinantes (*P. putida* U Δ *pha* pBBR1MCS-3-*phaC1* y *P. putida* U Δ *pha* pBBR1MCS-3-*phaC2*) que se denominarán a partir de ahora como Pp Δ *pha* pMC-*phaC1* y Pp Δ *pha* pMC-*phaC2*.

Proceso de conjugación (*mating*) triparental: obtención de Pp Δ *pha* pMC-*phaC1* y Pp Δ *pha* pMC-*phaC2*. El *mating* triparental (Fig. 2) es un procedimiento de conjugación y como todos ellos necesita una cepa donadora, una receptora y en este caso una intermediaria (*helper*) que ayuda al transporte del material genético. En los experimentos que nos ocupan, la cepa donadora ha sido *E. coli* DH10B pMC-*phaC1/phaC2*, la cepa receptora *P. putida* U Δ *pha* y la cepa intermediaria *E. coli* pRK600.

Extracción de polímero plástico: El cultivo celular se desarrolla en MM suplementado con ácido 4-hidroxifenilacético (4-OH-PhAc) como fuente de carbono para soportar el crecimiento y otra fuente de carbono (n-alcanoato ó n-fenilalcanoato) que aporte los precursores necesarios para la biosíntesis de polímero plástico. Cuando el cultivo se encuentra próximo a alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, se recogen las células, mediante centrifugación, se liofilizan y se pesan.

Una vez obtenido y pesado el liofilizado, se sigue el protocolo descrito por Lageveen y col. (1988). Para extraer el polímero se añade una mezcla de cloroformo/metanol en proporción 1:10. La naturaleza de los PHAs acumulados por las diferentes cepas se estableció como se ha descrito en otros casos (Lageveen y col., 1988; García y col., 1999) y su contenido y su composición se determinó por cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear del ^{13}C como se había descrito previamente (García y col., 1999; Olivera y col., 2001b).

