

UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Síntesis de polihidroxicanoatos en  
*Pseudomonas putida*:  
estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales

TESIS DOCTORAL

José Ignacio Obeso Rodríguez

León, 2017





universidad  
de león

## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. D. José María Luengo Rodríguez como Director y el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera como codirector de la Tesis Doctoral titulada “**Síntesis de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales**” realizada por D. José Ignacio Obeso Rodríguez en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a            de Julio de 2017

Fdo.: Dr. D. José María Luengo Rodríguez

Fdo.: Dr. D. Elías Rodríguez Olivera





universidad  
de león

## ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día            de Julio de 2017 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Síntesis de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales”, dirigida por el Dr. D. José María Luengo Rodríguez y el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera, elaborada por D. José Ignacio Obeso Rodríguez y cuyo título en inglés es el siguiente “Synthesis of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*: biochemical, genetic and ultrastructural studies”.

Lo que firmo, en León a            de Julio de 2017.

El Secretario,

Fdo.: Dr. D. Jesús Manuel Aparicio Fernández

Vº Bº

La Directora del Departamento/  
Presidenta de la Comisión Académica,

Fdo.: Dra. Dña. Ana Isabel González Cordero



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>1. Biomateriales plásticos</b> .....	9
1.1. Polilactato (PLA).....	11
1.2. Poli(succinato de butileno) (PBS) .....	12
1.3. Polietileno (PE).....	13
1.4. Poli(tereftalato de etileno) (PET) y poli(tereftalato de trimetileno) (PTT) .....	14
1.5. Almidón.....	15
1.6. Celulosa .....	16
<b>2. Los polihidroxicanoatos</b> .....	17
<b>3. Estructura química de los polihidroxicanoatos</b> .....	18
<b>4. El gránulo de PHAs: un orgánulo complejo y dinámico</b> .....	22
4.1. PHA polimerasas.....	23
4.1.1. Características estructurales .....	24
4.1.2. Mecanismo catalítico .....	26
4.1.3. Evolución dirigida de la polimerasa.....	27
4.2. PHA despolimerasas.....	29
4.3. Fasinas .....	30
4.4. Acil-CoA Sintetasas .....	31
<b>5. El <i>cluster pha</i></b> .....	32
5.1. En <i>Cupriavidus necator</i> .....	33
5.1.1. Organización genética .....	33
5.1.2. Regulación de la expresión.....	34
5.2. En <i>Pseudomonas putida</i> .....	35
5.2.1. Organización genética .....	35
5.2.2. Regulación de la expresión de los genes del <i>cluster pha</i> .....	35

5.2.2.1. A nivel enzimático.....	36
5.2.2.2. A nivel transcripcional.....	37
5.2.2.2.1. El regulador PhaD .....	37
5.2.2.2.2. La fasina PhaF como regulador transcripcional.....	37
5.2.2.2.3. Los reguladores transcripcionales globales RpoN, RpoS y Crc .....	38
<b>6. Metabolismo de PHAs .....</b>	<b>39</b>
6.1. Síntesis de PHB .....	40
6.2. Síntesis de mcl-PHAs .....	41
6.2.1. Síntesis de PHAs a partir de ácidos grasos por $\beta$ -oxidación .....	41
6.2.2. Síntesis de PHAs a partir de la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos .....	44
<b>7. Biogénesis del gránulo de PHA .....</b>	<b>46</b>
<b>8. Producción industrial de PHAs .....</b>	<b>48</b>
8.1. Producción global de PHAs.....	48
8.2. Aspectos clave en la optimización de la producción .....	50
8.2.1. Fuentes de carbono empleadas .....	50
8.2.2. La purificación de los PHAs .....	51
8.2.3. Diseño del proceso.....	52
8.2.4. Ingeniería genética de las cepas productoras .....	53
8.3. Un sistema alternativo: producción de PHAs en plantas.....	54
<b>9. Aplicaciones biotecnológicas de los PHAs.....</b>	<b>55</b>
9.1. Fabricación de diferentes objetos, envases y envoltorios .....	55
9.2. Materiales para bio-implantes .....	56
9.3. Fuente de ácidos hidroxialcanoicos quirales .....	57
9.4. Fuente de biocombustibles .....	58
9.5. Vehículos transportadores y liberadores de fármacos .....	58
9.6. Plataforma para la purificación de proteínas .....	59
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>



<b>1. Cepas microbianas .....</b>	<b>67</b>
<b>2. Vectores .....</b>	<b>69</b>
<b>3. Medios de cultivo .....</b>	<b>72</b>
<b>4. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos .....</b>	<b>74</b>
4.1. Cultivo en medio sólido .....	74
4.2. Cultivo en medio líquido y curvas de crecimiento.....	74
<b>5. Métodos generales para el análisis y/o tratamiento de las muestras de DNA.....</b>	<b>75</b>
5.1. Determinación de la concentración y pureza del DNA.....	75
5.2. Digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción .....	76
5.3. Desfosforilación del DNA.....	77
5.4. Ligación de los fragmentos de DNA .....	77
5.5. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.....	78
5.6. Aislamiento del DNA genómico de <i>Pseudomonas putida</i> .....	79
5.7. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> : minipreparaciones .....	81
5.8. Recuperación del DNA de los geles de agarosa .....	82
5.9. Transformación de <i>E. coli</i> .....	82
5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	84
5.11. Análisis de las secuencias de DNA y de aminoácidos .....	88
<b>6. Obtención de cepas mutantes de <i>Pseudomonas putida</i>.....</b>	<b>88</b>
6.1. Transferencia de plásmidos por conjugación .....	88
6.2. Construcción del vector de expresión con el gen de interés.....	89
6.3. Mutantes obtenidos por integración del plásmido pK18:: <i>mob</i> en el genoma de <i>Pseudomonas</i> .....	90
<b>7. Métodos generales para el estudio de polihidroxicanoatos y de sus derivados.....</b>	<b>93</b>
7.1. Tinción de las muestras .....	93
7.2. Extracción de los polímeros .....	94
<b>8. Microscopía electrónica .....</b>	<b>95</b>
8.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	96

8.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	97
9. Modelado de proteínas .....	98
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
1. Estudio comparativo del <i>cluster pha</i> en distintas estirpes de <i>Pseudomonas putida</i> ..	102
2. Producción de polihidroxicanoatos en <i>Pseudomonas putida</i> N.....	126
2.1. Producción en medio mínimo suplementado con octanoato .....	126
2.2. Producción en medio mínimo suplementado con octanoato y glucosa.....	128
3. Construcción de cepas superproductoras de PHAs derivadas de <i>P. putida</i> N.....	131
3.1. Expresión del gen <i>phaF</i> en <i>trans</i> en <i>P. putida</i> N .....	131
3.2. Expresión de una copia adicional del <i>cluster pha</i> en <i>Pseudomonas putida</i> N.....	132
3.3. Deleción de los genes <i>fadBA</i> en <i>Pseudomonas putida</i> N .....	134
3.3.1. Producción de PHAs utilizando <i>P. putida</i> N $\Delta$ <i>fadBA</i> en distintos medios de producción.....	139
4. Expresión en <i>trans</i> del gen <i>phaZ</i> de <i>Pseudomonas putida</i> U en <i>Pseudomonas putida</i> N y en <i>Pseudomonas putida</i> N $\Delta$ <i>fadBA</i> .....	140
5. Efecto de la fasina PhaF en la morfología y en el tamaño de <i>P. putida</i> N.....	144
5.1. Morfología de <i>P. putida</i> N a concentraciones subinhibitorias de ampicilina .....	144
5.2. Efecto de la expresión en <i>trans</i> de PhaF en la morfología de <i>P. putida</i> N.....	146
5.3. Observaciones ultraestructurales entre las células de <i>P. putida</i> N .....	150
5.4. Disrupción del gen <i>phaF</i> en <i>Pseudomonas putida</i> N .....	152
5.5. Disrupción génica de <i>ftsZ</i> en <i>P. putida</i> U.....	153
6. Adaptación de <i>Pseudomonas putida</i> en medio de producción.....	155
6.1. Crecimiento de <i>P. putida</i> U y <i>P. putida</i> $\Delta$ <i>fadBA</i> en medio definido con distintas fuentes de carbono.....	156
6.2. Aislamiento e identificación de mutantes de la cepa superproductora <i>PpU</i> $\Delta$ <i>fadBA</i> incapaces de sintetizar PHAs .....	158
6.3. Análisis de las causas responsables de las diferencias de crecimiento observadas. Cultivo en MM con butirato.....	161
6.4. Identificación de las secuencias mutadas en el <i>cluster pha</i> en los mutantes PHA <sup>-</sup> .....	163

6.5. Análisis funcional de las proteínas mutadas: restauración de la capacidad para sintetizar PHAs .....	166
6.5.1. Expresión de <i>phaC1</i> , <i>phaC1</i> <sup>*</sup> y <i>phaC2</i> en las cepas mutantes PHA <sup>-</sup> .....	167
6.5.2. Expresión en <i>trans</i> de <i>phaC1</i> , <i>phaC1</i> <sup>*</sup> y <i>phaC2</i> en <i>P. putida</i> U $\Delta$ <i>pha</i> .....	169
6.5.3. Coexpresión en <i>trans</i> de PhaC1 <sup>*</sup> y PhaC2 en <i>PpU<math>\Delta</math>pha</i> .....	170
6.6. Análisis estructural <i>in silico</i> de las mutaciones de PhaC1 y de una posible interacción proteína-proteína entre PhaC1 y PhaC2.....	173
6.7. El proceso de adaptación: una visión de conjunto.....	176
<b>7. Expresión del <i>cluster pha</i> en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>180</b>
7.1. Expresión del <i>cluster pha</i> en <i>E. coli</i> DH10B .....	180
7.2. Expresión del <i>cluster pha</i> en <i>E. coli</i> pN131 .....	183
<b>8. Cultivo de <i>P. putida</i> N<math>\Delta</math><i>fadBA</i> y <i>P. putida</i> U<math>\Delta</math><i>fadBA</i> en medios mínimos conteniendo ácido adípico .....</b>	<b>184</b>
<b>9. Cultivo de <i>P. putida</i> N y <i>P. putida</i> N <math>\Delta</math><i>fadBA</i> en MM con butirato .....</b>	<b>186</b>
<b>10. Cultivo de <i>P. putida</i> N <math>\Delta</math><i>fadBA</i> en glicerol .....</b>	<b>186</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>193</b>



## ABREVIATURAS

3HA	3-hidroxicanoatos
3HAME	Metil ésteres de PHAs
3HBME	Metil ésteres de PHB
Abs <sub>540</sub>	Absorbancia medida a 540 nm
ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
Ap <sup>R</sup>	Resistencia a ampicilina
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Cm <sup>R</sup>	Resistencia a cloranfenicol
CoA	Coenzima A
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
Gm <sup>R</sup>	Resistencia a gentamicina
HB	Hidroxibutirato
HV	Hidroxivalerato
IPTG	Isopropanil-β-D-galactopiranosido
Km <sup>R</sup>	Resistencia a kanamicina
LB	<i>Lysogenic Broth</i>
MCS	Sitio de clonación múltiple
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MM	Conjunto de sales del medio mínimo
MMB	Medio mínimo butirato

MMO	Medio mínimo octanoato
MPa	Megapascal
“n”X	Solución concentrada “n” veces (p. ej. 10X = 10 veces concentrada)
NAD	Nicotina adenina dinucleótido
NADH	Nicotina adenina dinucleótido reducido
NADPH	Fosfato de nicotina adenina dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	Amino terminal
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas que se unen a penicilina
PBS	Polibutilén succinato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Polietileno
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PHBHx	Polihidroxibutirato-co-hexanoato
PHBO	Polihidroxibutirato-co-octanoato
PHBOd	Polihidroxibutirato-co-hidroxiocetadecanoato
PHBV	Polihidroxibutirato-co-valerato
PHO	Polihidroxiocetanoato
PLA	Polilactato
pMC	Plásmido pBBR1MCS-3
PP	Polipropileno
PTT	Poli(tereftalato de trimetileno)
REP	Secuencia palindrónica extragénica y repetitiva
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RNAr	Ácido ribonucleico ribosómico
Rf <sup>R</sup>	Resistencia a rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
σ	Factor sigma de la RNA polimerasa
SDS	Dodecilsulfato sódico

SEM	Microscopía electrónica de barrido
TAE	Tris acetato EDTA
Tc <sup>R</sup>	Resistencia a tetraciclina
TE	Tris EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TPS	Almidón termoplástico
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

Aminoácidos:

Ala (A) Alanina	Gly (G) Glicina	Pro (P) Prolina
Arg (R) Arginina	His (H) Histidina	Ser (S) Serina
Asn (N) Asparragina	Ile (I) Isoleucina	Thr (T) Treonina
Asp (D) Aspártico	Leu (L) Leucina	Trp (W) Triptófano
Cys (C) Cisteína	Lys (K) Lisinaa	Tyr (Y) Tirosina
Gln (Q) Glutamina	Met (M) Metionina	Val (V) Valina
Glu (E) Glutámico	Phe (F) Fenilalanina	





# Introducción



El desarrollo de nuevos materiales ha contribuido de manera importante al progreso social, cultural y económico de la especie humana. Los individuos pertenecientes al género *Homo* cuentan, entre sus singulares características, con la capacidad para elaborar distintas herramientas y utensilios. Tal es la significación de esta habilidad, que se ha utilizado para dar nombre a distintas épocas de la Historia. Así, la Edad de Piedra y la Edad de los Metales (dividida en Edad de Cobre, Edad de Bronce y Edad de Hierro), llevan el nombre del material o materiales cuyo dominio supuso un hito fundamental en la adaptación y evolución de aquellos homínidos. La madera, la arcilla, la cerámica, el cristal y más recientemente el plástico, entre otros, también han sido materiales clave para el desarrollo de distintas sociedades a lo largo de la historia (Larson, 2015).

El término plástico alude a un amplio y diverso grupo de materiales que se encuentran presentes de tantas formas y en tantos objetos que puede resultar difícil identificarlos. Según el diccionario de la Real Academia Española (RAE) se define “plástico”, adjetivo, como: “capaz de ser moldeado”; “dicho de un material: que mediante una compresión, puede cambiar de forma y conservar esta de modo permanente, a diferencia de los cuerpos elásticos”; “dicho de ciertos materiales sintéticos: que pueden moldearse fácilmente y están compuestos principalmente por polímeros, como la celulosa”. En todas sus acepciones hace referencia a su definición clásica (del griego *πλαστικός*, *plastikós*), previa a la existencia de los polímeros a los que ahora da nombre, que describía cualquier cosa que pudiera ser fácilmente moldeable, es decir, aquella a la que se le pudiera dar forma.

El primer plástico sintético moderno fue la parkesina, ideada y patentada por el británico Alexander Parkes a mediados del siglo XIX. Este material se obtuvo al disolver piroxilina (cuyo principal componente era nitrato de celulosa) en una mezcla de solventes (Parkes, 1866). En 1866, Parkes fundó la Parkesine Co. con el fin de explotar comercialmente su invención. Sin embargo, un material que a la postre se revelaría prometedor, no encontró mercado en aquel entonces, y la actividad de la empresa cesó al cabo de dos años (Gilbert, 2017a).

En 1868, John Wesley Hyatt desarrolló el celuloide. Durante el siglo XIX la utilización de marfil para fabricar todo tipo de objetos, desde peines a bolas de billar, se había extendido ampliamente. Fue precisamente un fabricante de bolas de billar quien, ante la escasez de marfil, ofreció un premio importante (10.000 dólares) a quien descubriese un sustituto al marfil natural para la fabricación de sus bolas de billar. El compuesto que presentó Hyatt había sido obtenido

a partir de una mezcla de nitrato de celulosa y alcanfor. El celuloide no fue el producto ganador de aquel concurso, pero comenzó a utilizarse industrialmente en la fabricación de diversos objetos y de películas para la industria cinematográfica, alcanzando un gran éxito comercial (Painter y Coleman, 2008).

El siguiente hito histórico en el desarrollo de los plásticos sintéticos tuvo lugar en 1909, cuando Leo H. Baekeland condensó una mezcla de fenol y formaldehído, a la que añadía sales alcalinas, para obtener un producto al que llamaría baquelita. Se trataba de un polímero termoestable muy resistente, que se endurecía al ser sometido a elevadas temperaturas bajo las condiciones adecuadas, y que mantenía su dureza al ser sometido a altas temperaturas (300 °C) o frente a solventes orgánicos (Baekeland, 1910). Con la baquelita nació la industria moderna del plástico y se fabricaron en masa todo tipo de objetos para el hogar y la oficina, como radios y teléfonos (Osswald y Menges, 2012).

En 1926 se produciría un giro conceptual importante de la mano del químico alemán Hermann Staudinger, quien demostró que los polímeros se organizaban en cadenas lineales de moléculas formando macromoléculas, contra lo que indicaban las hipótesis esgrimidas en la época (Osswald y Menges, 2012). En las décadas posteriores, la síntesis de nuevos polímeros plásticos se apoyaría en esta idea. Así surgió el nylon en los años 30, la primera fibra artificial, desarrollada por Wallace Carothers y su grupo de investigación en el seno de la empresa DuPont (Osswald y Menges, 2012). También a comienzos de esa década, los químicos Eric Fawcett y Reginald Gibson descubrieron el polietileno en la compañía Imperial Chemical Industries, al comprobar que el etileno polimerizaba en condiciones de calor y alta presión (Gilbert, 2017a). Otras modificaciones químicas del polietileno condujeron a la producción industrial del cloruro de polivinilo (PVC), cuya polimerización había sido problemática hasta entonces, y al descubrimiento del poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), más conocido por el nombre comercial de teflón (Gilbert, 2017a).

Ya en los años 50, Karl Ziegler se percató de que determinados compuestos organometálicos añadidos al etileno facilitaban su polimerización a bajas presiones, funcionando como catalizadores. El polietileno sintetizado mediante este método poseía cadenas largas y menos ramificadas, lo que mejoraba su resistencia y su dureza. Giulio Natta mediante experimentos similares obtuvo el polipropileno. En 1963 Ziegler y Natta compartirían el Premio Nobel de Química por sus trabajos sobre los catalizadores denominados desde entonces Ziegler-Natta (Gilbert, 2017a).

Hoy día, los plásticos son un material de uso común, presente en la mayoría de los objetos que nos rodean. Con ellos se fabrican todo tipo de utensilios, desde los más simples y desechables hasta superficies antiadherentes, prendas de vestir o componentes de los últimos dispositivos electrónicos con los que nos comunicamos. La polivalencia y el bajo coste del plástico han facilitado que su presencia sea ubicua, que se utilice para desarrollar nuevas tecnologías y aplicaciones (impensables antes de la existencia de este material) que han facilitado en gran medida la vida de los seres humanos. En definitiva, estos compuestos se han convertido en una parte imprescindible de nuestras actividades cotidianas.

Sin embargo, la utilización de los plásticos convencionales presenta inconvenientes importantes. Por un lado, el origen de la mayoría de ellos es petroquímico y, teniendo en cuenta que las reservas de petróleo son finitas, su producción no podrá perdurar eternamente. La dependencia de este material por parte de la sociedad actual insta a la búsqueda de alternativas antes de que su obtención se vea comprometida.

Por otro lado, se trata de compuestos muy recalcitrantes cuyo enorme consumo genera desechos que contaminan gran parte de la Biosfera. Tal es la dimensión del problema que pueden aparecer acúmulos de plástico en los lugares más recónditos del planeta. Así, se ha estimado que existen unas 250.000 toneladas de plástico en los océanos, y se han observado concentraciones particularmente importantes en los giros oceánicos subtropicales (Eriksen *et al.*, 2014). La comunidad científica registra cada vez con mayor frecuencia la distribución generalizada de microplásticos en la cadena trófica. Sus efectos sobre la diversidad biológica y su influencia en la salud humana todavía no se conocen con precisión (Avio *et al.*, 2015; Setälä *et al.*, 2014; Wierckx *et al.*, 2015).

Por todo ello, es importante desarrollar una alternativa sostenible a unos plásticos que siendo imprescindibles en la vida del ser humano, también pueden ser dañinos. Los biomateriales, y concretamente los bioplásticos, se presentan como una alternativa real y necesaria, ya que solventarían parte de los problemas asociados a los plásticos de origen petroquímico.

## **1. Biomateriales plásticos**

Se denominan bioplásticos a aquellos polímeros plásticos que proceden de fuentes renovables de origen biológico y que poseen características similares a los plásticos de origen

petroquímico, esto es, a los derivados del petróleo. A menudo se asocia erróneamente el concepto de bioplástico con la cualidad biodegradable, cuando no siempre se puede establecer dicha relación. Este tipo de polímeros pueden ser biodegradables como el polilactato (PLA), los polihidroxicanoatos (PHA), el almidón o la celulosa; o no biodegradables, caso del polietileno (PE), del poli(tereftalato de etileno) (PET) o el poli(succinato de butileno) (PBS). Sin embargo, no todos los polímeros biodegradables son bioplásticos (Babu *et al.*, 2013).

Actualmente, la producción anual de plástico en todo el mundo alcanza los 300 millones de toneladas. Se trata de un mercado dominado por los plásticos de origen petroquímico, en el que los bioplásticos representan menos del 1%. Este porcentaje supuso 1,7 millones de toneladas en 2014, según datos de European Bioplastics ([www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)) y Nova Institute<sup>1</sup> (Aeschelmann y Carus, 2015). Se prevé que en 2019 la producción de este tipo de biopolímeros alcance los 7,8 millones de toneladas. De ahí el interés en este tipo de biopolímeros, ya que se trata de un mercado con proyección, en el que se observa un crecimiento continuo año tras año.



**Figura 1.** Capacidad global de producción de bioplásticos en 2014. En tonos de color verde se representan aquellos bioplásticos que no son biodegradables, mientras que en tonos de color naranja se reflejan aquellos que son biodegradables. PET, poli(tereftalato de etileno); PE, polietileno; PTT, poli(tereftalato de trimetileno); PA, poliamida; PHA, polihidroxicanoatos. Se indica el porcentaje que corresponde a cada tipo de bioplástico. Fuente: Adaptado de European Bioplastics y Nova Institute (2015) ([www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)).

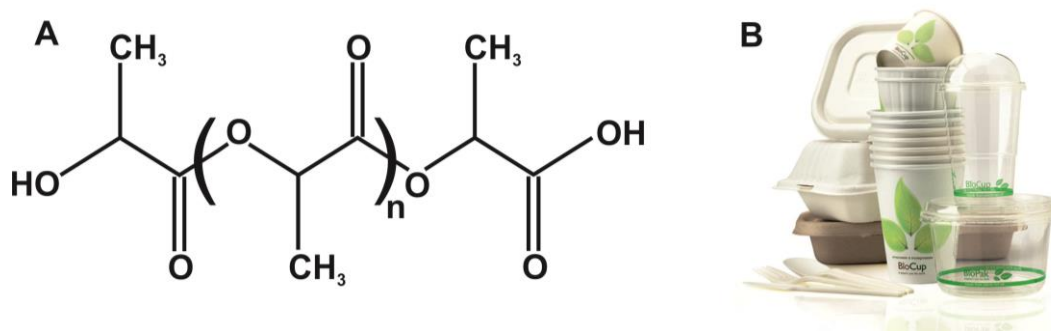
<sup>1</sup>European Bioplastics es la asociación que representa los intereses de la industria europea de los bioplásticos y está constituida por las principales empresas e instituciones del sector.

Nova Institute es una empresa alemana de consultoría e investigación de mercados en el ámbito de la bioeconomía y la biotecnología industrial.

La presente tesis doctoral versa sobre uno de estos biomateriales plásticos, los polihidroxicanoatos, pero en este primer apartado se describirán otros polímeros de origen, total o parcialmente, biológico.

### 1.1. Polilactato (PLA)

El polilactato (PLA) es un poliéster alifático, formado por unidades repetidas de ácido láctico (LA). Este monómero es un ácido hidroxicarboxílico que se obtiene por fermentación bacteriana del almidón u otros azúcares procedentes de cultivos vegetales tales como el maíz, la caña de azúcar y la patata (Babu *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2010).



**Figura 2.** A, estructura química del polilactato (PLA). B, algunos objetos que a día de hoy se fabrican con este material (productos de la empresa Biopak fabricados con el PLA de Natureworks; imagen tomada de: [www.ecobuy.org.au/products/biopak](http://www.ecobuy.org.au/products/biopak)).

La producción de PLA se lleva a cabo bien por condensación directa (poli-condensación) del ácido láctico o por polimerización de los dímeros cíclicos del ácido láctico (láctidas). Dependiendo de la proporción y de la naturaleza estereoquímica de los monómeros (D o L) se pueden obtener varios tipos de PLA, con propiedades mecánicas diferentes. Variando la proporción de los isómeros, los PLA pueden ser cristalinos, cuanto mayor sea el contenido de la forma L, o amorfos, si es mayor la cantidad de D-LA (Södergård y Stolt, 2002).

El polímero que se obtiene de la L-láctida (PLLA) es duro y transparente, con una capacidad de elongación previa a la rotura (porcentaje que expresa cuánto puede ser estirado un plástico antes de romperse) de entre el 85% y el 105%, y una fuerza tensil (tensión necesaria para romper un polímero) de 45-70 MPa. Tiene un punto de fusión de 170-180 °C y una temperatura de transición vítrea (temperatura por debajo de la cual el polímero cristaliza) de 53 °C (Mochizuki y Hirami, 1997). El PLA que se comercializa habitualmente está compuesto mayoritariamente por PLLA y contiene hasta un 8% de D-LA. El grado de cristalinidad de este polímero es del 16% y tiene una temperatura de fusión de 155 °C. La temperatura de fusión

del PLA se puede incrementar 40-50 °C y su temperatura de flexión bajo carga (HDT) se puede aumentar de 60 a 190 °C mezclando este polímero con PDLA. Incluso la adición de tan solo un 3-10% de PDLA mejora notablemente las propiedades mecánicas, al funcionar como agente de nucleación e incrementar la cristalización (Niaounakis, 2015).

Además de ser biodegradable, el PLA presenta unas propiedades físicas similares a los plásticos tradicionales. Gracias a ello, la manufactura de productos utilizando este material se puede llevar a cabo en el equipamiento industrial que se utiliza actualmente con los plásticos petroquímicos. Este hecho es importante ya que la inversión en nueva maquinaria de procesado no constituiría una barrera de acceso al mercado. Los PLA tienen muchas aplicaciones y han sido utilizados principalmente para el embalaje de alimentos, pero también en la fabricación de dispositivos médicos y electrónicos, en la industria del automóvil, textil etc. En los últimos años se ha extendido su uso como materia prima en la impresión 3D de objetos (Kim *et al.*, 2015; Serra *et al.*, 2013). Existen varias empresas que se dedican a la producción de este bioplástico en todo el mundo, entre las que se encuentran Natureworks LLC (EE. UU.) y Dow Chemical Company (EE. UU.) (Babu *et al.*, 2013; Madhavan Nampoothiri *et al.*, 2010).

## 1.2. Poli(succinato de butileno) (PBS)

El poli(succinato de butileno) (PBS) es un poliéster obtenido a partir de ácido succínico y de 1,4-butanodiol. La síntesis de ambos monómeros se puede llevar a cabo a partir de compuestos petroquímicos o por rutas bacterianas de fermentación (Xu y Guo, 2010).

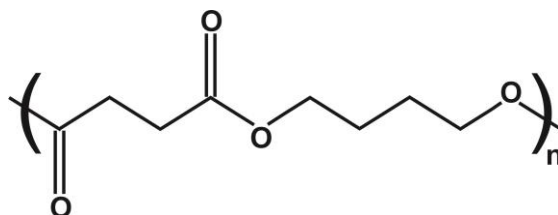


Figura 3. Estructura química del PBS.

Este polímero termoplástico se caracteriza por una coloración blanquecina y una estructura semicristalina. Su temperatura de transición vítrea es notablemente baja (situándose en torno a -32 °C), y posee una temperatura de fusión de 114 °C. Con respecto a sus propiedades mecánicas, su fuerza tensil es de 34 MPa y su capacidad de elongación previa a la rotura alcanza el 560% (Fujimaki, 1998; Xu y Guo, 2010).



Entre sus aplicaciones se encuentran los films y espumas para embalaje, la elaboración de artículos desechables, fibras, materiales médicos, sistemas de encapsulación de fármacos, etc. (Xu y Guo, 2010).

Actualmente, su producción se basa principalmente en los recursos fósiles, aunque son varias las empresas (BASF, Myriant, Reverdia etc.) que están realizando grandes esfuerzos para conseguir la producción de este compuesto por fermentación. El objetivo es alcanzar un nivel de producción que permita atender los grandes mercados con un material íntegramente de origen biológico.

### 1.3. Polietileno (PE)

El polietileno (PE) es el material plástico convencional más relevante si consideramos el volumen de su producción anual y, tradicionalmente, se produce a partir de hidrocarburos fósiles. La producción de PE se lleva a cabo mediante polimerización de etileno bajo presión, a elevada temperatura (80-300 °C) y en presencia de un catalizador. El polietileno de origen biológico se obtiene mediante la deshidratación del bioetanol producido en la fermentación microbiana de residuos lignocelulósicos, melazas y otra biomasa de origen vegetal (Bedia *et al.*, 2011). Al final del proceso de fermentación, el agua se elimina para producir una mezcla azeotrópica de etanol hidratado. Este etanol se deshidrata generando polietileno (Chen *et al.*, 2007).

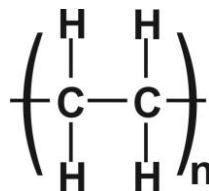


Figura 4. Estructura química del polietileno (PE).

El polietileno se utiliza ampliamente en ingeniería, agricultura, como material de empaquetamiento y, debido a su bajo precio, para la fabricación de muchos artículos de uso diario (Shah *et al.*, 2008).

Si bien la producción biológica de este polímero se conoce desde los años 60 del siglo pasado, no resultaba rentable desde el punto de vista económico. Actualmente, empresas como Braskem (Brasil), Dow Chemical (EE. UU.) o Solvay (Bélgica) ya producen biopolietileno a nivel industrial (Babu *et al.*, 2013).

#### 1.4. Poli(tereftalato de etileno) (PET) y poli(tereftalato de trimetileno) (PTT)

El poli(tereftalato de etileno) (PET) es un poliéster termoplástico producido mediante policondensación de etilenglicol (EG) y de ácido tereftálico (TPA), descubierto y patentado por Whinfield y Dickson en 1941 (Whinfield, 1946). Es uno de los plásticos más empleados en la elaboración de fibras (textiles) y de envases (botellas y contenedores para alimentos), así como en la construcción de dispositivos electrónicos.

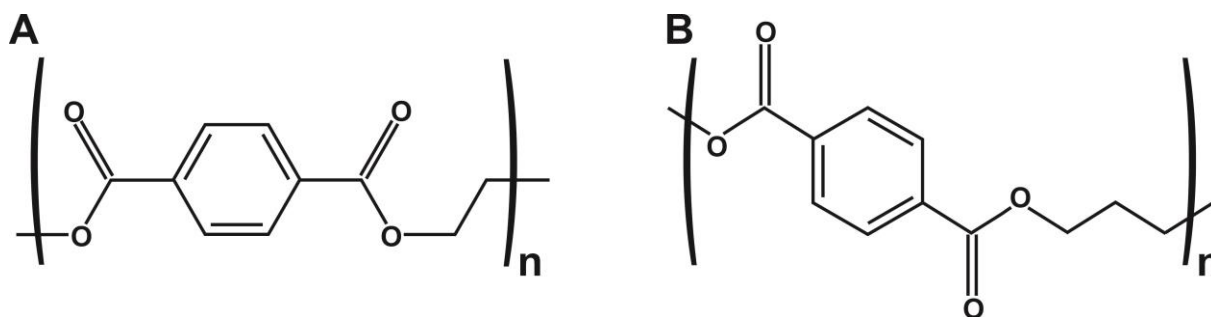


Figura 5. Estructura química del PET (A) y del PTT (B).

El EG se puede obtener a partir del bio-etileno producido por fermentación. Para ello, el etileno se somete a una catálisis oxidativa que conduce a la obtención de óxido de etileno. Finalmente, la hidrólisis del óxido de etileno origina el EG. La producción y comercialización de bio-EG es rentable, como ya demostró India Glycols, quien lo produce desde 1989. Por su parte, la producción biológica de TPA es más compleja, aunque se están haciendo progresos notables para llevar su producción a escala industrial. La empresa Toray Industries Inc. utiliza el bio-p-xileno proporcionado por Gevo Inc. para obtener bio-TPA y producir finalmente bio-PET a escala planta piloto (Tachibana *et al.*, 2015). Otras empresas, tales como SABIC Innovative plastics, BP o Virent, también se encuentran desarrollando sus propias estrategias para producir TPA a partir de residuos vegetales (Collias *et al.*, 2014). El objetivo de todas ellas es la puesta en el mercado de un PET 100% biológico.

A día de hoy el bio-PET se obtiene mediante un proceso mixto que consiste en la obtención de EG mediante un proceso biológico y el TPA desde derivados del petróleo. La producción se ha incrementado notablemente, en parte por el éxito de la botella hecha con bio-PET e introducida por Coca-Cola en 2009.

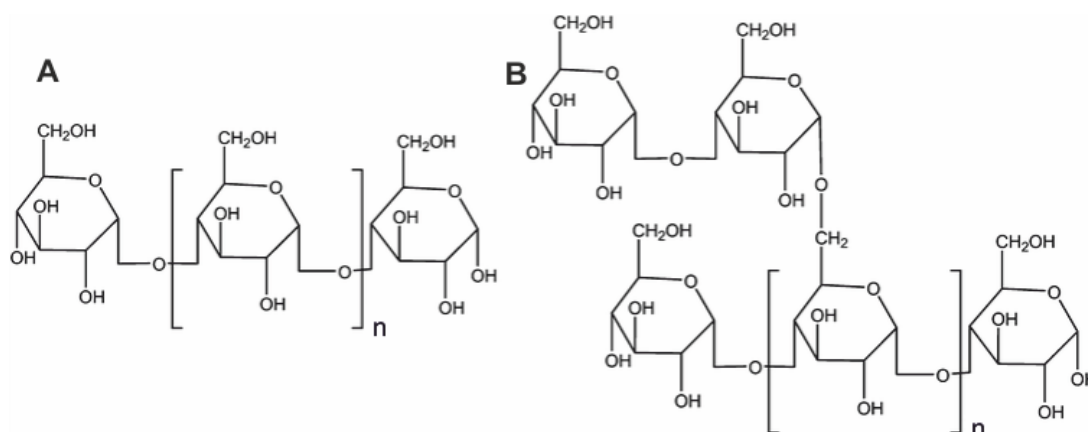
El poli(tereftalato de trimetileno) (PTT) es un poliéster muy resistente, químicamente estable, fácilmente procesable, suave y flexible (Guo *et al.*, 2012). Se produce mediante polimerización por condensación o transesterificación. Las dos unidades monoméricas que se

utilizan en la producción de este polímero son el 1,3-propanediol y el ácido tereftálico. El 1,3-propanediol se puede producir por fermentación de los glúcidos presentes en distintos cultivos vegetales o en sus residuos, tratándose en este caso de bio-PTT, al igual que en el caso del PET (Saxena *et al.*, 2009).

El PTT ha sido comercializado por la empresa DuPont, con el nombre de Sorona<sup>®</sup>. Este polímero lineal cristalizable tiene una temperatura de fusión de 228 °C y una temperatura de transición vítrea en torno a los 50 °C (Kurian, 2005). Sus principales aplicaciones comerciales corresponden a la industria textil, empleándose sobre todo para la elaboración de las fibras con las que se fabrican alfombras y tapicería (Saxena *et al.*, 2009).

### 1.5. Almidón

El almidón es un biopolímero natural presente en muchas plantas (cereales, legumbres, tubérculos etc.) como producto final de la fotosíntesis. Se acumula en forma de gránulos discretos, como reservorio de energía, y está formado por dos polisacáridos: la amilosa (lineal), y la amilopectina (muy ramificada) (van Soest y Vliгентhart, 1997). El almidón natural tiene una estructura semicristalina, por lo que no es adecuado para su procesado termoplástico. Para conseguir un material plástico es necesario destruir la organización supramolecular del almidón natural, utilizando algún plastificante (principalmente agua y glicerol, pero también glucosa, sorbitol, polietilenglicol, sacarosa etc.) y aplicando presión y calor. Se obtiene así un almidón termoplástico (TPS, por sus siglas en inglés), cuyas propiedades térmicas y mecánicas varían notablemente en función de la cantidad de plastificante empleado (Halley, 2005; Liu *et al.*, 2009; van Soest y Vliгентhart, 1997; Storz y Vorlop, 2013).



**Figura 6.** Estructura química de los polímeros que componen el almidón. A, amilosa; B, amilopectina. Adaptado de Mekonnen *et al.*, 2013.

Si bien el TPS es barato y biodegradable, y su producción es factible en grandes cantidades, también cuenta con algún inconveniente importante. Se trata de un polímero muy sensible al contacto con el agua o a los ambientes húmedos, lo que limita enormemente sus posibles usos. Con el fin de mejorar esa propiedad, se han elaborado soluciones que implican la adición de plastificantes (sorbitol, xilol) o de rellenos (lignina) más hidrofóbicos, y las mezclas del TPS con otros plásticos para dar lugar a materiales biodegradables, suficientemente robustos, flexibles e impermeables (Halley, 2005; Storz y Vorlop, 2013).

Este tipo de material se ha utilizado en la fabricación de films, bolsas, materiales de embalaje etc. Entre las empresas productoras más importantes se encuentran Novamont (Italia), Japan Corn Starch (Japón) Rodenberg (Holanda) y Biotec (Alemania) (Babu *et al.*, 2013).

### 1.6. Celulosa

La celulosa es el polímero que constituye mayoritariamente los tejidos de sostén de las plantas. Está formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que dan lugar a un polisacárido lineal no ramificado con morfología cristalina. La celulosa que se utiliza comercialmente procede fundamentalmente del algodón y de la pulpa de la madera. Se caracteriza por poseer una gran resistencia tensil (oscila de 62 a 500 MPa) y una capacidad de elongación previa a la rotura del 4% (Babu *et al.*, 2013). La modificación estructural, plastificación y/o mezcla con otros polímeros permite salvar los problemas que presenta la celulosa natural a la hora de ser procesada, como su alta viscosidad y su elevada temperatura de transición vítrea (Mekonnen *et al.*, 2013). Dependiendo de la mezcla y de su composición, las propiedades térmicas y mecánicas varían notablemente (Babu *et al.*, 2013).

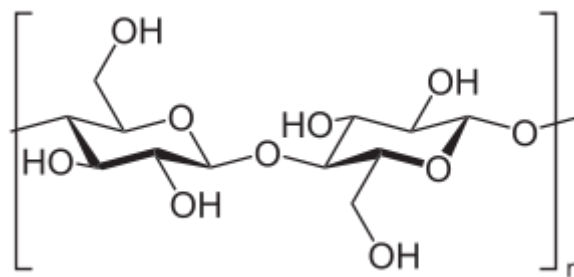


Figura 7. Estructura química de la celulosa.

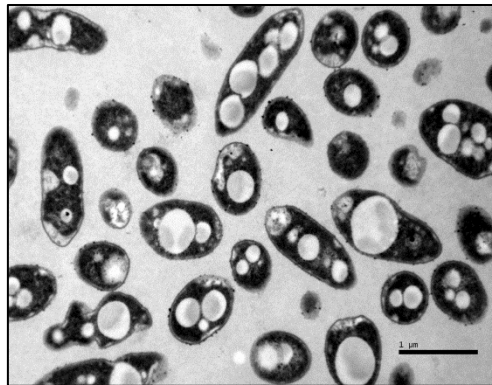
El material más importante derivado de la celulosa termoplástica es el acetato de celulosa. Su preparación se lleva a cabo por acetilación de los grupos hidroxilo de la pulpa de celulosa con anhídrido acético. Las propiedades térmicas, mecánicas y el grado de

biodegradación del acetato de celulosa dependen de su grado de acetilación, de la longitud de las moléculas de celulosa y del tipo y cantidad de plastificante que se añada en su procesado (Gilbert, 2017b).

Este biopolímero y sus derivados se utilizan para la obtención de films y fibras textiles, y en la obtención de productos usados para empaquetamiento, cuidado personal, productos farmacéuticos etc. Entre los principales fabricantes de productos celulósicos se encuentran FKUR (Alemania) y Eastman Chemical (EE. UU.), siendo este último el mayor productor a nivel mundial (Babu *et al.*, 2013).

## 2. Los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables con propiedades similares a las de los plásticos de origen petroquímico (termoplásticos como el polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo etc.) y producidos por distintas especies bacterianas. Se trata de poliésteres que generalmente están compuestos por ácidos 3-, 4-, 5- y 6- hidroxicarboxílicos (Park *et al.*, 2012; Zinn *et al.*, 2001). Fueron descubiertos en 1923 por Maurice Lemoigne en el Instituto Pasteur de Lille, cuando trabajaba sobre la causa de la acidificación de los cultivos de *Bacillus megaterium* en una atmósfera libre de oxígeno (Lemoigne, 1923).



**Figura 8.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de *Pseudomonas putida*, cultivada en un medio de composición definida (MM) que contenía octanoico (20 mM) como única fuente de carbono. En el centro de las células se aprecian los gránulos de polímero.