Mating triparental

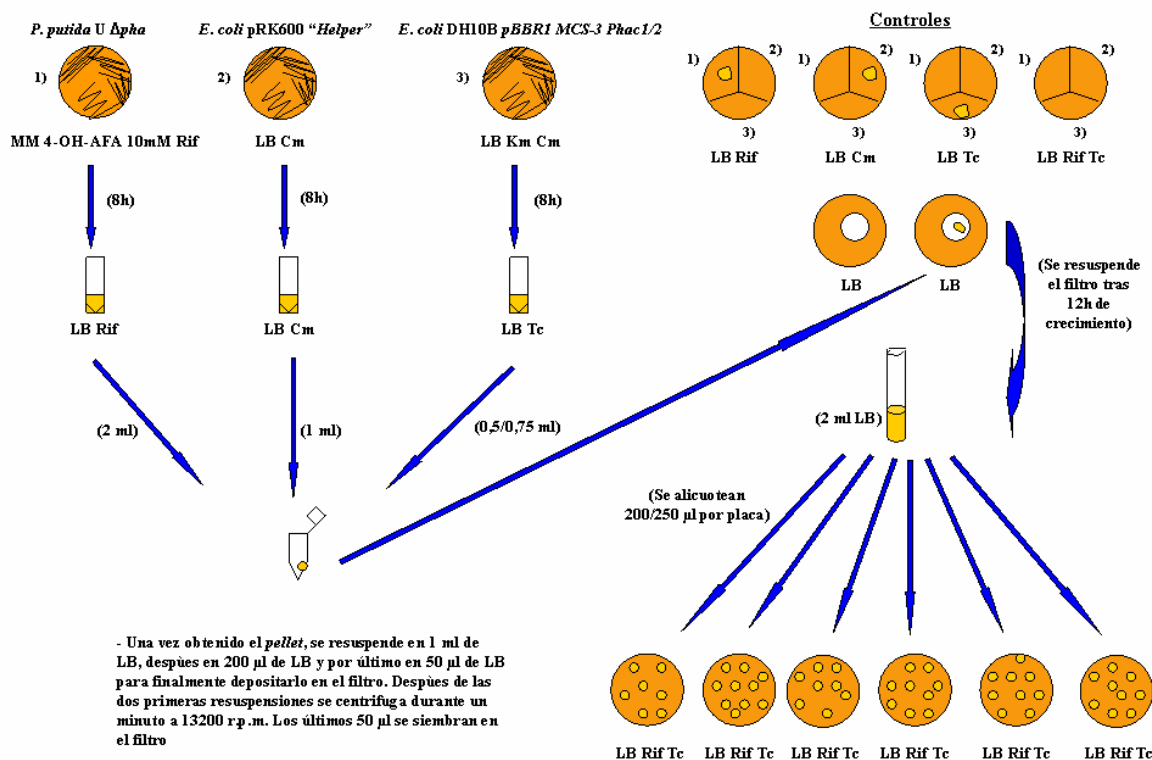


Fig. 2. Representación del *mating triparental*. Cada cepa se sembró el día antes del mating en su medio específico y con el antibiótico adecuado, según la resistencia de la cepa. Los controles del mating se siembran a partir de los diferentes cultivos utilizando un volumen de 50 µl. Las colonias finales serán transconjugantes con resistencia a Rif y Tc (*PpΔpha pMC-phaC1* ó *PpΔpha pMC-phaC2* según la *PhaC1* clonada en el *pBRR1MCS-3*).

Resultados

Cuando *Pseudomonas putida* U se cultiva en medio químicamente definido (MM) (Martínez-Blanco y col., 1990; García y col., 1999) suplementado con precursores de polihidroxicanoatos (PHAs) (García y col., 1999; Olivera y col., 2001a; 2001b) acumula intracelularmente, como material de reserva, diferentes PHAs de naturaleza alifática (3-OH-n-alcanoatos), aromática (3-OH-arilalcanoatos), o mezcla monomérica de alifáticos y aromáticos.

El estudio de la especificidad de sustrato de las polimerasas PhaC1 y PhaC2 en *P. putida* U se llevó a cabo en la cepa *PpΔpha*, que se utilizó como receptora en diferentes experimentos de conjugación mediante los que se transfirieron las construcciones *pMC-phaC1* y *pMC-phaC2*. De este modo se obtuvieron las cepas

recombinantes Pp Δ pha pMC-phaC1 y Pp Δ pha pMC-phaC2. La cepa Pp Δ pha, aunque presenta deleciónado todo el *cluster pha* (*P. putida* U Δ pha C1ZC2DF1), mantiene intacto el resto de los elementos que pueden participar en la síntesis/acumulación de PHAs.

Con el objeto de analizar el bioplástico acumulado por *P. putida* U, Pp Δ pha y las dos cepas recombinantes Pp Δ pha pMC-phaC1 y Pp Δ pha pMC-phaC2, estas bacterias se cultivaron en placas con MM sólido al que se le había añadido como fuente de carbono 4-OH-PhAc y diferentes precursores de PHAs de naturaleza alifática (ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico y decanoico) o aromática (ácidos fenilacético, fenilpropiónico, fenilbutírico, fenilvalérico, fenilhexanoico, fenilnonanoico o fenildecanoico) (García y col., 1999).

De este modo se observó que mientras Pp Δ pha era incapaz de acumular PHAs en todos los medios probados. Sin embargo, Pp Δ pha pMC-phaC1 y Pp Δ pha pMC-phaC2 sí sintetizaban estos biopolímeros en algunos medios, y, además, la acumulación de estos poliésteres en esas dos cepas difería bastante en función del precursor utilizado.

Así, cuando estas bacterias se cultivaron en MM líquido suplementado con ácidos alcanóicos (As) se observó que Pp Δ pha pMC-phaC1 era capaz de sintetizar PHAs en aquellos medios que contenían As con una longitud de cadena carbonada de más de cinco átomos (desde hexanoico a decanoico), acumulando una mayor cantidad de polímero en presencia de ácido decanoico. En este caso, el contenido en PHA (dado como porcentaje con respecto a peso seco) fue del 30%, y el polímero sintetizado contenía un 65% de ácido 3-OH-decanoico y un 35% de ácido 3-OH-octanoico. Cuando se utilizaron como precursores de PHAs los ácidos nonanoico, octanoico, heptanoico o hexanoico, la cantidad de PHA acumulado decreció proporcionalmente según la longitud de la cadena carbonada del ácido utilizado (23, 20, 15 y 9% respectivamente), siendo su composición relativa, 60% de ácido 3-OH-nonanoico y 40% de ácido 3-OH-heptanoico; 97% de ácido 3-OH-octanoico y 3% de ácido 3-OH-hexanoico; 100% de ácido heptanoico y 100% de ácido hexanoico respectivamente. Estos resultados sugieren que PhaC1 no polimeriza 3-OH-As-CoA derivados con una longitud de cadena carbonada inferior a seis átomos, y que, además, esta enzima reconoce mejor 3-OH-n-acyl-CoA derivados (3-OH-n-alcanoil-CoA) con una cadena carbonada constituida por ocho o más átomos.

Cuando estos mismos experimentos se llevaron a cabo con la cepa Pp Δ pha pMC-*phaC2*, se observaron ciertas diferencias con respecto a PhaC1. Así, la cantidad del PHA sintetizado decrecía (19, 17, 11, 8 y 6%) cuando la longitud de la cadena carbonada del compuesto utilizado como precursor incrementaba (ácido hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico y decanoico, respectivamente), siendo máxima con el ácido hexanoico y heptanoico (19 y 17 % respectivamente). La composición relativa de los polímeros acumulados fue: 100% de ácido 3-OH-hexanoico; 100% de ácido 3-OH-heptanoico; 75% de ácido 3-OH-hexanoico y 25% de ácido 3-OH-octanoico; 80% de ácido 3-OH-heptanoico y 20% de ácido 3-OH-nonanoico; y 54% de ácido 3-OH-hexanoico, 37% de ácido 3-OH-octanoico y 9% de ácido 3-OH-decanoico cuando se utilizaron los ácidos hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico y decanoico, respectivamente.

Estos datos revelan que aunque ambas enzimas polimerizan monómeros con una longitud de cadena carbonada de más de cinco átomos, PhaC2 utiliza preferentemente 3-OH-hexanoil-CoA, mientras que el mejor sustrato de PhaC1 es el 3-OH-decanoil-CoA.

Cuando se utilizaron precursores aromáticos, las diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato de ambas polimerasas, PhaC1 y PhaC2, fueron mucho más evidentes. Además, cuando se cultivaron Pp Δ pha pMC-*phaC1* y Pp Δ pha pMC-*phaC2* en MM con 4-OH-PhAc para soportar el crecimiento y con diferentes ácidos fenilalcanoicos (PhAs, desde ácido fenilacético hasta ácido 10-fenildecanoico), se observó que ambas cepas eran incapaces de acumular PHAs cuando la longitud de la mitad alifática de la cadena carbonada del precursor utilizado tenía menos de cinco átomos (**Fig. 3 y 4**).

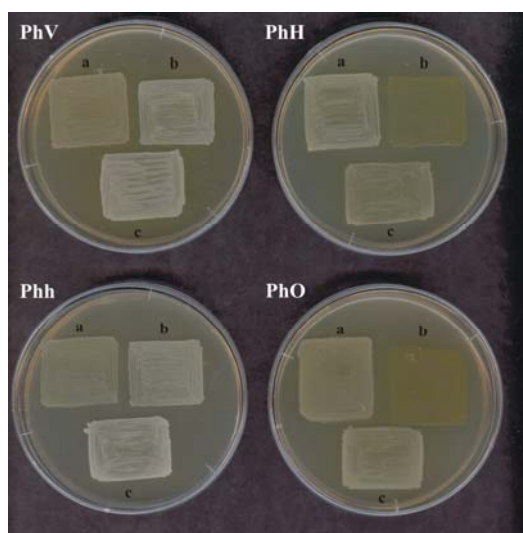


Fig. 3. Cepas Pp Δ pha pMC-*phaC1* (a), Pp Δ pha pMC-*phaC2* (b) y *Pseudomonas putida* U (c). Comparación de acumulación de biopolímeros en MM con ácido 4-OH-fenilacético y todo ello suplementado con ácido fenilvalérico, fenilhexanoico, fenilheptanoico y feniloctanoico respectivamente. (El aspecto blanquecino indica capacidad acumulativa de biopolímeros).