Muchos microorganismos (algunas arqueas y bacterias, tanto gram positivas como gram negativas) acumulan PHAs intracelularmente como depósito de carbono, energía y poder reductor, cuando existe un desequilibrio nutricional (falta de N, P, S, o exceso de precursores poliméricos). Otros microorganismos, como por ejemplo *Pseudomonas putida*, acumulan

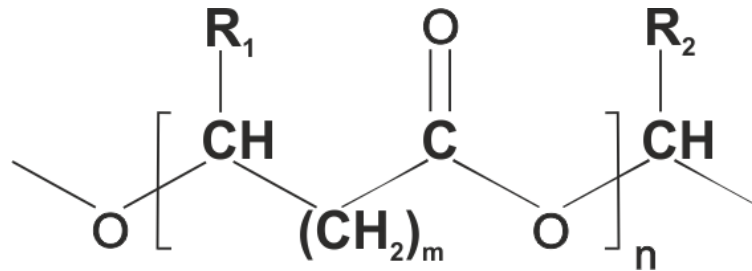
PHAs incluso cuando no hay limitación de nutrientes, y desde el comienzo de la fase de crecimiento exponencial (Carnicero *et al.*, 1997). Estos acúmulos de polímero se presentan como gránulos líquidos, amorfos y móviles que, cuando se producen en grandes cantidades, llegan a modificar el tamaño y la morfología de estas bacterias (Luengo *et al.*, 2003; Olivera *et al.*, 2010). Aunque tradicionalmente se ha identificado este material como un reservorio energético, parece que está implicado en muchas otras funciones, tales como tolerancia al estrés, formación de biofilms y en el mantenimiento del estado redox. El hecho de que este tipo de acúmulos se encuentren presentes y se hayan conservado en especies filogenéticamente muy alejadas, pone de relieve su importancia para el mantenimiento y la supervivencia celular (Aldor y Keasling, 2003; Ayub *et al.*, 2009; de Eugenio *et al.*, 2010a; Kalia *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2004).

Los bioplásticos, entre los que se encuentran los PHAs, se postulan como una alternativa necesaria y sostenible a los plásticos convencionales de origen petroquímico. Conforme determinados problemas medioambientales, tales como el calentamiento global y la disminución de las reservas fósiles, adquieren importancia, es necesario trabajar en la búsqueda de soluciones y en el desarrollo de nuevos materiales que salvaguarden las necesidades de la sociedad en el futuro. En este sentido, los PHAs no son solo una alternativa al material plástico como el polipropileno, sino que, al no ser tóxicos y ser biodegradables y biocompatibles, pueden utilizarse para la elaboración de productos de alto valor añadido tales como dispositivos médicos, portadores de fármacos, soportes de ingeniería tisular, o como fármacos en sí mismos (Gross y Kalra, 2002; Koller *et al.*, 2010; Urtuvia *et al.*, 2014).

### 3. Estructura química de los polihidroxicarboxilatos

Los polihidroxicarboxilatos son poliésteres con actividad óptica, compuestos en su mayor parte por monómeros de ácidos 3-hidroxicarboxílicos, aunque también pueden estar compuestos por ácidos 4-, 5- o 6-hidroxicarboxílicos, si bien estos constituyentes son los menos frecuentes (Steinbüchel y Valentin, 1995). Todos los monómeros que constituyen los PHAs son enantiómeros R, cuyo centro quiral se encuentra en el carbono unido al grupo hidroxilo, salvo aquellos casos especiales en los que no hay quiralidad (Madison y Huisman, 1999). De este modo, lo más frecuente es que el centro quiral se sitúe en el carbono 3, aunque también se han descrito casos en los que recae sobre el carbono 4, 5 o 6 (Doi *et al.*, 1987; Valentin *et al.*, 1994, 1996). En estos polímeros el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster

con el grupo hidroxilo del monómero adyacente. Cada monómero consta de una cadena lateral que se encuentra unida al carbono  $\beta$  o  $\beta$ . La naturaleza de este radical es muy variable, pudiendo estar integrada por grupos alquilo, sulfhidrilo, aromáticos, halogenados, epoxidados etc., y la presencia de cada uno de esos grupos confiere al polímero distintas propiedades (García *et al.*, 1999; Lageveen *et al.*, 1988a; Meng *et al.*, 2014; Olivera *et al.*, 2010; Song y Yoon, 1996).



**Figura 9.** Estructura química de los PHAs. La cadena lateral, R, tiene una longitud que puede variar de C1 a C11. Generalmente,  $m=1$  (3-OH-alcanoatos), pero también puede ser  $m=2$  (4-OH-alcanoato),  $m=3$  (5-OH-alcanoatos),  $m=4$  (6-OH-alcanoatos). El peso molecular vendrá determinado por el número de unidades monoméricas ( $n$ ).

Se han identificado más de 150 tipos de ácidos hidroxicarboxílicos que pueden ser utilizados como monómeros para constituir PHAs. Así, las combinaciones de monómeros y, por tanto, el número de polímeros distintos que pueden obtenerse con distintas propiedades son inmensos (Chen y Wu, 2005a; Gao *et al.*, 2011; Steinbüchel y Valentin, 1995).

Se pueden establecer varias clasificaciones de estos polímeros atendiendo a diferentes criterios, tal y como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los PHAs, obedeciendo a diferentes criterios (Olivera *et al.*, 2010).

<b>PHAs NATURALES</b>	<b>Frecuencia de aparición</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Comunes:</b> PHAs que se encuentran habitualmente como material de reserva en muchos microorganismos diferentes. Son polímeros compuestos por monómeros que se obtienen de diferentes fuentes de carbono a través de rutas metabólicas generales.</li> <li>- <b>No comunes:</b> Poliésteres que raramente se encuentran en la naturaleza y que están compuestos por monómeros naturales con una estructura química inusual. A su vez pueden ser naturales o no naturales (sintetizados por síntesis química).</li> </ul>
	<b>Estructura química y tamaño de los monómeros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>scl-PHA:</b> Constituidos por monómeros cuya longitud está comprendida entre 3 y 5 átomos de carbono.</li> <li>- <b>mcl-PHA:</b> Sus monómeros están formados por cadenas carbonadas de entre 6 y 14 átomos de carbono.</li> <li>- <b>lcl-PHA:</b> Contienen monómeros que tienen más de 14 átomos de carbono.</li> </ul>
	<b>Origen biosintético</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Naturales:</b> Producidos por microorganismos a partir de metabolitos generales.</li> <li>- <b>Semisintéticos:</b> Contienen monómeros que no pueden ser sintetizados por el microorganismo productor y que deben ser suplementados en el medio de cultivo (aromáticos o con otros grupos funcionales).</li> <li>- <b>Sintéticos:</b> Poliésteres que se obtienen completamente por una síntesis química, o por modificación química de PHAs naturales o semisintéticos.</li> </ul>
	<b>Tipos de monómeros en PHA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Homopolímeros:</b> Los polímeros están compuestos por un único tipo de monómeros.</li> <li>- <b>Heteropolímeros:</b> Están constituidos por monómeros diferentes.</li> </ul>
	<b>Tipo de monómero acumulado por el microorganismo productor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>scl-PHA:</b> El microorganismo productor únicamente produce este tipo de polímero.</li> <li>- <b>mcl-PHA:</b> El microorganismo productor únicamente produce mcl-PHAs.</li> <li>- <b>scl-mcl-PHA:</b> El microorganismo productor es capaz de sintetizar PHAs híbridos de ambos tipos.</li> </ul>
<b>PHAs INUSUALES</b>	<b>Sintetizados por microorganismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>PHAs pertenecientes a la Clase I:</b> Sintetizados generalmente por pseudomonádidos pertenecientes al grupo de RNA ribosomal I. Llevan dobles o triples enlaces (PHAs insaturados) y/o contienen distintos grupos funcionales (metil, metoxi, etoxi, hidroxil, epoxi, acetoxi, carbonil, ciano, fenil, nitrofenil, fenoxi, tiofenoxi, cianofenoxi o monómeros alicíclicos) en las cadenas laterales que modifican las propiedades de los polímeros.</li> <li>- <b>PHAs pertenecientes a la clase II:</b> Polímeros con esqueletos alargados cuyos monómeros son distintos de los (R)-3-hidroxiácidos [p.ej. copolímeros que contienen unidades repetidas de ácido (R)-3-hidroxi-butírico y ácido (R)-4-hidroxi-butírico, P(3HB-4HB)].</li> <li>- <b>PHAs pertenecientes a la clase III:</b> Bioplásticos en los que sus monómeros están unidos por enlaces tioéster.</li> </ul>
	<b>Sintetizados por modificación química o física de los PHAs naturales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>PHAs funcionalizados:</b> PHAs a los que se les ha introducido algún grupo funcional (halógeno, epoxi, hidroxilo, carboxilo, o glucosilo).</li> <li>- <b>PHAs entrecruzados:</b> Bioplásticos que se obtienen por entrecruzamiento del polímero lineal, formando estructuras en red tridimensionales, utilizando métodos químicos o físicos.</li> <li>- <b>Copolímeros injertados de PHAs:</b> PHAs a los que se les han insertado fragmentos moleculares de otros polímeros dentro de sus cadenas laterales (quitosano, celulosa etc.).</li> <li>- <b>Copolímeros en bloque de PHA:</b> Polímeros sintetizados químicamente en los que se han insertado fragmentos moleculares pertenecientes a otros polímeros en la estructura de un PHA particular.</li> <li>- <b>Mezclas de PHAs con otros polímeros:</b> Se trata de mezclas físicas (por fundición o solución) de homopolímeros o copolímeros con diferentes estructuras y propiedades. Generalmente se trata de un polímero natural (PHB o un derivado, y uno o más polímeros sintéticos).</li> </ul>



Actualmente, la clasificación más utilizada para este tipo de poliéster es aquella que atiende al número de carbonos por el que están constituidos los monómeros y, según la cual, existen tres grupos principales (Madison y Huisman, 1999):

1. PHAs de cadena corta (*short chain length*-PHA, scl-PHA): Son aquellos que están compuestos por monómeros que tienen entre 3 y 5 átomos de carbono.

2. PHAs de cadena media (*medium chain length*-PHA, mcl-PHAs): Son aquellos que están compuestos por monómeros que tienen entre 6 y 14 átomos de carbono.

3. PHAs de cadena larga (*long chain length*-PHA, lcl-PHAs): Formados por monómeros que tienen más de 14 átomos de carbono.

Los scl-PHAs se caracterizan por poseer un alto grado de cristalinidad, una temperatura de transición vítrea alta (entre -13 y 4 °C), altas temperaturas de fusión (180 °C) y alto peso molecular (200.000–3.000.000 Da). Por el contrario, en los mcl-PHAs se ha descrito un bajo grado de cristalinidad, bajas temperaturas de transición vítrea (entre -25 y -40 °C), temperaturas de fusión bajas (entre 45 y 60 °C) y masas moleculares inferiores a las de los scl-PHAs (entre 160.000 y 360.000 Da) (Gross *et al.*, 1989; Khanna y Srivastava, 2005; Sudesh *et al.*, 2000).

La longitud que alcanza la cadena lateral también repercute en las propiedades mecánicas. Así, el scl-PHA más característico, el PHB, posee una baja capacidad de elongación previa a la rotura (6%), y una fuerza tensil que se sitúa en 30-40 MPa (al igual que la de sus copolímeros con 3HV). Cabe señalar como excepción el homopolímero de 4HB, poli-(4HB), el único scl-PHA natural cuyos monómeros no son quirales, que alcanza una altísima elongación previa a la rotura (1.000%). Por su parte, los mcl-PHAs presentan una capacidad de elongación previa a la rotura alta (hasta del 100%), y una fuerza tensil notablemente inferior a la de los scl-PHAs, de unos 10 MPa (Khanna y Srivastava, 2005; Williams y Martin, 2005; Koller *et al.*, 2013).

Dadas sus características, los scl-PHAs competirían en el mercado con termoplásticos como el polietileno (PE) o el polipropileno (PP) y, en función de las aplicaciones, también con el ácido poli-L-láctico de origen biológico. La cepa bacteriana más estudiada en relación con la producción de scl-PHAs es *Cupriavidus necator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*, (Vandamme y Coenye, 2004)) (Akaraonye *et al.*, 2010; Babel *et al.*, 2001; Hazer y Steinbüchel, 2007; Koller *et al.*, 2013).

Los mcl-PHA son mucho menos cristalinos que los scl-PHA. Los monómeros de cadena media pueden incorporar grupos funcionales que permiten modificaciones químicas post-sintéticas y que confieren a esos polímeros nuevas propiedades (Bear *et al.*, 1997; Levine *et al.*, 2016; Steinbüchel y Valentin, 1995; Tortajada *et al.*, 2013). Las propiedades de los mcl-PHAs son muy parecidas a las de los elastómeros y a la del látex. El productor microbiano más importante de mcl-PHAs es *Pseudomonas putida*, una bacteria que ha sido ampliamente estudiada por la comunidad científica (Gagnon *et al.*, 1992; Koller *et al.*, 2013; Timm y Steinbüchel, 1990; Witholt y Kessler, 1999).

Con lo que respecta a los lcl-PHA, estos polímeros son menos frecuentes y, por lo tanto, han sido mucho menos estudiados. Los co-polímeros de scl-lcl-PHA presentan una temperatura de fusión y una temperatura de transición vítrea menor que los scl-PHAs; la resistencia tensil se reduce prácticamente a la mitad, y la capacidad de elongación previa a la rotura del co-polímero es más de 100 veces superior (Singh y Mallick, 2008).

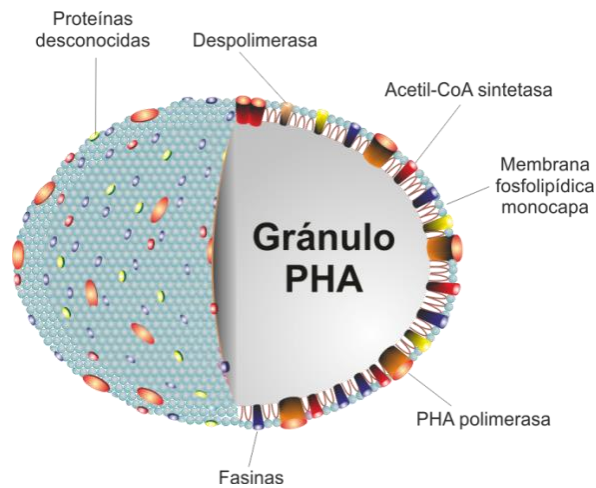
#### 4. El gránulo de PHAs: un orgánulo complejo y dinámico

Generalmente, los PHAs se acumulan en el interior celular como gránulos amorfos que refractan la luz, pudiendo llegar a suponer el 90% del contenido citoplasmático. Esta acumulación en gránulos separa los polímeros del lumen celular, evitando así que se produzca una alteración de la presión osmótica en la célula. El almacenamiento de estos compuestos en procariontes mejora su supervivencia, principalmente en situaciones de falta de nutrientes (Anderson y Dawes, 1990; Luengo *et al.*, 2003).

El aislamiento de los gránulos de PHAs, junto a las observaciones realizadas por microscopía electrónica de transmisión, permitieron establecer un modelo comúnmente aceptado sobre su estructura, según la cual el polímero estaría envuelto por una monocapa lipídica, en la que se encuentran embebidas distintas proteínas (Griebel *et al.*, 1968; Mayer y Hoppert, 1997). Recientemente, se ha cuestionado este modelo, y los experimentos realizados marcando con proteínas fluorescentes tanto los hipotéticos fosfolípidos como las proteínas asociadas al gránulo, sugieren que no existiría esa monocapa de fosfolípidos rodeando los PHAs, sino que se trataría de una envuelta constituida exclusivamente por proteínas (Bresan *et al.*, 2016). En cualquier caso, los acúmulos de PHAs son estructuras subcelulares con una organización compleja, razón por la que algunos autores los han catalogado como auténticos

orgánulos celulares, a los que se denomina “carbonosomas”, por analogía con los carboxisomas o magnetosomas (Jendrossek, 2009).

Las proteínas que se asocian al gránulo se pueden clasificar en cinco tipos diferentes: 1) PHA polimerasas, 2) PHA despolimerasas, 3) fasinas (proteínas asociadas al gránulo que tienen una función estructural), 4) acil-CoA sintetasas y 5) otras proteínas desconocidas y/o cuya función no está clara (posiblemente enzimas que catalizan la formación del gránulo y con función reguladora) (Jendrossek y Pfeiffer, 2014).



**Figura 10.** Representación esquemática clásica del gránulo de PHA, actualmente cuestionada. En ella, el polímero estaría confinado por una monocapa lipídica en la que se encontrarían embebidas distintas proteínas (Luengo *et al.*, 2003).

A continuación, pasaremos a describir cada uno de los diferentes tipos de proteínas asociadas al gránulo.

#### 4.1. PHA polimerasas<sup>2</sup>

Las PHA polimerasas son las enzimas clave del proceso de síntesis de PHAs. Catalizan la transformación de los sustratos monoméricos solubles hidroxiacil-coenzima A (CoA) en un polímero insoluble con la correspondiente liberación de CoA (Rehm, 2003). Se puede establecer una clasificación de las PHAs polimerasas atendiendo a sus características (secuencia nucleotídica, estructura primaria, especificidad de sustrato y composición en subunidades) (Rehm, 2003):

<sup>2</sup> Las PHA polimerasas también se denominan PHA sintetasas. En la presente tesis doctoral se opta por la primera denominación, más extendida en los trabajos realizados sobre mcl-PHAs.

Clase I: Estas polimerasas constan de una única subunidad (PhaC). Poseen un peso molecular que oscila entre 61 y 73 kDa (Qi y Rehm, 2001) y, de acuerdo con su especificidad de sustrato, estas enzimas utilizan preferentemente tioésteres CoA de varios (R)-3-hidroxiácidos grasos que comprenden entre 3 y 5 átomos de carbono (Rehm, 2003). El ejemplo típico poseedor de este tipo de polimerasas es la bacteria *Cupriavidus necator*.

Clase II: Al igual que las de la clase I, están compuestas por una única subunidad de 60-65 kDa. Las polimerasas de la clase II utilizan preferentemente tioésteres CoA de varios (R)-3-hidroxiácidos grasos formados por 6-14 átomos de carbono y los modelos bacterianos más estudiados son *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* (Rehm, 2003; Ren *et al.*, 2000).

Clase III: Polimerasa descrita en *Allochromatium vinosum*. Consta de 2 tipos de subunidades, (i) la subunidad PhaC (peso molecular alrededor de 40 kDa) cuya secuencia aminoacídica tiene una similitud de entre el 21 y el 28% con las polimerasas de la clase I y II, y (ii) la subunidad PhaE (peso molecular alrededor de 40 kDa) que no tiene ninguna similitud con las polimerasas que se han descrito hasta el momento. Estas enzimas tienen mayor afinidad por tioésteres CoA de (R)-3-hidroxiácidos grasos cuya longitud de cadena oscila entre 3 y 5 átomos de carbono (Liebergesell y Steinbüchel, 1992; Liebergesell *et al.*, 1992; Rehm, 2003).

Clase IV: Integradas por polimerasas similares a las de la clase III, pero con una subunidad PhaR (20 kDa de peso molecular) en lugar de la subunidad PhaE. El modelo bacteriano en el que más se ha estudiado es *Bacillus megaterium* (McCool y Cannon, 2001; Rehm, 2003).

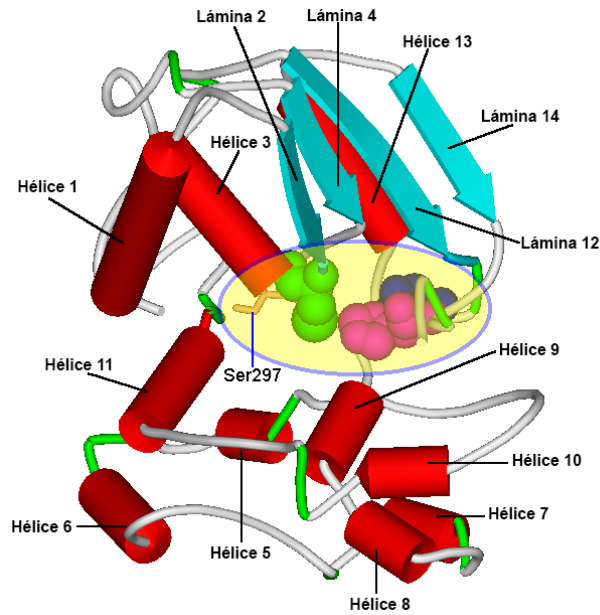
#### 4.1.1. Características estructurales

Durante décadas distintos grupos de investigación acometieron la cristalización de las polimerasas con el fin de resolver su estructura tridimensional. Sin embargo, todos los esfuerzos llevados a cabo fueron en vano, poniendo de relieve la extraordinaria dificultad de la tarea. En 2016, y prácticamente de forma simultánea, dos laboratorios lograron finalmente dilucidar la estructura del dominio catalítico de la polimerasa PhaC de *Cupriavidus necator* (Kim *et al.*, 2016a; Wittenborn *et al.*, 2016). En el proceso de cristalización, el dominio N-terminal (aminoácidos 1-200) se escindía del resto de la proteína, por lo que su cristalización se realizó de forma independiente y, posteriormente, se reconstruyó el modelo tridimensional completo de la enzima (Kim *et al.*, 2016b). Así, la PhaC1 de clase I estaría formada por dos

dominios: el C-terminal y el N-terminal. Según este modelo el dominio C-terminal consta de un núcleo del tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasa en el que se encuentra el centro activo y de un subdominio a través del cual forma dímeros con otra PhaC1. En posición opuesta a este subdominio, unido al núcleo, se sitúa el dominio N-terminal que mantiene la polimerasa unida al gránulo, y favorece la polimerización situando la cadena de PHB que está siendo sintetizada en las proximidades del centro activo (Kim *et al.*, 2016a, 2016b).

A pesar de que la estructura cristalina de la PHA polimerasa de clase II es aún desconocida, se ha obtenido una predicción de su modelo tridimensional en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp.* USM4-55 basándose en la epóxido hidrolasa de ratón y en la lipasa gástrica humana, respectivamente (Amara y Rehm, 2003; Wahab *et al.*, 2006). Una predicción de la estructura también se obtuvo en su momento para la polimerasa de Clase I de *Cupriavidus necator* (Rehm *et al.*, 2002) que, una vez cristalizada, ha sido corroborada. El modelo de la PHA polimerasa propuesto para la Clase II, señala a estas enzimas como integrantes de la superfamilia de proteínas de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, que contienen una secuencia consenso denominada caja del tipo lipasa (G-X-C-X-G). El alineamiento múltiple de secuencias ha llevado a la identificación de una caja del tipo lipasa en todas las PHA polimerasas, en la que la serina conservada en el sitio catalítico de la lipasa es sustituida en las polimerasas por una cisteína (Tan *et al.*, 2010).

En el caso de la polimerasa de *C. necator*, se ha propuesto que el sustrato y la cadena polimérica nascente se introducirían en un canal o cavidad presente en la polimerasa, que daría acceso al centro activo, y cuyos residuos estarían estabilizados por el monómero PhaC adyacente que completa el dímero (Kim *et al.*, 2016a). Los experimentos de mutagénesis dirigida han proporcionado información valiosa sobre la estructura de la polimerasa, y han indicado que varios residuos, como I247, V360, T393, F396, R398, Y445, H481 y I482 participan en la estabilización de los sustratos en el canal en el que se encuentra el centro activo (Kim *et al.*, 2016a). Estos autores también han propuesto que en el caso de las polimerasas de clase II, cuyo principal sustrato son 3-hidroxiacil-CoAs de cadena media, los residuos que se localizarían en ese canal no están conservados, como sí lo están los de las clases I, III y IV, y estarían adaptados para estabilizar sustratos con cadenas carbonadas más largas (Kim *et al.*, 2016a).



**Figura 11.** Representación teórica de la estructura tridimensional de la polimerasa PhaC1 de *Pseudomonas sp* USM4-55. En el centro de la figura, el modelo de esferas CPK (Corey-Pauling-Koltum, es un modelo molecular tridimensional donde los átomos se representa como esferas) representa los residuos catalíticos que comprenden la Cys296, el Asp451 y la His479, mientras que la Ser297 se muestra con el modelo de varillas (Wahab *et al.*, 2006).

Por otro lado, y también en *C. necator*, los estudios llevados a cabo con PhaC1 truncadas en el extremo N-terminal revelaron que los 60 primeros aminoácidos no están implicados en la actividad enzimática, mientras que la delección de los aminoácidos 65-98 y 110-192 sí alteran el plegamiento y función de la polimerasa, poniendo de relieve la importancia del dominio N-terminal (Kim *et al.*, 2016b).

#### 4.1.2. Mecanismo catalítico

Se han introducido numerosas mutaciones puntuales, con el fin de conocer la función de ciertos residuos aminoacídicos en el mecanismo catalítico. De este modo se encontraron evidencias de que, en *Cupriavidus necator*, los aminoácidos conservados implicados en la catálisis covalente de la PHA polimerasa de Clase I eran la Cys319, el Asp480 y la His508 (Jia *et al.*, 2001), lo que se confirmó tras la cristalización de la proteína. En el caso de la polimerasa de *A. vinosum* (tipo III), los experimentos de mutagénesis específica indicaron que los residuos aminoacídicos homólogos Cys 149, Asp 302 y His 331 formarían la triada catalítica responsable de la catálisis covalente (Jia *et al.*, 2000).

En las PHA polimerasas de Clase II los residuos aminoacídicos Cys296, Asp451 y

His479 forman una triada catalítica en la que Cys296 actuaría como nucleófilo (Wahab *et al.*, 2006). Este residuo Cys296 participa en un ataque nucleofílico sobre el sustrato (R)-3-hidroxiacil-CoA durante la unión y la polimerización de dicho sustrato. El residuo His479 sería el catalizador básico para la activación nucleofílica de la cisteína. Dado que la sustitución de esta histidina no inactiva la enzima, se ha propuesto que la His453, que también es un aminoácido conservado en las polimerasas, pueda reemplazar funcionalmente a esta His479 (Amara y Rehm, 2003). Además de la triada catalítica, se ha propuesto que el residuo Ser297 jugaría un papel importante formando un agujero oxianiónico que favorecería la estabilización de los intermediarios que se formen durante la reacción catalítica (Wahab *et al.*, 2006).

#### 4.1.3. Evolución dirigida de la polimerasa

Las características de los aminoácidos que constituyen las polimerasas determinan el peso molecular del polímero, el tipo de monómeros que lo integrarán, y la eficiencia del proceso de polimerización. Por ello, estas proteínas han sido objeto de experimentos de evolución dirigida, con los que se pretende mejorar la actividad específica y modificar la especificidad de sustrato para obtener de forma eficiente biopoliésteres hechos, prácticamente, a medida (Rehm *et al.*, 2002; Amara *et al.*, 2002; Sheu y Lee, 2004).

Los primeros experimentos de este tipo dieron como resultado el aislamiento de polimerasas con una actividad reducida (Rehm *et al.*, 2002). Sin embargo, usando *E. coli* XL-1 Red, se llevó a cabo la mutagénesis al azar *in vivo* de la polimerasa de *A. punctata* (Amara *et al.*, 2002). Se analizaron más de 200.000 mutantes en medio de cultivo con rojo Nilo, y se seleccionaron cinco mutantes cuyas colonias evidenciaban un incremento en la fluorescencia con esta tinción, indicando un mayor acúmulo de PHAs. Cuatro de ellos mostraban una mejora de la actividad polimerásica tanto *in vivo* como *in vitro*. La mutación puntual F518I comportaba un incremento de cinco veces en la actividad específica de la polimerasa, aunque la acumulación de PHA se incrementaba sólo un 20%. La mutación puntual V214G mostraba un incremento de dos veces en la actividad específica de la enzima, aumentando un 7% la acumulación de PHA. Es llamativo el hecho de que, si bien las actividades *in vitro* de los mutantes superproductores aumentaron hasta cinco veces la actividad de la polimerasa, las cantidades de PHAs acumulados oscilaban del 107% al 126% con respecto a las de la cepa silvestre. Es posible que el incremento de la actividad de PhaC *in vivo* al modificar estos residuos estuviese limitado por otros factores (reguladores, sustratos disponibles etc.), o que estos residuos desempeñasen alguna otra función importante en la estructura de la polimerasa

*in vivo* y su relación con el gránulo (Amara *et al.*, 2002; Rehm, 2007).

Respecto a la PhaC de *C. necator*, una vez conocida su estructura, se han modificado residuos implicados en la interacción con el sustrato, obteniendo una polimerasa con la modificación P245A que incrementa un 25% la actividad enzimática (Kim *et al.*, 2016a).

En *Pseudomonas putida* GPo1 (anteriormente *Pseudomonas oleovorans* GPo1 (van Beilen *et al.*, 2001; Diard *et al.*, 2002)) se ha modificado la PhaC1, concretamente mediante la sustitución L484V, lo que se ha traducido en un notable incremento de la proporción de monómeros de (R)-3-hidroxi butirato presente en el copolímero acumulado poli[(3-hidroxi butirato)(3-hidroxi hexanoato)(3-hidroxi octanoato)(3-hidroxi decanoato)]. Sin embargo, las sustituciones Q481M y S482G aumentaron la presencia del monómero (R)-3-hidroxi hexanoato en la composición del PHA acumulado (Chen *et al.*, 2014b). Del mismo modo, en *Pseudomonas* sp. 61-3 la sustitución en la PhaC1 de los aminoácidos situados en posición 325 (S325C y S325T) y en la posición 481 (Q481K, Q481M y Q481R) incrementaba la incorporación de monómeros (R)-3-hidroxi butirato en el homopolímero de PHB (Takase *et al.*, 2003). Es llamativo que el mismo cambio Q481M en polimerasas de especies diferentes (GPo1 y 61-3) implique una mayor incorporación de monómeros diferentes (Chen *et al.*, 2014b). También se ha utilizado la mutagénesis al azar en el gen de la polimerasa *phaC1* de *Pseudomonas* sp. 61-3, con la que se obtuvo un mutante E130D que incrementaba 10 veces el acúmulo de PHB en *E. coli* recombinante a partir de glucosa, con respecto al rendimiento obtenido cuando se expresaba en esa bacteria una copia del gen que codificaba la polimerasa silvestre (Matsumoto *et al.*, 2005).

Como se ha observado con los experimentos de mutagénesis dirigida llevados a cabo en *C. necator*, la cristalización de su PhaC1 ha permitido una primera aproximación racional en la modificación de la polimerasa. El estudio bioquímico y enzimático de la enzima silvestre y de las modificadas permitirá establecer certeramente qué función desempeña cada aminoácido y qué modificaciones se pueden realizar para incrementar la actividad o modificar el sustrato polimerizable. Una vez que se resuelva la estructura cristalina de la polimerasa de *Pseudomonas putida*, estudios similares permitirán mejorar también la producción de mcl-PHAs (Rehm, 2007).

En esta tesis doctoral, nosotros abordaremos el estudio de aquellos residuos de aminoácidos claves para la actividad de la PhaC1 de *Pseudomonas putida* U y cuya mutación pueda conducir a la inactivación de la misma.



## 4.2. PHA despolimerasas

La función fisiológica principal del PHA acumulado es proveer a la célula de una fuente de carbono y energía en aquellas fases del ciclo vital en las que los nutrientes no se encuentren disponibles. La enzima que cataliza la liberación de monómeros (R)-3-hidroxiacil-CoA desde el polímero acumulado se denomina despolimerasa (PhaZ). Posteriormente, estos tioésteres se isomerizan a enantiómeros S y se incorporan a la ruta de  $\beta$ -oxidación, que lleva a cabo el complejo proteico FadBA (García *et al.*, 1999; Sandoval *et al.*, 2005).

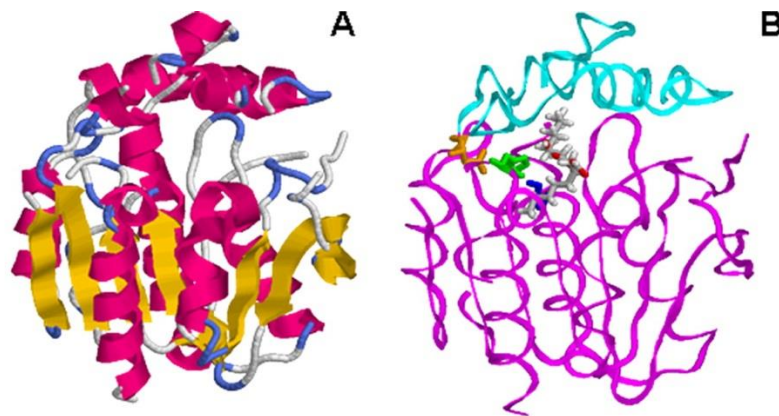
El proceso de despolimerización puede ser intracelular o extracelular, dependiendo de la localización de los PHA. El polímero extracelular se genera como consecuencia de la lisis de aquellos microorganismos que lo acumulan intracelularmente. Los gránulos de PHA liberados se propagan en el medio ambiente y las despolimerasas extracelulares secretadas por otros microorganismos los hidrolizan a monómeros y oligómeros solubles. La despolimerización extracelular está muy extendida para los scl-PHA. En el caso de las despolimerasas de mcl-PHA sólo se ha caracterizado la de *Pseudomonas fluorescens* GK13, aunque existen ciertas evidencias de que, inespecíficamente, algunas esterases fúngicas pueden también hidrolizar estos polímeros (Jendrossek y Handrick, 2002; Schirmer y Jendrossek, 1994).

Por su parte, las despolimerasas intracelulares, liberan los monómeros del PHA intracelular, y se encuentran permanentemente unidas al gránulo de PHA. Se ha descrito este tipo de despolimerasas en distintas especies del género *Pseudomonas* (de Eugenio *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 1996).

Aunque generalmente se abordan los procesos de síntesis y degradación intracelular de PHA de forma independiente, varios estudios sostienen que ambos tienen lugar de forma simultánea (de Eugenio *et al.*, 2010a; Ren *et al.*, 2010a). De este modo, mientras las polimerasas están activas y polimerizan el PHA, la PhaZ también estaría activa y despolimerizaría el gránulo. Obviamente, para que la acumulación de plástico tenga lugar, la actividad polimerásica debe ser mayor que la despolimerásica (Arias *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la despolimerasa es exohidrolítico, y tiene lugar a través de una actividad catalítica del tipo serina esterasa sobre el extremo del polímero que contiene el grupo carboxilo (de Eugenio *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 1999).

Si bien la despolimerasa no ha sido cristalizada aún, se ha partido de su similitud con hidrolasas cristalizadas para obtener un modelo tridimensional de su estructura. Según este modelo, la enzima está integrada por un núcleo con un dominio del tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasa, que tiene un centro activo formado por la triada catalítica Ser102-Asp221-His248, la cual queda cubierta con una tapa. Esta enzima cataliza la liberación de monómeros de distinta longitud y naturaleza, para lo que cuenta con un sitio de unión lo suficientemente amplio, capaz de acomodar distintos sustratos de mcl-PHA (de Eugenio *et al.*, 2007).



**Figura 12.** Predicción de la estructura tridimensional de la PhaZ de *P. putida* realizada a partir de la hidrolasa CumD. A, diagrama general. B, modelo de cintas, indicando el dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa (magenta) y la tapa (cian). Los residuos Ser102 (azul), His248 (verde) y Asp221 (naranja), y un dímero teórico de 3-hidroxi octanoato aparecen representados por modelos moleculares de varillas (de Eugenio *et al.*, 2007).

### 4.3. Fasinas

Las fasinas son proteínas que se encuentran en la superficie del gránulo de PHA. El término fasina (*phasin* en inglés) se acuñó por analogía con las oleosinas, proteínas situadas en la superficie de los cuerpos lipídicos en algunas células vegetales. Los cuerpos lipídicos serían similares a los gránulos de PHA en estructura y cometido, y las fasinas tendrían una función idéntica a las oleosinas, que estabilizan estas inclusiones (Steinbuchel *et al.*, 1995).

Se trata de proteínas de bajo peso molecular que constituyen la mayor fracción de las proteínas asociadas al gránulo. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los géneros de bacterias, tanto gram positivas como gram negativas, que acumulan este tipo de polímeros plásticos. En *Pseudomonas putida* hay dos tipos de fasinas: PhaF y PhaI (Wieczorek *et al.*, 1996).

Las fasinas cumplen una función estructural en el gránulo de PHA, formando parte de su recubrimiento y confiriéndole estabilidad. Generan una interfase entre el citoplasma y el núcleo hidrofóbico de los gránulos de PHA, y afectan de modo determinante el tamaño y el número de gránulos presentes en las células (Sandoval *et al.*, 2007; Steinbuchel *et al.*, 1995).

La fasina PhaF está involucrada en el control de la expresión de los genes de la PhaC1 y de la fasina PhaI (Sandoval *et al.*, 2007). Su estructura primaria muestra dos dominios modulares: el dominio N-terminal de unión al gránulo y el dominio C-terminal, que contiene repeticiones en tándem del tipo AAKP características de la familia de histonas H1. Este dominio de unión a DNA explicaría esta función como regulador transcripcional (Prieto *et al.*, 1999). Se han descrito otras proteínas con dominios similares que se unen al DNA, como AlgP, que regula la producción de alginato en *P. aeruginosa* (Medvedkin *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 2007).

Además, esta proteína está implicada en la segregación del gránulo durante la división celular, garantizando una división igualitaria de los gránulos entre las células hijas. La falta de PhaF en *Pseudomonas putida* desequilibra la segregación de los gránulos durante la división celular (Galán *et al.*, 2011). Esta fasina desempeñaría un papel similar al de la proteína PhaM en *C. necator*, que se une a los gránulos de PHB y al cromosoma bacteriano, y facilita el reparto los gránulos a las células hijas en el proceso de división celular (Pfeiffer y Jendrossek, 2012).

Con respecto a su estructura, se ha sugerido que la fasina PhaF se presenta como una proteína tetramérica e intrínsecamente desordenada en ausencia de PHA y DNA, que adquiere un grado más alto de estructura secundaria cuando interacciona con sus ligandos (Maestro *et al.*, 2013).

En cuanto a la proteína PhaI, su secuencia completa de aminoácidos muestra una similitud del 57% con el dominio N-terminal de la proteína PhaF, con la que funciona coordinadamente participando en la formación y distribución óptima de los gránulos de PHAs (Moldes *et al.*, 2004).

#### 4.4. Acil-CoA sintetasas

Las acil-CoA sintetasas son una familia de enzimas ubicuas que catalizan la activación de los ácidos grasos a tioésteres de CoA, uniendo una molécula de CoA mediante un ataque nucleofílico del SH de este tioéster al carbono carbonílico del grupo carboxilo. Para que este

ataque sea más eficaz el grupo carbonilo ha de fosforilarse lo que implica que en esta reacción se consumen dos enlaces de alta energía. Esta actividad enzimática se encuentra codificada en el gen *fadD* (Black *et al.*, 1992).

En *Pseudomonas putida* U se han descrito dos FadD homólogas: FadD1 y FadD2 (García *et al.*, 1999). Se obtuvo un mutante deficiente en FadD1 que era incapaz de crecer en ácidos grasos cuyos restos acilo eran superiores a 4 átomos de carbono. Sin embargo, cuando estos mutantes se cultivaban durante tiempos largos (80 h), se reestablecía el crecimiento. La disrupción del gen *fadD2* no tenía ningún efecto en el catabolismo de los ácidos grasos. Se concluyó que FadD1 es una enzima implicada en la degradación fisiológica de diferentes ácidos grasos, y que FadD2 se induce cuando FadD1 se encuentra inactiva. Una vez adaptados, los mutantes *fadD1* de *P. putida* U eran capaces de reestablecer el crecimiento y la acumulación de PHAs, alcanzando una biomasa y una cantidad de PHA similares a los de la cepa silvestre. La morfología y la composición de estos PHA era similar a los de la cepa parental (Olivera *et al.*, 2001a).

Las acil-CoA sintetasas que también se encuentran en la superficie de los gránulos de PHAs, activan los ácidos hidroxicarboxílicos liberados por las despolimerasas durante la degradación de PHA. Dependiendo del estado fisiológico de la célula, este sustrato puede ser oxidado por las enzimas de la  $\beta$ -oxidación, o ser incorporado de nuevo al gránulo de PHA por la polimerasa (Ruth *et al.*, 2008).

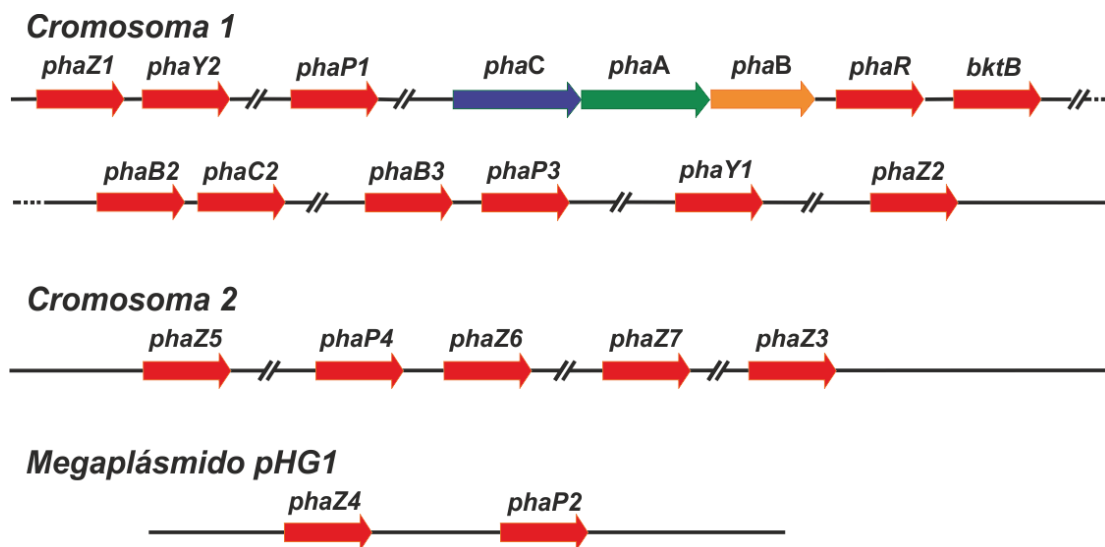
## 5. El *cluster pha*

Como ya se indicaba anteriormente, existen muchos géneros bacterianos capaces de producir PHA, por lo que la diversidad de los genes implicados en la producción de este polímero es elevada, y se sigue incrementando conforme se descubren nuevos isólogos y nuevas especies bacterianas (Aneja *et al.*, 2009; Pärnänen *et al.*, 2015). A continuación, se expone la estructura del *cluster pha* en las dos especies más representativas para la síntesis de scl-PHA y mcl-PHA: *Cuapriavidus necator* y *Pseudomonas putida*, respectivamente.