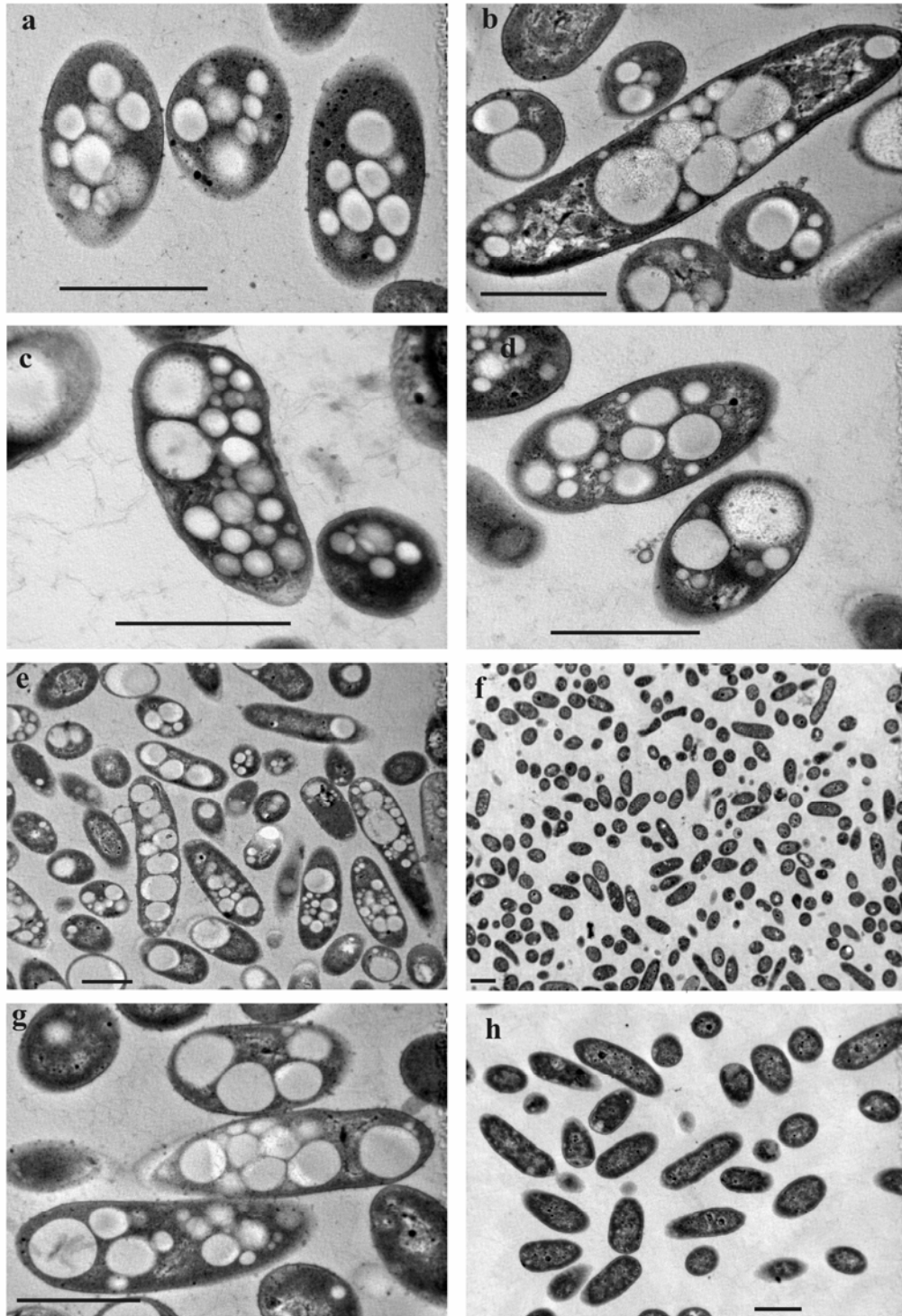


Fig. 4. Fotografía electrónica de Pp Δ pha pMC-phaC1 (a,b,c,d) y Pp Δ pha pMC-phaC2 (e, f, g, h) cultivadas en MM con 4-OH-PhAc (10mM) suplementado con ácido 5-fenilvalérico 10mM (a,e); ácido 6-fenilhexanoico 10mM (b,f); ácido 7-fenilheptanoico 10mM (c,g) y ácido 8-feniloctanoico 10mM (d,h).

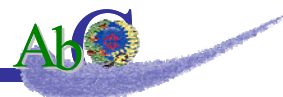
Así, *PpΔpha* pMC-*phaC1* era capaz de acumular diferentes PHAs dependiendo de los precursores utilizados, tal y como se ha visto cuando esta cepa se cultivaba en MM suplementado con los ácidos 5-fenilvalérico (100% de ácido 3-OH-fenilvalérico); 6-fenilhexanoico (100% de ácido 3-OH-fenilhexanoico); 7-fenilheptanoico (80% de ácido 3-OH-fenilvalérico y 20% de ácido 3-OH-fenilheptanoico); 8-feniloctanoico (65% de ácido 3-OH-fenilhexanoico y 35% de ácido 3-OH-feniloctanoico); 9-fenilnonanoico (60% de ácido 3-OH-fenilhexanoico, 35% de ácido 3-OH-fenilheptanoico y 5% de ácido 3-OH-fenilnonanoico); y 10-fenildecanoico (50% de ácido 3-OH-fenilhexanoico, 33% de ácido 3-OH-feniloctanoico y 17% de ácido 3-OH-fenildecanoico).