## 5.1. En *Cupriavidus necator*

### 5.1.1. Organización genética

El análisis exhaustivo del genoma de *Cupriavidus necator* llevado a cabo en los últimos años ha permitido añadir varios integrantes a la lista de genes implicados en el metabolismo de los PHA (Pohlmann *et al.*, 2006). Los genes clave en la síntesis de PHB son: i) *phaA*, que codifica una  $\beta$ -cetotiolasa responsable de la síntesis de acetoacetyl-CoA a partir de acetyl-CoA; ii) *phaB1*, *phaB2* y *phaB3*, que codifican NADPH oxidorreductasas (Budde *et al.*, 2010) y iii) *phaC1* que codifica una PHB polimerasa (Peoples y Sinskey, 1989).



**Figura 13.** Cluster *pha* de *Cupriavidus necator* en el que está codificada la maquinaria para la síntesis de PHA. Inicialmente, se consideraba que la agrupación génica estaba compuesta únicamente por los genes *phaC*, *phaA* y *phaB*. Sin embargo, la secuenciación del genoma de esta bacteria ha revelado la presencia de otros genes implicados en la síntesis y movilización del PHB, repartidos a lo largo de los dos cromosomas y el megaplásmido que constituyen su genoma.

Sorprendentemente, y mediante el análisis del genoma, se describió la existencia de un segundo gen que codifica una PHB polimerasa, *phaC2* (Pohlmann *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce su función, ya que es incapaz de producir acúmulo de polímero en una cepa sin PhaC1 (Reinecke y Steinbüchel, 2009). También se han descrito isólogos de *phaA* que codifican para  $\beta$ -cetotiolasas alternativas con diferente especificidad de sustrato (por ejemplo *bktB*) (Slater *et al.*, 1998). Del mismo modo, se han identificado isólogos de *phaB*. La contribución de los respectivos productos génicos a la síntesis de PHB es todavía una incógnita (Budde *et al.*, 2010).

Hasta el momento se han descrito 7 genes que codifican fasinas: *phaP1*, *phaP2*, *phaP3*, *phaP4*, *phaP5*, *phaP6* y *phaP7*, siendo la proteína PhaP1 la que se expresa en mayor medida. Estas fasinas participan en la arquitectura del gránulo, evitando su coalescencia, y regulando su número y tamaño (Pfeiffer y Jendrossek, 2012; Pötter *et al.*, 2004). Otros 7 genes codifican isoenzimas de la PHA despolimerasa, *phaZ1-Z7*, implicadas en la despolimerización del gránulo (Abe *et al.*, 2005; Pfeiffer y Jendrossek, 2012). Además hay dos genes, *phaY1* y *phaY2*, que codifican para sendas hidrolasas de oligómeros de PHB (Kobayashi *et al.*, 2005).

Por último, se ha descrito otro gen, *phaM*, que codifica una proteína (PhaM) implicada tanto en la distribución de los gránulos de PHB a las células hijas, como en la activación de PhaC (Pfeiffer y Jendrossek, 2014; Ushimaru y Tsuge, 2016).

Hasta el año 2006 se habían realizado numerosas investigaciones relacionadas con los genes y proteínas que dan lugar a la síntesis de PHB. Se consideraba este polímero y su síntesis el caso más sencillo para el estudio de los PHAs. Sin embargo, la secuenciación y el estudio del genoma de *Cupriavidus necator* ha revelado una situación aparentemente más complicada, y de la que aún queda mucho por descubrir (Pohlmann *et al.*, 2006).

### 5.1.2. Regulación de la expresión

La regulación de la ruta del PHB es compleja. A nivel enzimático, un exceso de CoA libre reduce la síntesis de PHB, mientras que todas las condiciones metabólicas o ambientales que causan una reducción en el contenido de CoA desencadenan, o restauran, la síntesis de PHB (Steinbüchel y Schlegel, 1991; Zinn *et al.*, 2001). Además, parece ser que PhaC se sintetiza como una proteína que requiere un polipéptido distinto (PhaM) para convertirse en una enzima plenamente funcional, poniendo de manifiesto que la regulación del PHB requiere diferentes señales ambientales, metabólicas y genéticas (Pfeiffer y Jendrossek, 2014).

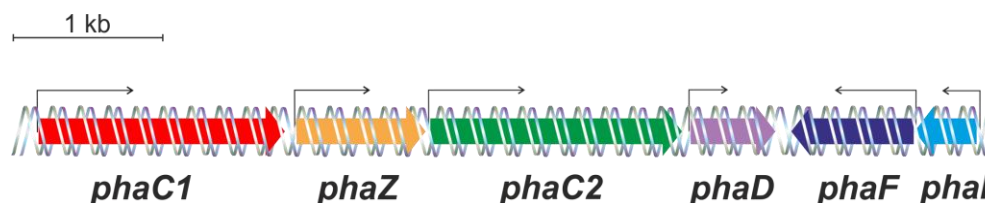
En el caso de la despolimerización, en ausencia de PHB, PhaZ se produce como una proteína inactiva que requiere PHB y un activador para que se transforme en una enzima activa (Zinn *et al.*, 2001).

Por su parte, PhaP mejora la producción de PHB uniéndose a los gránulos y regulando su tamaño, número y la relación superficie/volumen de las inclusiones. Además, la síntesis y acumulación de PhaP1 es un proceso dependiente de PHB en el que participa el represor PhaR (Pötter *et al.*, 2002).

## 5.2. En *Pseudomonas putida*

### 5.2.1. Organización genética

Los genes que codifican la ruta metabólica de los mcl-PHAs se encuentran situados en el *locus pha*, que contiene dos operones que se expresan en sentido opuesto y están separados por una secuencia intergénica. El primero de ellos (*phaC1ZC2D*) incluye cuatro genes que codifican dos polimerasas (PhaC1 y PhaC2), una despolimerasa (PhaZ) y un regulador transcripcional (PhaD), que funciona como un activador del *cluster pha*, necesario para la formación del gránulo de PHAs (de Eugenio *et al.*, 2010b; Huisman *et al.*, 1991; Steinbüchel y Hein, 2001). El otro operón (*phaIF*), que se transcribe en sentido opuesto desde el promotor Pi, codifica dos proteínas (las fasinas PhaF y PhaI) que están involucradas en la formación y estabilización de las inclusiones de bioplástico, así como en la regulación de la expresión génica (Prieto *et al.*, 1999). En *P. putida* U se han identificado 6 promotores diferentes, Pc<sub>1</sub>, Pz, Pc<sub>2</sub>, Pd, Pi y Pf que se encuentran corriente arriba de los genes *phaC1*, *phaC2*, *phaZ*, *phaD*, *phaI* y *phaF* respectivamente (Fig. 14) (Sandoval *et al.*, 2007). En *P. putida* KT2440 se han encontrado los mismos promotores salvo en el caso de Pd, para el que no se encontró actividad (de Eugenio *et al.*, 2010b).



**Figura 14.** Organización genética del *cluster pha* de *Pseudomonas putida* U. Se señalan los genes del *cluster* y los promotores de los mismos.

### 5.2.2. Regulación de la expresión de los genes del *cluster pha*

La regulación del metabolismo de los PHAs es harto compleja, puesto que tiene lugar tanto a nivel enzimático, por inhibición de cofactores y disponibilidad de metabolitos, como a nivel transcripcional, a través de factores de regulación transcripcional específicos y globales (Kessler y Witholt, 2001; Madison y Huisman, 1999). Desafortunadamente, se sabe poco acerca de la regulación de la biosíntesis de PHAs en *Pseudomonas*, por lo que se requieren nuevos estudios que ahonden en la regulación de la producción de los mcl-PHA a nivel enzimático (Prieto *et al.*, 2007).

### 5.2.2.1. A nivel enzimático

Las cepas de *Pseudomonas putida* obtienen los sustratos que serán utilizados por las polimerasas para la síntesis de mcl-PHAs a partir de las rutas de  $\beta$ -oxidación y de síntesis *de novo* de los ácidos grasos. Por tanto, es probable que aquellos factores que regulan la actividad de las enzimas de estas rutas metabólicas participen, de alguna manera, en el control de la biosíntesis de PHA. De hecho, las PHA polimerasas compiten con los complejos de la  $\beta$ -oxidación por los sustratos (Kessler y Witholt, 2001; Prieto *et al.*, 2007).

Los procesos de acumulación y degradación de PHA parecen producirse de forma simultánea, estando regulados por determinados metabolitos. Así, cuando las células contienen altos niveles de acetil-CoA, ATP y NADH (metabolitos altamente energéticos), las células no consumen estos compuestos para crecer, y los ratios [acetil-CoA]/[CoA] y [NADH]/[NAD] permanecen altos. Como consecuencia, el ciclo de  $\beta$ -oxidación se inhibe y se acumula 3-hidroxiacil-CoA. Puesto que PhaC incrementa su actividad frente a un ratio [3-hidroxiacil-CoA]/[CoA] alto, los ácidos 3-hidroxicarboxílicos se canalizan hacia la síntesis de PHAs. Sin embargo, la actividad de PhaZ no se encuentra influenciada por el cambio en la concentración de metabolitos y continúa degradando el polímero. Debido a la disponibilidad limitada de CoA en la célula, parte de los monómeros liberados se excretan antes de que sean activados de nuevo por la acil-CoA sintetasa. Por el contrario, cuando la concentración de metabolitos con alta capacidad energética es baja, los ratios [acetil-CoA]/[CoA] y [NADH]/[NAD] en las células son bajos y se estimula la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Así, PhaZ libera 3-hidroxiácidos del gránulo de PHA, los cuales son activados por la acil-CoA sintetasa a intermediarios 3-hidroxiacil-CoA, que se degradan mayoritariamente por la ruta de oxidación de los ácidos grasos en lugar de ser polimerizados de nuevo (Ren *et al.*, 2009).

Este ciclo de polimerización y degradación de polímero, que en principio podría contemplarse como un gasto inútil de energía, parece obedecer a un mecanismo de regulación en el que se controla el flujo de ácidos grasos a través de la ruta de  $\beta$ -oxidación. Frente a condiciones ambientales en las que se produzcan cambios en la concentración de la fuente de carbono y de otros nutrientes esenciales, la célula se puede adaptar rápidamente sin necesidad de inducir una cascada de genes. Los PHAs actuarían como un tampón metabólico que absorbe o libera carbono fácilmente en función del requerimiento celular (Arias *et al.*, 2013; Doi *et al.*, 1990; Ren *et al.*, 2009).



### 5.2.2.2. A nivel transcripcional

La regulación a nivel transcripcional se puede producir bien por reguladores específicos de la ruta de los PHAs, tales como PhaD o PhaF, o por reguladores globales del metabolismo bacteriano, tales como RpoN, RpoS y Crc, que ajustan la ruta al estado general de la célula (Díaz y Prieto, 2000).

Aunque la organización y los productos de los genes *pha* están altamente conservados en las cepas productoras de mcl-PHA, las secuencias de DNA de las regiones intergénicas del *cluster pha* varían notablemente entre especies semejantes. Por tanto, no es sorprendente que los factores transcripcionales puedan provocar efectos diferentes (Kessler y Witholt, 2001; Prieto *et al.*, 2007).

#### 5.2.2.2.1. El regulador PhaD

El gen *phaD* del *cluster pha* pertenece a la familia de reguladores transcripcionales TetR (Ramos *et al.*, 2005). Se ha observado en *P. putida* que el producto del gen *phaD* juega un papel importante en la biosíntesis de mcl-PHA. Una inactivación insercional de este gen provoca una disminución dramática de la acumulación de polímero y, además, produce un incremento del número de gránulos de PHA (Klinke *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que PhaD no se encuentra asociado a los gránulos de PHA, este efecto ha sido adscrito a una alteración en la expresión de las fasinas. En este mutante con *phaD* inactivo el patrón proteico de los gránulos de PHA se modificaba, y la proteína PhaI no se detectaba como una proteína asociada al gránulo (Klinke *et al.*, 2000). De hecho, cuando *phaF* se superexpresaba en *trans*, se revertía el efecto observado en el mutante defectivo en PhaD. Estos estudios demostraron que PhaD es un regulador transcripcional que activa la síntesis de PhaF y PhaI en respuesta a la fuente de carbono necesaria para el crecimiento (Sandoval *et al.*, 2007).

#### 5.2.2.2.2. La fasina PhaF como regulador transcripcional

La expresión de los transcritos de *phaF* y *phaIF* en diferentes especies de *Pseudomonas* sugiere la presencia de dos promotores, uno localizado corriente arriba del gen *phaI* y otro corriente arriba de *phaF*. Como ya se ha mencionado, PhaF es una proteína modular, con un dominio N-terminal que tiene una función estructural, y un dominio C-terminal con un motivo de unión a DNA que funciona como un regulador transcripcional (Prieto *et al.*, 1999). La disrupción del gen *phaF* conduce a un incremento en la expresión de *phaCI*, sugiriendo que PhaF actúa como un regulador negativo de la expresión de *phaCI*. Estudios llevados a cabo en

*P. putida* GPO1 han demostrado que el gen de esta fasina puede transcribirse para dar lugar a dos RNAm diferentes, uno que contiene sólo *phaF*, y otro que contiene los genes *phaI* y *phaF*. El transcrito de *phaF* se observa en la cepa de forma permanente, incluso cuando el sustrato utilizado para el crecimiento no es un precursor de PHAs, como por ejemplo la glucosa. Sin embargo, la expresión del transcrito *phaIF* sólo se observa cuando la bacteria se cultiva en medios que contienen ácidos grasos tales como el ácido octanoico (precursor de PHA) (Prieto *et al.*, 1999). Bajo estas condiciones de crecimiento, el regulador PhaD también estimula la expresión del transcrito *phaIF*. Estos resultados sugieren un sistema de regulación según el cual PhaF estaría presente en las células en aquellas condiciones en las que no se acumulan PHAs, uniéndose al DNA, y evitando la expresión de *phaC1* (o *phaC1Z*) y *phaIF* (o *phaD*). Aunque se ha demostrado la capacidad de unión a DNA de los péptidos que contienen el dominio repetido AAKP (Medvedkin *et al.*, 1995), no existe evidencia que indique la unión de PhaF a las regiones promotoras de *phaC1* o *phaIF* (Prieto *et al.*, 2007).

#### 5.2.2.2.3. Los reguladores transcripcionales globales RpoN, RpoS y Crc

El regulador global RpoN controla la expresión del transcrito *phaF* en *P. putida* KT2440, en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Para ello cuenta con un promotor dependiente de RpoN situado corriente arriba de *phaF*. Sin embargo, se ha demostrado que la transcripción de *phaIF* sí depende de la concentración de nitrógeno, pero es RpoN independiente (Hoffmann y Rehm, 2005; Rehm, 2006).

Existen otros reguladores globales que gobiernan la expresión del *cluster pha*. Por ejemplo, el gen *rpoS* codifica el factor de transcripción  $\sigma^s$ , un regulador general que controla la expresión de varios genes implicados en la supervivencia celular bajo condiciones adversas (estrés celular), como aquellas que tienen lugar en la fase estacionaria del ciclo celular una vez que la fuente de carbono se ha agotado (Hengge-Aronis, 2002; Ramos-González y Molin, 1998). RpoS afecta negativamente la expresión desde el promotor  $P_{c1}$ , disminuye la expresión de los genes involucrados en la acumulación de PHAs y, por tanto, disminuye la tasa de degradación del biopolímero. Durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano los niveles de RpoS intracelulares son muy bajos, por lo que no se produce alteración alguna en el acúmulo de PHAs. Sin embargo, en la fase estacionaria aquellas bacterias en las que se mute *rpoS* desatarán la respuesta a estrés, incrementando la expresión desde  $P_{c1}$ , lo que comporta la expresión del operón *phaC1ZC2D*. De este modo, al no haber sustratos disponibles para las polimerasas, se incrementará el grado de despolimerización del PHA, que proporcionará

fuentes de C y poder reductor para hacer frente a la situación de estrés que enfrenta la bacteria en la fase estacionaria. Los experimentos llevados a cabo sugieren que la síntesis/degradación de PHAs durante la fase exponencial provee a la célula de carbono y agentes reductores, que aumentan su capacidad de resistencia frente a condiciones adversas (estrés oxidativo) (Raiger-Iustman y Ruiz, 2008).

Por su parte, el regulador global Crc es una proteína que optimiza el metabolismo del carbono por inhibición de la expresión de los genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono alternativas (Rojo, 2010). En *Pseudomonas putida* KT2440 este regulador inhibe la traducción del RNAm del gen *phaCI* *in vivo*, lo que conduce a un cese en la producción de PHAs. En un medio con una relación carbono/nitrógeno equilibrada, el ácido octanoico activaría la transcripción de los genes *pha*, pero Crc reduciría los niveles de PhaCI disminuyendo el flujo de carbono hacia la síntesis de PHAs y favoreciendo su uso para el crecimiento celular. Sin embargo, en un medio en el que hay un desequilibrio carbono/nitrógeno la falta de Crc facilita la desviación de todo el carbono que no puede ser utilizado en el crecimiento celular a la síntesis de PHAs (La Rosa *et al.*, 2014). Este tipo de regulación no tiene lugar en todas las estirpes de *Pseudomonas putida* ya que experimentos similares llevados a cabo en nuestro grupo de investigación con mutantes del gen *crc* en *Pseudomonas putida* U, demostraron que en ningún caso dichos mutantes incrementaban la acumulación de polímero. Estos resultados sugieren que al igual que se aprecian diferencias en la utilización de distintas fuentes de carbono para sintetizar PHA entre distintas estirpes de *Pseudomonas putida*, también existen diferencias en la regulación llevada a cabo por reguladores globales como Crc.

Finalmente, es interesante el hecho de que la síntesis de PHAs esté bajo el control de reguladores celulares globales, ya que esto viene a reforzar la idea de que el metabolismo de los PHAs es una ruta crítica para la sincronización del metabolismo global del carbono en las bacterias que lo producen (Escapa *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2013).

## 6. Metabolismo de PHAs

Durante las últimas tres décadas se han tratado de esclarecer las rutas metabólicas que conducen a la síntesis y movilización de los PHA (Rehm, 2007). Las técnicas en Biología Molecular han permitido descubrir qué genes y proteínas están implicadas en el metabolismo de este polímero acumulado por diversas especies microbianas. La maquinaria metabólica

involucrada en la síntesis y degradación de PHA no constituye un conjunto de reacciones bioquímicas aisladas, sino que se encuentran íntimamente conectadas con otras rutas centrales del metabolismo bacteriano (Arias *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 2014, 2007; Sandoval *et al.*, 2007). Las rutas de síntesis de PHA son distintas en función del microorganismo estudiado, pudiendo dar lugar a scl-PHA o mcl-PHA (Luengo *et al.*, 2003; Madison y Huisman, 1999). A continuación, se presentan las principales rutas biosintéticas para cada tipo de polímero.

### 6.1. Síntesis de PHB

El PHB es el más sencillo y el más estudiado de los scl-PHAs y, como ya se indicaba anteriormente, la cepa *Cupriavidus necator* es el paradigma de microorganismo productor de este bioplástico (Dawes y Senior, 1973; Schubert *et al.*, 1988).

La síntesis de PHB tiene lugar en tres etapas. En el primer paso, dos moléculas de acetil-CoA se condensan para dar lugar a acetoacetil-CoA. Esta reacción está catalizada por una  $\beta$ -cetotiolasa (PhaA) (Masamune *et al.*, 1989). A continuación el acetoacetil-CoA generado es reducido estereoselectivamente a (R)-3-hidroxiacetil-CoA por una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhaB) (Haywood *et al.*, 1988). Esta reacción tiene lugar estereoespecíficamente, lo que quiere decir que todo el 3-hidroxiacetil-CoA resultante se encuentra en configuración R en la posición 3. En el último paso, una PHB sintasa (PhaC) polimeriza los monómeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA dando lugar a PHB y liberando CoA (Peoples y Sinskey, 1989; Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998). Esta reacción tiene lugar únicamente en la superficie del gránulo. La formación de PhaB está regulada, como ya hemos indicado, por la concentración intracelular de acetil-CoA (Steinbüchel y Schlegel, 1991). Bajo condiciones de crecimiento sin restricción de nutrientes (fase exponencial de cultivos discontinuos) se incrementa la cantidad de CoA-SH. Sin embargo, cuando el crecimiento tiene lugar en condiciones en las que alguno de los nutrientes está limitado, como por ejemplo amonio o fosfato, el nivel de CoA disminuye y se favorece la síntesis de PHB (Prieto *et al.*, 2007; Zinn *et al.*, 2001).

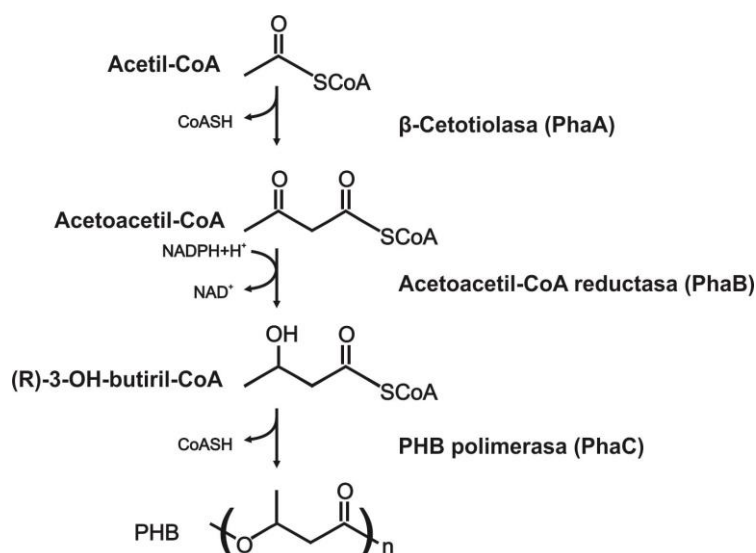


Figura 15. Ruta metabólica de síntesis de PHB.

## 6.2. Síntesis de mcl-PHAs

Este tipo de polímero lo producen mayoritariamente las bacterias del género *Pseudomonas* (Akaraonye *et al.*, 2010). A principios de la década de los 80 se describieron por vez primera las inclusiones características de PHAs en *Pseudomonas putida* GPo1 (Smet *et al.*, 1983). En los años sucesivos, Witholt y colaboradores clarificaron las rutas metabólicas que conducían a la generación de monómeros que formarían parte de los mcl-PHAs (Huisman *et al.*, 1991).

Hay dos rutas principales implicadas en la síntesis de precursores de mcl-PHAs (Huijberts *et al.*, 1994). En primer lugar la degradación de ácidos grasos a través de la  $\beta$ -oxidación, la ruta principal cuando se utilizan ácidos grasos como sustrato; y en segundo lugar la biosíntesis de *novo* de ácidos grasos, que es la ruta seguida prioritariamente cuando el crecimiento tiene lugar a partir de compuestos carbonados simples (Zimm *et al.*, 2001).

### 6.2.1. Síntesis de PHAs a partir de ácidos grasos por $\beta$ -oxidación

Los estudios realizados muestran que en las *Pseudomonas* del grupo I de homología del RNAr existe una relación directa entre la composición del PHA acumulado y el ácido graso utilizado como fuente de carbono. Cuando la fuente de carbono posee una longitud de entre 6 y 12 átomos de carbono, los monómeros de los PHAs acumulados tienen la misma longitud, o han sido acortados en 2, 4 o 6 átomos de carbono. Este hecho indica que los ácidos grasos pueden incorporarse directamente a los PHAs a través de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación sin

necesidad de ser degradados totalmente a acetil-CoA. La degradación de los ácidos grasos por esta ruta sugiere la eliminación sucesiva de unidades de 2 átomos de carbono hasta llegar a acetil-CoA (caso de los ácidos grasos pares) o a propionil-CoA (caso de los impares) (Huisman *et al.*, 1989; Lageveen *et al.*, 1988a).

La ruta de  $\beta$ -oxidación se encuentra altamente conservada en las distintas especies bacterianas, y ha sido profundamente estudiada y descrita en el microorganismo modelo *E. coli* (Black y DiRusso, 1994). En todas ellas, la ruta de degradación de ácidos grasos se encuentra codificada en el regulón *fad* (Numm, 1986).

La formación de PHAs a partir de ácidos grasos comienza con el transporte a través de la membrana de dichos ácidos grasos. En este tránsito se encuentran implicadas dos proteínas, FadL (Black, 1991; Yuan *et al.*, 2008) y FadD. La primera es una proteína de la membrana externa, y la segunda una acil-CoA sintetasa que activa los ácidos grasos a acil-CoA en su paso al interior celular (Black *et al.*, 1992; Hume *et al.*, 2009; Olivera *et al.*, 2001a). A continuación comienza la  $\beta$ -oxidación propiamente dicha, el acil-CoA se transforma en enoil-CoA en una reacción catalizada por una acil-CoA deshidrogenasa (FadE) (Campbell y Cronan, 2002). Este enoil-CoA se hidrata para dar lugar a 3-hidroxiacil-CoA. En este punto cabrían dos posibilidades: a) que la PhaC1 polimerice el 3-hidroxiacil-CoA a PHA, esta molécula se encontraría en configuración S y, dado que la PhaC1 polimeriza monómeros en configuración R, sería necesaria la participación de una epimerasa que catalice la transformación de S-3-hidroxiacil-CoA en R-3-hidroxiacil-CoA (Madison y Huisman, 1999); o b) que el 3-hidroxiacil-CoA continúe la ruta de  $\beta$ -oxidación, oxidándose a 3-cetoacil-CoA primero, y finalizando con una rotura tiolítica, que da lugar a una molécula de acetil-CoA y un acil-CoA con dos átomos de carbono menos que el ácido graso inicial (Numm, 1986).

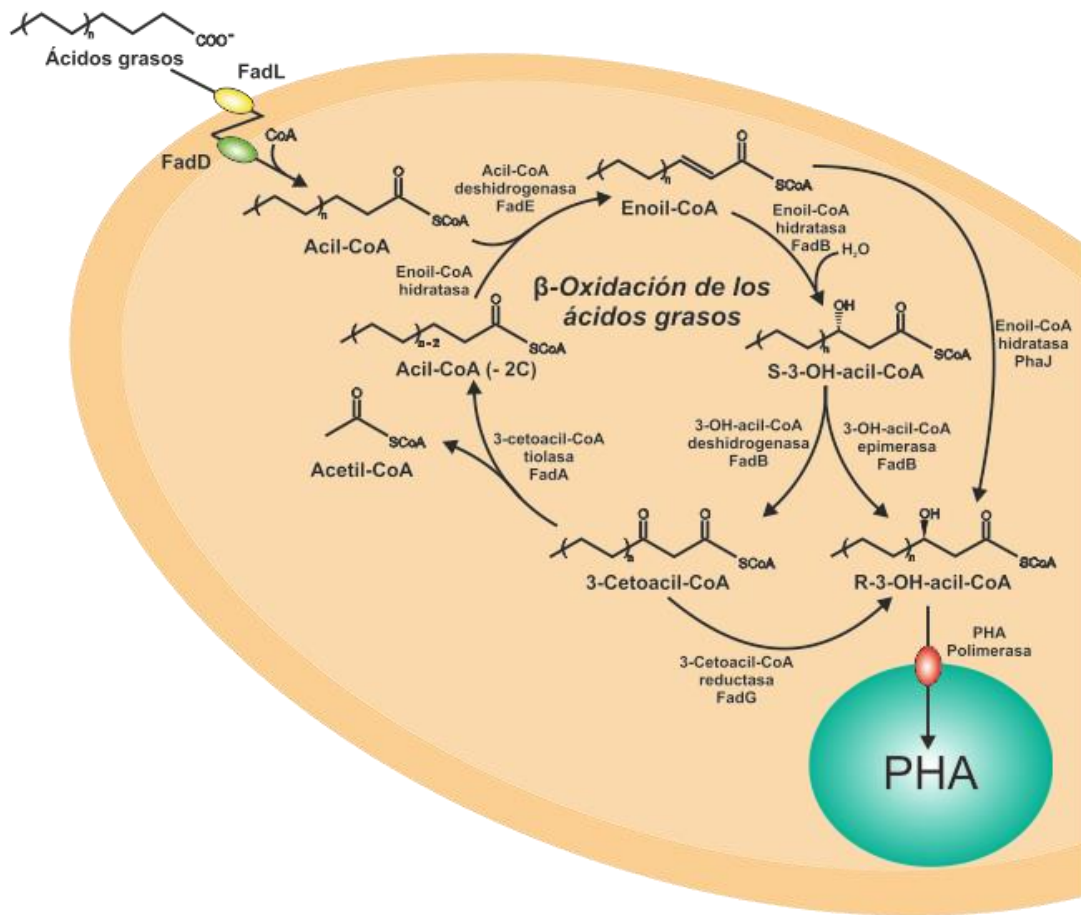
El complejo multienzimático FadBA lleva a cabo varias de estas reacciones (Pramanik *et al.*, 1979). Las actividades enzimáticas enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, *cis*- $\Delta^3$ -*trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa y 3-hidroxiacil-CoA epimerasa están codificadas en el gen *fadB* (Yang *et al.*, 1988), mientras que la actividad enzimática 3-cetoacil-CoA tiolasa está codificada en el gen *fadA* (DiRusso, 1990; Olivera *et al.*, 2001b, 2001a; Yang *et al.*, 1990).

En la ruta de  $\beta$ -oxidación, cuando el ácido graso de partida tiene un número par de átomos de carbono, la última rotura tiolítica da lugar a dos moléculas de acetil-CoA. Si el

número de átomos de carbono inicial es impar, se origina un acetil-CoA y un propionil-CoA (Lageveen *et al.*, 1988a).

Entre las actividades enzimáticas propias de la  $\beta$ -oxidación y relacionadas con la síntesis de PHAs en *Pseudomonas* destaca la que se refiere a la conversión de los intermediarios (S)-3-hidroxiacil-CoA en (R)-3-hidroxiacil-CoA. Se han propuesto 3 actividades enzimáticas como responsables de esta conversión: actividad epimerasa, llevada a cabo por FadB, actividad enoil-CoA hidratasa catalizada por PhaJ, y/o actividad 3-cetoacil-CoA reductasa a través de FadG. Aunque algunos trabajos indican que son PhaJ y FadG las principales responsables de interconectar la síntesis de PHA con la  $\beta$ -oxidación (Davis *et al.*, 2008; Fiedler *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2011; Vo *et al.*, 2008), este punto necesita aún ser fehacientemente demostrado.

Las enzimas de la  $\beta$ -oxidación compiten con las enzimas de la síntesis de PHAs (polimerasas) por los sustratos. Una disminución de la  $\beta$ -oxidación (por ejemplo, por delección de los genes que codifican alguna/s actividad/es enzimática/s de esta ruta) deja más intermediarios metabólicos disponibles para que puedan ser polimerizados (Escapa *et al.*, 2012; Olivera *et al.*, 2001b; Suriyamongkol *et al.*, 2007). Siguiendo esta estrategia (delección de los genes responsables de la  $\beta$ -oxidación) nuestro grupo de investigación ha logrado la obtención de mutantes superproductores de PHAs (Olivera *et al.*, 2001b, 2001a).



**Figura 16.** Representación esquemática de la ruta que siguen los ácidos grasos hasta que se incorporan como R-3-hidroxiacil-CoA al mcl-PHA a través de la ruta de β-oxidación.

### 6.2.2. Síntesis de PHAs a partir de la síntesis *de novo* de ácidos grasos

El acúmulo de PHAs no sólo se produce a partir de ácidos grasos, sino que muchos pseudomonádidos también lo pueden producir a partir de otras fuentes de carbono no relacionadas, tales como azúcares, glicerol etc. Estos PHAs constan fundamentalmente de monómeros compuestos por entre 8 y 10 átomos de carbono (Haywood *et al.*, 1990; Timm y Steinbüchel, 1990). La evidencia sugería que estos monómeros se derivaban de intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos y que la composición de este bioplástico era un reflejo de los intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos presentes en el interior celular.

Los PHAs obtenidos partiendo de distintos sustratos no relacionados tienen una composición similar, lo que llevó a Huijberts y colaboradores a considerar la existencia de un intermediario común en el metabolismo de estos sustratos, que sería el precursor en la síntesis de los monómeros que constituyen los PHAs. Teniendo en cuenta el papel central que



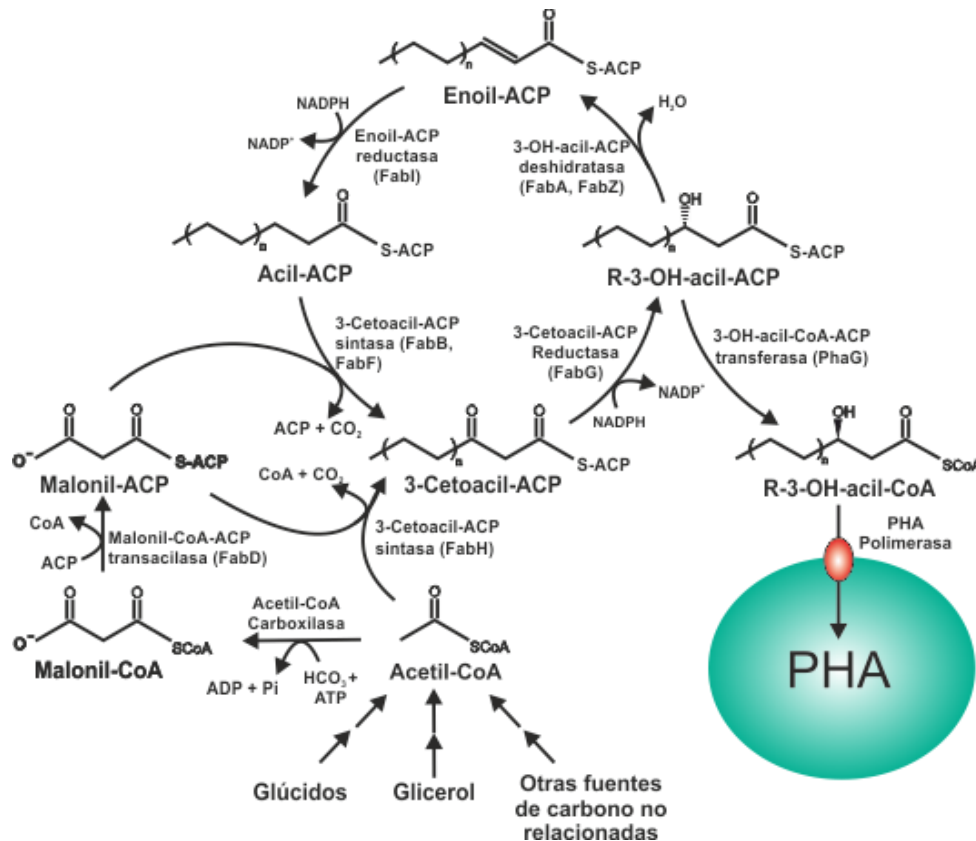
desempeña el acetil-CoA en el metabolismo de los hidratos de carbono en *Pseudomonas sp.*, esta molécula era el intermediario común más plausible. Por otro lado, la presencia de ácidos grasos hidroxilados tanto saturados como insaturados en los PHAs, y el hecho de que siete monómeros de PHAs (3-hidroxihexanoato, 3-hidroxi octanoato, 3-hidroxi decanoato, 3-hidroxi dodecanoato, 3-hidroxi dodecenoato, 3-hidroxi tetradecanoato, 3-hidroxi tetradecenoato) también sean intermediarios secuenciales en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, sugería un posible vínculo entre la biosíntesis de ácidos grasos y la síntesis de PHAs (Huijberts *et al.*, 1992).

La hipótesis que vinculaba la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la síntesis de PHAs, se vió reforzada al observar que, cuando *Pseudomonas putida* KT2442 crecía en glucosa como única fuente de carbono, la composición del PHA acumulado (tanto la longitud como la presencia de insaturaciones en los monómeros) variaba exactamente igual que la composición de los lípidos de membrana (Huijberts *et al.*, 1992). Los microorganismos sintetizan membranas con una gran proporción de ácidos grasos insaturados cuando se cultivan a bajas temperaturas. Este sistema de regulación parece controlar el estado físico de las membranas lipídicas, manteniendo una función óptima de las mismas a distintas temperaturas de crecimiento (de Mendoza *et al.*, 1983). De este modo, la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados en los lípidos de *P. putida* decrece cuando disminuye la temperatura de crecimiento, y es independiente de la fuente de carbono utilizada (glucosa o decanoato). Se observó que la composición del PHA de *P. putida* KT2442 creciendo en glucosa variaba de la misma manera cuando se modificaba la temperatura de crecimiento. Todo ello permitió establecer la participación de la ruta de síntesis *de novo* de ácidos grasos en la síntesis de PHAs a partir de fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos (Huijberts *et al.*, 1992).

La ruta seguida para la síntesis de PHAs a partir de fuentes no relacionadas sería la siguiente. La fuente de carbono es degradada hasta acetil-CoA a través de la ruta metabólica correspondiente, y este acetil-CoA se incorpora a la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Los intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos, que son (R)-3-hidroxi alcanoatos-ACP, se convierten a (R)-3-hidroxi acil-CoA en una reacción catalizada por una acil-ACP:CoA transacilasa, que se encuentra codificada en el gen *phaG* (Rehm *et al.*, 1998). De este modo se obtiene el sustrato de la polimerasa que es incorporado al gránulo (Fig. 17).

Es importante señalar que no se trata de un comportamiento biosintético general seguido por todas las especies de *Pseudomonas*, ya que algunas estirpes de *P. putida* como

*Pseudomonas putida* Gpo1 y *Pseudomonas putida* U no sintetizan ni siquiera trazas de PHAs cuando se utilizan fuentes de carbono diferentes de los ácidos grasos o de sus inmediatos precursores, lo que presupone la existencia de mecanismos reguladores que deciden la deriva de los flujos metabólicos hacia PHAs o hacia otras funciones.



**Figura 17.** Esquema del acúmulo de PHA a partir de los intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos. En este proceso, el malonil-CoA se activa por transacilación a un intermediario ACP. El derivado malonil-ACP se condensa en una reacción catalizada por una cetoacil-ACP sintasa, se reduce, pierde un grupo ceto, se deshidrata, y se satura para dar lugar al correspondiente (R)-3-hidroxiacil-ACP, que puede ser alargado con cadenas de 2 átomos de carbono. Una transacetilasa específica presente en la mayoría de *Pseudomonas*, PhaG, transforma los intermediarios acil-ACP en (R)-3-hidroxiacil-CoAs.

## 7. Biogénesis del gránulo de PHA

Las investigaciones sobre el metabolismo de los PHA durante las tres últimas décadas han incrementado considerablemente el conocimiento de proteínas individuales como las PHA polimerasas, las fasinas, los reguladores específicos PhaD o PhaR y las despolimerasas (Fuller, 1999; Prieto *et al.*, 1999; Klinke *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2005; Sandoval *et al.* 2007; Rehm,

2006; de Eugenio *et al.*, 2010b). Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables del inicio de la síntesis de PHA y el ensamblaje del gránulo aún no están muy claros. La mayoría de los esfuerzos en este sentido se han realizado con *Cupriavidus necator*, por lo que la información de la que se dispone explica cómo se generan los gránulos de PHB en esta cepa. A continuación se explican brevemente los tres modelos que se han propuesto en los últimos 20 años (Jendrossek y Pfeiffer, 2014):

a) El modelo de micela (*micelle model*), asume que las polimerasas solubles reaccionan con las moléculas sustrato (tioésteres-CoA de los ácidos hidroxialcanoicos) en el citoplasma; conforme se sintetizan las primeras cadenas de PHAs, las moléculas del polímero se agregan por interacciones hidrofóbicas dando lugar a la formación de pequeños gránulos de PHAs, en estructuras del tipo micela. Las polimerasas permanecen unidas a la superficie de los gránulos de PHAs y así pasan a ser insolubles. Las fasinas y otras proteínas específicas del gránulo de PHAs se unen a la superficie de los gránulos durante la formación de los mismos (Gerngross *et al.*, 1993).

b) El modelo de gemación (*budding model*) preconiza que la PHA polimerasa se une a la membrana citoplasmática y la cadena de PHB que se empieza a sintetizar se libera en la bicapa lipídica, a la que se adhiere por medio de interacciones hidrofóbicas. Como resultado se forman moléculas de PHB dentro de la membrana citoplasmática. En etapas posteriores, los gránulos se despegan de la membrana como vesículas membranosas, y las proteínas específicas de la superficie de los PHA se unen a los gránulos en formación (Tian *et al.*, 2005).

c) El modelo de andamio (*scaffold model*), asume que la PHB polimerasa de los gránulos en formación, se encuentra unida a una molécula en el interior celular que actuaría como esqueleto o andamio en este proceso (Tian *et al.*, 2005). Este soporte a partir del cual se forma el gránulo sería el nucleoide bacteriano, que se une a la PHB polimerasa por medio de la proteína PhaM para dar lugar al comienzo de la síntesis de polímero (Bresan y Jendrossek, 2017; Pfeiffer y Jendrossek, 2014). De acuerdo con las últimas investigaciones llevadas a cabo, los PHAs estarían recubiertos únicamente por proteínas (y no por fosfolípidos) que se irían uniendo a las polimerasas y al polímero en formación (Bresan *et al.*, 2016).

El modelo de gemación entra en contradicción con resultados recientes obtenidos mediante criotomografía electrónica, según los cuales los gránulos de PHB se localizan en el centro celular. En ningún caso se detectaron estos acúmulos unidos a la membrana o asociados a los polos celulares. Por ello se ha propuesto la exclusión de este modelo (Beeby *et al.*, 2012).

Por su parte, el modelo en micela está íntimamente relacionado con la formación de estructuras tipo micela entre los hipotéticos fosfolípidos del gránulo y el polímero. Si los fosfolípidos no forman parte de estas inclusiones difícilmente este modelo será plausible.

Por las razones expuestas, el modelo de andamio parece ser el más probable, entre todos los propuestos, para explicar la formación del gránulo de PHB. Es posible que el papel clave que desempeña PhaM en *Cupriavidus necator*, fijando la polimerasa al nucleóide a través de residuos lisina, sea llevado a cabo por PhaF en *Pseudomonas putida*, gracias a las repeticiones AAKP presentes en el extremo C-terminal (Bresan y Jendrosseck, 2017; Pfeiffer y Jendrosseck, 2014).

## 8. Producción industrial de PHAs

Es difícil recopilar información acerca de la cantidad real de PHAs que se produce a nivel industrial. Existe una diferencia notable entre la publicidad llevada a cabo por las empresas productoras sobre su capacidad (y publicada habitualmente en prensa) y la producción real de PHAs. En muchas ocasiones sólo se da a conocer la capacidad de producción. En 2015 Nova-Institute (Alemania) publicó un estudio de mercado sobre monómeros y polímeros de origen biológico, según el cual la capacidad de producción mundial de PHA en 2014 ascendía a 32.000 toneladas/año (Aeschelmann y Carus, 2015). European Bioplastics prevé que la producción de PHA se duplique en el periodo 2014-2020 (Khandal *et al.*, 2015).

### 8.1. Producción global de PHAs

Los primeros esfuerzos serios a la hora de escalar a nivel industrial la producción de estos compuestos se produjeron a raíz de la crisis del petróleo de los años 70, que cuadruplicó el precio del crudo en tan solo 3 meses. Imperial Chemical Industries (Reino Unido) consiguió llevar al mercado en 1983 un polímero compuesto por PHA (PHB-co-PHBV) bajo el nombre comercial de Biopol. Posteriormente, ICI pasó a ser Zéneca (Reino Unido), y durante los años 90 produjeron P(3HB-co-3HV) por fermentación bacteriana a escala planta piloto, utilizando una mezcla de glucosa y ácido propiónico. En 1996 Zéneca vendió toda la división de negocio de producción de PHAs a Monsanto (EE. UU.), que continuó las investigaciones comenzadas por Zéneca sobre síntesis de este polímero en cultivos modificados genéticamente. La producción de P(3HB-co-3HV) finalizó en 1999, al no alcanzar el rendimiento esperado para

que el producto fuera rentable. Los activos de Biopol pertenecientes a Monsanto fueron adquiridos en 2001 por Metabolix (EE. UU.), una *spin-off* del MIT (Khandal *et al.*, 2015).

En 2004, Procter & Gamble (EE. UU.) y Kaneka Corporation (Japón) anunciaron un proyecto entre ambas empresas para el desarrollo de actividades de investigación que condujesen a la comercialización exitosa de Nodax (polihidroxibutirato-co-hidroxicanoatos (PHBHx, PHBO, PHBOd)). El objetivo inicial era alcanzar la producción a escala industrial de Nodax con un precio de 2 euros/Kg, pero finalmente su desarrollo se detuvo en 2006. En 2007 Meredian Inc. (EE. UU.) adquirió la propiedad intelectual de los PHA perteneciente a P&G y, recientemente, ha inaugurado una planta de producción de PHA (Khandal *et al.*, 2015).

En 2007, Metabolix y Archer Daniel Midland (EE. UU.) crearon Telles, una *joint venture* para producir PHAs que llevarían al mercado con el nombre comercial Mirel. Telles puso fin a su actividad en 2012. Metabolix continuó su actividad desarrollando aditivos de PHA para mezclarlos con plásticos petroquímicos, de acuerdo con su informe anual de 2014.

Finalmente, en la segunda mitad de 2016 Metabolix anunció la venta de sus activos y propiedad industrial relacionada con los PHAs a la multinacional surcoreana CJ Cheil Jedang que previsiblemente continuará con el negocio de los bioplásticos.

**Tabla 2.** Algunas de las empresas que producen o estudian la producción de PHAs actualmente en el mundo.

Empresa	Origen	Producto (tipo de PHA)
Biomatera	Canadá	PHBV (escala piloto)
Biomers	Alemania	PHB
Bio-On SRL	Italia	PHA
Biopolis	España	PHA, fase de desarrollo
Kaneka Corporation	Japón	Varios PHA
Meredian Inc.	EE. UU.	Varios PHA
Neol	España	Varios PHA, fase de desarrollo
PHB Industrial S.A.	Brasil	PHB
Polyferm Canada Inc.	Canadá	mcl-PHA
Shenzhen Ecomann Biotechnology Co. LTD	China	Varios PHA
Tepha	EE. UU.	Varios PHAs
Tianan Biologic Materials Co. LTD	China	PHBV
Tianjin Greenbio Materials Co. LTD	China	PHB

La empresa china Tianan también ha anunciado su intención de incrementar la producción de PHA a varios miles de toneladas en los próximos años. Por su parte, la multinacional química holandesa DSM ha invertido en una planta de PHA junto con una compañía china de producción de bioplásticos, Tianjin GreenBio-Science Co. La producción comenzará siendo de 10.000 toneladas anuales. Kaneka espera alcanzar esa misma cifra para su producción en 2020 (Khandal *et al.*, 2015).

La historia de la producción industrial de los PHA pone de relieve que estos polímeros no se han posicionado en el mercado como una tecnología de vanguardia. Sin embargo, aún es posible reducir los costes de producción y optimizar ese proceso para que la producción industrial de este material sea significativa dentro del mercado del plástico (Koller *et al.*, 2013).

## **8.2. Aspectos clave en la optimización de la producción**

Actualmente, se están estudiando varias estrategias para conseguir reducir el coste de producción de PHA, y por tanto, lograr que estos materiales sean competitivos en el mercado. A continuación se exponen algunas de las aproximaciones que se están estudiando actualmente y sobre las que se está trabajando en cada una de las etapas del proceso industrial de producción de este biomaterial.

### **8.2.1. Fuentes de carbono empleadas**

Una de las principales razones por las que los PHA no son económicamente competitivos a día de hoy es el elevado precio de las materias primas. De hecho, aproximadamente la mitad del coste de producción se debe a la fuente de carbono (Kaur y Roy, 2015). Tradicionalmente, la producción de PHA se ha llevado a cabo a partir de sustratos caros, con un alto valor nutricional, como la glucosa, el almidón o aceites comestibles. Este hecho se sitúa en el centro de la controversia sobre la utilización de cultivos y superficies cultivables para producir bioetanol o bioplásticos en lugar de utilizarlos para alimentación. Teniendo en cuenta la hambruna que sufre un gran número de personas en todo el mundo, la producción a gran escala de PHAs utilizando estos sustratos causaría grandes dilemas éticos. (Koller *et al.*, 2013; Nikodinovic-Runic *et al.*, 2013).

Este problema se podría solventar mediante la utilización de desechos y residuos de otras industrias, lo cual tendría una doble función: la obtención de una materia prima con escaso o nulo coste, y la eliminación de productos de desecho, permitiendo que el proceso sea considerado como sostenible. Entre los residuos que podrían ser utilizados con este fin caben

citarse los sueros de las industrias lácteas, los subproductos de la producción de biodiesel, las melazas, salvado de trigo o de arroz, gas de síntesis, etc. (Akaraonye *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2015; Revelles *et al.*, 2016; Van-Thuoc *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta el amplio elenco de microorganismos capaces de producir estos plásticos, y su diversidad metabólica, es de esperar que alguno sea capaz de utilizar estos subproductos como sustrato para la producción de PHA (Solaiman *et al.*, 2006).

Los residuos utilizados como materia prima con fines biotecnológicos se seleccionarían en función de la región del mundo en la que se ubique la planta de producción, escogiendo aquellos que estén disponibles en esa zona geográfica (Koller *et al.*, 2013).

Otra posibilidad sobre la que se está trabajando, es la utilización de aguas residuales municipales como sustrato para la obtención de PHA, empleando para ello cultivos mixtos de microorganismos (Chen *et al.*, 2014a; Coats *et al.*, 2007; Morgan-Sagastume *et al.*, 2015).

### 8.2.2. La purificación de los PHAs

Los PHAs son productos intracelulares, por lo que una vez que las células han sido separadas del caldo de cultivo, deben ser extraídos de la masa celular que los rodea. Este proceso de recuperación entraña un elevado coste que debe ser reducido y optimizado para que la producción industrial sea económicamente factible. En este sentido, la extracción con solventes tales como cloroformo o carbonato de etileno es útil a nivel de laboratorio, y permite obtener PHA muy puros con gran eficiencia. Sin embargo, a escala industrial los solventes de los que se dispone actualmente presentan varios problemas: son peligrosos, muy contaminantes, y encarecen notablemente el proceso. Por ello es necesario el desarrollo de solventes ambientalmente seguros y eficientes. Otras alternativas en el proceso de purificación se podrían alcanzar a través de la mejora de los métodos de lisis celular, con fluidos supercríticos, utilizando técnicas de flotación, sistemas acuosos de dos fases o incluso radiación gamma (Koller *et al.*, 2013; Kunasundari y Sudesh, 2011). Recientemente, se ha desarrollado una estrategia que induce la lisis celular al emplear pequeñas cantidades de solventes o un ligero estrés mecánico, utilizando mutantes que incorporan holinas modificadas del fago lambda (Hajnal *et al.*, 2016). Soluciones de este tipo auguran la existencia de muchas posibilidades tecnológicas que se podrían implementar en un futuro cercano.

Además, el proceso de purificación de PHAs podría incrementar su valor añadido utilizando la masa celular sobrante como fertilizante o, tras un proceso de digestión enzimática, nuevamente como sustrato (Koller *et al.*, 2013; Kunasundari y Sudesh, 2011).

### 8.2.3. Diseño del proceso

El incremento de la productividad a través de un diseño óptimo del proceso de fermentación es fundamental para el desembarco final de los PHA en el mercado.

El primer proceso de síntesis de PHA a escala industrial fue, como ya indicamos, el llevado a cabo por ICI durante los años 80 para producir Biopol. En este caso, el sistema de producción era alimentado o en *fed-batch*. La fermentación comenzaba con el inóculo de la cepa productora, *C. necator*, en un medio con sales y glucosa. Todos los nutrientes se encontraban en exceso salvo el fosfato. Se añadía una cantidad suficiente de este nutriente para permitir que el cultivo alcanzase una densidad celular determinada (Byrom, 1987). A partir de entonces, se iniciaba la alimentación de la fuente de carbono con el fin de mantener un ligero exceso de carbono en el medio. La alimentación se prolongaba hasta que las células alcanzaban la cantidad adecuada de PHB (Byrom, 1990).

La primera fase de crecimiento de esta fermentación tenía lugar durante 40-60 h, y posteriormente la segunda fase de alimentación se prolongaba hasta alcanzar una duración total del proceso de 100-120 h. La operación se llevaba a cabo tanto en fermentadores de tipo *air-lift* (agitado por aire) como en fermentadores agitados convencionales, que alcanzaban los 220 m<sup>3</sup>. De este modo se lograba un peso seco total de células con polímero superior a los 100 g/l (Byrom, 1990).

ICI también producía el copolímero hidroxibutirato/hidroxivalerato (HB/HV), en cuya fermentación se utilizaba como fuente de carbono una mezcla de glucosa y propionato. La cantidad de HV presente en el polímero final dependía de la proporción en la que se suministrase cada uno de los sustratos durante el proceso de alimentación. (Byrom, 1990).

Actualmente, los sistemas de fermentación en discontinuo y alimentado son los más utilizados para la producción microbiana de PHA. Sin embargo, el sistema de producción en continuo se utiliza habitualmente en procesos industriales por lograr mayor productividad, menor coste y una calidad del producto constante. Por ello, se está investigando el potencial de la producción de PHA en un sistema de etapa múltiple que consta de 5 biorreactores agitados en continuo y situados en serie (5STR). Desde el punto de vista de la ingeniería de procesos,



este sistema sustituiría al reactor tubular de flujo continuo. En el primer reactor de la cascada se establece el crecimiento bacteriano. Posteriormente, el cultivo se alimenta de forma continua desde el primer reactor a los siguientes donde tiene lugar la acumulación de PHA en condiciones limitantes de N. Con *C. necator* (la cepa con la que se han realizado la mayoría de estas investigaciones) se obtuvo una alta productividad y una calidad del producto elevada y constante (Atlic *et al.*, 2011; Koller y Braunegg, 2015; Sun *et al.*, 2007).

#### 8.2.4. Ingeniería genética de las cepas productoras

El diseño de cepas modificadas genéticamente con capacidad para sintetizar grandes cantidades de polímero ha sido hasta el momento, y es aún hoy, una de las principales líneas de trabajo para alcanzar la escala industrial en la producción de PHAs. En este sentido la delección de los genes implicados en la degradación de PHAs es la estrategia que ha dado mejores resultados (Olivera *et al.*, 2001b). También se han desarrollado mutantes que permiten evitar los “cuellos de botella” metabólicos que impiden una conversión rápida y completa de los sustratos (Koller *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2007a, 2007b).

La evolución dirigida de la PHA polimerasa permitirá obtener nuevas polimerasas más procesivas, o modificaciones de las mismas que permitan polimerizar monómeros diferentes. En este sentido, ya se han obtenido polimerasas capaces de utilizar el lactil-CoA como monómero para obtener PHAs que contengan lactato (Yang *et al.*, 2013) y, mediante un complejo proceso de ingeniería metabólica, cepas de *E. coli* que produzcan poli(D-lactato-co-glicolato-co-3HB) (Choi *et al.*, 2016).

También es necesario que las cepas productoras modificadas sean genéticamente estables durante un largo periodo de tiempo bajo las condiciones de cultivo continuo, de tal modo que su capacidad de acúmulo no se vea mermada. Por otro lado, sería conveniente que resistieran la contaminación con competidores microbianos, que representan un gran peligro para todos los parámetros de producción (Braunegg *et al.*, 1998). La utilización de especies extremófilas podría ser una solución para minimizar el, normalmente indispensable, gasto de energía que se realiza en la esterilización previa al proceso de producción (Lillo y Rodríguez-Valera, 1990; Yin *et al.*, 2014).

La mejora en las distintas etapas del proceso puede constituir un avance considerable hacia una tecnología respetuosa con el medio ambiente y rentable desde el punto de vista

económico. Tal y como señaló David Byrom, pionero en esta industria de la mano de ICI, en última instancia, el desarrollo de una producción de biopolímero realmente eficiente, dependerá de la colaboración estrecha entre la industria y expertos de diversos campos científicos: microbiólogos, ingenieros químicos, biólogos moleculares, químicos de polímeros, gestores empresariales etc., (Byrom, 1990). Esta visión de un abordaje multidisciplinar sigue hoy plenamente vigente. A la luz de los avances ya realizados, parece previsible que en el futuro se alcance un modelo de producción sostenible y, finalmente, el éxito en el mercado con unos bioplásticos competitivos.

### 8.3. Un sistema alternativo: producción de PHAs en plantas

A finales de los años 80 surgió una gran expectación en torno a la posibilidad de producir PHB en cultivos con un coste similar al del almidón y al de los aceites vegetales. En 1992 se describió la producción de PHB en *Arabidopsis thaliana* (Poirier *et al.*, 1992), y la investigación para optimizar el proceso de PHA en plantas ha continuado hasta nuestros días (Somleva *et al.*, 2013).

Las plantas han abastecido al ser humano de distintos polímeros como la celulosa, el almidón, la lignina o el caucho que han sido ampliamente utilizados para la fabricación de multitud de objetos. Partiendo de esta idea e intentando replicar el modelo que tiene lugar en la naturaleza, se ha propuesto la utilización de las plantas como biofactorías para producir PHAs. La elección de los cultivos adecuados, como el *Panicum virgatum* o “pasto varilla” y el tabaco, evitaría el posible conflicto que acarrearía el uso de cultivos dedicados al consumo humano (patata, maíz etc.). De este modo, su producción en grandes cantidades proporcionaría un polímero biodegradable partiendo de una fuente renovable, y al mismo tiempo se capturaría CO<sub>2</sub>, en un proceso realmente sostenible (Snell *et al.*, 2015).

Se han realizado distintas aproximaciones para incrementar la producción de PHAs en plantas. Así, se ha tratado de inhibir las enzimas endógenas que compiten por los sustratos con las de la ruta de síntesis de PHB, como es el caso de la acetil-CoA carboxilasa que compite con la  $\beta$ -cetotiolasa en los plastos de la caña de azúcar y de *Panicum virgatum* (Petrasovits *et al.*, 2013; Snell *et al.*, 2015). En otros trabajos se han expresado en *trans* enzimas con mayor actividad, como la acetoacetil-CoA sintasa de *Streptomyces* también en la caña de azúcar (McQualter *et al.*, 2015; Snell *et al.*, 2015). También se ha logrado la producción de PHBV y mcl-PHA en *Arabidopsis thaliana*, patata o tabaco, aunque alcanzando cantidades discretas (Matsumoto *et al.*, 2009; Slater *et al.*, 1999). En muchas ocasiones, la producción de polímero

en determinadas localizaciones como el citoplasma celular comporta una alteración importante del equilibrio metabólico, conduciendo a la pérdida de biomasa y tamaño de las plantas o a la esterilidad de las mismas. Todo ello ha contribuido no sólo a aumentar la producción de biopolímero plástico, sino a entender mejor la fisiología vegetal y los flujos metabólicos en distintos orgánulos y tejidos vegetales, lo que será útil a la hora de modificar las plantas con otros fines o para producir otros compuestos (Snell *et al.*, 2015).

Por el momento el rendimiento de bioplástico obtenido en plantas (en distintas especies y diferentes orgánulos) es muy discreto. El valor más alto se ha obtenido en la producción de PHB en los plastos de *Arabidopsis thaliana*, con la que se ha alcanzado un valor del 4% del peso de la planta (aproximadamente 40% del peso seco) (Bohmert *et al.*, 2000).

Aún en el caso de que se consiguiese alcanzar una producción suficiente de PHAs en plantas transgénicas, su escalabilidad requeriría, al igual que vimos con la producción por fermentación microbiana, que el proceso de extracción fuese eficiente, rentable y que utilizase métodos respetuosos con el medio ambiente (Chen, 2011; Somleva *et al.*, 2013). En este sentido, si bien es cierto que existen varias patentes sobre métodos de extracción de PHAs en plantas, el trabajo que se ha realizado es muy limitado, y es necesario un desarrollo paralelo a la mejora genética de las plantas (Van Beilen y Poirier, 2008).

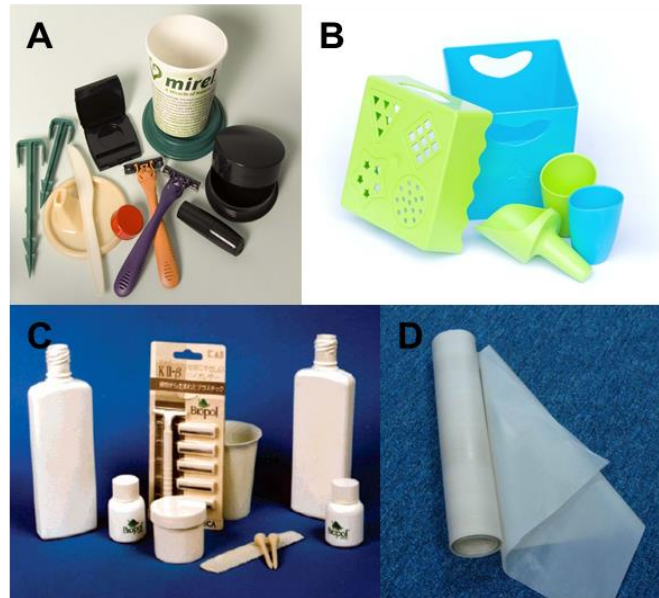
## **9. Aplicaciones biotecnológicas de los PHAs**

Se han descrito numerosas aplicaciones para los PHAs, ya sea sustituyendo a los plásticos petroquímicos o bien para nuevos usos. Entre éstos últimos se encuentra su utilización como vehículos de fármacos, como material para la fabricación de dispositivos médicos, etc. En buena medida, el éxito comercial de este material dependerá de que se encuentren nuevas aplicaciones de alto valor añadido, que ofrezcan ventajas respecto a los posibles competidores (biocompatibilidad, revalorización de residuos etc.). A continuación, se enumeran algunas de las aplicaciones para las que se han utilizado o se podrían utilizar estos materiales.

### **9.1. Fabricación de diferentes objetos, envases y envoltorios**

Los primeros PHAs producidos a nivel industrial se utilizaron en la fabricación de objetos de uso cotidiano, envases y botes de champú, como los que comercializó la empresa Wella (Alemania) hechos con el copolímero Biopol de ICI (Weiner, 1997). Posteriormente, varias compañías, entre las que se encuentran Procter & Gamble, Biomers y Metabolix,

desarrollaron los PHAs como *films* de embalaje para su utilización en la fabricación de bolsas, artículos desechables como maquinillas de afeitar, envases cosméticos, tazas, embalajes, tapas, recipientes para artículos termoformados, etc. (Chen, 2009; Clarinval y Halleux, 2005).



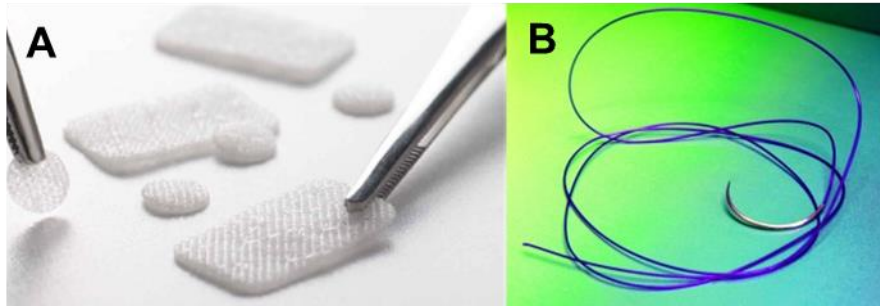
**Figura 18.** Distintos objetos fabricados con PHAs. A y C recoge recipientes y utensilios hechos con PHAs, comercializados bajo las marcas Mirel (imagen tomada del sitio web de Telles) y Biopol (Lenz y Marchessault, 2005) respectivamente. B, juguetes de playa biodegradables fabricados con Mirel (imagen perteneciente a Zöe B Organic). D. Film comercializado por Shenzhen Ecomann Biotechnology Co LTD (imagen tomada de [www.ecomann.en.ecplaza.net](http://www.ecomann.en.ecplaza.net)).

Para poder fabricar este tipo de productos es necesario obtener fibras de PHB que cuenten con una elevada fuerza tensil. Esta propiedad mecánica puede incrementarse mediante una cristalización isotérmica de las fibras de PHB, llevada a cabo a una temperatura próxima a la de transición vítrea, durante largos periodos de tiempo (más de 24 h) y seguida de una extensión posterior (Tanaka *et al.*, 2007). En última instancia estos y otros procesos se han utilizado para superar la fragilidad de los PHA, y obtener fibras mucho más fuertes con un mayor número de aplicaciones (Chen, 2009).

## 9.2. Materiales para bio-implantes y dispositivos médicos

Algunos PHAs, como el PHB, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), el poli-4-hidroxibutirato (P4HB), el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (PHBHHx) y el poli-3-hidroxioctanoato (PHO), se han utilizado para desarrollar dispositivos médicos. Entre ellos encontramos productos finales diversos, como suturas, placas de huesos, mallas quirúrgicas, dispositivos de reparación/regeneración tisular, dispositivos de reparación de

cartílago articular, válvulas y dispositivos cardiacos, prótesis del tipo estent, andamiaje para ingeniería tisular, apósitos para heridas etc. (Bian *et al.*, 2009; Chen y Wu, 2005b; Wang *et al.*, 2010). La modificación de la composición monomérica de los PHAs permite obtener materiales biocompatibles, con propiedades mecánicas adecuadas en función de su uso, y que tengan tiempos de degradación deseables bajo determinadas condiciones fisiológicas (Chen, 2011; Simon F. Williams, 2005).



**Figura 19.** Dispositivos médicos compuestos por P4HB ya disponibles en el mercado. A, malla quirúrgica Tornier Biofiber®, y B, hilo para sutura ThephaFLEX®. Imágenes tomadas del sitio web de Tephha ([www.tepha.com](http://www.tepha.com)).

La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) aprobó en 2007 el TephhaFLEX™ de Tephha, compuesto de P4HB, como biomaterial para la fabricación de hilo de sutura. Desde entonces, se ha aprobado la utilización de este PHA en la fabricación de distintos dispositivos médicos y, teniendo en cuenta su éxito, se espera que pronto otros PHA alcancen la fase clínica (Williams *et al.*, 2013). El gran número de PHAs diferentes que se conocen hasta el momento abre la puerta al desarrollo de nuevos materiales con los que se puedan diseñar una amplia variedad de bioimplantes con diversas aplicaciones (Chen, 2009).

### 9.3. Fuente de ácidos hidroxialcanoicos quirales

Los ácidos hidroxialcanoicos en configuración quiral **R** pueden ser utilizados como intermediarios en la síntesis de otros compuestos de interés para las industrias química, médica y farmacéutica. Si bien su síntesis química es complicada, se pueden obtener a partir de los PHAs, en los que se han caracterizado más de 150 monómeros distintos en configuración **R** (Ren *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 2005).

Entre los compuestos de alto valor que se pueden obtener de este modo se encuentran los antibióticos carbapenémicos, sintetizados a partir de **R**-3-hidroxiбутирато (3HB), o beta-lactonas, derivadas de los 3-hidroxialkanoatos (3HA). También se ha documentado el uso de

otros 3-hidroxiácidos como monómeros quirales para la síntesis de macrólidos (p. ej. pirenoforina y coletodiol) (Chen y Wu, 2005a).

Los 3HB también se pueden utilizar para sintetizar dendrímeros monodispersos, biodegradables y que posean un gran número de unidades funcionales de superficie, propiedades que los convierten en serios candidatos para la administración de fármacos *in vivo* (Chen, 2011; Chen y Wu, 2005a).

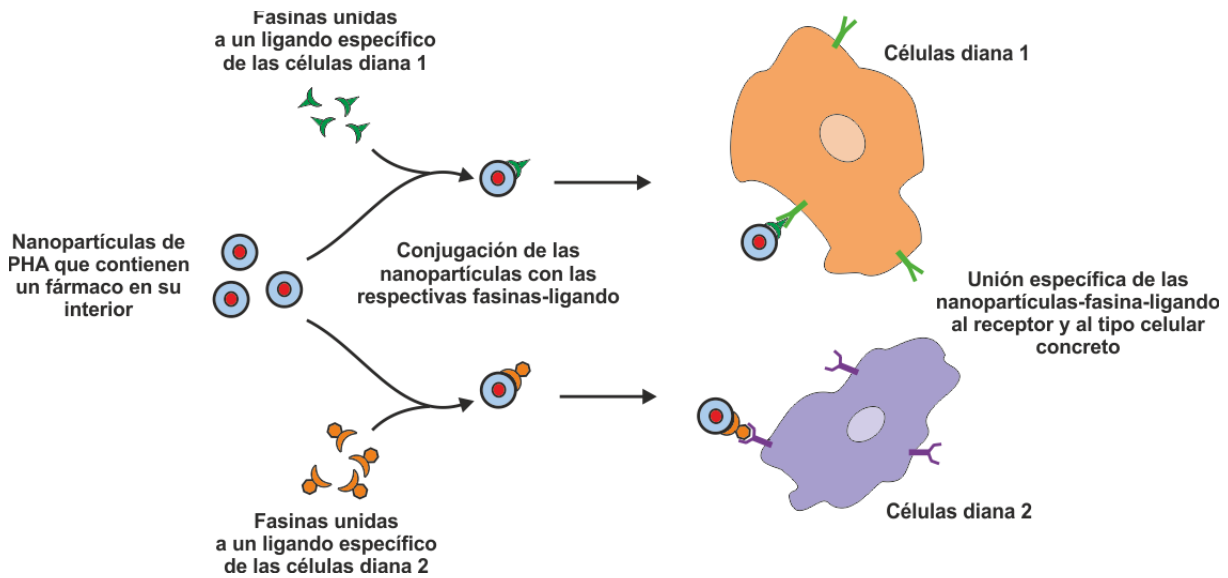
#### 9.4. Fuente de biocombustibles

En el año 2009, y partiendo de la semejanza aparente entre estas moléculas y los metil ésteres de ácidos grasos que forman parte del biodiesel, se publicó un trabajo que valoraba el potencial de algunos derivados de los PHAs como biocombustibles. El calor de combustión es una de las propiedades que se utilizan para determinar el potencial de un combustible, y en los metil ésteres del PHB (3HBME) y de los mcl-PHA (3HAME) alcanza unos valores de 20 y 30 kJ/g respectivamente. Por su parte, el etanol tiene un calor de combustión de 27 kJ/g, que se incrementa hasta alcanzar 30 o 35 kJ/g cuando se añade un 10% de 3HBME o 3HAME respectivamente. Por el contrario, la adición de 3HBME y 3HAME en n-propanol y n-butanol conduce a una ligera reducción de sus calores de combustión. En cuanto a la utilización de los derivados de PHAs como aditivos de combustibles fósiles, se ha observado que los calores de combustión de las mezclas 3HBME/diésel (38-50 kJ/g) o 3HBME/gasolina (39-44 kJ/g) y 3HAME/diésel (41-47 kJ/g) o 3HAME/gasolina (46-53 kJ/g) fueron más bajos que aquellos del diésel (50 kJ/g) o la gasolina puros (52 kJ/g), aunque razonables para su uso como combustible. La estimación, aproximada, del coste de producción de biocombustibles basados en PHA se sitúa en torno a 1200 US\$ (850 euros) por tonelada cuando los PHA se producen a partir de fangos activados. Este valor es superior al del coste de la gasolina (800US\$ por tonelada, en China en 2009, año de publicación del artículo), pero el incremento del precio del petróleo podría convertirlos en una alternativa competitiva (Zhang *et al.*, 2009).

#### 9.5. Vehículos transportadores y liberadores de fármacos

Los homopolímeros o copolímeros de PHA son adecuados para embeber o microencapsular fármacos. Se trata de materiales hidrófobos, biocompatibles y fácilmente moldeables, que pueden convertirse en microcápsulas, microesferas, nanopartículas etc., para la administración de medicamentos. Se han llevado a cabo ensayos para la dispensación de antibióticos, anestésicos, hormonas, vacunas o anticancerígenos microencapsulados con PHAs,

poniendo de relieve el potencial de esta tecnología (Nobes *et al.*, 1998; Shrivastav *et al.*, 2013). El fármaco en cuestión se va liberando paulatinamente y de forma sostenida a lo largo del tiempo, manteniendo una concentración adecuada del mismo en el organismo (Abraham *et al.*, 2001).



**Figura 20.** Representación esquemática de la utilización de nanopartículas de PHAs y fasinas para el transporte de fármacos a tipos celulares concretos. Adaptado de (Yao *et al.*, 2008).

Los últimos trabajos sobre la utilización de PHA para la dispensación de principios activos tratan sobre la obtención de nanopartículas que puedan dirigirse específicamente a las dianas terapéuticas correspondientes. El diseño consistiría en nanopartículas (gránulos) de PHAs que encapsulan el fármaco, y en cuya superficie se embeben las fasinas o las polimerasas conjugadas con ligandos determinados o receptores (Fig. 20). De este modo, las nanopartículas se unirían específicamente al lugar donde se encuentra la diana terapéutica, liberando la dosis correcta de fármaco en el lugar adecuado, de forma paulatina y sostenida, sin que otros órganos o tejidos se vean afectados por efectos secundarios (Bartlett *et al.*, 2007; Paik *et al.*, 2005; Shrivastav *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2008).

## 9.6. Plataforma para la purificación de proteínas

La producción de PHA también puede utilizarse para la purificación de proteínas. Se ha llevado a cabo la expresión de proteínas de fusión que constan por una parte de la proteína de interés a producir, y por otra de la fasina PhaF. Al expresar esta proteína en *Pseudomonas putida*, las fasinas se dispondrán en los gránulos de PHAs, con la proteína de interés unida a éstos. Mediante un sencillo procedimiento de rotura celular y centrifugación, los gránulos de

PHA con la proteína de interés podrían recogerse fácilmente, y dicha proteína se separaría de los gránulos utilizando un detergente (Moldes *et al.*, 2004).

De este modo se podría llevar a cabo el proceso de producción de proteínas de interés y de alto valor añadido en bacterias, que serían auténticas biofactorías, y dotarlas de este sistema (sistema BioF) para una sencilla purificación de las mismas. Los costes de purificación se simplificarían y abaratarían notablemente utilizando este procedimiento, que ya ha demostrado su utilidad en la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa y de Cry1Ab, toxina biológica que podría utilizarse como insecticida (Moldes *et al.*, 2004, 2006).



# Objetivos



Los objetivos que se persiguieron en la realización de esta tesis doctoral fueron:

1. Establecer la secuencia completa de los genes *pha* en *Pseudomonas putida* N y en *Pseudomonas putida* DOC21, y compararla con la de otras especies pertenecientes al género *Pseudomonas*.
2. Realizar un estudio comparativo de la capacidad para producir PHAs de *P. putida* N y de *P. putida* U cuando se cultivan en diferentes medios. Con ello se pretende establecer la capacidad biosintética de PHAs de ambas cepas.
3. Diseñar y ejecutar distintas estrategias para obtener mutantes superproductores de PHAs a partir de la cepa *P. putida* N.
4. Obtener una cepa de *P. putida* N con capacidad para producir y acumular en el caldo de cultivo R-3-hidroxiácidos a partir del polímero acumulado por esta cepa, incrementando para ello la actividad despolimerásica.
5. Evaluar la estabilidad genética de mutantes superproductores.
6. Obtener una cepa de *E. coli* capaz de producir mcl-PHAs utilizando los genes de *P. putida* U.
7. Evaluar la capacidad de *P. putida* N para producir biopolímero a partir de distintas fuentes de carbono.



## **Materiales y Métodos**



## 1. Cepas microbianas

Se describe brevemente cada una de las especies bacterianas utilizadas en este trabajo y, a continuación, se recogen en la Tabla 3 las cepas empleadas en la realización de todos los experimentos realizados en el apartado *Resultados y Discusión*.

### ***Pseudomonas putida* N**

Cepa silvestre de *Pseudomonas putida* utilizada en el trabajo experimental, cedida por NEOL Biosolutions S.A. (Granada, España), y registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT8092. Fue aislada de las inmediaciones de una almazara durante una búsqueda rutinaria de bacterias que acumulasen PHAs. Posee resistencia genómica a ampicilina.

### ***Pseudomonas putida* U**

Cepa silvestre de *Pseudomonas putida* utilizada en el trabajo experimental que pertenece a nuestra colección. Originalmente fue aislada del lodo de un arroyo en la ciudad de Urbana (Illinois. EE. UU.), utilizando un medio selectivo que contenía m-cresol (Dagley y Gibson, 1965). Posee resistencia genómica a rifampicina.

### ***Pseudomonas putida* DOC21**

Cepa silvestre de *Pseudomonas putida* aislada por nuestro grupo de investigación a partir de muestras de suelos próximos a la Universidad de León. Se utilizó el DNA extraído de esta bacteria para secuenciar su *cluster pha*. Posee resistencia genómica a ampicilina (Merino *et al.*, 2013).

### ***Escherichia coli* DH10B**

Cepa utilizada en los experimentos de transformación y amplificación de plásmidos. Posee una alta eficiencia de transformación y la capacidad de mantener de forma estable plásmidos de gran tamaño. Esta cepa carece de los sistemas de recombinación homóloga y de los sistemas de restricción dependientes de metilación. Los plásmidos pueden ser seleccionados por  $\alpha$ -complementación gracias a la delección en el gen *lacZ*, que porta la bacteria (Durfee *et al.*, 2008).

El genotipo que caracteriza a *E. coli* DH10B es: F, *araD139*,  $\Delta$ (*ara, leu*) 7697,  $\Delta$ *lacX74*, *gal U*, *galK*, *rpsL*, *deoR*,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15, *endA1*, *nupG*, *recA1*, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr hsdRMS mcr BC*) (Grant *et al.*, 1990).

***Escherichia coli* HB101**

Cepa obtenida originalmente por Boyer y Roulland-Dussoix que se deriva de *E. coli* K12 (Boyer y Roulland-dussoix, 1969). Se utilizó en los experimentos de conjugación triparental como portadora del plásmido pRK600 que contiene la región *mob* y facilita la movilización de plásmidos desde una cepa donadora a una cepa receptora.

El genotipo que caracteriza a esta cepa es: *supE44*, *supF58*, *hdsS3* ( $r_B^- m_B^-$ ), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xyt5*, *mtl1*.

**Tabla 3.** Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>P. putida</i> N	Cepa silvestre. Ap <sup>R</sup>	NEOL Biosolutions S.A.
<i>P. putida</i> N pMC	Cepa de <i>P. putida</i> N que porta el plásmido pBBR1MCS-3.	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N pMC <i>phaF</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N que porta el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaF</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N pK18 <i>pha</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N con una copia adicional del cluster <i>pha</i> de <i>P. putida</i> U integrada en su genoma en el plásmido pK18:: <i>mob</i> .	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N Δ <i>fadBA</i>	Mutante de <i>P. putida</i> N al que se le han deletado los genes <i>fadBA</i> .	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N pMC <i>phaZ</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N que contiene el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaZ</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N Δ <i>fadBA</i> pMC <i>phaZ</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N Δ <i>fadBA</i> que porta el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaZ</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N pK18 <i>phaF</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N con el gen <i>phaF</i> interrumpido por el plásmido pK18:: <i>mob</i> .	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N pK18 <i>ftsZ</i>	Cepa de <i>P. putida</i> N con el gen <i>ftsZ</i> interrumpido por el plásmido pK18:: <i>mob</i> .	Este trabajo.
<i>P. putida</i> U	Cepa silvestre. Rf <sup>R</sup>	Martínez-Blanco <i>et al.</i> , 1990
<i>P. putida</i> Δ <i>fadBA</i>	Mutante de <i>P. putida</i> U al que se le ha deletado los genes <i>fadBA</i> .	Olivera <i>et al.</i> , 2001a
<i>P. putida</i> PHA <sup>-</sup> (mutantes 1-22)	Mutantes de <i>P. putida</i> Δ <i>fadBA</i> que han perdido la capacidad para producir PHAs.	Este trabajo.
PHA <sup>-</sup> pMC	Cepas de <i>P. putida</i> PHA <sup>-</sup> que portan una copia del plásmido pBBR1MCS-3.	Este trabajo.
PHA <sup>-</sup> pMC <i>phaC1</i>	Cepas de <i>P. putida</i> PHA <sup>-</sup> que contienen el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaC1</i> .	Este trabajo.
PHA <sup>-</sup> pMC <i>phaC1</i> *	Cepas de <i>P. putida</i> PHA <sup>-</sup> que contienen el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia mutada del gen <i>phaC1</i> .	Este trabajo.
PHA <sup>-</sup> pMC <i>phaC2</i>	Cepas de <i>P. putida</i> PHA <sup>-</sup> que contienen el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaC2</i> .	Este trabajo.
<i>P. putida</i> U Δ <i>pha</i>	Mutante de <i>P. putida</i> al que se ha deletado el cluster <i>pha</i> completo.	Sandoval <i>et al.</i> , 2007



<b><i>Δpha</i> pMC<i>phaC1</i></b>	<i>P. putida Δpha</i> que contiene el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaC1</i> .	Sandoval <i>et al.</i> , 2007
<b><i>Δpha</i> pMC<i>phaC1</i>*</b>	Cepas de <i>P. putida Δpha</i> que contienen los plásmidos pBBR1MCS-3 con las copias del gen <i>phaC1</i> mutadas.	Este trabajo.
<b><i>Δpha</i> pMC<i>phaC2</i></b>	<i>P. putida Δpha</i> que contiene el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaC2</i> .	Arias <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Δpha</i> pMC<i>phaC1</i>*<i>phaC2</i></b>	<i>P. putida Δpha</i> que contiene el plásmido pBBR1MCS-3 con una copia del gen <i>phaC1</i> * y una copia del gen <i>phaC2</i> .	Este trabajo.
<b><i>P. putida</i> DOC21</b>	Cepa silvestre. Ap <sup>R</sup>	Merino <i>et al.</i> , 2013
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>DH10B</b>	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\emptyset$ 80 <i>dlacZ1M15</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697, <i>galU galK</i> , $\lambda^-$ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> .	García <i>et al.</i> , 2004
<b>DH10B pK18<i>pha</i></b>	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B que contiene el plásmido pK18 <i>pha</i>	García <i>et al.</i> , 2004
<b>HB101pRK600</b>	<i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>hdsS3</i> ( $r_B^- m_B^-$ ), <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyt-5</i> , <i>mtl-1</i> , Cm <sup>R</sup> , <i>oriColE1oriV</i> , Mob <sup>+</sup> , posee el plásmido <i>helper</i> utilizado en las conjugaciones triparentales.	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<b>LE392 pN131</b>	Tc <sup>R</sup> , <i>fadB</i> interrumpido por Tn10 (Tn10:: <i>fadB64</i> ).	Cedida por Dra. C. DiRusso
<b>LE392 pN131 pK18<i>pha</i></b>	Cepa de <i>E. coli</i> LE392 pN131 que contiene el plásmido pK18 <i>pha</i> .	Este trabajo

## 2. Vectores

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy** ([www.promega.es/products/pcr/pcr-cloning/pgem\\_t-easy-vector-systems](http://www.promega.es/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems))

Vector comercial suministrado por Promega, que tiene un tamaño de 3.015 pb y se utiliza para la clonación de los fragmentos obtenidos por PCR. El vector se comercializa linearizado y posee en cada extremo 3' una timina libre, de tal modo que no religa consigo mismo y permite la ligación directa de aquellos productos de PCR amplificados con determinadas polimerasas termoestables que añaden una adenina adicional al finalizar la carrera de amplificación.