Por el contrario, *PpΔpha* pMC-*phaC2* sólo acumulaba PHAs cuando se cultivaba en MM que contenía PhAs con un número impar de átomos de carbono, como los ácidos 5-fenilvalérico, 7-fenilheptanoico y 9-fenilnonanoico, siendo incapaz de sintetizar PHAs cuando el medio se suplementaba con ácido 6-fenilhexanoico, 8-feniloctanoico ó 10-fenildecanoico (**Fig. 3**). Además, el análisis de los PHAs acumulados reveló que en los tres casos el único polímero acumulado fue poli-3-OH-fenilvalerato, lo cual sugiere que el 3-OH-fenilvaleril-CoA (3-OH-PhV-CoA) es el único monómero que puede ser polimerizado por PhaC2.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos tras realizar diferentes estudios *in vivo* con las polimerasas PhaC1 y PhaC2 de *P. putida* U, se puede concluir que ambas enzimas presentan diferente especificidad de sustrato. Así, mientras PhaC1 es capaz de polimerizar varios monómeros alifáticos y aromáticos (siendo los mejores sustratos el ácido 3-OH-decanoil-CoA y el ácido 3-OH-5-fenilvaleril-CoA), PhaC2 sólo polimeriza un compuesto aromático (ácido 3-OH-5-fenilvaleril-CoA) y ciertos alifáticos (utilizando como mejor sustrato el ácido 3-OH-hexanoil-CoA).

El conocimiento de la especificidad de sustrato de PhaC1 y de PhaC2 puede contribuir a conseguir sintetizar PHAs con unas características distintas a los que actualmente se obtienen.

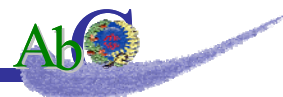


Agradecimientos

Estos resultados han sido obtenidos en el Departamento de Biología Molecular en un proyecto dirigido por el Prof. José María Luengo Rodríguez. La financiación de esta investigación ha sido satisfecha por la Excma Diputación Provincial de León (2005), por la Junta de Castilla y León (LE40A06, 2006) y por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (BIO2003-05309-C04-01 y BFU2006-15214-C03-03/BMC) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Bibliografía

- Anderson, A. J., Haywood, G. W., Williams, D. R., Dawes, E. A. (1990) The production of polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. E. A. Dawes (ed.), Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer. Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. vol. 186.
- Donnenberg, M.S., Kaper J.B. (1991). Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 59: 4310-4317.
- García, B., Olivera, E. R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L. M., Prieto, M. A., García, J. L., Martínez, M., Luengo, J. M. (1999). Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. J. Biol. Chem. 274: 29228-29241.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Williams, G. A., Dawes, E. A., Ewing, D. F. (1991). Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. Int. J. Biol. Macromol. 13: 83-88.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign DNA in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172: 6557-6567.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop R. M., Peterson K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176.
- Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. (1988). Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2924-2932.



- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. B., Luengo, J. M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J. Biol. Chem.* 265: 7084-7090.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Olivera, E. R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M. A., Cañedo, L., Dirusso, C. C., Naharro, G., Luengo, J. M. (2001a). Two different pathways are involved in the β -oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39: 863-874.
- Olivera, E. R., Carnicero, D., Rodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G. A., Gallardo, J., San Román, J., García, J. L., Naharro, G., Luengo, J. M. (2001b). Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3: 612-618.
- Quandt, J., Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene.* 127: 15-21.
- Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E. R., Luengo, J. M. (2007) Genetic and structural analysis of different mutants of *Pseudomonas putida* U affected in the poly-3-hydroxy-n-alkanoate gene cluster. *Environ. Microbiol.* 9: 737-751.
- Valentin, E. H., Lee, Y. E., Choi, C. Y., Steinbüchel, A. (1994). Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 710-716.
- Valentin, H. E., Dennis, D. (1996) Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate co- 3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of mutB by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 372-379.