El lugar de clonación con las timinas libres se encuentra interrumpiendo un gen que codifica el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa (primeros 146 aminoácidos de esta enzima). De este modo, cuando se clona un fragmento obtenido por PCR, permite una selección blanco/azul de los transformantes obtenidos en medio de cultivo suplementado con X-gal.

El fragmento clonado queda, al estar incluido en un sitio de clonación múltiple, flanqueado por diversos cortes de restricción, que permiten la extracción del mismo. Los productos de PCR quedan bajo el control de los promotores T7 y Sp6.

La selección y el mantenimiento de la cepa de *E. coli* que lleva el plásmido se realiza suplementando ampicilina al medio de cultivo, puesto que el pGEM-T Easy presenta un gen que codifica para una  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.

**pTZ57R/T** ([www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1214](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1214))

Plásmido comercial similar al anterior, que tiene una longitud de 2.886 pb, y pertenece a la multinacional Thermo Fisher Scientific. Al igual que el pGEM-T Easy, se utiliza para la clonación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR, generalmente como paso previo a su clonación en un plásmido de expresión o para secuenciar el DNA. El fragmento clonado queda flanqueado por distintas dianas de restricción que facilitan el subclonaje en otros vectores. Dispone de un gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina, y un sistema de selección blanco/azul mediado por la interrupción de la  $\beta$ -galactosidasa, como el de Promega. El producto clonado se puede expresar desde el promotor T7.

**pK18::mob** (Schäfer *et al.*, 1994)

El plásmido pK18::mob tiene un tamaño de 3.793 pb, y entre sus características cabe señalar que contiene un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección, y que posee la región *mob* del plásmido RP4, lo que permite su transferencia mediante conjugación. Se caracteriza por ser replicativo en *E. coli* pero no en *P. putida*, ya que su origen de replicación, pMB1, no es reconocido por la maquinaria replicativa de *Pseudomonas*. Por ello, este vector se utilizó para llevar a cabo experimentos de obtención de mutantes por recombinación homóloga, que integraban el plásmido (y el/los gen/es clonado/s en el mismo) en el genoma de la cepa de *Pseudomonas*.

**pJQ200 (KS/SK)** (Quandt y Hynes, 1993)

Este plásmido consta de 5.217 pb y ha sido utilizado para la obtención de mutantes por delección, gracias a la presencia en el mismo de un gen letal condicional y de un marcador de resistencia a antibiótico. Dicha resistencia la confiere un gen que codifica para una acetiltransferasa de gentamicina. Por su parte, el gen letal es el *sacB* de *Bacillus subtilis*, que al ser inducido por sacarosa permite el acúmulo de levanos en el espacio periplásmico, lisando las bacterias gram negativas. Posee el origen de replicación (*ori*) P15A del plásmido pACYC184, únicamente funcional en enterobacterias, e incorpora el origen de transferencia de RP4 que

permite la movilización del plásmido a otras bacterias gram negativas. Este vector también dispone del sistema *lacZα* para la selección blanco/azul de los fragmentos clonados. Finalmente, a cada lado del gen *lacZ*, se encuentran dos sitios múltiples de clonación, de 448 pb, extraídos del plásmido pBluescriptIISK y -KS.

**pBBR1MCS-3** (Kovach *et al.*, 1995)

Plásmido derivado del vector de amplio rango de hospedador pBBR1MCS utilizado para la expresión de genes, que consta de 5.228 pb. Es un plásmido replicativo en *E. coli* y en *P. putida*, entre otras cepas bacterianas, que se mantiene en el hospedador en un número de copias bajo. Posee un gen de resistencia a tetraciclina. Al igual que otros plásmidos, posee el gen *lacZα* que permite la selección blanco azul. Este plásmido también cuenta con una región de movilización *mob*, por lo que es apto para su utilización en experimentos de conjugación triparental (necesita de la expresión de las funciones de transferencia RK2 en *trans*). Es compatible con los replicones basados en los orígenes de replicación ColE1 y P15a, y con plásmidos pertenecientes a los grupos IncP, IncQ e IncW.

**Tabla 4.** Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pGEM-T Easy	Ap <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> <sup>+</sup> , SP6 T7, promotor <i>lac</i> , clonación directa de productos de PCR.	Promega (EE. UU.).
pGN <i>fadBA</i>	Plásmido pGEM-T Easy con una copia de los genes <i>fadBA</i> de <i>P. putida</i> N.	Este trabajo.
pBBR1MCS-3 (pMC)	Tc <sup>R</sup> , <i>oriBBR1</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>lac</i> promotor <i>lacZα</i> <sup>+</sup> , vector de expresión de amplio rango de hospedador.	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pMC <i>phaF</i>	Plásmido pBBR1MCS-3 que contiene una copia del gen <i>phaF</i> de <i>P. putida</i> U.	Sandoval <i>et al.</i> , 2007
pMC <i>phaZ</i>	Plásmido pBBR1MCS-3 que contiene una copia del gen <i>phaZ</i> de <i>P. putida</i> U.	Sandoval <i>et al.</i> , 2005
pMC <i>phaC1</i>	Plásmido pBBR1MCS-3 que contiene una copia del gen <i>phaC</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pMC <i>phaC1</i> *	Plásmidos pBBR1MCS-3 que contienen las copias mutadas del gen <i>phaC1</i> .	Este trabajo.
pMC <i>phaC2</i>	Plásmido pBBR1MCS-3 que contiene una copia del gen <i>phaC2</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pMC <i>phaC1</i> * <i>phaC2</i>	Plásmido pBBR1MCS-3 que contiene una copia mutada del gen <i>phaC1</i> y una copia del gen <i>phaC2</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pTZ57R/T	Ap <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> <sup>+</sup> , promotor T7, clonación directa de productos de PCR.	Thermo Fisher Scientific (EE. UU.).
pTZ <i>phaC1</i>	Plásmido pTZ57R/T con una copia del gen <i>phaC1</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pTZ <i>phaC1</i> *	Plásmidos pTZ57R/T con copias mutadas del gen <i>phaC1</i> * de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pTZ <i>phaC2</i>	Plásmido pTZ57R/T con una copia del gen <i>phaC2</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
pJQ200KS	Gtm <sup>R</sup> , <i>orip15A</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>lacZα</i> <sup>+</sup> , <i>sacB</i> .	Quandt y Hynes, 1993

<b>pJQΔ<i>fadBA</i></b>	Plásmido pJQ200KS que contiene la construcción de delección de los genes <i>fadBA</i> de <i>P. putida</i> N.	Este trabajo.
<b>pK18::<i>mob</i></b>	Km <sup>R</sup> , <i>oriToriV</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>lacZα</i> <sup>+</sup> , <i>sacB</i> .	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
<b>pK18<i>pha</i></b>	Plásmido pK18:: <i>mob</i> que contiene una copia del <i>cluster pha</i> de <i>P. putida</i> U completo.	García <i>et al.</i> , 2004
<b>pK18<i>phaF</i></b>	Plásmido pK18:: <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>phaF</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
<b>pK18<i>ftsZ</i>Disrup</b>	Plásmido pK18:: <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>ftsZ</i> de <i>P. putida</i> U.	Este trabajo.
<b>pRK600</b>	Cm <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>oriV</i> , Mob <sup>+</sup> , plásmido auxiliar utilizado en experimentos de conjugación.	Kessler <i>et al.</i> , 1992

### 3. Medios de cultivo

El mantenimiento y cultivo de las distintas cepas se realizó en diferentes medios de cultivo que se prepararon de acuerdo a las siguientes indicaciones. Todos ellos se esterilizaron en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### Medio LB (Sambrook y Russell, 2001)

Bacto-triptona	10,0 g/l
Extracto de levadura	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l
H <sub>2</sub> O destilada	hasta 1 l

Se ajustó el pH a 7,5 con KOH.

La preparación de medio sólido LB se realizó añadiendo a la composición anterior agar (Laboratorios Conda) al 2% (p/v). En el caso de los medios sólidos, en algunos experimentos se añadió el suplemento correspondiente, como sacarosa (VWR BDH Prolabo). En aquellos medios suplementados con antibióticos (ver concentraciones a continuación), éstos se añadieron inmediatamente antes de repartir el volumen de LB en placas Petri, mezclados adecuadamente con el medio.

#### Sales del medio mínimo de *Pseudomonas* (MM) (Martínez-Blanco *et al.*, 1990)

Este medio se utilizó exclusivamente para el cultivo de las cepas de *Pseudomonas putida*. La composición de este medio químicamente definido es la siguiente:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,60 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,00 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g/l
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	hasta 1 l

Se ajusta el pH a 7,0 con KOH. Para la preparación del medio sólido se añadió a la composición anterior agar al 2% (p/v). Al conjunto de sales que constituyen el medio mínimo es preciso añadirle la/s fuente/s de carbono correspondiente/s a la concentración/es que requiera cada experimento (p. ej. ácido 4-hidroxifenilacético, Sigma-Aldrich). Dichas fuentes de carbono se prepararon como soluciones concentradas, se esterilizaron y se añadieron al medio, junto con los antibióticos o suplementos requeridos en cada experimento.

Cuando se estudió la acumulación de polihidroxicanoatos, se añadieron diferentes ácidos n-alcánicos (VWR BDH Prolabo) o n-fenilalcánicos (Alfa-Aesar, Lancaster) al medio de cultivo, cuyos intermediarios metabólicos eran susceptibles de ser polimerizados.

Medio  $\Phi$  (Sandoval, 2005)

Bactotripton	20,0 g/l
Extracto de levadura	5,0 g/l
KCl	7,5 g/l
$\text{MgSO}_4$	4,0 g/l
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	hasta 1 l

Se ajustó el pH a 7,6 con KOH.

Los medios de cultivo se suplementaron, en función del experimento a realizar, con distintos aditivos. Entre los que se añadieron a los medios de forma habitual se encuentran los antibióticos, empleados generalmente como marcadores de selección a las concentraciones finales indicadas en cada caso: rifampicina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio líquido, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio sólido), ampicilina (Ap, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), kanamicina (Km, 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio líquido y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio sólido), cloranfenicol (Cm, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), tetraciclina (Tc, 37,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio líquido y 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medio sólido) y/o gentamicina (Gtm, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Todos ellos se adquirieron a Sigma-Aldrich. Se prepararon en soluciones concentradas (1.000X), se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C. La solución concentrada de rifampicina se prepara en metanol, la de cloranfenicol en etanol y la del resto de antibióticos en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

En función de los experimentos, estas concentraciones sufrieron variaciones. En el apartado *Resultados y Discusión* se indican las concentraciones empleadas en cada caso concreto.

También se utilizó el isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor de la expresión de aquellos sistemas que se encuentran bajo el control de un promotor del tipo *lacI*, evitando utilizar la lactosa que es el inductor original, pero que tiene el inconveniente de ser metabolizable. Por cada ml de medio se añadieron 0,7  $\mu$ l de una solución 100 mM preparada en H<sub>2</sub>O MilliQ. La concentración final en el medio de cultivo fue de 70  $\mu$ M.

Otro de los aditivos comúnmente empleados fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal), que permite la selección blanco/azul de aquellas colonias que contienen vectores capaces de expresar el péptido  $\alpha$  de la proteína LacZ. Se suplementó el X-Gal a razón de 1,7  $\mu$ l por cada ml de medio, partiendo de una disolución maestra de 20 mg de X-Gal/ml en dimetilformamida, alcanzando así una concentración final en el medio de cultivo de 34  $\mu$ g/ml.

## **4. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos**

Para periodos cortos de tiempo (un mes máximo), se mantuvieron las cepas en placas de Petri a 4 °C y adecuadamente selladas con Parafilm™. La conservación de las cepas a -80 °C se llevó a cabo en criotubos con una disolución al 50% de glicerol y medio LB.

### **4.1. Cultivo en medio sólido**

El cultivo de las cepas de *E. coli* se llevó a cabo en placas Petri con medio LB sólido a 37 °C. Por su parte, las cepas de *P. putida* N, de *P. putida* U y de sus diferentes mutantes se cultivaron a 30 °C en el medio correspondiente, y se conservaron en placas con MM suplementado con ácido 4-hidroxifenilacético como fuente de carbono. En todos los casos, los medios disponían de los aditivos y antibióticos correspondientes.

### **4.2. Cultivo en medio líquido y curvas de crecimiento**

Para realizar cultivos en medio líquido usualmente destinados a estudiar la cinética de crecimiento bacteriano, o a determinar el acúmulo de PHAs, la cepa objeto de estudio se sembró en medio sólido. Una vez que el cultivo había crecido en medio sólido, se recogieron las células, resuspendiéndolas en H<sub>2</sub>O MilliQ. A partir de las suspensiones celulares obtenidas

se procedió a inocular *P. putida* o *E. coli* en los diferentes medios líquidos. Cada matraz Erlenmeyer, que contenía el medio deseado (1/5 del volumen del matraz), se inoculó con el volumen necesario de esta suspensión bacteriana para que la absorbancia a tiempo 0 h (medida a 540 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-640) fuese 0,05. Los matraces se incubaron en un agitador orbital Innova 4330 (New Brunswick Scientific) a 250 rpm y a 30 °C (*P. putida*) o 37 °C (*E. coli*) durante el tiempo requerido para cada experimento. Las curvas de crecimiento bacteriano se obtuvieron midiendo la absorbancia de la suspensión de células a 540 nm a los intervalos de tiempo requeridos en cada caso. Para ello, se realizaron las diluciones adecuadas para que los valores se mantuviesen siempre en el rango de absorbancia comprendido entre 0,2-0,9.

Para los experimentos de acumulación de polihidroxicanoatos, los matraces Erlenmeyer utilizados fueron de 2.000 ml con 500 ml de medio mínimo. A estos matraces se les añadió una suspensión bacteriana, a partir de matraces crecidos previamente (inóculo) que contenían 100 ml de medio mínimo, y que habían sido preparados tal y como se indicó anteriormente (análisis de curvas de crecimiento).

## **5. Métodos generales para el análisis y/o tratamiento de las muestras de DNA**

A continuación se indican los protocolos utilizados habitualmente para manipular los fragmentos de DNA. En general se siguieron los protocolos descritos por Sambrook y colaboradores (Sambrook, 2001). En todos los casos es importante mantener la esterilidad y tomar las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los reactivos y materiales (H<sub>2</sub>O, tubos eppendorf, puntas de micropipeta etc.).

### **5.1. Determinación de la concentración y pureza del DNA**

#### **Reactivos**

- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM.

#### **Procedimiento**

El método usado consistió en la medida directa de la concentración de la muestra en un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000. De acuerdo con el fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1 µl de la muestra es suficiente para garantizar una medida adecuada de las muestras de ácidos nucleicos en solución acuosa, si bien se recomienda la utilización de 1,5-2 µl

para garantizar que la muestra forme completamente la columna líquida que ha de interponerse al haz de luz.

La medida de la concentración y la pureza de las muestras de DNA se realizó midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm, previa dilución de las muestras en agua estéril o en tampón TE (en función de la concentración esperada de la muestra). Se ha determinado experimentalmente que a una longitud de onda de 260 nm una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 µg/ml (Davis *et al.* 1986). La pureza de la muestra viene determinada por la relación entre los valores de las absorbancias medidas a 260 y a 280 nm, considerándose el DNA como “puro” cuando esta relación se encuentra en torno a 1,8 (Sambrook *et al.* 2001).

## **5.2. Digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción**

Las digestiones de fragmentos de DNA con enzimas de restricción se llevaron a cabo utilizando las soluciones amortiguadoras y las condiciones recomendadas por los diferentes proveedores de cada enzima (Takara, Thermo Scientific (anteriormente Fermentas) etc.). Es recomendable leer previamente las indicaciones del fabricante, que se adjuntan con cada enzima o que pueden ser consultadas a través de su sitio web.

Cada reacción se preparó de acuerdo a las siguientes indicaciones:

X µg de DNA en H<sub>2</sub>O MilliQ.

Tampón de digestión (10X).

1-3 unidades de la endonucleasa de restricción/µg de DNA.

H<sub>2</sub>O MilliQ hasta completar el volumen de digestión.

El volumen final nunca fue inferior a 20 µl en digestiones realizadas sólo con una enzima (simples) ni inferior a 30 µl en aquellas digestiones realizadas simultáneamente con dos enzimas (dobles), ya que la concentración de glicerol en la que se conservan las enzimas podría inhibir parcialmente la catálisis enzimática.

La mezcla de reacción se incubó a la temperatura adecuada para cada enzima, durante 2-3 h. En otros casos, cuando la estabilidad de la(s) enzima(s) así lo requería, se añadía al ensayo de reacción albúmina sérica bovina (BSA) (10X).



### **5.3. Desfosforilación del DNA**

La desfosforilación eficaz del DNA se llevó a cabo disolviendo, en primer lugar, el DNA en una mezcla de H<sub>2</sub>O MilliQ (45 µl) y tampón de fosfatasa 10X (5 µl). Para ello, se calentó la muestra en un *Thermoblock* a 65 °C durante 10 minutos, asegurando así la completa disolución y la relajación del DNA. Una vez disuelto, se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación se añadió la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, Roche) o de gamba (SAP, Promega) (5 unidades). La reacción se incubó durante 60-90 minutos a 37 °C.

Cuando se utilizó SAP, la enzima se inactivó a 65 °C durante 15 minutos. Tanto en las reacciones llevadas a cabo con SAP como con CIAP, la enzima se eliminó mediante fenolización. La precipitación se realizó a -20 °C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 6,5 y con 2,5 volúmenes de etanol frío.

### **5.4. Ligación de los fragmentos de DNA**

La ligación de fragmentos de DNA, ya sean obtenidos por PCR o por digestión, se realizó utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Takara o Thermo Fisher Scientific). Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' y 5' fosfato del DNA, necesitando para ello ATP y Mg<sup>2+</sup>. Las ligaciones se llevaron a cabo atendiendo a las siguientes indicaciones:

1. Las concentraciones (ng/µl) del plásmido y del DNA utilizado como inserto se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.
2. Se aplicó la siguiente ecuación para determinar las proporciones óptimas de DNA del inserto y del plásmido:  
$$(\text{longitud inserto/longitud plásmido}) \times \text{ng vector} \times 3 = \text{ng inserto}$$
3. La reacción se prepara en un volumen final de 10 µl. A la cantidad adecuada de plásmido e inserto se añade 1 µl de tampón de ligasa (10X) y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4. Se completó el volumen hasta 10 µl con H<sub>2</sub>O MilliQ.
4. La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante toda la noche (aprox. 12 h). En el caso de las ligaciones en el plásmido pTZ57R/T, se llevaron a cabo a 22 °C durante 1 h y posteriormente a 4 °C toda la noche (aprox. 12 h).

5. La reacción de ligación se transfirió a la cepa *E. coli* DH10B siguiendo un protocolo de transformación por choque térmico.

### **5.5. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa**

Las muestras de DNA (digestiones, PCRs, etc.) se separaron en función del tamaño de los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración del gel se modificó dependiendo del tamaño del fragmento de DNA que se pretendía visualizar. En general, para aquellos fragmentos de entre 500 pb y 3,5 Kb se utilizaron geles al 1% en agarosa. Cuando los fragmentos fueron más grandes, se disminuyó la proporción (0,7%) y cuando fueron más pequeños se incrementó (llegando al 2%).

#### **Materiales y reactivos:**

- Tampón de carga: Suministrado por Takara (azul de bromofenol 0,05%, SDS 0,9%, 0,25% y glicerol 50%) o Thermo Fisher Scientific [Tris HCl (pH 7,6) 10 mM, azul de bromofenol 0,03%, azul de xileno 0,03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM].
- TAE 50X: Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 ml; EDTA 0,5 M pH 8,0 100 ml; agua destilada hasta 1 l.
- Bromuro de etidio: Solución 10 mg/ml en agua; se conserva protegido de la luz a 4 °C.

#### **Procedimiento**

La preparación de los geles se llevó a cabo fundiendo la agarosa en TAE 1X en un microondas, y añadiendo aproximadamente 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Este agente intercalante se une al DNA permitiendo su visualización en un transiluminador de luz UV.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga antes de proceder a depositarlas en los pocillos del gel. El tampón de carga incrementa la densidad de la muestra, favoreciendo que quede comprendido en el pocillo de agarosa. El volumen del tampón de carga utilizado varió en función de la concentración al que lo distribuya el proveedor (1/10 del volumen final de la muestra en el caso de Takara y 1/6 en el caso de Thermo Fisher Scientific).

Junto a las muestras siempre se carga un marcador de peso molecular que indique el tamaño de los fragmentos de DNA que se separan por electroforesis. El marcador de tamaño utilizado fue el producto comercial de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) 1 kb Plus *DNA ladder*®.

Los geles de agarosa se depositaron en una cubeta de electroforesis (BIO RAD) y se cubrieron, hasta quedar sumergidos, con buffer TAE. Se utilizó una fuente de alimentación BIO RAD PowerPac Basic™, configurando una diferencia de potencial de 100 V que se prolongaría durante un periodo de tiempo variable en función de las muestras a separar.

### **5.6. Aislamiento del DNA genómico de *Pseudomonas putida***

El DNA genómico de *P. putida* se aisló mediante una extracción fenol-cloroformo. La purificación del DNA a partir de un lisado celular requiere la extracción del mismo de una mezcla de moléculas, entre las que abundan las proteínas. El fenol desnaturaliza estas proteínas, y su eliminación es más eficiente cuando se utilizan dos solventes orgánicos. La adición de alcohol isoamílico permite reducir la formación de espuma, y contribuye a la inactivación de la RNasa y a la eliminación de las moléculas de RNA (Sambrook y Russell, 2001).

#### **Reactivos:**

- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico: Mezcla de fenol (equilibrado con tampón Tris-HCl pH 8,0) cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, respectivamente.
- Cloroformo: alcohol isoamílico (CIA): Mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.
- Solución GTE (Solución de lisis I): Tris-HCl 25 mM pH 8; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM pH 8.
- Fenol neutro: El fenol puede adquirirse al fabricante directamente líquido y equilibrado a pH 8. El fenol sólido o el líquido que no se encuentre equilibrado a pH 7,8-8 deberá equilibrarse antes de ser utilizado para la extracción de los ácidos nucleicos. En nuestro caso se siguió el siguiente procedimiento:
  1. El fenol se funde a 68 °C y se añade 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%. La hidroxiquinoleína protegerá el fenol de la oxidación.
  2. Se añade un volumen de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 y se mezcla durante 15 min. Se deja reposar y una vez que las dos fases se hayan separado, se elimina la mayor cantidad posible de tampón.
  3. Se repite el paso anterior empleando en esta ocasión un volumen de tampón Tris HCl 0,1 M pH 8,0.
  4. Añadir un décimo de volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 con 0,2% β-mercaptoetanol y conservar a 4 °C.

- TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0.

### **Procedimiento:**

#### **Cultivo**

1.- Se realizó un cultivo de *Pseudomonas putida* (N o U, según el caso) en 50 ml de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico correspondiente. Se incubó durante 12 h (toda la noche) a 30 °C y 250 rpm.

#### **Lisis celular**

2.- Se centrifugó el cultivo para recoger las células a 4000 x g durante 10 minutos en una centrifuga previamente refrigerada a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspenden en 20 ml de solución GTE (glucosa Tris EDTA). Se añadieron 20 mg de lisozima para favorecer la disolución de la pared bacteriana y se mezcla bien la suspensión final. Se incubó a 37 °C durante 30 min.

3.- Se añadieron 2 ml de SDS 10% para obtener una solución final al 1%. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. El SDS permite la lisis de las células y separa las proteínas del DNA.

#### **Tratamiento del lisado**

4.- A continuación, se añadieron 300 µl de proteinasa K (10 mg/ml). La proteinasa K facilita la eliminación del elevado número de proteínas presentes en el lisado celular desnaturando las mismas. Además, evita que las nucleasas presentes en el lisado o en el ambiente degraden el DNA que se está extrayendo. Se incubó 30 minutos (como mínimo) a 37 °C.

5.- Posteriormente, se añadieron 550 µl de NaCl 4 M, para alcanzar una concentración en el volumen final de 0,1 M.

#### **Extracción por fenol:cloroformo**

6.- La extracción se llevó a cabo realizando en primer lugar un lavado con un volumen de fenol neutro (el fenol tiene que estar equilibrado a pH 8). A continuación, se llevaron a cabo otros dos lavados con un volumen de fenol:cloroformo. Por último, se realizó un cuarto lavado con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico. En cada lavado se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm para separar ambas fases, conservando la fase acuosa (superior), en la que se encuentra el DNA, y descartando el solvente orgánico.

7.- Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) paulatinamente, de tal modo que el etanol y la fase acuosa no se mezclasen abruptamente. Las dos fases se mezclaron suavemente por inversión del tubo Eppendorf para lograr que el DNA precipitase en forma de ovillo. Con ayuda de una pipeta Pasteur, previamente cerrada en su extremo más fino, se recogió el ovillo.

8.- Se realizó un lavado del DNA así precipitado con etanol frío al 70% (-20 °C) para eliminar el exceso de sales y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente.

9.- Una vez seco, el DNA fue resuspendido en 5 ml de TE.

### **5.7. Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli*: minipreparaciones**

Se utilizaron productos comerciales (Promega o Qiagen) que permiten la purificación de DNA plasmídico de forma sencilla y rápida, tanto a pequeña como a gran escala. En estos casos, se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante. El fundamento de los protocolos seguidos en estos productos comerciales es el mismo que el desarrollado por Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979) en su protocolo de la lisis alcalina:

1. Los cultivos bacterianos llevados a cabo en tubos falcon (10 ml de cultivo) se centrifugaron a 10.000 x g para recoger las células que contienen el plásmido. El cultivo se realizó a 37 °C, 250 rpm durante 8-12 horas (toda la noche).
2. Se resuspendió el precipitado en la solución de resuspensión, que contiene RNasa.
3. Las bacterias se sometieron a una lisis alcalina, añadiendo la solución de lisis, que destruye la pared bacteriana y lisa las células en presencia de SDS.
4. Se añadió proteasa alcalina, que degrada la abundante cantidad de proteínas presentes en la solución.
5. Se neutralizó la lisis y la degradación con una solución de neutralización que contenía acetato potásico pH 6-6,5.
6. Los restos celulares (DNA genómico y proteínas) se separaron por centrifugación, quedando precipitados en el fondo del tubo. Se recogió el sobrenadante que contiene el plásmido.

7. El DNA plasmídico se retuvo específicamente mediante interacciones hidrofóbicas en una columna con una membrana de sílice.
8. Se lavó la columna con etanol para eliminar restos de otras moléculas. Se eliminaron los restos de etanol por centrifugación de la columna.
9. El DNA se eluyó con agua MilliQ o TE (aprox. 50 µl).

### **5.8. Recuperación del DNA de los geles de agarosa**

La extracción del DNA de los geles de agarosa en los que dichas muestras de DNA se habían separado por electroforesis se realizó utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen. El fragmento de agarosa escindido del gel que contenía el DNA se disolvió en una solución salina a 55-60 °C. Posteriormente, la purificación se realizó utilizando las columnas de las que dispone el producto comercial, que contienen una membrana de sílice que retiene el DNA mediante interacciones hidrofóbicas.

### **5.9. Transformación de *E. coli***

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo siguiendo un protocolo de choque térmico. Para ello, es necesario que las células sean competentes, es decir, que puedan incorporar DNA exógeno. El protocolo para la obtención de células competentes se detalla a continuación.

#### **Obtención de células competentes: método del cloruro de rubidio**

La obtención de células competentes se llevó a cabo mediante el método del cloruro de rubidio, descrito por Douglas Hanahan, y que proporciona células *E. coli* competentes con una alta eficiencia de transformación (Hanahan, 1983).

#### **Reactivos**

##### Solución TFB1:

- RbCl 100 mM
- MnCl<sub>2</sub> 50 mM
- Acetato potásico 30 mM
- CaCl<sub>2</sub> 10 mM
- Glicerol 15% (v/v)
- H<sub>2</sub>O MilliQ hasta 500 ml
- Ajustar pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M y esterilizar por filtración.

**Solución TFB2:**

- MOPS 10 mM pH 7
- RbCl 10 mM
- CaCl<sub>2</sub> 75 mM
- Glicerol 15% (v/v)
- H<sub>2</sub>O MilliQ hasta 50 ml
- Ajustar pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

**Procedimiento:**

**Cultivo de *E. coli* DH10B**

1. Se sembró la cepa *E. coli* DH10B en placa Petri de medio LB sólido, y se cultivó a 37 °C durante 12-14 horas.
2. Partiendo de una colonia aislada de *E. coli* DH10B, se sembró un matraz con 100 ml de medio  $\Phi$ , que constituía el preinóculo. Se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzó un crecimiento suficiente para inocular 2 matraces (2,5 l) con 500 ml de medio  $\Phi$  cada uno.
3. Los matraces se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una absorbancia medida a 600 nm de 0,4-0,5. Una vez alcanzado este valor los matraces y su contenido se refrigeraron en hielo durante 30 minutos.
4. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 x g y 4 °C durante 5 minutos.

**Tratamiento para que las células adquieran el estado de competencia**

5. Las células así precipitadas se resuspendieron en 500 ml de la solución TFB1, y se incubaron en hielo 30 min.
6. La suspensión celular se centrifugó de nuevo a 5.000 x g y 4 °C durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 50 ml de la solución TFB2 y se incubó durante 15 min en hielo.
7. Se repartieron 200  $\mu$ l de la solución resultante (células competentes) en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El proceso se llevó a cabo en hielo y en campana de flujo laminar en todo momento. Las células se congelaron a -80 °C.

**Procedimiento de transformación**

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* se siguió el correspondiente método descrito también por Hanahan (Hanahan, 1983):

1. Se añadió el plásmido con el que se quiere transformar *E. coli* a un volumen de 200 µl de células competentes (que una vez extraídas de -80 °C se mantenían en hielo). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, para permitir que el DNA se adhiriera a la superficie de las células.
2. Las células se sometieron a un choque térmico. Para ello se sumergió el Eppendorf colocado en un baño de agua a una temperatura de 37 °C durante 2 minutos. La membrana de las células, que han sido tratadas para favorecer su permeabilización, se relaja permitiendo el paso del plásmido al interior celular.
3. A continuación se enfrió el Eppendorf con las células competentes en hielo durante 2 minutos, para que la membrana vuelva al estado original.
4. Se añadieron 800 µl de medio LB fresco, y se incubaron las células a 37 °C durante 1 h a 250 rpm. Las células que hayan incorporado el plásmido comenzaron a dividirse, a replicar el plásmido y a expresar la resistencia al antibiótico.
5. Se sembraron alícuotas de 200 µl en placas de LB sólido que contenía el antibiótico utilizado como marcador de selección del plásmido.
6. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas, tiempo al cabo del cual se observaron las colonias transformantes. La eficacia de transformación obtenida por este método fue del orden de  $5 \times 10^8$  transformantes/µg de DNA plasmídico.

### **5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación de fragmentos de DNA (Mullis *et al.*, 1986). Para ello se utilizan dos oligonucleótidos, cada uno situado en un extremo de cada una de las hebras de DNA del fragmento que se desea amplificar. La elongación a partir de estos oligonucleótidos se realiza con una enzima con actividad DNA polimerásica. La sucesión de ciclos de desnaturalización del DNA, anillamiento de los oligonucleótidos y extensión de los mismos llevada a cabo por la DNA polimerasa, variando la temperatura, permite la obtención de un gran número de copias del fragmento de DNA de interés.

#### **Reactivos:**

- Tampón de la polimerasa: Proporcionado por el fabricante junto con la enzima (Biotools).



- MgCl<sub>2</sub>: Suministrado por Biotools.
- Desoxinucleótidos (dNTPs): Solución a una concentración 10 mM adquirida a Biotools.
- Oligonucleótidos: Fragmentos de DNA (generalmente de entre 14 y 30 nucleótidos), diseñados sobre la secuencia de DNA de interés. Fueron proporcionados por Biomers y Roche. Se indica la secuencia de los oligonucleótidos empleados en este trabajo en la Tabla 5.
- DNA polimerasa: En los experimentos llevados a cabo se utilizaron dos tipos de DNA polimerasa:

*Taq* polimerasa: enzima aislada originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, y cuyo producto comercial es una variante modificada de la enzima homónima de *Thermus sp.* (Biotools, B&M Labs, S.A.). Se caracteriza por ser una polimerasa termoestable, de alta procesividad (hasta 5 Kb de DNA) y que no dispone de actividad correctora de copia. Esta enzima añade siempre al final de la carrera de amplificación una adenina, razón por la que los plásmidos de clonación comerciales tipo pGEM-T Easy o pTZ57R/T tienen una timina libre en sus extremos 3', que facilita la clonación directa de los productos de PCR.

*Pfu* polimerasa: enzima procedente de *Pyrococcus furiosus* (Promega). Se caracteriza por poseer actividad correctora de copia. Los fragmentos amplificados con esta enzima tienen extremos romos, es decir, esta polimerasa no añade una adenina al final de cada carrera de amplificación. Es capaz de amplificar 1 Kb de DNA cada 2 minutos, aproximadamente.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR deben de encontrarse a las concentraciones adecuadas para que el proceso tenga lugar de forma óptima. Es necesario el concurso de un exceso de oligonucleótidos, de tal modo que una vez producida la desnaturalización del DNA sean los oligonucleótidos quienes anillen con las hebras de DNA, y no la hebra complementaria. Es necesaria una cantidad suficiente de polimerasa, *Taq* polimerasa o una mezcla de *Taq* polimerasa y *Pfu* polimerasa, para incrementar la fidelidad de copia. También es preciso incorporar desoxinucleótidos que puedan ser incorporados por la polimerasa para la síntesis del DNA. Finalmente, y para el adecuado funcionamiento de la polimerasa es necesario añadir un tampón de la polimerasa y MgCl<sub>2</sub> como cofactor de la enzima.

La reacción se puso generalmente en un volumen final de 50 µl y los diferentes reactivos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: tampón de la polimerasa 1X (5 µl de *stock* 10X), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (4 µl de *stock* 50 mM), dNTPs 0,4 µM (2 µl de *stock* 2,5 mM), oligonucleótidos directo y reverso, cada uno 0,4 mM (10 µl de *stock* 2 µM), DNA 2,5 ng/µl (5 µl de *stock* 25 ng/µl) y DNA polimerasa 1 unidad (1 µl). Cuando se requería un incremento en la fidelidad de copia, se añadió 0,5 µl de *Pfu* polimerasa (2-3 unidades/µl). El volumen, hasta 50 µl, se completó con H<sub>2</sub>O MilliQ. En ocasiones fue necesario modificar la concentración de alguno de los reactivos o añadir algún otro (DMSO para prevenir, por ejemplo, la formación de estructuras secundarias).

Las PCR se llevaron a cabo en termocicladores *Amp PCR Sistema 2400* de Perkin Elmer, en el modelo *2720* de Applied Biosystems y en el *MJ mini Gradient* de Bio-Rad.

Las condiciones (temperatura y tiempo) a las que se llevaron a cabo las distintas etapas de la reacción fueron las siguientes:

- Una desnaturalización inicial del DNA molde a 95 °C durante 2 minutos.
- A continuación se repitieron 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos; anillamiento de los oligonucleótidos a una temperatura que dependió de la longitud y composición de bases nitrogenadas de los propios oligonucleótidos, y generalmente durante 10 segundos; y extensión llevada a cabo habitualmente a 72 °C (temperatura óptima de la *Taq* polimerasa) durante un tiempo que varió en función de la longitud del fragmento de DNA a amplificar. Cabe señalar que la *Taq* polimerasa es capaz de amplificar 1 Kb de DNA por minuto.
- Finalmente, después de los 35 ciclos, se mantuvo la reacción a 72 °C durante el tiempo necesario para que se completasen las carreras de amplificación (tiempo necesario para una carrera adicional).

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
<b>Ppha5</b>	5' CCTGGAATACCTGGTACCGCTGTGCCTGC 3'
<b>CIXba</b>	5' GCGTTCGACTCTGTCTAGAAAAAAGTGCCGTGGC 3'
<b>CIBHI</b>	5' GTGCGCTTGTCACAGGATCCGGTACTCGTCTCAG 3'
<b>5B21</b>	5' GGCGCCGACCAATACCTTGCCAAACCC 3'
<b>5B22</b>	5'CCCGCTGGCCTGGCAGGAAAACGC 3'
<b>5B24</b>	5'CGCCAAAAGGTGCCGTGCCGTGCCGTGTGC 3'

<b>UCIintR</b>	5' GCCTTCCAGCACGCCAGCC 3'
<b>PhaKT9</b>	5' AGCATCCTCAACCCGCCGGGC 3'
<b>PhaKT14</b>	5' CACCCGCCCAACTGCCCGCC 3'
<b>UphaC2</b>	5' TGCACAAGATCCACCAGCCAACGC 3'
<b>C25</b>	5' CGGGTAAGACGAGGGAGTGTTGC 3'
<b>C23</b>	5' GGCGCATTCGAGGATACGGTC 3'
<b>UC2intF2</b>	5' GCCCTACCAGCCCAACCCTCG 3'
<b>UC2intR2</b>	5' TGAAAAAGTCCAGCAAGTCCCCG 3'
<b>Pol2F</b>	5' CCAACAGCGGGCACATCCAGAGCATCATC 3'
<b>phaF33</b>	5' CGAAGAAACCTGCGGTGAAGAAAGC 3'
<b>phaDa</b>	5' GCAGGCCTACCCCTCCAGATAGCGCACCGCC 3'
<b>phaKT17</b>	5' GACGCTGCTGTTCTCGCTGGATTACC 3'
<b>PhaIXbaI</b>	5' CTTGCGGTATATAGATGCGACAACGACGACC 3'
<b>FMR</b>	5' TCTGGCGTGAAGGACCTTGCGATGGGC 3'
<b>PhaF52</b>	5' GACAAAGAGCTCGATGCCGCCAACCACCAG 3'
<b>phaKT19</b>	5' GCGGCGCTTAGTTGCACACGTTCC 3'
<b>phaKT2</b>	5' GTCGGCAGAACCCACGCAGCACC 3'
<b>phaKT7</b>	5' TTCCAGGTCCGGGTCAAGTGCATCG 3'
<b>DOC21phaD3</b>	5' GTTTCTCTTTCAGGATCTGTCTGAACC 3'
<b>DOC21phaF3</b>	5' CCAAACCAGCAGCAGCGAAAAAGCC 3'
<b>fadBA5'BHI</b>	5' GGATCCGCGTGTACAGTTCAGCTTCCATATCG 3'
<b>fadBA3'XbaI</b>	5' TCTAGATCAGACGCGTTCAAAGACAGTGG 3'
<b>NfadBA1</b>	5' GCGAACGCAAGCCGAACAGGTCC 3'
<b>NfadBA2</b>	5' CGGTGGTCGCCCCTGAGCTGCTGC 3'
<b>NfadBA3</b>	5' CGAGTCGATGTAACGCAGCGCACACCACC 3'
<b>NfadBA4</b>	5' GAAGGCCAGGTGAAGGACGATG 3'
<b>NB4</b>	5' CCCTGAACGAGCTGCGCCAGGCCG 3'
<b>NB1BHI</b>	5' TTCTGGATCCTCTTGATTGCTTCGACCGGGGCTG 3'
<b>NA1</b>	5' CGCGCCCCGGAGCAACCAAACGG 3'
<b>NA3BHI</b>	5' TGATGGATCCCGTAGACCCCAACCCGCACCTGTCC 3'
<b>UftsZ1</b>	5' CGATGGAAAAAGAACTGGGCGTGTGCC 3'
<b>UDisFtsZ1</b>	5' TCTGCGCCAACACCGATGCC 3'
<b>UDisFtsZ4</b>	5' CGCCATACCCATTTACCCATCACG 3'
<b>F24</b>	5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3'

---

<b>R24</b>	5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA 3'
<b>F17</b>	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
<b>R19</b>	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

### 5.11. Análisis de las secuencias de DNA y de aminoácidos

Las secuencias de genes que ya han sido descritos se obtuvieron consultando la base de datos GenBank (*National Center for Biotechnology Information*), como la del *cluster pha* de *P. putida* U y *P. putida* KT2440 para el diseño de oligonucleótidos con los que secuenciar el *cluster pha* de *P. putida* N.

La secuenciación de los fragmentos de DNA, clonados o como productos de PCR, fue realizada por la empresa Secugen, S.L. (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España).

Las secuencias obtenidas experimentalmente se visualizaron con el programa Finch TV y fueron comparadas frente a las secuencias depositadas en las bases de datos de secuencias genéticas públicas de GenBank (Benson *et al.*, 2000), EMBL/EBI *Nucleotide Sequence Database* (Stoesser *et al.*, 2001), utilizando los programas BLASTP, BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Los alineamientos múltiples, entre dos o más secuencias, se realizaron con la herramientas proporcionadas por BLASTN y BLASTP, y el programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011).

Por su parte, las secuencias proteicas que codificaban los fragmentos de DNA y el peso molecular de las mismas, se obtuvieron con la herramienta ExPASy del Instituto de Bioinformática de Suiza.

## 6. Obtención de cepas mutantes de *Pseudomonas putida*

### 6.1. Transferencia de plásmidos por conjugación

La transformación de *Pseudomonas* se realizó mediante conjugación bacteriana. De este modo se introdujeron en las estirpes N y U los plásmidos, bien para la expresión de uno o más gen/es en *trans* (pBBR1MCS-3) o para la integración en el genoma de los plásmidos correspondientes (pK18::*mob* o pJQ200KS).

El plásmido que contiene el gen de interés se transfiere por conjugación triparental (Kessler *et al.*, 1992) a las cepas de *Pseudomonas putida* N o U correspondientes según el experimento. La cepa donadora en la conjugación fue *E. coli* DH10B previamente transformada con la construcción correspondiente. Es necesario, además, el concurso de la cepa *E. coli* HB101 que porta el plásmido pRK600 para facilitar la movilización de aquellos plásmidos que contengan los genes *mob* (Kessler *et al.*, 1992).

Cada una de las tres cepas se incubó en medio LB líquido, suplementado con el antibiótico correspondiente, hasta que alcanzan una  $Abs_{540}$  de 1,5-2. La conjugación triparental se lleva a cabo mezclando cada una de estas tres cepas en una proporción 1:1:1 en un tubo Eppendorf estéril. Se centrifugó la mezcla de bacterias (6.000 rpm, 1 minuto) y se desechó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados de las células con 0,5 ml de medio LB estéril, centrifugando la suspensión celular a 6.000 rpm durante 1 minuto después de cada lavado. Finalmente, se resuspendió el precipitado celular en 50  $\mu$ l de medio LB líquido, que se dispone en una gota sobre un filtro bacteriológico (Millipore) de nitrocelulosa en una placa de LB sólido. La placa se incubó durante 12 h a 30 °C para permitir que la conjugación tenga lugar.

Tras este tiempo de incubación, se llevó a cabo la selección de los conjugantes utilizando los marcadores de resistencia a antibióticos del plásmido y de la cepa receptora. Así, se resuspendieron las bacterias presentes en el filtro en 2 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril y se sembraron diluciones de la suspensión bacteriana en placas de medio mínimo con ácido 4-hidroxifenilacético suplementadas con los antibióticos correspondientes.

Una vez que se obtuvieron los transconjugantes, se comprobó la integridad de la secuencia por secuenciación, ya sea a partir del plásmido (expresión en *trans*) o del producto de PCR (integración del plásmido en el genoma bacteriano).

## **6.2. Construcción del vector de expresión con el gen de interés**

El gen de interés se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos específicos correspondientes. Así, se emplearon los pares de oligonucleótidos CIBHI/CIXba y C23/C25 para amplificar los genes *phaC1*, *phaC1*<sup>\*</sup> y *phaC2*.

Se ligó el producto de amplificación en un plásmido comercial para la clonación de productos de PCR (pGEM-T Easy o pTZ57R/T), y se subclonó en el plásmido pBBR1MCS-3. Es importante que la orientación del inserto sea la adecuada, para lo que se seleccionan pares

de enzimas que permitan mantener una orientación adecuada para que la expresión tenga lugar bajo el control del promotor del plásmido. Se transforma la cepa *E. coli* DH10B con este plásmido.

Posteriormente, se transfirió la construcción a la cepa de *Pseudomonas* correspondiente mediante una conjugación triparental y se seleccionaron los transconjugantes con los marcadores de selección de la cepa y del plásmido.

### **6.3. Mutantes obtenidos por integración del plásmido pK18::*mob* en el genoma de *Pseudomonas***

Tal y como se indicaba en el apartado 2, el plásmido pK18::*mob* no es replicativo en *Pseudomonas*. Esta característica posibilita la disrupción o duplicación de uno o varios genes cuando se introduce el plásmido en *P. putida*, y, posteriormente, se somete a la bacteria a la presión selectiva que el plásmido adquirido permite salvar. Esta estrategia se utilizó para duplicar el *cluster pha* en el genoma de *P. putida* N, empleando la construcción obtenida por García y colaboradores (García *et al.*, 2004) y realizando una conjugación triparental con *P. putida* N como cepa receptora.

Por otro lado, se utilizó este plásmido para interrumpir el gen *phaF* y el gen *ftsZ* en los respectivos experimentos. En el caso de la construcción pK18*phaF*, se digirió el gen con las enzimas PstI y SalI obteniendo un fragmento interno de 307 pb que se clonó utilizando los mismos cortes en pK18::*mob*. En el caso de la construcción pK18*ftsZ* se amplificó un fragmento de 552 pb de dicho gen con los oligonucleótidos UDisrFtsZ1 y UDisrFtsZ4, se clonó en el plásmido pTZ57R/T el producto de PCR, y posteriormente se subclonó en el plásmido pK18::*mob* sobre los cortes de restricción EcoRI y BamHI.

Las construcciones se transfirieron por conjugación triparental a las cepas receptoras (*P. putida* U y *P. putida* N). La correcta integración del plásmido en los conjugantes se comprobó por PCR y posterior secuenciación del fragmento correspondiente.

### **6.4. Obtención de mutantes mediante delección**

La obtención del mutante superproductor *P. putida*  $\Delta$ *fadBA* se llevó a cabo mediante delección de los genes *fadBA*. El protocolo para eliminar un fragmento de DNA genómico se basa en la integración de un plásmido en el genoma a través de una primera recombinación homóloga, y en la eliminación del fragmento de interés a través de una segunda recombinación

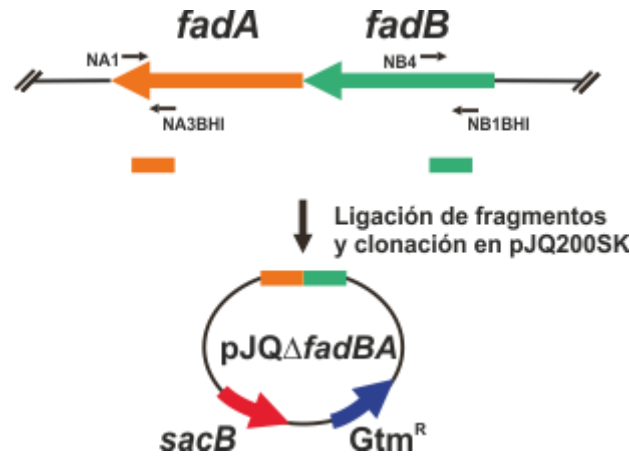
homóloga, mediada por un gen letal presente en el plásmido integrativo pJQ200KS (Donnenberg y Kaper, 1991; Hmelo *et al.*, 2015; Quandt y Hynes, 1993).

**Procedimiento:**

1. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos: Un par en la zona inmediatamente anterior al fragmento que se desea delecionar, que amplifique aproximadamente 650 pb; otro par en la zona inmediatamente posterior, que comprenda un tamaño similar al primer par; y un tercero que amplifique desde la zona anterior al primer fragmento hasta la zona posterior al segundo fragmento. Este último par se utilizó para comprobar que la delección había tenido lugar.

En el oligonucleótido reverso del primer par y en el directo del segundo par se incluyó un corte de restricción BamHI, gracias al cual se pueden ligar ambos fragmentos para obtener la construcción de delección.

2. Se amplificaron ambos fragmentos por PCR con los pares de oligonucleótidos correspondientes. Se separaron los fragmentos en un gel de agarosa, se cortaron del gel y se purifican con un *kit* comercial. Los fragmentos resultantes se digirieron con BamHI; se purificaron (eliminación de los restos de agarosa), y se ligaron a 16 °C. El producto de dicha ligación se amplificó mediante PCR con el oligonucleótido directo de un fragmento y el reverso del otro fragmento, de tal manera que se amplificó la ligación de los dos fragmentos y se ligó a su vez en el plásmido pGEM-T Easy.
3. La ligación de los fragmentos en pGEM-T Easy se utilizó para transformar *E. coli* DH10B, y se comprobó que el plásmido de clonación poseía la construcción con los dos fragmentos de 650 pb unidos. A continuación, esta construcción se clonó en el plásmido pJQ200KS mediante el corte de restricción NotI situado en los sitios múltiples de clonación de ambos plásmidos.

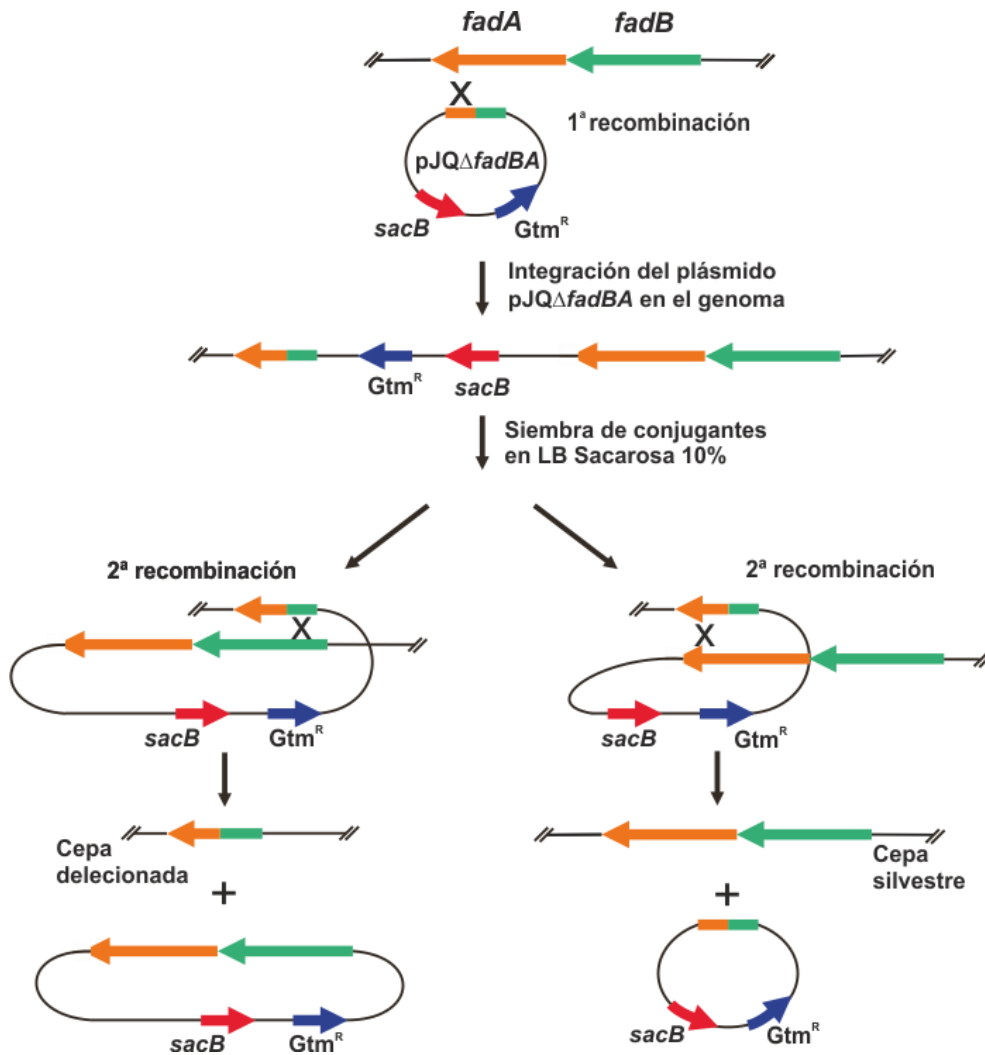


**Figura 21.** Diseño seguido para la obtención de la construcción de deleción pJQΔ*fadBA*. Se amplifican dos fragmentos de un tamaño similar situados en los extremos de la zona a deleccionar y se clonan en el plásmido pJQ200SK con los dos marcadores de selección (*sacB* y *Gtm<sup>R</sup>*).

4. El plásmido pJQ200KS con los dos fragmentos se transfirió a *P. putida* N mediante una conjugación triparental. Puesto que este plásmido no es replicativo en *Pseudomonas*, y la selección se realiza en un medio con ampicilina y gentamicina (marcador de selección del plásmido), se seleccionarán aquellos conjugantes que integren en su genoma el plásmido por recombinación homóloga (llevada a cabo entre uno de los fragmentos de la construcción y el propio genoma).
5. Las colonias de *Pseudomonas* con el plásmido integrado así obtenidas, se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ. A partir de estas suspensiones celulares, se sembraron alícuotas de 200 μl en medio LB sólido suplementado con ampicilina (resistencia natural de la bacteria) y sacarosa al 10%. Los conjugantes sembrados en este medio, no serán capaces de crecer si tienen integrado el plásmido, ya que el gen letal *sacB* que poseen permite la conversión de la sacarosa en levanos, letales en esta bacteria gram negativa al acumularse en el espacio periplásmico. De este modo, sólo serán capaces de crecer aquellas bacterias que sufran una recombinación homóloga a través del segundo fragmento clonado en el plásmido, que permita la expulsión y eliminación del plásmido. Dicha segunda recombinación eliminará el DNA presente entre los dos fragmentos clonados en la construcción, llevando a cabo la deleción del gen de interés.
6. Los mutantes obtenidos, se sometieron a amplificaciones por PCR para comprobar que la deleción había tenido lugar. La PCR se llevó a cabo con los oligonucleótidos



diseñados en las regiones externas a los fragmentos utilizados para la delección y al gen a deleccionar, verificando así que el gen de interés se había eliminado.



**Figura 22.** Representación esquemática del proceso de delección.

## 7. Métodos generales para el estudio de polihidroxicanoatos y de sus derivados

### 7.1. Tinción de las muestras

#### Reactivos:

- Fucsina Gram: fucsina básica, 0,1 g; fenol (5%), 10 ml; etanol, 1 ml y agua destilada, 100 ml.

**Procedimiento:**

El seguimiento del acúmulo de PHAs se realizó cualitativamente mediante la tinción de las bacterias en crecimiento con fucsina Gram, y su observación posterior al microscopio óptico. Se tomaron 10 µl de la suspensión celular, en el caso de cultivos líquidos, y se extendieron sobre un portaobjetos. Para la tinción de muestras procedentes de cultivos sólidos, se dispuso sobre el portaobjetos una gota de 10 µl de agua destilada; con un palillo estéril se rascó una pequeña cantidad de masa celular del cultivo, y se extendió a lo largo del portaobjetos sobre la gota de H<sub>2</sub>O. Se añadió fucsina Gram sobre la superficie del portaobjetos, hasta saturar la misma. Al cabo de 2 minutos se lavó el portaobjetos eliminando cuidadosamente el exceso de fucsina y se dejó secar al aire. La observación de las muestras se realizó con un microscopio óptico. Los gránulos hidrofóbicos de PHA no se tiñen con la fucsina, y se observan como zonas claras (blanquecinas) en el interior de la célula, teñida con fucsina (coloración rosácea).

**7.2. Extracción de los polímeros**

La extracción y posterior cuantificación de los PHAs acumulados por las cepas de *Pseudomonas putida* durante el crecimiento celular y bajo distintas condiciones de cultivo se llevó a cabo utilizando solventes orgánicos (cloroformo y metanol) tal y como describieron Lageveen y colaboradores (Lageveen *et al.*, 1988b):

1. Con carácter general, el cultivo bacteriano se prolongó hasta que las células alcanzaron un acúmulo elevado de PHAs. Este momento coincide con el punto en el que finaliza la fase exponencial y comienza la fase estacionaria de crecimiento. Por ello, se realizó un seguimiento del cultivo midiendo la Abs<sub>540</sub>, y una vez alcanzada la fase estacionaria (no se detectaba incremento de la absorbancia), se recogieron las células. La recolección se llevó a cabo mediante centrifugación a 4 °C y 14.000 rpm durante 15 minutos.
2. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado celular se congeló a -80 °C.
3. Las células se liofilizaron.
4. Se pesaron las células liofilizadas para obtener el valor correspondiente del peso seco, y se trituraron en un mortero de porcelana, pulverizando homogéneamente la muestra.

5. El pulverizado celular se depositó en un matraz de fondo redondo, y se añadieron 100 ml de cloroformo por cada gramo de peso seco de bacterias. La extracción del polímero plástico se llevó a cabo en un sistema de reflujo, durante 3-4 h. El cloroformo en ebullición perfora las bacterias y disuelve los PHAs acumulados.
6. Una vez frío el matraz, se filtró el contenido del mismo a otro matraz de fondo redondo, utilizando papel de filtro y un embudo de cristal, para eliminar los restos celulares.
7. El filtrado, cloroformo en el que se encontraban disueltos los PHAs, se concentra en un rotavapor, evaporando paulatinamente el solvente. Una vez evaporado todo el cloroformo, se resuspendió el residuo obtenido en el mínimo volumen posible de cloroformo. A continuación, se sumergió el matraz en hielo y se añadieron 10 volúmenes de metanol por cada volumen de cloroformo empleado para resuspender el residuo. De este modo, se precipitan en frío únicamente los PHAs, que se expulsan de la disolución y quedan pegados en las paredes del matraz. Otros lípidos que pudieran estar presentes en el residuo permanecen disueltos. Los solventes (cloroformo y metanol) se eliminan volcando el matraz cuidadosamente.
8. El polímero que queda pegado en el matraz se disuelve completamente en cloroformo, y esta disolución se depositó en una placa Petri de cristal previamente tarada. El cloroformo se evapora en una estufa a 80 °C. Una vez que la placa está completamente seca, se vuelve a pesar la placa. La lámina de PHA se extrae fácilmente con una espátula.
9. El rendimiento obtenido se calcula dividiendo la diferencia entre el peso de la placa con y sin PHA entre el peso del liofilizado celular y multiplicando el valor resultante por 100.

$$[(\text{peso placa con PHAs} - \text{peso placa}) / \text{peso seco de bacterias}] \times 100$$

## **8. Microscopía electrónica**

Las células crecidas en medios sólidos o líquidos se recogieron para su posterior procesamiento, visualización y análisis por microscopía electrónica de transmisión y/o barrido. Las suspensiones celulares se centrifugaron generalmente a 12.000 rpm durante 2 min. En el caso de algunas muestras sensibles, la centrifugación se llevó a cabo a menos rpm (5.000 rpm) para

preservar su integridad. Se eliminó el sobrenadante, y las células precipitadas se resuspendieron en glutaraldehído 2,5% en tampón PBS 0,1 M para su fijación (durante 2 h a 4 °C).

### **8.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

La preparación de las muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión requiere diferentes etapas que conllevan lavados, fijación, deshidratación e inclusión en resina:

1. Las células fijadas en glutaraldehído se lavan con PBS 0,1 M tres veces. La suspensión celular se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 min, se cambia el PBS y se resuspende de nuevo el precipitado celular. Antes de cada repetición del lavado, se deja resuspendido durante 10 min.
2. Se lleva a cabo una post-fijación de la muestra en tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) (1%) en PBS, durante 2 h en oscuridad (se recubre el tubo con papel de aluminio) y a temperatura ambiente.
3. Se repiten tres lavados en PBS 0,1 M (igual que en el paso 1).
4. Las células precipitadas se incluyeron en agar al 2% en PBS, de tal modo que se continúa el procesado sin recurrir a continuas centrifugaciones. Una vez que ha solidificado, la muestra se corta en cubos de aproximadamente 2 mm de lado.
5. La muestra se deshidrata en una serie creciente de etanol: 50°, 70°, 90°, 96° y absoluto. Cada lavado se realiza una vez durante 30 min, salvo las deshidrataciones en etanol 96° y absoluto, que se repiten 3 veces cada una. Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.
6. Posteriormente, se llevan a cabo tres lavados de 1 h de duración con óxido de propileno a temperatura ambiente.
7. El proceso prosigue con la inclusión de la muestra en una resina tipo epoxi, EMBED-812:
  - Se realiza una primera infiltración en óxido de propileno: resina, en proporción 1:1, en la que permanecerá la muestra 12-24 h a temperatura ambiente.

- A continuación, se infiltra la muestra en resina pura, 12-24 h a temperatura ambiente.
  - Finalmente, se encapsula la muestra con resina pura y se etiqueta adecuadamente. La polimerización se lleva a cabo a 60 °C durante 24 h.
8. A partir de los bloques de resina con la muestra se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm y ultrafinos de 80-100 nm de grosor con un ultramicrotomo LKB V, los cuales se tiñeron con azul de toluidina 1% (p/v) sobre un portaobjetos. Con el ultramicrotomo se obtuvieron cortes ultrafinos de 80-100 nm de grosor. Los cortes se recogieron sobre rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y se contrastaron siguiendo el método de doble tinción con acetato de uranilo al 2% (p/v) (20 min) y citrato de plomo (3 min). Las rejillas con las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010, con el que se realizaron las microfotografías correspondientes.

## **8.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Los primeros tres pasos del procesado para preparación de la muestra para microscopía electrónica de barrido coinciden con los del procesado para TEM: se llevan a cabo, así, tres lavados con PBS, fijación en OsO<sub>4</sub> y se repiten otros tres lavados con PBS.

- 1-3. Igual que en el protocolo TEM.
4. Con ayuda de una jeringa, se filtra la suspensión bacteriana, de tal modo que las células quedan adheridas a la superficie de un filtro Millipore, con un diámetro de poro de 0,22 µm.
5. El filtro con las bacterias se retira e inmediatamente a continuación se coloca en una placa Petri con tampón PBS 0,1 M, para evitar su desecación.
6. Se deshidrató la muestra en un gradiente creciente de etanol (50°, 70°, 96° y absoluto), pasando el filtro por cada placa de Petri con el debido cuidado para no eliminar la muestra adherida sobre él.
7. La muestra se lava tres veces con isoamilacetato.
8. Se seca la muestra en un desecador de punto crítico Balzers CPD10.

9. El filtro desecado, se recortó y se colocó sobre el portamuestras metálico del microscopio electrónico de barrido, empleando para ello una cinta de carbono conductora.
10. La muestra se recubre metálicamente con un metalizador Balzers SCD 004.
11. Se observó la muestra en microscopio electrónico de barrido JEOL SSM-6.100, con el que se realizaron las microfotografías de barrido.

## **9. Modelado de proteínas**

La estructura tridimensional de PhaC1 y PhaC2 se estableció utilizando el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>)(Kelley *et al.*, 2015), basándose en la homología de sus secuencias con distintas  $\alpha/\beta$  hidrolasas. En el caso de PhaC1, se utilizó como modelo la lipasa gástrica humana (código del Protein Data Bank 1hlg), mientras que en el caso de PhaC2 se tomó una esterasa de *Sulfolobus sulfataricus* como referencia (código Protein Data Bank 2rau), dada su mayor similitud con ella. De este modo se modelaron con más de un 90% de exactitud los residuos 201-530 de ambas polimerasas. Debido a la falta de secuencias homólogas adecuadas la estructura correspondiente a los residuos 1-200 y 530-558 no se pudo establecer.

Las predicciones sobre las posibles interacciones homodiméricas entre PhaC1 y PhaC2, y la formación de complejos heterodiméricos entre ambas proteínas se llevaron a cabo con la herramienta bioinformática ZDOCK 3.0.2. (<http://www.zdock.umassmed.edu>) (Pierce *et al.*, 2014).

## **Resultados y Discusión**





En los últimos años, la Biología Sintética ha alcanzado una gran relevancia en la comunidad científica, y son muchos los grupos de investigación que trabajan en ese ámbito. La posibilidad de diseñar y construir microorganismos de forma totalmente dirigida es muy atractiva y, además, puede proporcionar herramientas muy útiles para la industria. Sin embargo, todavía falta un gran camino por recorrer, ya que la expresión y regulación génica es compleja y las redes metabólicas son intrincadas. Como se podrá observar en los próximos apartados, la modificación genética mediante la expresión en *trans* o la supresión de genes específicos puede desestabilizar la fisiología celular, alterando parámetros que, como la morfología o la capacidad para producir PHAs, no se contemplaban inicialmente. Por ello, es necesario adquirir toda la información posible acerca de la relación existente entre el genoma, la expresión del mismo y el metaboloma resultante, elementos que determinan, en buena medida, la viabilidad y la supervivencia de los microorganismos. Una vez conocidos todos esos parámetros podremos tratar de diseñar con garantías de éxito, y de forma totalmente racional, biofactorías sintéticas.

El papel de los PHAs en la obtención de energía para la célula, en la morfología o en el proceso de división celular señala que tanto su ruta biosintética como la que permite su movilización se encuentran conectadas y coordinadas con procesos fisiológicos relevantes, tales como aquellos implicados en el control del tamaño y del volumen celular.

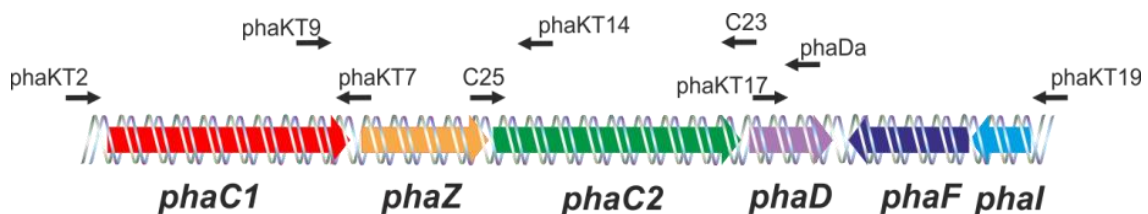
Dado el interés de estos biopolímeros (PHAs) y sus posibles implicaciones funcionales, esta tesis doctoral ha abordado el estudio de la producción de esos compuestos, tratando de analizar aspectos que, como la regulación de la producción o su influencia sobre el control del tamaño celular, aún no habían sido esclarecidos.

## 1. Estudio comparativo del *cluster pha* en distintas estirpes de *Pseudomonas putida*

El *cluster pha* de *Pseudomonas putida* contiene todos los genes necesarios para la biosíntesis de polihidroxicanoatos de cadena media (mcl-PHA) (Sandoval *et al.*, 2007). Tal y como se indicaba en la *Introducción*, existen distintas agrupaciones de genes que conducen a la síntesis de PHAs, siendo la correspondiente a los mcl-PHAs característica de los pseudomonádidos (Steinbüchel y Hein, 2001).

Actualmente, se encuentran disponibles en las bases de datos varias secuencias completas de este *cluster* pertenecientes a distintas bacterias (GenBank, del NCBI), y su número se amplía continuamente. Durante la realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo la secuenciación de los *clusters pha* de *Pseudomonas putida* N y de *Pseudomonas putida* DOC21, y se ha comparado con la secuencia de *Pseudomonas putida* U (estirpe modelo utilizada por nuestro grupo de investigación) y con las de otras estirpes disponibles en las diferentes bases de datos públicas.

La secuenciación del *cluster pha* de *P. putida* N se llevó a cabo tras la amplificación por PCR del mismo, utilizando oligonucleótidos diseñados sobre las correspondientes secuencias de las cepas *P. putida* U y *P. putida* KT2440 (Materiales y Métodos, Tabla 5, oligonucleótidos phaKT2, phaKT7, phaKT9, phaKT14, C25, C23, phaDa, phaKT17, phaKT19). En el caso de *P. putida* DOC21, las PCRs se llevaron a cabo para ensamblar el *cluster pha*. Su secuencia estaba dividida en varios de los *contigs* que habían sido obtenidos tras la secuenciación masiva de su genoma mediante las tecnologías *pirosecuenciación 454* (Roche) e *Illumina*. Una vez obtenidas las secuencias se procedió a su respectiva comparación.



**Figura 23.** Representación esquemática de la posición en la que se ubican los oligonucleótidos empleados en la secuenciación del *cluster pha* de *P. putida* N.

Tanto en el caso de *P. putida* N como en el de *P. putida* DOC21 la organización en genes y la sintenia de los mismos en los *loci pha* es similar a la descrita en *P. putida* U y en otras cepas de *Pseudomonas putida* (Sandoval, 2005). Estos *loci* están constituidos por seis

genes; los cuatro primeros, *phaC1ZC2D*, codifican, de acuerdo a su homología con aquellos que se encuentran descritos en la base de datos, dos polimerasas (PhaC1 y PhaC2), una despolimerasa (PhaZ), y un regulador transcripcional (PhaD). Los dos restantes, *phaIF*, se encuentran separados por una secuencia intergénica, expresándose en sentido contrario a los genes anteriores, y guardan una similitud muy elevada con los ya conocidos para las fasinas presentes en los gránulos de mcl-PHAs (*phaI* y *phaF*).

La secuencia intergénica, que actúa como espaciador entre las unidades *phaC1ZC2D* y *phaIF*, es una secuencia no codificante de 111 pares de bases nucleotídicas (pb) en el caso de *P. putida* N y de 282 pb en el caso de *P. putida* DOC21. Sin embargo, teniendo en cuenta la disposición común que ocupa esta secuencia, separando los genes que codifican las fasinas del resto del *cluster* en muchas de las especies que poseen esta agrupación génica, no se puede descartar que juegue algún papel importante en la expresión de todos esos genes.

La disposición de un fragmento de DNA entre *phaD* y *phaF* es típica de este *loci*, y dicha región suele albergar una secuencia palindrómica extragénica y repetitiva (REP) (de Eugenio *et al.*, 2007; Huisman *et al.*, 1991). Se desconoce la función exacta que esta estructura podría llevar a cabo en esta posición. Las secuencias REP se han identificado en gran número a lo largo de todos los genomas de los integrantes del género *Pseudomonas*, y se ha sugerido que desempeñan varios papeles. Así, se ha propuesto que podrían actuar como puntos de inserción génica, de anclaje para las topoisomerasas durante la transcripción simultánea de dos operones enfrentados, o como reguladores de la transcripción cuando se sitúan a 15 nucleótidos o menos de un codón de terminación (Aranda-Olmedo *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2015; Nunvar *et al.*, 2013).

En el caso de *P. putida* N la secuencia REP identificada es la siguiente:

```

                REP                                REP                                -----15pb-----
CCGACGCATTTCGCGGGTAAACCCGCTCCTACAAGGTTTGGCGCAAATTGTAGGAGCGGGTTTACCCGCGAAAGAGGCGACGCGGTATCAGATCA
GGCTGCGTAAGCGCCCATTTGGCGGAGGATGTTCCAAACCGCGTTGAACATCCTCGCCCAAATGGGCGCTTCTTCGCTGCGCCATAGTCTAGT
                                                                phaF ←-
    
```

En *P. putida* DOC21 la secuencia intergénica posee una mayor longitud y presenta dos secuencias REP:

```

-----REP1-----
CCGGCCGGGTGCGTAATACTGGGGCCGCTCGCAACCCTTCGCGGGCAAGCCCGCTCCTACGGACTATCCGCCCATAGGAGCGGGTTAGCCGC
GGCCGGCCACAGGCATTATGACCCCGGCGAGCGTTGGGAAGCGCCCGTTCGGGCGAGGATGCCTGATAGCGGGTATCCTCGCCGAAATCGGCC
-----REP1-----
GAACGCGACCACTTAAGCGGCTGCGTTCGCGGCTGAAGCCGCTCCTACGGAGGGCGTGTGGGAGCTGGCTTGCCAGCGAAGGGCCGCAAAGCGG
CTTGCGCTGGTGAATTCGCCGACGCAAGCGCCGACTTCGGCGAGGATGCCTCCCGCACACCCTCGACCGAACGGTCGCTTCCCGGCGTTTCGCC
    
```

```

-----
                REP2                REP2                -----15pb-----
CCCCAAGAGCTTGAGTGAACAGCAGAACGCCCGGGTGC CGGGCGTTTGTCTGCAGCCGCCTGAGGTCAGGTATGGCTGGTTGGCGTTACCGG
GGGGTTCTCGAACTCACTTGTCTGCTTTGCGGGCCACAGGCCCGCAAAACGAACGTCGGCGGACTCCAGTCCATACCGACCAACCGCAATGGCC
                phaF ←-
    
```

```

TGCCGATGG
ACGGCTACC
    
```

En el caso de *P. putida* DOC21, las secuencias REP no son continuas, sino que se encuentran intercaladas por pares de bases que no están perfectamente conservadas en la secuencia REP. En cualquier caso, la secuencia palindrómica es evidente y la probabilidad de formación de estructuras secundarias muy elevada. La secuencia REP2 es mucho más pequeña y estaría integrada por 13 nucleótidos, lo que disminuye notablemente la estabilidad de la posible estructura secundaria.

La búsqueda de REPs en la secuencia intergénica del *cluster pha* de otras estirpes tales como *P. putida* U o *P. putida* KT2440 también dio lugar a la identificación de estas secuencias.

En *P. putida* U la secuencia intergénica tiene una longitud de 121 nucleótidos y su correspondiente REP consta de 25 nucleótidos, interrumpida por 2 bases que no forman parte del palíndromo:

```

                REP                REP
TGCGGTGTCGGCGCTGGGGCCTTCGCGGCATGCCCGCTCCACAGGGCCTGCGCTGACCTGCTGATCGGCGCTGTACCTGTGGAAGCGGGCAA
ACGCCACAGCCGCGACCCCGGAAGCGCCGTACGGGCGAGGGTGTCCCGGACGCGACTGGACGACTAGCCGCGACATGGACACCTTCGCCCGTT
-----14pb-----
GCCGCGAAGAAGACGACGCGGTATCAGATCAGGGTACCGGTG
CGGGCGCTTCTTCTGCTGCGCCATAGTCTAGTCCCATGGCCAC
    
```

La secuencia intergénica de *P. putida* KT2440 tiene 111 pb, al igual que la de *P. putida* N, y su REP es idéntica a la de ésta (de Eugenio *et al.*, 2010b):

```

                REP                REP                -
TGCTGGAGATGTAGTGTTCAGCCGACGCAATTCGCGGGTAAACCCGCTCCTACAAGGTTTGGCGCATCTTGTAGGAGCGGGTTTACCCGCGAAG
ACGACCTCTACATCACAAACGTCGGCTGCGTAAGCGCCCATTTGGGCGAGGATGTTCAAACCGCGTAGAACATCCTCGCCCAAATGGGCGCTTC
-----15pb-----
AAGGCGACGCGGTATCAGATCAGGGTAC
TTCCGCTGCGCCATAGTCTAGTCCCATG
    
```

Tal y como describen Aranda-Olmedo y colaboradores (Aranda-Olmedo *et al.*, 2002), las REP de *P. putida* KT2440, y por tanto de *P. putida* N y de *P. putida* U, tienen un núcleo común, o muy conservado, que se encuentra repetido un gran número de veces a lo largo del genoma de *Pseudomonas*. Sin embargo, la conservación en *P. putida* DOC21 es más laxa, manteniéndose sólo algunos nucleótidos comunes a los encontrados en las secuencias de otras *Pseudomonas*.

## Resultados y Discusión

*P. putida* U CTTTCGCGGGCATGCCCGCTCCCACAGG

*P. putida* N ATTTCGCGGGTAAACCCGCTCCTACAAG

Las secuencias completas del *cluster pha* de *P. putida* N y de *P. putida* DOC21, con las respectivas secuencias proteicas que codifican, se muestran a continuación.

Secuencia de nucleótidos que integra el *cluster pha* de *P. putida* N, y la correspondiente traducción como secuencia de aminoácidos:

```
1 GCTGTTCCCTTATCACTGGTCACCCGAGTAGCAGTACCGGGCTCAGGGCTGTGCACCCACC 60
  CGACAAGGAATAGTGACCAGTGGGCTCATCGTCATGGCCCGAGTCCCGACACGTGGGTGG

                                     PhaC1 ►
                                     M S N K N N D
61 ACAGCAACCGGTACTCGTCTCAGGACAACGGAGCGTCGTAGATGAGTAACAAGAACAACG 120
  TGTCGTTGGCCATGAGCAGAGTCCTGTTGCCCTCGCAGCATCTACTCATTGTTCTTGTGG

  E L Q R Q A S E N T L G L N P V I G I R
121 ATGAGCTGCAGCGGCAGGCCTCGGAAAACACCTGGGGCTGAACCCGGTCATCGGCATCC 180
  TACTCGACGTCGCCGTCGGGAGCCTTTTGTGGGACCCCGACTTGGGCCAGTAGCCGTAGG

  R K D L L S S A R T V L R Q A V R Q P L
181 GCCGCAAGGACCTGTTGAGCTCGGCACGCACCGTGTGCGCCAGGCCGTGCGCCAACCGC 240
  CGGCGTTCCCTGGACAACCTCGAGCCGTGCGTGGCAGCAGCGGTCGGCACGCGGTTGGCC

  H S A K H V A H F G L E L K N V L L G K
241 TGCACAGCGCCAAGCATGTGGCTCACTTTGGCCTGGAGCTGAAGAACGTGTTGTGTTGGGCA 300
  ACGTGTGCGGTTTCGTACACCGAGTGAAACCGGACCTCGACTTCTTGCACAACGACCCGT

  S S L A P D S D D R R F N D P A W S N N
301 AATCCAGCCTGGCCCCGGACAGCGACGACCGTTCGCTTCAATGACCCGGCCTGGAGCAACA 360
  TTAGGTCGGACCGGGCCCTGTCGCTGCTGGCAGCGAAGTTACTGGGCCGGACCTCGTTGT

  P L Y R R Y L Q T Y L A W R K E L Q D W
361 ACCCGCTGTACCGTTCGCTACCTGCAAACCTACCTGGCCTGGCGCAAGGAGCTGCAGGACT 420
  TGGGCGACATGGCAGCGATGGACGTTTGGATGGACCGGACCGGCTTCCTCGACGTCCTGA

  V S S S D L S P Q D I S R G Q F V I N L
421 GGGTGAGCAGCAGCGACCTGTCCCCCAGGACATCAGCCGCGGCCAGTTTCGTATCAACC 480
  CCCACTCGTTCGCTGACAGGGGGTCTGTAGTCGGCGCCGGTCAAGCAGTAGTTGG

  M T E A M A P T N T L S N P A A V K R F
481 TGATGACCGAGGCCATGGCGCCGACCAATACCTGTCCAACCCGGCTGCGGTCAAACGCT 540
  ACTACTGGTCCGGTACCGCGGCTGTTATGGGACAGGTTGGGCCGACCCAGTTTGCGA

  F E T G G K S L L D G L S N L A K D M V
541 TCTTCGAAACCGCGGCAAGAGCCTGCTCGATGGCCTGTCCAACCTGGCCAAGGACATGG 600
  AGAAGCTTTGGCCGCCGTTCTCGGACGAGCTACCGGACAGGTTGGACCGGTTCTGTACC

  N N G G M P S Q V N M D A F E V G K N L
601 TCAATAACGGCGGCATGCCAGCCAGGTGAACATGGATGCCCTCGAAGTGGGCAAGAACC 660
  AGTTATTGCGCCGTACGGGTCGGTCCACTTGTACCTACGGAAGCTTACCCGTTCTTGG

  G T S E G A V V Y R N D V L E L I Q Y S
661 TGGGCACCGTGAAGGCGCGGTGGTGTACCGCAACGATGTGCTGGAACCTGATCCAGTACA 720
  ACCCGTGGTCACTTCCGCGCCACCACATGGCGTTGCTACACGACCTTGACTAGGTCATGT

  P I T E Q V H A R P L L V V P P Q I N K
721 GCCCATCACCGAACAGGTGCATGCCCGCCCGCTGCTGGTGGTGGCCGCGCAGATCAACA 780
  CGGGGTAGTGGCTTGTCCACGTACGGGCGGGCAGCACCACCAGCGCGGCTCTAGTTGT
```

## Resultados y Discusión

F Y V F D L S P E K S L A R F C L R S Q  
781 AGTTCTACGTGTTTCGACCTCAGCCCGAAAAGAGCCTGGCGCGCTTCTGCCTGCGCTCGC 840  
TCAAGATGCACAAGCTGGAGTCGGGCCTTTTCTCGGACCGCGGAAGACGGACGCGAGCG

Q Q T F I I S W R N P T K A Q R E W G L  
841 AGCAGCAGACCTTCATCATCAGCTGGCGCAACCCGACCAAGGCCAGCGCGAGTGGGGCC 900  
TCGTCGTCTGGAAGTAGTAGTCGACCGCGTTGGGCTGGTTCCGGGTCGCGCTCACCCGG

S T Y I D A L K E A V D A V L A I T G S  
901 TGTCCACCTACATCGATGCGCTGAAAGAAGCCGTCGACGCGGTACTGGCGATTACCGGCA 960  
ACAGGTGGATGTAGCTACGCGACTTTCTTCGGCAGCTGCGCCATGACCGCTAATGGCCGT

K D L N M L G A C S G G I T C T A L V G  
961 GCAAGGACTTGAACATGCTCGGCGCTGCTCCGGCGGCATCACCTGTACCGCTCTGGTTCG 1020  
CGTTCCTGAACTTGTACGAGCCGCGGACGAGGCCCGCGTAGTGGACATGGCGAGACCAGC

H Y A A I G E N K V N A L T L L V S V L  
1021 GCCACTATGCCGCCATTGGTGAGAACAAGGTCAACGCCCTGACCTGTGTGGTTCAGCGTGC 1080  
CGGTGATACGGCGGTAACCACTCTTGTTCAGTTGCGGGACTGGGACGACCAGTCGCACG

D T T M D N Q V A L F V D E Q T L E A A  
1081 TGGACACCACCATGGACAACCAGGTTGCATTGTTTGTGCGACGAGCAGACCTTGGAGGCCG 1140  
ACCTGTGGTGGTACCTGTTGGTCCAACGTAACAAACAGCTGCTCGTCTGGAACCTCCGGC

K R H S Y Q A G V L E G S E M A K V F A  
1141 CCAAGCGCCACTCTTATCAGGCGGGCGTGTGGAAGGCAGCGAAATGGCCAAGGTGTTTCG 1200  
GGTTCGCGGTGAGAATAGTCCGCCCGCACGACCTTCCGTCGCTTACCAGGTTCCACAAGC

W M R P N D L I W N Y W V N N Y L L G N  
1201 CCTGGATGCGCCCAACGACCTGATCTGGAATTACTGGGTTAACAACCTGCTGCGGCA 1260  
GGACCTACGCGGGTTGCTGGACTAGACCTTAATGACCCAATTGTTGATGGACGAGCCGT

E P P V F D I L F W N N D T T R L P A A  
1261 ATGAGCCCCCGTGTTCGACATCTGTTCTGGAACAACGACACCACGCGCCTGCCGGCCG 1320  
TACTCGGGGGGCACAAGCTGTAGGACAAGACCTTGTGCTGTGGTGC GCGGACGGCCGGC

F H G D L I E M F K S N P L T R P D A L  
1321 CCTTCCACGGCGACCTGATCGAAATGTTCAAAAAGCAACCCGCTGACCCGCCCCGATGCC 1380  
GGAAGGTGCCGCTGGACTAGCTTTACAAGTTTTTCGTTGGGCGACTGGGCGGGGCTACGGG

E V C G T A I D L K Q V K C D I Y S L A  
1381 TGGAAAGTGTGCGGCACCGCGATCGACCTGAAACAGGTCAAATGCGACATCTACAGCCTCG 1440  
ACCTTACACGCGCGTGGCGCTAGCTGGACTTTGTCCAGTTTACGCTGTAGATGTCGGAGC

G T N D H I T P W P S C Y R S A H L F G  
1441 CCGGCACCAACGACCACATCACCCATGGCCGTCATGCTACCGCTCGGCACATCTGTTTCG 1500  
GGCCGTGGTTGCTGGTGTAGTGGGTACCGGCAGTACGATGGCGAGCCGTGTAGACAAGC

G K I E F V L S N S G H I Q S I L N P P  
1501 GTGGCAAGATCGAATTCGTACTGTCCAACAGCGGCATATCCAGAGCATCCTCAACCCGC 1560  
CACCGTTCTAGCTTAAGCATGACAGGTTGTGCGCCGTATAGGTCTCGTAGGAGTTGGGGC

G N P K A R F M T G A D R P G D P V A W  
1561 CGGGCAACCCGAAGGCACGTTTCATGACCGGTGCCGACCGCCCGGGGGACCCGTTGGCCT 1620  
GCCCCTTGGGCTTCCGTGCAAAGTACTGGCCACGGCTGGCGGGCCCCCTGGGCCACCGGA

Q E N A T K H A D S W W L H W Q S W L G  
1621 GGCAGGAAAACGCCACCAAGCATGCAGACTCCTGGTGGTTGCACTGGCAAAGTTGGCTGG 1680  
CCGTCTTTTGGGTTGGTTCGTACGTCTGAGGACCACCAACGTGACCGTTTCAACCGACC

E R A G A L K K A P T R L G N R A Y A A  
1681 GCGAGCGTGCCGGCGCGCTGAAAAAGGCACCGACCCGCTGGGCAACCGTGCCTACGCGG 1740  
CGCTGCGACGGCCGCGGACTTTTCCGTGGCTGGGCGGACCCGTTGGCACGGATGCGCC

G E A S P G T Y V H E R \*  
1741 CGGCGAAGCCTCCCAGGCACCTACGTTACAGAGCGTTGAGTTACAGCGCCGTGGCGGC 1800  
GCCCCTTCGGAGGGTCCGTGGATGCAAGTGTGCAACTCAATGTGCGGGCACCCGC

## Resultados y Discusión

### PhaZ ▶

M P Q P Y I  
1801 CTGCGGGGCGCCACGGTGTCTTACTTCACCCAAGAGTCACGTGCATGCCGCAACCCATATAT 1860  
GACGCCCCGCGGTGCCACAAATGAAGTGGGTCTCAGTGCACGTACGGCGTTGGGATATA  
F R T V E L D H Q S I R T A V R P G K P  
1861 TTTCAGGACCGTTCGAGCTGGACCACAGTCCATCCGACCGCTGTTCCGCCCCGGCAAACC 1920  
AAAGTCCTGGCAGCTCGACCTGGTGGTTCAGGTAGGCGTGGCGACAAGCGGGGCGCTTGG  
H L T P L L I F N G I G A N L E L V F P  
1921 GCACCTGACGCGGTTGCTGATCTTCAACGGCATCGGCGCCAACCTCGAGCTGGTGTCC 1980  
CGTGGACTGCGGCAACGACTAGAAAGTTGCCGTAGCCGCGGTTGGAGCTCGACCACAAGGG  
F I D A L D P D L E V I A F D V P G V G  
1981 GTTCATCGATGCACTTGACCCGGACCTGGAAGTCATCGCCTTCGATGTGCCTGGGGTTCGG 2040  
CAAGTAGCTACGTGAACTGGGCTGGACCTTCAGTAGCGGAAGCTACACGGACCCAGCC  
G S S T P R H P Y R F P G L A K L T A R  
2041 CGGCTCGTCCACACCACGCCACCCGATCGCTTCCCTGGGCTGGCAAGCTGACCGCACG 2100  
GCCGAGCAGGTGTGGTGCAGTGGGCATAGCGAAGGGACCCGACCGGTTCCGACTGGCGTGC  
M L D Y L D Y G Q V N V I G V S W G G A  
2101 CATGCTCGACTACCTCGACTACGGCCAGGTCAACGTCATCGGCGTGTCTGGGGCGGCGC 2160  
GTACGAGCTGATGGAGCTGATGCCGGTCCAGTTGCAGTAGCCGCACAGGACCCCGCCGCG  
L A Q Q F A H D Y P E R C K K L V L A A  
2161 CCTGGCCCAGCAGTTTGGCTCAGATTACCCGAGCGCTGCAAGAACTGGTGTGGCCGC 2220  
GGACCGGGTTCGTAACAGAGTCTAATGGGGCTCGCGACGTTCTTTGACCACGACCCGGCG  
T A A G A V M V P G K P K V L W M M A S  
2221 CACCGCTGCCGGTGCAGTAATGGTGCAGGCAAGCCCAAGGTGCTGTGGATGATGCCAG 2280  
GTGGCGACGGCCACGCCATTACCACGGTCCGTTCCGGGTTCCAGGACACCTACTACCGGTC  
P R R Y V Q P S H V I R I A P M I Y G G  
2281 CCCCCGGCGTTACGTGCAGCCGTCGCATGTCATCCGATTGCACCGATGATCTATGGCGG 2340  
GGGGCCGCAATGCACGTCCGACGCGTACAGTAGGCGTAACGTGGCTACTAGATAACCGCC  
G F R R D P D L A M H H A A K V R S G G  
2341 CGGCTTCCGACGTGACCCCGACCTGGCCATGCACCATGCTGCCAAAGTGCCTCCGGCGG 2400  
GCCGAAGGCTGCACTGGGGCTGGACCGGTACGTGGTACGACGGTTTCACGCGAGGCCGCC  
K L G Y Y W Q L F A G L G W T S I H W L  
2401 CAAGCTGGGCTACTACTGGCAGCTGTTCCGCGGGCTGGGCTGGACCAGCACCCTGGCT 2460  
GTTCCGACCCGATGATGACCGTTCGACAAGCGGGCCGACCCGACCTGGTTCGTAGGTGACCGA  
H K I Q Q P T L V L A G D D D P L I P L  
2461 GCACAAGATCCAGCAGCCCACCCCTGGTACTGGCCGGTGCACGACGCCCGCTGATCCCGCT 2520  
CGTGTCTTAGGTTCGTCGGGTGGGACCATGACCGGCCACTGCTGCTGGGCGACTAGGGCGA  
I N M R L L A W R I P N A Q L H I I D D  
2521 GATCAACATGCGCCTGCTGGCCTGGCGGATTCCCAATGCCAGCTACACATTATCGACGA 2580  
CTAGTTGTACGCGGACGACCGGACCGCCTAAGGGTTACGGGTCGATGTGTAATAGCTGCT  
G H L F L I T R A E A V A P I I M K F L  
2581 CGGCCATCTGTTCCCTGATCACCCGTGCCAAGCCGTCGCCCCGATCATCATGAAGTTCT 2640  
GCCGGTAGACAAGGACTAGTGGGCACGGCTTCGGCAGCGGGGCTAGTAGTACTTCAAGGA  
Q E E R Q R A V M H P R P A S G G \*  
2641 GCAGGAAGAACGTACGCGTCCGGTTCATGCATCCCCGTCGGGCTCGGGGGGTGAACAG 2700  
CGTCCTTCTTGACGTGCACGCCAGTACGTAGGGGCAGGCCGAGCCCCCCTTTGTC

### PhaC2 ▶

M K D K P A  
2701 CTGCGGCCTGACAGGGGAAATGGATCAGACGAGGGAGTGTGGCCATGAAAGACAAACCGG 2760  
GACGCCGACTGTCCCTTTACCTAGTCTGCTCCCTCACAACGGTACTTTCTGTTTGGCC

## Resultados y Discusión

K G S T T L P A T R M N V Q N A I L G L  
2761 CCAAAGGATCGACAACGCTCCCCGCCACCCGCATGAACGTGCAGAACGCCATCCTCGGCC 2820  
GGTTTCCTAGCTGTTGCGAGGGGCGGTGGGCGTACTTGCACGTCTTGCGGTAGGAGCCGG

R G R D L L S T L R N V G R H G L R H P  
2821 TGCGCGGCCGCGACCTGCTTTCCACGCTGCGCAACGTGCGCCGCCACGGCCTGCGCCACC 2880  
ACGCGCCGGCGCTGGACGAAAGGTGCGACGCGTTGCAGCCGGCGGTGCCGGACGCGGTG

L H T A H H L L A L G G Q L G R V M L G  
2881 CGCTGCATAACCGGCATCATCTGCTGGCGCTTGGCGGGCAGTTGGGGCGGGTGATGCTGG 2940  
GCGACGTATGGCGCGTAGTAGACGACCGCAACCGCCCGTCAACCCCGCCACTACGACC

D T P Y Q P N P R D A R F S D P T W S Q  
2941 GGGACACGCCCTACCAGCCGAACCCGCGTGACGACGCTTTCAGTGACCCGACCTGGAGCC 3000  
CCCTGTGCGGGATGGTTCGGCTTGGGCGCACTGCGTGCGAAGTCACTGGGCTGGACCTCGG

N P F Y R R G L Q A Y L A W Q K Q T R Q  
3001 AGAACCCGTTCTATCGCCGCGGCTGCGAGCCCTATCTGGCCTGGCAGAAGCAGACACGCC 3060  
TCTTGGGCAAGATAGCGGCGCCGACGTCCGGATAGACCGGACCGTCTTCTGTCTGTGCGG

W I D E S H L N D D D R A R A H F L F N  
3061 AGTGGATCGATGAAAGCCATTTGAACGACGATGATCGAGCCCGGCCACTTCTGTGTTCA 3120  
TCACCTAGCTACTTTCGGTAAACTTGCTGCTACTAGCTCGGGCGCGGGTGAAGGACAAGT

L I N D A L A P S N S L L N P L A V K E  
3121 ACCTGATCAACGATGCGCTGGCGCCAGCAACTCGCTGCTCAATCCGCTGGCGGTCAAGG 3180  
TGGACTAGTTGCTACGCGACCGGGTTCGTTGAGCGACGAGTTAGGCGACCGCCAGTTCC

L F N T G G Q S L V R G V A H L L D D L  
3181 AGCTGTTCAACACCGGCGGCCAGAGCCTGGTACGCGGCGTGGCCACCTGCTCGACGACC 3240  
TCGACAAGTTGTGGCCGCCGCTTCGGACCATGCGCCGACCGGTTGGACGAGCTGCTGG

R H N D G L P R Q V D E R A F E V G A N  
3241 TGCGTCACAACGATGGGCTGCCGCGTCAGGTGGACGAGCGCGCCTTCGAAGTAGGCGCCA 3300  
ACGCAGTGTGCTACCCGACGGCGCAGTCCACCTGCTCGCGCGGAAGCTTCATCCGCGGT

L A A T P G A V V F R N E L L E P I Q Y  
3301 ACCTGGCTGCGACCCCTGGCGCAGTGGTATTTTCGCAACGAGCTGCTGGAGCCGATCCAGT 3360  
TGGACCGACGCTGGGGACCGCGTACCATAAAGCGTTGCTCGACGACCTCGGCTAGGTCA

S P M S E K Q H A R P L L V V S P Q I N  
3361 ACTCGCCGATGAGCGAAAAGCAGCACGCACGCCACTGCTGGTTCGTGTCGCCTCAGATCA 3420  
TGAGCGGCTACTCGCTTTTCGTGCTGCGTGCAGTGGGTTGACGACCAGCACAGCGGAGTCTAGT

K F Y I F D L S A T N S F V Q Y M L K S  
3421 ACAAGTTCTACATCTTCGACCTCAGCGCTACCAACAGCTTTGTCCAGTACATGCTCAAAA 3480  
TGTTCAAGATGTAGAAGCTGGAGTTCGCGATGGTTGTCGAAACAGTTCATGTACGAGTTTT

G L Q V F M V S W R N P D P R H R E W G  
3481 GCGGCTTGCAAGTGTTCATGGTCAGCTGGCGCAACCCCGACCCAGCCACCGTGAATGGG 3540  
CGCCGAACGTTCCACAAGTACCAGTCGACCGCGTTGGGGCTGGGTGCGGTGGCACTTACCC

L S S Y V Q A L E E A L N A C R S I S G  
3541 GCCTTTCCAGCTACGTGCAAGCCCTGGAGGAAGCGCTCAATGCCTGCCGACGATACAGCG 3600  
CGGAAAGGTTCGATGCACGTTCCGGGACCTCCTTCGCGAGTTACGGACGGCGTACATGTCG

N R D P N L M G A C A G G L T M A A L Q  
3601 GCAACCGCGACCCCAACCTGATGGGCGCCTGTGCCGGCGGCCTGACCATGGCCGCACTGC 3660  
CGTTGGCGCTGGGGTTGGACTACCCGCGGACACGGCCCGGACTGGTACCGGCGTGACG

G H L Q A K Q Q L R R V R S A T Y L V S  
3661 AAGGCCACCTGCAAGCCAAGCAGCAATTGCGCCGGGTACGCAGTGCCACCTATCTGGTCA 3720  
TTCCGGTGGACGTTTCGGTTCGTGTTAACGCGGCCCATGCGTACGGTGGATAGACCAGT

L L D S K F E S P A S L F A D E Q T I E  
3721 GCTTGTGACAGCAAGTTTCGAAAGCCCGGCCAGCCTGTTTCGCCGATGAGCAGACCATCG 3780  
CGAACGACCTGCTGTTCAAGCTTTCGGGCGCGTTCGGACAAGCGGCTACTCGTCTGGTAGC



## Resultados y Discusión

A A K R R S Y Q R G V L D G G E V A R I  
3781 AAGCGGCCAAGCGCCGCTCTTATCAGCGCGGCTGCTGGACGGTGGCGAAGTGGCGCGGA 3840  
TTCGCCGGTTTCGCGGCGAGAATAGTCGCGCCGCACGACCTGCCACCGCTTCACCGCGCT

F A W M R P N D L I W N Y W V N N Y L L  
3841 TCTTCGCTGGATGCGGCCAACGACCTGATCTGGAACACTGGGTCAACAACACTACCTGC 3900  
AGAAGCGGACCTACGCCGGGTGCTGGACTAGACCTTGATGACCCAGTTGTTGATGGACG

G K T P P A F D I L Y W N A D S T R L P  
3901 TCGGCAAGACACCGCCGGCTTCGACATCCTGTACTGGAATGCCGACAGCAGCGCCTGC 3960  
AGCCGTTCTGTGGCGCCGCAAGCTGTAGGACATGACCTTACGGCTGTCGTGCGCGGACG

A A L H G D L L E F F K L N P L A Y A S  
3961 CCGCCGCGCTGCATGGCGACCTGCTGGAGTTTTTCAAGCTCAACCCCTTGGCCTACGCGT 4020  
GGCGGCGCGACGTACCGCTGGACGACCTCAAAAAGTTCGAGTTGGGGAACCGGATGCGCA

G L E V C G T P I D L Q Q V N I D S F T  
4021 CCGGGCTGGAGGTGTGCGGTACACCGATTGACCTGCAGCAGGTCAATATCGACAGCTTTA 4080  
GGCCGACCTCCACACGCCATGTGGCTAACTGGACGTCGTCCAGTTATAGCTGTCGAAAT

V A G S N D H I T P W D A V Y R S A L L  
4081 CCGTGGCCGGCAGCAACGACCACATCAGCCATGGGACGCGGTGTACCGCTCGGCCTTGC 4140  
GGCACCGGCCGTCGTTGCTGGTGTAGTGCAGTACCCTGCGCCACATGGCGAGCCGGAACG

L G G E R R F V L A N S G H I Q S I I N  
4141 TGCTGGGTGGCGAGCGGCGCTTCGTGCTGGCCAACAGCGGGCATATCCAGAGCATCATCA 4200  
ACGACCCACCGCTCGCCGCGAAGCAGCAGCCGTTGTCGCCCCTATAGGTCTCGTAGTAGT

P P G N P K A Y Y L A N P K L S S D P R  
4201 ACCCGCCAGGCAACCCCAAGGCTACTACCTGGCCAACCCCAAGCTGAGCAGCGACCCAC 4260  
TGGGCGGTCCGTTGGGGTTCGGATGATGGACCGGTTGGGGTTCGACTCGTTCGCTGGGTG

A W F H D A K R S E G S W W P L W L E W  
4261 GCGCCTGGTTCCACGACGCCAAGCGCAGTGAAGGCAGCTGGTGGCCGTTTGTGGCTGGAGT 4320  
CGCGGACCAAGGTGCTGCGGTTTCGCGTCACTTCCGTCGACCACCGGCAACACCGACCTCA

I T A R S G L L K A P R T E L G N A T Y  
4321 GGATCACCGCAGCTCCGGCCTGCTCAAGGCGCGCGCACTGAACTGGGCAACGCCACTT 4380  
CCTAGTGGCGTGCAGGCGGACGAGTTCGCGGCGCGTACTGACCCGTTGCGGTGAA

P P L G P A P G T Y V L T R \* M **PhaD ▶**  
4381 ACCACCGCTAGGCCCCGCGCCAGGCACCTACGTGCTGACCCGATGAGCTGCTGACTGGA 4440  
TGGGTGGCGATCCGGGGCGCGTCCGTGGATGCACGACTGGGCTACTCGACGACTGACCT

K T R D R I L E C A L Q L F N Q Q G E P  
4441 TGAAAACCCGCGACCGTATCCTTGAATGCGCCCTGCAGTTGTTCAACCAGCAGGGCGAAC 4500  
ACTTTTGGGCGCTGGCATAGGAACTTACGCGGGACGTCAACAAGTTGGTTCGTCCCCTTG

N V S T L E I A N E L G I S P G N L Y Y  
4501 CCAACGTATCCACCCTGGAAATTGCCAACGAACTCGGCATCAGCCCAGGCAACCTGTACT 4560  
GGTTGCATAGGTGGGACCTTTAACGGTTGCTTGAGCCGTAGTCGGGTCCGTTGGACATGA

H F H G K E P L V L G L F E R F E E A L  
4561 ACCACTTCCATGGCAAGGAGCCCTTGGTACTGGGCTTGTTCGAGCGTTTTGAAGAAGCGT 4620  
TGGTGAAGGTACCGTTCCTCGGAACCATGACCCGAACAAGCTCGAAAACCTTCTTCGCA

M P L L D P P L E V R L D A E D Y W L F  
4621 TGATGCCGTTGCTGGACCCGCGCTGGAGGTGCGCCTGGACGCAGAGGACTACTGGCTGT 4680  
ACTACGGCAACGACCTGGGCGGCGACCTCCACGCGGACCTGCGTCTCCTGATGACCGACA

L H L I V E R M A Q Y R F L F Q D L S N  
4681 TTCTGCACTTGATCGTCGAGCGCATGGCTCAGTACCGCTTCCGTTCAGGACCTGTCCA 4740  
AAGACGTGAACTAGCAGCTCGCGTACCGAGTCAATGGCGAAGGACAAGGTCTGGACAGGT

L T G R L P K L A R G M R S L I N A I K  
4741 ACCTGACCGGGCGCCTGCCCAAGCTCGCCCGAGGCATGCGCAGCCTGATCAATGCAATCA 4800  
TGGACTGGCCCGGACGGGTTTCGAGCGGGCTCCGTACGCGTTCGGACTAGTTACGTTAGT

## Resultados y Discusión

R T L A A L L A S L K S Q G L V E S D T  
4801 AACGCACGCTGGCGGCGCTGTTGGCCAGCCTCAAGAGCCAGGGGCTGGTAGAGAGTGATA 4860  
TTGCGTGCACCGCCGCGACAACCGGTCGGAGTTCTCGGTCCCCGACCATCTCTACTAT

Q A L G Q L V E Q I T L T L M F S L D Y  
4861 CCCAGGCGCTGGGGCAACTGGTCGAGCAGATCACACTGACGCTGATGTTCTCGCTGGATT 4920  
GGTCCGCGACCCCGTTGACCAGCTCGTCTAGTGTGACTGCGACTACAAGAGCGACTAA

Q R V L G R E G D V G I V V Y Q V M M L  
4921 ACCAGCGTGTGCTGGGGCGCGAGGGGATGTGGGATCGTGGTGTATCAGGTGATGATGC 4980  
TGGTCGCACACGACCCCGCGCTCCCCCTACCCCTAGCACCACATAGTCCACTACTACG

V A P H L Q A Q A R A A A E Q L A V K Y  
4981 TGGTGGCGCCGCATCTGCAGGCCAGGCCGGGGCGGCGGAGCAGCTGGCAGTGAAGT 5040  
ACCACCGCGGGCTAGACGTCCGGGTCCGGGCCCGCCGCGCCTCGTCGACCGTCACTTCA

L E G \* **REP**  
5041 ACCTGGAGGGGTAGGCGCTGCTGGAGATGTAGTGTTCAGCCGACGCATTTCGCGGGTAAAC 5100  
TGGACCTCCCCATCCGGACGACCTCTACATCACAACGTCGGCTGCGTAAGCGCCATTG

**REP**  
5101 CCGCTCCTACAAGGTTTGGCGCAACTTGTAGGAGCGGGTTTACCCGGAAGAAGCGACG 5160  
GGCGAGGATGTTCCAAACCGCGTTGAACATCCTCGCCCAAATGGGCGCTTCTTCCGCTGC

5161 CGGTATCAGATCAGGTTACCGGTGCCGTTAGGTGCCGATGGCGTGTGCTGGCCGGGGTG 5220  
GCCATAGTCTAGTCCCATGGCCACGGCCATCCACGGCTACCGCAGGACGACCGGCCCCAC  
\* I L T G T G T P A S P T S S A P T

5221 GCGGCAGGTGCCGTTGCCGTTGCCGTTGCCGAGCAGGCGCAGTGTGCGCGCTGGGGCG 5280  
CGCCGTCCACGGCCACGGCCACGGCGCCAGCGTTCGTCGCGTACGACCGGCGACCCCGC  
A A P A P A P A A T A A P A T S A A P A

5281 GCTGGCTTGGCGGCTGCCGTTTGGCCGGCGCCTTCTTACCGCAGGTTTTTTGGCCGCT 5340  
CGACCGAACCGCCGACGGCCAAACCGGCCGCGGAAGAAGTGGCGTCCAAAAAACC GGCGA  
A P K A A A P K A P A K K V A P K K A A

5341 GCCGGCTTCGCGCAGGCTTCGCTGCCGCGGGCTTGGCGCAGGTTTTTCCGCTGCGGTT 5400  
CGGCCGAAGCGGCGTCCGAAGCGACGGCGCCCGAACCGCGTCCAAAAAGGCGACGCCAA  
A P K A A P K A A A P K A A P K E A A T

5401 TTGGCTGCGGGTTTTGGCCGCTGCGGTTTTGCCAGCAGGTTTGGCCGCCGCGCTTTTCGCT 5460  
AACCGACGCCAAACCGGCGACGCCAAACGGTTCGTCCAAACCGGCGGCGGCAAAAGCGA  
K A A P K A A A T K G A P K A A A T K A

5461 GCAGGCTTGGCTGCTGCCTTGGCCAGTGGCTTGGCCGAGCCTTGCTCGCAGCCGGCTTG 5520  
CGTCCGAACCGACGACGGAACCGTTCACCGAACCGGCGTCCGAAACGAGCGTCCGCGAAC  
A P K A A A K A L P K A A A K S A A P K

5521 GTTGCTGCAGTGCAGCAGAAATCGGCGTAACCGAAGCACCAGTTCAGTTCCTCGATCTGC 5580  
CAACGACGTCACGCGCTGCTTTAGCCGATTTGGCTTCGTTGGCCAGTCCGAAGAGCTAGACG  
T A A T R S S I P T V S A G T L K E I Q

5581 TTGGTCAGGCTGTCCACCTGCTGGTGCAGTGCCTTGATCTCGTTGCGGCTCGGTACACCA 5640  
AACCAGTCCGACAGGTGGACGACCACGTCACGGAACCTAGAGCAACCGCGAGCCATGTGGT  
K T L S D V Q Q H L A K I E N R S P V G

5641 AGGCGCAGATGGCACTGTTAAGGCGCTTGTGCAAGGCTTCTTCAAGTTTCGCTCCACTTG 5700  
TCCGCGCTCTACCGTGACAATTCGCGAACAGCTTCCGAAGAAGTTCAAGCGAGGTGAAC  
L R S I A S N L R K D F A E E L E S W K

5701 CCCAGCGCACGGTCCCTTACGCCCCGACCCCGGAAGTGGTCGAGGACTTGGCAGTCTCG 5760  
GGTTCGCGTCCAGGAAGTGGGGCTGTGGGCGCTTACCAGCTCCTGAACCGTCCAGAGC  
G L A R D K V G S V R S T T S S K A T E

5761 GCAACATCTTACCGCTTTTTTGCCTGCTTCTCGGCCTTCTCGCCATCCTTACCAGC 5820  
CGTTGTAGAAGTCCGCGAAAAAGCGGACGAAGAGCCGGAAGAGCGGTAGGAAGTGGTGC  
A V D E A T K K A Q K E A K E G D K V L

## Resultados y Discusión

5821 GAGTCGAACAGCTTCGGGCGTCCTGGTTCGATCTTCGAATAGATACCCAGCCCCGCCAGC 5880  
 CTCAGCTTGTTCGAAGCCCGGCAGGACCAGCTAGAAGCTTATCTATGGGTTCGGGGCGGTTCG  
 S D F L K P G D Q D I K S Y I G L G A L

5881 CAGATCTTGCGGGAGTATTTCTCGATCCCGCCGACCCAGGAGCTGCTTTCTTTTTTCGGTG 5940  
 GTCTAGAACGCCCTCATAAAGAGCTAGGGCGGCTGGGTCTTCGACGAAAGAAAAAGCCAC  
 W I K R S Y K E I G G V W S S S E K E T

5941 TTCTTCTTGCCAGCCATCCTGCTCTCCTTATGGTTTGTGCGGACGCGCTCAAGCAGCTC 6000  
 AAGAAGAACGGTTCGGTAGGACGAGAGGAATACCAAACACGCGCTGCGCGAGTTTCGTCGAG  
 N K K G A M  
 ◀ PhaF \* P K H A V R E L L E

6001 ATGCAACTGTTCAAGCTTGATCGACAACGCCTCAACGTCATGTTTAGACGGAATACCCAG 6060  
 TACGTTGACAAGTTTCGAAGTAGCTGTTGCGGAGTTGCAGTACAAATCTGCCTTATGGGTC  
 H L Q E L K I S L A E V D H K S P I G L

6061 GCGATTCAAGGCGGACCGACCCGTGCGTCGAAAGCTTTTTTCGATCTTGTTCGAGTTGAAT 6120  
 CGTAAGTTCCGCGCTGGCTGGGCACGCAGCTTTCGAAAAAGCTAGAACAGCTCAACTTA  
 R N L A R G V R A D F A K E I K D L Q I

6121 TTCTACCTTGCCGCGTACGCGGTTCACTTCTTCCACCGACTTCGTCGAGCTGGTGGTTGGC 6180  
 AAGATGGAACGGCGCATGCGCCAAGTGAAGAAGTGGCTGAAGCAGTTTCGACCACCAACCG  
 E V K G R V R N V E E G V E D L Q H N A

6181 GGCATCGAGCTCTTGTTCGATGCGCTTCTTGCCGCGCGTCTCGACACCTTCACCCGCCCT 6240  
 CCGTAGCTCGAGAAACAGCTACGCGAAGAACGGCGCGCAGAGCTGTGGAAGTGGGCGGGA  
 A D L E K D I R K K G R T E V G E G A R

6241 GACCAGCTCTTTGAAGTAGTCAGAGCCTTCCTGACCGACGCGGGCGTAGGCGCCGATAACC 6300  
 CTGGTCGAGAACTTCATCAGTCTCGGAAGGACTGGCTGCGCCCGCATCCGCGGCTATGG  
 V L E K F Y D S G E Q G V R A Y A G I G

6301 GGCCAGCCAGATCTTGC GCGCATAGCCGCGCACCTCGCCAAGCGTGCCAGGGCTTCGTC 6360  
 CCGGTCGGTCTAGAACGCGGTATCGGCGCGTGGAGCGGTTTCGCACGGGTCCCGAAGCAG  
 A L W I K R A Y G R V E G L T G L A E D

6361 TTTTTTCTTCAACAATCACTTTGGCCATGCTGTGTACCTCATGCTCATGAGTGGTGGAAAA 6420  
 AAAAAAGAAGTGTAGTGAACCGGTACGACACATGGAGTACGAGTACTCACCACCTTTT  
 K K K V I V K A M  
 ◀ PhaI

6421 CCGCCCATGGAGGCTGGGCTTGTGCATAAGGTAGGGAAGAAAATTAGAAACCTCACCCCTA 6480  
 GGCGGGTACCTCCGACCCGAACACGTATTCCATCCCTTCTTTTAATCTTTGGAGTGGGAT

6481 AGGTCTTCGTTGTCGCATCTATATACCGCAAGCCCGTTGACCATAGCGCTAGCGTCGCA 6540  
 TCCAGAAGCAACAGCGTAGATATATGGCGTTCGGGGCAACTGGTATCGCGATCGCAGCGT

6541 GGCTCACC'TCACGGACATCGACGCCATGACTGCTGTAGCAAACCCACCCAGGCTGACGT 6600  
 CCGGAGTGGAGTGCTGTAGCTGCGGTA CTGACGACATCGTTTTGGGTGGGTCCGACTGCA

6601 TCAAGCAACGCGTGGCAGCCTGTTTCTCCAACGACCCAGCCTGCGGGACGTTTTATCAA 6660  
 AGTTCGTTGCGCACCGTTCGGACAAAGAGTTTTGCTGGGTTCGGACGCCCTGCAAAATAGTT

6661 AAGAAGCATTCAGGTTTTTCAGCGACCGGTATCCATGGGTGCACCGTAACCACCCTCACA 6720  
 TTCTTCGTAAGGTCCAAAAGTCGCTGGCCATAGGTACCCACGTGGCATTGGTGGGAGTGT

6721 TCACATCGCTCGATCCTTTTCGTCATCCTGC 6750  
 AGTGTAGCGAGCTAGGAAAGCAGTAGGACG

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al *cluster pha* presente en *P. putida* DOC21:

## Resultados y Discusión

1 AGCAGGCTGTCTTCACACGCAGAAAAACCCGCGTGTTCATCGTCGCTCGCATCCCGCCG 60  
TCGTCCGACAGAAGTGTGCGTCTTTTTGGGCGCGACGAGTAGCAGCGAGCGTAGGGCGG

61 CAGGACCGCAATTCGTTATCACTGGTCACCCGAGTAGCAGTACCGGGGCTTCGTCTGGGT 120  
GTCTTGGCGTTAAGCAATAGTGACCAGTGGGCTCATCGTCATGGCCCCGAAGCAGACCCA

PhaC1 ►  
M S N

121 AACGCCCACAGCCGAGCCGGTACTCGTCTCAGGACAACGGAGCGTCGTAGATGAGTAACA 180  
TTGGGGGTGTGCGCTCGGCCATGAGCAGAGTCTGTTGCCTCGCAGCATCTACTCATTGT

K N N D D L Q R Q A S E N T L G L N P V

181 AGAATAACGATGACCTGCAGCGCCAAGCCTCGGAAAACACTCTGGGCTGAACCCGGTCA 240  
TCTTATTGCTACTGGACGTGCGGTTTCGGAGCCTTTTGTGAGACCCGGACTTGGGCCAGT

I G L R R K D L L T S A R M V L R Q A I

241 TAGGCTTGGCGCCGAAGGATTTGCTGACTTCTGCTCGGATGGTGTGCGCCAGGCCATTTC 300  
ATCCGAACGCGCGTTTCTAAACGACTGAAGACGAGCCTACCACGACGCGGTCCGGTAAG

R Q P L H S A K H V A H F G M E L K D V

301 GACAACCGCTGCACAGTGCCAAGCATGTGCGGCACTTCGGCATGGAACCAAGGATGTGA 360  
CTGTTGGCGACGTGTACCGTTTCGTACAGCGCGTGAAGCCGTACCTTGAGTTCCTACT

I F G K S S L Q P E S D D R R F N D P A

361 TCTTCGGCAAATCCAGCCTGCAGCCGGAGAGTGACGACCGCGCTTCAACGACCCGGCCT 420  
AGAAGCCGTTTAGGTGCGACGTGCGCCTCTCACTGCTGGCGGCGAAGTTGCTGGGCCGA

W S Q N P L Y R R Y L Q T Y L A W R K E

421 GGAGCCAGAACCCGCTGTACCGCCGCTACCTGCAGACCTACCTGGCCTGGCGCAAGGAGC 480  
CCTCGGTCTTGGGCGACATGGCGCGGATGGACGTCTGGATGGACCGGACCGGTTCTCTCG

L H D W I G D S S L S P T D I S R A H F

481 TGCATGACTGGATCGGCGACAGCAGCCTGTCAACCCGACATCAGCCGCGCCACTTCG 540  
ACGTACTGACCTAGCCGCTGTGTCGGACAGTGGGTGGCTGTAGTCGGCGCGGTTGAAGC

V I N L M T E A M A P T N S A A N P A A

541 TCATCAACCTGATGACCGAGGCCATGGCGCCGACCAACAGCGCGCCAACCCGGCAGCAG 600  
AGTAGTTGGACTACTGGCTCCGGTACCGCGGCTGGTTGTGCGCGCGGTTGGGCCGTCGTC

V K R F F E T G G K S L L D G L S N L A

601 TCAAACGCTTCTTCGAAACCGCGGCAAGAGCCTGCTCGACGGCCTGTGCAACCTGGCCA 660  
AGTTTGGGAAGAAGCTTTGGCCCGGTTCTCGGACGAGCTGCCGGACAGCTTGGACCGGT

K D L V N N G G M P S Q V N M D A F E V

661 AGGACCTGGTCAACAACGGCGGCATGCCGAGCCAGGTCAACATGGATGCCTTCGAAGTGG 720  
TCCTGGACCAGTTGTTGCCGCCGTACGGCTCGGTCCAGTTGTACCTACGGAAGCTTACC

G K N L G T S E G S V V Y R N D V L E L

721 GCAAGAACCTCGGCACCAGCGAAGGTTCCGGTGGTCTATCGCAATGATGTGCTGGAGCTGA 780  
CGTTCTTGGAGCCGTGGTTCGCTTCCAAGCCACCAGATAGCGTTACTACACGACCTCGACT

I Q Y N P I T E Q V H E R P L L V V P P

781 TCCAGTACAACCCGATCACCGAACAGGTGCATGAGCGCCCGCTGCTGGTGGTGGCCGCAC 840  
AGGTCATGTTGGGCTAGTGGCTTGTCCACGTACTCGCGGGCGACGACCACCACGGCGGTG

Q I N K F Y V F D L S P D K S L A R F C

841 AGATCAACAAGTTCTACGTCTTCGACCTGAGCCCGGACAAGAGCCTGGCGCGCTTCTGCC 900  
TCTAGTTGTTCAAGATGCAGAAGCTGGACTCGGCCTGTTCTCGGACCGCGCAAGACGG

L R S T V Q T F I I S W R N P T K A Q R

901 TGGCTCCACGGTGCAGACCTTCATCATCAGTTGGCGCAACCCGACCAAGGCCACGCGTG 960  
ACGCGAGGTGCCACGTCTGGAAGTAGTAGTCAACCGGTTGGGCTGGTTCCGGGTCGCAC

E W G L S T Y I D A L K E A V D V V L A

961 AATGGGGCCTGTCCACCTACATCGACGCCCTGAAGGAAGCCGTCGACGTGGTGTGGCGA 1020  
TTACCCCGGACAGGTGGATGTAGCTGCGGGACTTCCTTCGGCAGCTGCACCACGACCGCT

## Resultados y Discusión

I T G S K D L N M L G A C S G G I T C T  
1021 TCACCGGCAGCAAGGACCTGAACATGCTCGGCGCCTGCTCCGGCGGCATCACCTGCACCG 1080  
AGTGGCCGTCGTTCTCTGGACTTGTACGAGCCGCGGACGAGGCCGCCGTAGTGGACGTGGC

A L V G H Y A A L G E K K V N A M T L L  
1081 CGCTGGTTCGGCCATTACGCCGCACTGGGCGAGAAGAAGGTCAACGCCATGACCCTGCTGG 1140  
GCGACCAGCCGGTAATGCGGCGTGACCCGCTCTTCTTCCAGTTGCGGTAAGTGGGACGACC

V S V L D T T L D T Q V A L F V D E Q T  
1141 TGAGCGTGCTCGACACCACCTCGACACCCAGGTGCGGCTGTTTCGTCGACGAGCAGACCC 1200  
ACTCGCACGAGCTGTGGTGGGAGCTGTGGGTCCAGCGGACAAGCAGCTGCTCGTCTGGG

L E A A K R H S Y Q A G V L E G R D M A  
1201 TCGAAGCGGCCAAGCGTCATTCTACCAGGCCGGGTGCTGGAAGCCGCGACATGGCCA 1260  
AGCTTCGCCGGTTCGCAGTAAGGATGGTCCGGCCCCACGACCTTCCGGCGCTGTACCGGT

K V F A W M R P N D L I W N Y W V N N Y  
1261 AGGTCTTCGCCGTTGGATGCGGCCAACGACCTGATCTGGAAGTACTGGGTCAACAACCTACC 1320  
TCCAGAAGCGGACCTACGCCGGTGTGCTGGACTAGACCTTGATGACCCAGTTGTTGATGG

L L G N E P P V F D I L F W N N D T T R  
1321 TGCTGGGCAACGAGCCGCCGGTGTTCGACATCTGTTCTGGAACAACGACACCACGCGCC 1380  
ACGACCCGTTGCTCGGCGGCCACAAGCTGTAGGACAAGACCTTGTGCTGTGGTGGCGGG

L P A A F H G D L I E M F K N N P L V R  
1381 TGCCGGCCGCTTCCACGGCGACCTGATCGAGATGTTCAAGAACAACCCGCTGGTACGCG 1440  
ACGCCCGCGGAAGGTGCCGCTGGACTAGCTCTACAAGTTCTTGTGGGCGACCATGCGC

A D A L E V C G T P I D L K Q V T T D I  
1441 CCGACGCCCTGGAAGTCTGCGGCACGCCGATCGACCTCAAGCAGGTACCACCGACATCT 1500  
GGCTGCGGGACCTTCAGACGCCGTGCGGCTAGTGGAGTTCGTCCAGTGGTGGCTGTAGA

F C V A G T N D H I T P W K S C Y K S A  
1501 TCTGCGTGGCCGGCACCAACGACCACATCACCCCGTGAAGTCCCTGCTACAAGTCCGGCGC 1560  
AGACGCACCGGCCGTTGGTGTAGTGGGACACCTTCAGGACGATGTTACGCCGCG

Q L F G G N V E F L L S N S G H I Q S I  
1561 AACTGTTTCGGCGCAACGTCGAGTTCTGCTGTCCAACAGCGGGCACATCCAGAGCATCC 1620  
TTGACAAGCCGCCGTTGCAGCTCAAGGACGACAGGTTGTGCGCCGTTGAGGTTCTCGTAGG

L N P P G N P K A R Y M T S S E M P A D  
1621 TCAACCCGCGGGCAACCCCAAGGCGCGCTACATGACCAGCAGCGAGATGCCGGCCGATG 1680  
AGTTGGGCGGCCGTTGGGGTCCGCGCGATGTACTGGTTCGTCGCTCTACGGCCGGCTAC

A D H W Q E N S S K H T D S W W L Y W Q  
1681 CCGACCACTGGCAGGAAAACCTCAGCAAGCACACCGACTCCTGGTGGCTGTACTGGCAGA 1740  
GGCTGGTGACCGTCTTTTGGAGTTCGTTTCGTTGGCTGAGGACCACCGACATGACCGTCT

T W L A D R S G A L K K S P T T L G N K  
1741 CCTGGCTGGCCGACCGCTCCGGAGCACTGAAGAAGTCGCCCACCACTCTCGGCAACAAGG 1800  
GGACCGACCGGCTGGCGAGGCCTCGTGACTTCTTCAGCGGGTGGTGGAGCCGTTGTTC

A Y P A G E A S P G T Y V H E R \*  
1801 CCTATCCGGCAGGCGAAGCATCGCCGGGCACCTACGTCCACGAACGTTGAAACCCGCCGC 1860  
GGATAGGCCGTTCCGTTTCGTAGCGGCCCGTGAATGCAGGTGCTTGAACCTTGGGCGGGC

PhaZ ►  
M P Q P  
1861 GCCGCCCGGACACGCCGGCGGCGCTGCATTGCTGACAGGGCTCGCGCATGCCGCAACCG 1920  
CGCGGGCGCTGTGCGGCCGCCGCGACGTAACGACTGTCCCAGCGCGTACGGCGTTGGC

Y I F R T V D L D G Q T I R T A V R P G  
1921 TACATCTTCCGGACCGTCGACCTGGATGGACAGACCATCCGCACCGCGGTTCCGCCCGGC 1980  
ATGTAGAAGGCCCTGGCAGCTGGACCTACCTGTCTGGTAGGCGTGGCGCAAGCGGGGCC

K P H L T P L L I F N G I G A N L E L V  
1981 AAGCCGCACCTCACGCCCTTGCTGATCTTCAATGGCATCGGGGCCAACCTGGAGCTGGTA 2040  
TTCGGCGTGGAGTGGCGGAACGACTAGAAGTTACCGTAGCCCCGGTGGACCTCGACCAT

## Resultados y Discusión

F P F I Q A L D P D L E V I A F D V P G  
2041 TTTCCGTTTCATCCAGGCGCTGGACCCGGACCTTGAAGTCATTGCGTTCGACGTACCCGGC 2100  
AAAGGCAAGTAGTCCGCGACCTGGGCCTGGAACTTCAGTAACGCAAGCTGCATGGGCCG

V G G S S T P R H P Y R F P G L A K L T  
2101 GTCGGTGGTTCCTCGACGCCACGCCACCCCTATCGCTTTCCCGGCTGGCCAAACTGACC 2160  
CAGCCACCAAGGAGCTGCGGTGCGGTGGGGATAGCGAAAGGGCCGACCGGTTTGACTGG

A R M L D Y L D Y G Q V N V I G V S W G  
2161 GCACGCATGCTCGATTACCTGGACTACGGCCAGGTCAATGTCATCGGCGTGTCTGGGGC 2220  
CGTGCGTACGAGCTAATGGACCTGATGCCGGTCCAGTTACAGTAGCCGCACAGCACCCCG

G A L A Q Q F A H D Y P E R C K K L V L  
2221 GGCGCGCTGGCCCAGCAGTTCGCCACGACTACCCCGAGCGCTGCAAGAAGCTGGTTCG 2280  
CCGCGCGACCGGGTTCGTC AAGCGGGTGTGATGGGGCTCGCGACGTTCTTCGACCAAGAC

A A T A A G A V M V P G K P K V L W L M  
2281 GCCGCCACCGCCCGCGCGGTGATGGTGCCTGGCAAGCCCAAGGTGCTGTGGTTGATG 2340  
CGCGGGTGGCGGGCCGCGCCACTACCACGGGCGGTTTCGGGTTCCACGACACCAACTAC

A S P R R Y V Q P S H V I R I A P E I Y  
2341 GCCAGCCCGCGACGCTATGTGACGCGTTCGCATGTGATCCGCATCGCCCGGAGATCTAC 2400  
CGGTCCGGCGCTGCGATACACGTCCGCGAGGTACACTAGGCGTAGCGGGGCCCTTAGATG

G G A F R R N P D L A L S H A S K V R S  
2401 GGCGGCGGTTTCGCGCAACCCCGACCTGGCCCTGTGCGACGCTTCCAAGGTGGGTTCC 2460  
CCGCGCGCAAAGCGGCGTTGGGGCTGGACCGGACAGCGTGGCGAGGTTCCACGCAAGG

S G K L G Y Y W Q L F A G L G W T S A H  
2461 TCGGGCAAGCTCGGTTACTACTGGCAACTGTTCCGCGCCTTGGCTGGACCAGCGCCAC 2520  
AGCCCGTTCGAGCCAATGATGACCGTTGACAAGCGGCCGGAACCGACCTGGTTCGCGGGT

W L H K I Q Q P T L V L A G D D D P L I  
2521 TGGCTGCACAAGATCCAGCAGCCGACCCCTGGTGTGGCCGGCGACGATGACCCGTTGATC 2580  
ACCGACGTGTTCTAGGTTCGTCGGCTGGGACCACGACCGGCCGCTGCTACTGGGCAACTAG

P L I N M R F L A W R I P N A Q L H I I  
2581 CCGTTGATCAATATGCGCTTTCTGGCCTGGCGAATTCCTCAATGCCAGCTACACATAATC 2640  
GGCAACTAGTTATACGCGAAAGACCGGACCGCTTAAGGGTTACGGGTCGATGTGTATTAG

D D G H L F L I T R A E A V A P I I M K  
2641 GACGATGGTCACTTGTCTGATTACCCGTGCCGAGGCGGCGGCGGATCATCATGAAA 2700  
CTGCTACCAGTGAACAAAGACTAATGGGCACGGCTCCGGCACCGCGGCTAGTAGTACTTT

F L Q Q E R Q R A V M H P R P A P N A \*  
2701 TTCCTGCAGCAGGAGCGCAACGCGCCGTCATGCATCCTCGGCCGCCCCGAACGCTGA 2760  
AAGGACGTGTCCTCGCGGTTGCGCGGACGATACGTAGGAGCCGGGCGGGGCTTGGCGACT

2761 ACCACCCCCCATCGCTTGCACCTTTGGCAGGAGCGCCGAAGCATGCAAGCGCATTGGTTG 2820  
TGGTGGGGGTAGCGAACGTGGAAACCGTCTCGCGGCTTCGTACGTTTCGCGTAACCAAC

2821 AGGCAAATCCCGCCCCGACGGGTCAGTTTGTGATGGCTCGACGACGGAGTGTGTC 2880  
TCCGTTTAGGGCGGGGCGTGCACCAGTCAAACAACCTACCGAGCTGCTGCCTCACAACGG

PhaC2 ►  
M N D K P A K A T A P T P A A Y I N V  
2881 TGATGAATGACAAACCGCAAAGCGACGGCGCCGACACCCGCGGTACATCAACGTAC 2940  
ACTACTTACTGTTTGGGCGTTTTCGCTGCCGCGGCTGTGGGCGGCGCATGTAGTTGCATG

Q S A V V G L R G R D L V S T L R H V G  
2941 AGAGCGCGTTCGCTCGGTTTGGCGGGGCGGACCTGGTGTGACCCCTGCGCCATGTGCGCC 3000  
TCTCGCGCCAGCAGCCAAACGCGCCCGCGCTGGACCACAGCTGGGACGCGGTACAGCCGG

R H G L R H P L H T A R H M L A L G G Q  
3001 GCCACGGCCTGCGCCACCCGCTGCACACGGCCCGCACATGCTCGCGCTGGGCGGCCAGT 3060  
CGGTGCCGGACGCGGTGGGCGACGTGTGCCGGGCGTGTACGAGCGGACCCGCGGTC

## Resultados y Discusión

L G R V L L G D A P Y Q P A A R D N R F  
3061 TGGGCCGCGTACTGCTCGGCGATGCGCCCTATCAGCCCGCGCGGGACAACCGCTTCA 3120  
ACCCGGCGCATGACGAGCCGCTACGCGGGATAGTCGGGCGGCGCCCTGTTGGCGAAGT

N D P A W T L N P F Y R R G L Q A W L A  
3121 ACGATCCGGCCTGGACCCTCAATCCGTTCTACCGCCGCGCCTGCAGGCATGGCTGGCGT 3180  
TGCTAGGCCGGACCTGGGAGTTAGGCAAGATGGCGGCGCCGGACGTCGGTACCAGCCGA

W Q K Q T R N W I D E S Q L S D D D R A  
3181 GGCAGAAACAGACCCGCAACTGGATCGACGAAAGCCAGTTGAGCGACGACGACCGAGCCC 3240  
CCGTCTTTGTCTGGGCGTTGACCTAGCTGCTTTTCGGTCAACTCGCTGCTGGCTCGGG

R A H F L F S L L N D A V A P S N T L L  
3241 GCGCACATTTTCTGTTTTCCCTGCTCAACGACGCGGTAGCGCCGAGCAATACCTTGTCTCA 3300  
CGCGTGTAAGACAAAAGGGACGAGTTGCTGCGGCATCGCGGCTCGTTATGGAACGAGT

N P L A I K E L F N S G G L S V V K G L  
3301 ATCCGCTGGCGATCAAGGAGCTGTTCAACAGTGGCGGGCTCAGCGTGGTCAAGGGGCTGG 3360  
TAGGCGACCGCTAGTTTCTCGACAAGTTGTACCAGCCGAGTCGCACAGTTCCCCGACC

G H L L D D L R H N H G M P R Q V A K D  
3361 GGCATCTGCTCGACGATCTGCGGCACAACCACGGCATGCCGCGGCGAGGTCGCCAAGGACG 3420  
CCGTAGACGAGCTGCTAGACCCGTGTTGGTGGCGTACGGCGCCGTCCAGCGGTTCTCTGC

A F E V G H N L A A T P G A V V F R N E  
3421 CCTTCGAAGTCGGCCACAACCTTGCCGCGACGCTGGCGCGGTAGTGTTCGCAACGAGT 3480  
GGAAGCTTCAGCCGGTGTGGAAAGCGGCTGCGGACCGCGCCATCACAAGCGTTGCTCA

L L E L I Q Y S P M S E K Q Y A R P V L  
3481 TGCTGGAGCTGATCCAGTACAGCCCCATGAGCGAAAAGCAGTACGCCCGGCCGTTGCTGG 3540  
ACGACCTCGACTAGGTCATGTCCGGGTAAGTTCGTTTCGTCATCGGGCCGGGCACGACC

V V P P Q I N K F Y V F D L N P A N S L  
3541 TGGTACCGCCGAAAATCAACAAGTTCTATGTGTTCGACCTCAACCCGGCCAACAGCCTGG 3600  
ACCATGGCGGCGTTTGTGTTCAAGATACACAAGCTGGAGTTGGGCCGGTTGTCGGACC

V Q Y M L K N G L Q T F M I S W R N P D  
3601 TGCAAGTACATGCTCAAGAATGGTCTGCAGACGTTTCATGATCAGTTGGCGCAACCCCGACC 3660  
ACGTCATGTACGAGTTCTTACCAGACGCTCTGCAAGTACTAGTCAACCGGTTGGGGCTGG

P R H R E W G L S S Y V A A V E E A L N  
3661 CACGTCATCGCGAATGGGGCCTGTCGTCGTATGTCGCCGCGGTGGAGGAAGCCCTCAACG 3720  
GTGCAGTAGCGCTTACCCCGGACAGCAGCATAACAGCGGCGGCACCTCCTTCGGGAGTTGC

V C R A I T G S R D V N L M G A C A G G  
3721 TCTGCCGCGCCATCACCGGCAGCCGCGACGTC AACCTGATGGGCGCCTGCGCCGCGGCC 3780  
AGACGGCGCGGTAGTGGCCGTGCGCGCTGCAGTTGGACTACCCGCGGACGCGGCCCGGG

L T M A A L Q G H L Q A K R Q L R R V H  
3781 TGACCATGGCGGCCCTGCAGGGTCACCTGCAGGCAAGCGGCAACTGCGCCGTGTGCACA 3840  
ACTGGTACCGCCGGGACGTCACAGTGGACGTCGGTTTCGCCGTTGACGCGGCACACGTTG

S A S Y L V S L L D S A L D S P A S L F  
3841 GCGCCAGCTACCTGGTGAGCCTGCTCGACAGCGCCCTGGACAGCCCTGCCAGCCTGTTTCG 3900  
CGCGGTGATGGACCACTCGGACGAGCTGTGCGGGACCTGTGCGGGACGGTGGACAAGC

A D E Q T L E A A K R R S Y Q Q G V L D  
3901 CCGACGAGCAGACCCTGGAGGCGGCCAAGCGCCGCTCCTACCAGCAAGGCGTGTCTCGATG 3960  
GGCTGCTCGTCTGGGACCTCCGCCGTTTCGCGGCGAGGATGGTCTGTTCCGCACGAGCTAC

G G E M S R V F A W M R P N D L V W N Y  
3961 GCGGCGAAATGAGCCGCGTGTTCGCCTGGATGCGGCCCAACGACCTGGTCTGGAACCTACT 4020  
CGCCGCTTTACTCGGCGCACAAAGCGGACCTACGCCGGGTTGCTGGACCAGACCTTGATGA

F V N N Y L L G K S P P A F D I L Y W N  
4021 TCGTCAACAACCTGCTCGGCAAGTGCAGCCGCTGCGTTTCGACATCCTCTACTGGAACA 4080  
AGCAGTTGTTGATGGACGAGCCGTTACAGCGGCGGACGCAAGCTGTAGGAGATGACCTTGT

## Resultados y Discusión

N D C S R L P A A L H G D L L D F F K Y  
4081 ACGACTGCAGCCGCTGCCGGCTGCGCTGCACGGCGACCTGCTGGACTTCTTCAAGTACA 4140  
TGCTGACGTTCGGCGGACGGCCGACGCGACGTGCCGCTGGACGACCTGAAGAAGTTCATGT

N P L A H S A G L E V C G T P I D L H K  
4141 ACCCACTGGCGCACAGCGCCGGGCTGGAGGTCTGCGGTACGCCGATCGACCTGCACAAAG 4200  
TGGGTGACCGCGTGTTCGGGCCGACCTCCAGACGCCATGCGGCTAGCTGGACGTGTTTC

V T V D S F H V A G S N D H I T P W D A  
4201 TCACCGTCGACAGCTTCCACGTGGCCGGCAGCAATGACCACATCACGCCCTGGGACGCGG 4260  
AGTGGCAGCTGTGAAGGTGCACCGCCGTCGTTACTGGTGTAGTGCGGGACCCTGCGCC

V Y R S A L L L G G E R R F V L S N S G  
4261 TCTATCGCTCGGCGCTGCTGCTGGCGGCGAGCGCGGTTTCGTGCTGTCCAACAGCGGCC 4320  
AGATAGCGAGCCGCGACGACGCCCGCCGCTCGCCGAAAGCACGACAGGTTGTGCGCCG

H V Q S I L N P P G N P K S H Y V H N P  
4321 ATGTGCAGAGCATTCTCAACCCGCCGGGCAACCCCAAGTCGCACTACGTGCACAAACCCGA 4380  
TACACGTCTCGTAAGAGTTGGGCGGCCGTTGGGGTTCAGCGTGATGCACGTGTTGGGCT

K L S S D P R A W Y Y D A E K T D G S W  
4381 AGCTGAGCAGCGACCCTCGCGCCTGGTATTACGACGCCGAGAAGACCGACGGCAGTTGGT 4440  
TCGACTCGTTCGCTGGGAGCGCGGACCATAATGCTGCGGCTCTTCTGGCTGCCGTCAACCA

W P L W L E W I Q Q R S G A L R E T D A  
4441 GGCCGTTGTGGCTGGAGTGGATTAGCAACGCTCCGGCGCCCTGCGCGAAACCGACGCGA 4500  
CCGGCAACACCGACCTCACCTAAGTCGTTGCGAGCCGCGGGACGCGCTTTGGCTGCGCT

T L G S A N Y P P M D P A P G K Y V L V  
4501 CCCTGGGCAGTGCCAACTACCCGCAATGGACCCCGACCCGGCAAAATACGTCTGTTGTC 4560  
GGGACCCGTCACGTTGATGGGCGGTTACCTGGGGCGTGGGCCGTTTATGCAGGACCACG

PhaD ►  
M K T R D R I L E C A L H L

R \*  
4561 GCTGACAATGAGGACTGGATGAAAACCCGCGACCCGATCCTCGAATGCGCCCTGCACTTG 4620  
CGACTGTTACTCCTGACCTACTTTTGGGCGCTGGCGTAGGAGCTTACGCGGGACGTGAAC

F N Q Q G E P N V S T L E I A N E L G I  
4621 TTCAACCAGCAGGGCGAGCCCAACGTCTCGACACTGGAAATCGCCAACGAACCTGGGGATC 4680  
AAGTTGGTTCGTCGCGCTCGGGTTGCAGAGCTGTGACCTTTAGCGGTTGCTTGACCCCTAG

S P G N L Y Y H F H G K E P L V L G L F  
4681 AGCCCCGGCAACCTGTACTACCACTTCCACGGCAAGGAGCCGCTGGTGCTGGGGCTGTTTC 4740  
TCGGGGCCGTTGGACATGATGGTGAAGGTGCCGTTCTCGGGCACCACGACCCCGACAAG

G R F E E E L T P L L D P P L G V R L D  
4741 GGACGCTTCGAGGAAGAACTGACGCCGCTGCTCGACCCACCGCTGGGAGTGCGCCTGGAC 4800  
CCTGCGAAGCTCCTTCTTACTGCGGGCAGGAGCTGGGTGGCGACCCTCACGCGGACCTG

A E D Y W L F L H L I V E R M A Q Y R F  
4801 GCCGAGGATTACTGGCTGTTCCCTGCACCTGATCGTCGAGCGCATGGCGCAGTACCGGTTT 4860  
CGGCTCCTAATGACCGACAAGGACGTGGACTAGCAGCTCGCGTACCGGCTCATGGCCAAA

L F Q D L S N L T G R L P K L A R D M R  
4861 CTCTTTCAGGATCTGTGCAACCTACCCGACGCTTGCCGAAGCTGGCCCGGACATGCGC 4920  
GAGAAAGTCTTAGACAGCTTGGAGTGGCCTGCCAACGGCTTCGACCGGGCGCTGTACGCG

T L L N G L K R T L A A L L A S L K A Q  
4921 ACCCTGCTCAACGGCCTCAAGCGCACCTCGCCGCCCTGCTCGCCAGCCTCAAGGCGCAG 4980  
TGGGACGAGTTGCCGGAGTTCCGCTGGGAGCGGGACGAGCGGTCGGAGTTCCGCGCT

G Q I H S D T R A L G Q L V E Q I T L T  
4981 GGCCAGATTACAGCGACACCCGGCACTCGGGCAACTGGTTCGAACAGATCACCTGACG 5040  
CCGGTCTAAGTGTGCTGTGGGCCGTTGAGCCGTTGACCAGCTTGTCTAGTGGGACTGC



Resultados y Discusión

L L F S L D Y Q R V L A K D A E V G I V  
5041 CTGCTGTTCTCGCTGGATTATCAGCGGGTGTGGCCAAGGATGCCGAGGTGGGGATCGTG 5100  
GACGACAAGAGCGACCTAATAGTCGCCACGACCGGTTCTACGGCTCCACCCCTAGCAC

V Y Q V M M L V A P H L E A P S R H A A  
5101 GTGTATCAGGTCATGATGCTGGTGGCGCCGACCTGGAAGCCCCGTGCGGGCACGCGGG 5160  
CACATAGTCCAGTACTACGACCACCGCGCGTGGACCTTCGGGGCAGCGCCGTGCGCCG

E Q L A L R Y L E G \*  
5161 GAGCAGTTGGCACTGCGCTATCTGGAAGGATGAGTCCGGGGGACCCCAAAAACAAAACGC 5220  
CTCGTCAACCGTGACGCGATAGACCTTCTACTCAGGCCCCCTGGGGTTTTTGTTTTGGC

5221 CCGGCCGGGTGCCGTAATAC TGGGGCCGCTCGCAACCCCTTCGCGGGCAAGCCCGTCTCTA 5280  
GGCCGGCCACGGCATTATGACCCCGCGAGCGTTGGGAAGCGCCGTTTCGGGCGAGGAT  
-----REP1-----

5281 CGGACTATCCGCCATAGGAGCGGCTTTAGCCGGAAGCGCTGGTGAATTCGCCGACGCA 5340  
GCCTGATAGGCGGTATCCTCGCGAAATCGGCGCTTCGCGACCACTTAAGCGGCTGCGT  
-----

5341 TCGCGGCTGAAGCCGCTCCTACGAGGGCGTGTGGGAGCTGGCTTGCCAGCGAAGGGCCG 5400  
AGCGCCGACTTCGGCGAGGATGCCTCCCGCACACCCTCGACCGAACGGTTCGCTTCCCGG  
-----REP1'-----

5401 CAAAGCGGCCCAAGAGCTTGAGTGAACAGCAGAACGCCCGGGTCCGGGCGTTTTGCT 5460  
GTTTCGCCGGGTTCTCGAACTCACTTGTCTGCTTTCGGGGCCACGGCCCGCAAACGA  
-----REP2-----

5461 TGCAGCCGCTGAGGTCAGGTATGGCTGGTGGCGTTACCGGTGCCGATGGCGCCGGAGT 5520  
ACGTCGGCGGACTCCAGTCCATACCGACCAACCGCAATGGCCACGGCTACCGCGGCTCA  
\* T H S T P T V P A S P A P T

5521 AGCCGGTGCGGCGCTGGCGCCGAGCAGCACTGGCTGCCGGGGCTGCGCTGGCAGCAGG 5580  
TCGGCCACGCCGACCGCCGGCTCGTCTGACCGACGGCCCCGACGCGACCGTCTGTC  
A P A A S A A P A A S A A P A A S A A P

5581 AGCGGCCGTTTTGGCTGCCGGTTCGCTGCCGGTGCTTGC GCGCTACAGGCTTTTTTCGC 5640  
TCGCCGGCCAAACCGACGGCCGAAAGCAGCGCCACGGAACGCGGATGTCCGAAAAAGCG  
A A P K A A P K A A P A K R A V P K K A

5641 TGCTGCTGGTTTTGGCAACTGCTGGCTTGGCAGCCGGTTTTCGCCGCGACCGTTTTGCTGC 5700  
ACGACGACCAACCGTTGACGACCGAACCGTCGGCCAAAGCGGCGCTGGCCAAAGCGACG  
A A P K A V A P K A A P K A A V P K A A

5701 AGCCGGCTTGGCAGCGGGGTTTTGGCAGCCGGGCTTTGGCGGCAGCAGTTTTGGCTGC 5760  
TCGGCCGAACCGTCGCCGCCAAACCGTCGGCGCCGAAACCGCCGTCGTCCAACCGACG  
A P K A A A P K A A A A K A A A P K A A

5761 TGGCTTGGCCCGGTTTTGGCTGCGGCGTTTTTTCGCGTGGCTTGGCCAGAGGCTTGGC 5820  
ACCGAACCGGCGCCAAACCGACGCCGCAAAAACGGCGACCGAACCGGTCTCCGAACCG  
P K A A P K A A A T K A A P K A L P K A

5821 CGCTGCCTTGGTTGCCGTCGAGGACTTGGCCGAAATCGGCGTGACCGATGCACCGGTCAG 5880  
GCGACGGAACCAACGGCAGCTCCTGAACCGGTTTAGCCGCACTGGCTACGTGGCCAGTC  
A A K T A T S S K A S I P T V S A G T L

5881 TTTCTCGATCTGCTTGGTCAGCGTATCGACCTTGGCATGCAGTGCCTTGATCTCGTTCTT 5940  
AAAGAGCTAGACGAACAGTTCGCATAGCTGGAACCGTACGTCACGGAACCTAGAGCAAGAA  
K E I Q K T L T D V K A H L A K I E N K

5941 GCTCGGCACGCCGAGACGCGAGATCGCGCTGTTACGGCGTTTTGTCGAAAGCACCTTCAAG 6000  
CGAGCCGTGCGGCTCTGCGCTCTAGCGCGACAAGTCCGCAAACAGCTTTTCGTGGAAGTTC  
S P V G L R S I A S N L R K D F A G E L

6001 CTCGCTCCACTTGCCAGCGCGGGTCTTTGACATCGGCAACCCGGAAGTCGCCGACTT 6060  
GAGCGAGGTGAACGGTTCGCGCGCCAGAACTGTAGCCGTTGGGCGCTTCAGCGGCTGAA  
E S W K G L A R D K V D A V R S T A S K

## Resultados y Discusión

```
6061 GGC GCTGTCTTTTCGCCGTGTCCTTGACCGCATCGACGCTTTTCTTCGCCTGCTTCTCGGC 6120
    CCCGACAGAAAGCGGCACAGGAACTGGCGTAGCTGCGAAAAGAAGCGGACGAAGAGCCG
    A S D K A T D K V A D V S K K A Q K E A

6121 TTTCTCACCGTCCTTTACCAGCGACTCGAAGACCTTGCTGCCGTCCTGCTCGACCTTCGA 6180
    AAAGAGTGGCAGGAAATGGTCGCTGAGCTTCTGGAACGACGGCAGGACGAGCTGGAAGCT
    K E G D K V L S E F V K S G D Q E V K S

6181 GTAGACGCCCAGGCCAGCCAGCCAGATCTTGCGGGAGTACTTCTCGATTCCCCCGATCCA 6240
    CATCTGCGGGTCCGGTCCGGTCCGGTCTAGAACGCCCTCATGAAGAGCTAAGGGGGCTAGGT
    Y V G L G A L W I K R S Y K E I G G I W

6241 GGAGCTGCTTTCTTTTTCAGTATTCTTTTGGCCAGCCATCCCGCTCTCCTTATTTTTTGC 6300
    CCTCGACGAAAGAAAAGTCATAAGAAAACGGTCCGGTAGGGCGAGAGGAATAAAAAACG
    S S S E K E T N K K G A M * K K G
    ◀ PhaF

6301 CGGTGACACGTTCAAGCAACGCCGTCAGCTCATCGAGCTTGGCAGAAAAGTGCCTCCACGT 6360
    GCCACTGTGCAAGTTCGTTGCGGCAGTCGAGTAGCTCGAACCGTCTTTCACGGAGGTGCA
    T V R E L L A T L E D L K A S L A E V D

6361 CATGTTTAGACGGAATGCCGATCCGATTCAAGGCGCTGGCGACCCGTGTGTGCGAAAGCCT 6420
    GTACAAATCTGCCTTACGGCTAGGCTAAGTTCCGCGACCGCTGGGCACACAGCTTTCGGA
    H K S P I G I R N L A S A V R T D F A K

6421 TTTGATTTTGTCCAGTTGAACCTCGACCTTGCCCTTCACGGTGTGAGGTGCTGCTTCA 6480
    AAAGCTAAAACAGGTCAACTTGGAGCTGGAACGGGAAGTGCCACGACTCCAGCAGCAAGT
    E I K D L Q V E V K G K V T S L D H K V

6601 CACGGGTGTAGGCACCCAGACCGGCCAGCCAGATCTTGCGCGCGTAGCCACGCACTTCAC 6660
    GTGCCACATCCGTGGGTCTGGCCGGTCCGGTCTAGAACGCGCGCATCGGTGCGTGAAGTG
    R T Y A G L G A L W I K R A Y G R V E S

6661 TCAGGCTGCTCTGAACGTCGTCTTTTCTTCAGGATTACTTTGGCCATGCTCGGCACCT 6720
    AGTCCGACGAGACTTGCAGCAGAAAAAGAAGTCCTAATGAAACCGTACGAGCCGTGGA
    L S S Q V D D K K K L I V K A M
    ◀ PhaI

6721 CACACTCATGACGGAATGGAAGAACGCCACGGATTTCGGGGACTGGAAGCCAAAGTACGG 6780
    GTGTGAGTACTGCCTTACCTTCTTGCGGGTGCCTAAGCCCCTGACCTTCGGTTTCATGCC

6781 AGAAAAATTAGAATCGGCACCCTAACAGCAGCTGCAAGTCATGAGCTGCAAGCTTCAAGC 6840
    TCTTTTAAATCTTAGCCGTGGGATTGTGTCGTCGACGTTTCAGTACTCGACGTTTCAAGTTTCG

6841 AGAACTGCGGCGGAACCGACGCCGCGCCACACCAGAACGTCCTTGGGGCTTGCAGCTTG 6900
    TCTTGACGCCGCTTGGCTGCGGCGCCGGTGTGGTGTGCTTGCAGAACCCCGAACGTCGAAC
```

Cuando se comparan las secuencias obtenidas con las de otras especies de *Pseudomonas*, se observa que existe una gran similitud entre los genes que componen este *locus pha* en las distintas especies, lo que demuestra, como ya indicábamos anteriormente, que el *locus pha* es una región muy conservada en estas bacterias (Prieto *et al.*, 2007). Por ello, y teniendo en cuenta la homología entre las proteínas, podemos atribuir a los genes secuenciados las funciones correspondientes del *cluster pha*.

A continuación, se muestra un alineamiento de las secuencias proteicas codificadas por estos genes en distintas especies, realizado con la herramienta bioinformática Clustal Omega del EBI.

# Resultados y Discusión

## PhaC1

P. putida N	MSNKNNDELQRQASENTLGLNPVIGIRRKDLLSARTVLRQAVRQPLHSAKHVAHFGLEL	60
P. putida DOC21	MSNKNNDDLQRQASENTLGLNPVIGLRRKDLLTSARMVLRQAIRQPLHSAKHVAHFGMEL	60
P. putida U	MSNKNNDELQRQASENTLGLNPVIGIRRKDLLSARTVLRQAVRQPLHSAKHVAHFGLEL	60
P. putida KT2440	MSNKNNDELQRQASENTLGLNPVIGIRRKDLLSARTVLRQAVRQPLHSAKHVAHFGLEL	60
P. aeruginosa	MSQKNNNELPKQAAGENTLNLNPVIGIRKDLLTSARMVLLQAVRQPLHSAKHVAHFSLEL	60
	*:***:.:* .*:***.*****:* ****:* ** *:*****:*****:.**	
P. putida N	KNVLLGKSSLAPDSDDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTYLAWRKELQDWVSSDLSPPQDISR	120
P. putida DOC21	KDVIFGKSSLQPESSDDRRFNDPAWSQNPLYRRLQTYLAWRKELHDWIGDSSLSPTDISR	120
P. putida U	KNVLLGKSSLAPESDDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTYLAWRNELQDWIGNSDLPQDISR	120
P. putida KT2440	KNVLLGKSSLAPDSDDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTYLAWRKELQDWVSSDLSPPQDISR	120
P. aeruginosa	KNVLLGQSELRPDSDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTYLAWRKELHSHSDLSPPQDISR	120
	*:***:.:* ** .*****.*****:****:*:*****:***:.:* * * ****	
P. putida N	GQFVINLMTEAMPTNTLSNPAAVKRFETGGKSLLDGLSNLAKDMVNNGGMPQVNMMDA	180
P. putida DOC21	AHFVINLMTEAMPTNSAANPAAVKRFETGGKSLLDGLSNLAKDLVNNGGMPQVNMMDA	180
P. putida U	GQFVINLMTEAMPTNTLSNPAAVKRFETGGKSLLDGLSNLAKDMVNNGGMPQVNMMDA	180
P. putida KT2440	GQFVINLMTEAMPTNTLSNPAAVKRFETGGKSLLDGLSNLAKDMVNNGGMPQVNMMDA	180
P. aeruginosa	GQFVINLLTEAMPTNSLSNPAAVKRFETGGKSLLDGLGHLAKDLVNNGGMPQVNMMDA	180
	.:****:.***:***: .*****.*****.*****.*****:*****:*****:***	
P. putida N	FEVGKNLGTSEGAVVYRNDVLELIQYSPITEQVHARPLLVPVPPQINKFYVFDLSPEKSLA	240
P. putida DOC21	FEVGKNLGTSEGSVYRNDVLELIQYNPITEQVHERPLLVPVPPQINKFYVFDLSPEKSLA	240
P. putida U	FEVGKNLGTSEGAVVYRNDVLELIQYSPITEQVHARPLLVPVPPQINKFYVFDLSPEKSLA	240
P. putida KT2440	FEVGKNLGTSEGAVVYRNDVLELIQYSPITEQVHARPLLVPVPPQINKFYVFDLSPEKSLA	240
P. aeruginosa	FEVGKNLATTEGAVVFRNDVLELIQYRPITESVHERPLLVPVPPQINKFYVFDLSPEKSLA	240
	*****:*.:*:***:***** ****:* *****.*****:*****	
P. putida N	RFCLRSQQQTFIIISWRNPTKAQREWGLSTYIDALKEAVDAVLAITGSKDLNMLGACSGGI	300
P. putida DOC21	RFCLRSVQVTFIIISWRNPTKAQREWGLSTYIDALKEAVDVVLAITGSKDLNMLGACSGGI	300
P. putida U	RYCLRSQQQTFIIISWRNPTKAQREWGLSTYIDALKEAVDAVLAITGSKDLNMLGACSGGI	300
P. putida KT2440	RFCLRSQQQTFIIISWRNPTKAQREWGLSTYIDALKEAVDAVLSITGSKDLNMLGACSGGI	300
P. aeruginosa	RFCLRNGVQTFIVSWRNPTKSQREWGLTYIEALKEALEVLSITGSKDLNMLGACSGGI	300
	*:*** . ****.*****.*****:***:*****:..*:*****:*****	
P. putida N	TCTALVGHYAAIGENKVNALTLVSVLDTTMDNQVALFVDEQTLAAKRHSYQAGVLEGS	360
P. putida DOC21	TCTALVGHYAAALGEKKNAMTLVSVLDTTLDTQVALFVDEQTLAAKRHSYQAGVLEGR	360
P. putida U	TCTALVGHYAAIGENKVNALTLVSVLDTTMDNQVALFVDEQTLAAKRHSYQAGVLEGS	360
P. putida KT2440	TCTALVGHYAAIGENKVNALTLVSVLDTTMDNQVALFVDEQTLAAKRHSYQAGVLEGS	360
P. aeruginosa	TTATLVGHYVASGEKKNNAFTQLVSVLDFELNTQVALFADEKTLAAKRHSYQAGVLEK	360
	* .:*****.* **:****:* ***** :.*****.***:***:***:*****	
P. putida N	EMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLPAAFHGDLIEMFKSNP	420
P. putida DOC21	DMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLPAAFHGDLIEMFKSNP	420
P. putida U	EMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLPAAFHGDLIEMFKSNP	420
P. putida KT2440	EMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLPAAFHGDLIEMFKSNP	420
P. aeruginosa	DMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNQPPAFDILYWNNDTTRLPAALHGEFVELFKSNP	420
	:*****.*****:***:*****:***:..*:***.*	
P. putida N	LTRPDALVCGTAIDLKQVKCDIYSLAGTNDHITPWPSCYRSAHLFGGKIEFVLSNSGHI	480
P. putida DOC21	LVRADALVCGTPIDLKQVTTDFCVAGTNDHITPWKSCYKSAQLFGGNVEFLLSNSGHI	480
P. putida U	LIRPDALVCGTPINLKNVQCDIFSVAGTADHITPWQSCYRSAHLFGGKIEFVLSNSGHI	480
P. putida KT2440	LTRPDALVCGTAIDLKQVKCDIYSLAGTNDHITPWPSCYRSAHLFGGKIEFVLSNSGHI	480
P. aeruginosa	LNRPDALEVSGTPIDLKQVTCDFYCVAGLNDHITPWESCYKSARLLGGKCEFILLSNSGHI	480
	* * .****.* **:*** * :.:** ***** **:***:* **:******	
P. putida N	QSILNPPGNPKARFMTGADRPDPAVWQENATKHADSWWLHWQSWLGERAGALKKAPTRL	540
P. putida DOC21	QSILNPPGNPKARYMTSSEMPADADHWQENSSKHTDSWPLYWQTWLRDRSAGALKKSPTRL	540
P. putida U	QSILNPPGNPKARFMTGADRPDPAVWQENATKHADSWWLHWQSWLGERAGALKKAPTRL	540
P. putida KT2440	QSILNPPGNPKARFMTGADRPDPAVWQENATKHADSWWLHWQSWLGERAGALKKAPTRL	540
P. aeruginosa	QSILNPPGNPKARFMTNPELPAEPKAWLEQAGKHADSWWLHWQSWLWLAERSGKTRKAPASL	540
	*****.*****:*. * :. * **:* *****:* **:***:* **:*** *	
P. putida N	GNRAYAAGEASPGTYVHER*	559
P. putida DOC21	GNKAYPAGEASPGTYVHER*	559
P. putida U	GNRAYAAGEAAPGTYVHER*	559
P. putida KT2440	GNRTYAAGEASPGTYVHER*	559
P. aeruginosa	GNKTYPAGEAAPGTYVHER*	559
	**:.:* *****.*****	

## Resultados y Discusión

### PhaZ

<i>P. aeruginosa</i>	MPQPFVVRTIDLDGQTI RTAVRPGKKGSTPLLI FNGIGANLELVFPFVQALDPELEVI AF	60
<i>P. putida</i> DOC21	MPQPYIFRTVDLDGQTI RTAVRPGKPHLTPLLI FNGIGANLELVFPFI QALDPELEVI AF	60
<i>P. putida</i> U	MPEFYIFRTVELDDQSI RTAVRPGKPHLTPLLI FNGIGANLELVFPFIEALDPELEVI AF	60
<i>P. putida</i> N	MPQPYIFRTVELDQSI RTAVRPGKPHLTPLLI FNGIGANLELVFPFI DALDPELEVI AF	60
<i>P. putida</i> KT2440	MPQPYIFRTVELDNQSI RTAVRPGKPHLTPLLI FNGIGANLELVFPFI DALDPELEVI AF	60
	**.:*.:**.:** *.:***** *****:*****.:**.:**.:*****	
<i>P. aeruginosa</i>	DVPGVGSSTPSVYRFPGLAKLAARMLDYLDYGQVNAIGVSWGALAQQFAHDYPERCK	120
<i>P. putida</i> DOC21	DVPGVGSSTPRHPYRFPGLAKLTARMLDYLDYGQVNVIGVSWGALAQQFAHDYPERCK	120
<i>P. putida</i> U	DVPGVGSSTPRHPYRFPGLAKLTARMLDYLDYGQVSAIGVSWGALAQQFAHDYPERCK	120
<i>P. putida</i> N	DVPGVGSSTPRHPYRFPGLAKLTARMLDYLDYGQVNVIGVSWGALAQQFAHDYPERCK	120
<i>P. putida</i> KT2440	DVPGVGSSTPRNRYRFPGLAKLTARMLDYLDYGQVNVIGVSWGALAQQFAHDYPERCK	120
	***** *****:***** *****:***** *****:***** *****	
<i>P. aeruginosa</i>	KLILAATSAGAVMPGKPKVLMRMAPRRIYQPSYGVHIAPDIYGGAFRRDPKLAMAHAS	180
<i>P. putida</i> DOC21	KLVLAATAAGAVMPGKPKVLMASPRRYVQPSHVIRIAPEIYGGAFRRNPDALSHAS	180
<i>P. putida</i> U	KLVLAATAAGAVMPGKPKVLMMASPRRYVQPSHVIRIAPLIYGGAFRRDPDLAMHHAS	180
<i>P. putida</i> N	KLVLAATAAGAVMPGKPKVLMMASPRRYVQPSHVIRIAPMIYGGFRRDPDLAMHHAA	180
<i>P. putida</i> KT2440	KLVLAATAAGAVMPGKPKVLMMASPRRYVQPSHVIRIAPMIYGGFRRDPDLAMHHAA	180
	**.:**.:***** *****:***.:**.:** *.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	KVRSSGKLGYYWQLFAGLGWTSIHWLHRI RQPTLVLAGDDDP I I PLINMRVLAWRIPNAE	240
<i>P. putida</i> DOC21	KVRSSGKLGYYWQLFAGLGWTSIHWLHKIQQPTLVLAGDDDP I I PLINMRFLAWRIPNAQ	240
<i>P. putida</i> U	KVRSSGKLGYYWQLFAGLGWTSIHWLHKIQQPTLVLAGDDDP I I PLVNMRLAWRIPNAQ	240
<i>P. putida</i> N	KVRSSGKLGYYWQLFAGLGWTSIHWLHKIQQPTLVLAGDDDP I I PLINMRLLAWRIPNAQ	240
<i>P. putida</i> KT2440	KVRSSGKLGYYWQLFAGLGWTSIHWLHKIQQPTLVLAGDDDP I I PLINMRLLAWRIPNAQ	240
	****.***** *****:***.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	LHVIDDGHFLVTRAEVAPIIMKFLAEERRAVMHPRPFPLPKTG*	285
<i>P. putida</i> DOC21	LHIIDDGHFLITRAEAVAPIIMKFLQERQRAVMHPRPAPNA*--	283
<i>P. putida</i> U	LHIIDDGHFLITRAEAVAPIIMKFLQERQRAVMHPRPASGG*--	283
<i>P. putida</i> N	LHIIDDGHFLITRAEAVAPIIMKFLQERQRAVMHPRPASGG*--	283
<i>P. putida</i> KT2440	LHIIDDGHFLITRAEAVAPIIMKFLQERQRAVMHPRPASGG*--	283
	**.:*****:***.:***** :**.:*****	

### PhaC2

<i>P. aeruginosa</i>	MREKQESGSPVPAEFMSAQSAIVGLRGKDLLTIVRS LAVHGLRQPLHSARHLVAFGGQL	60
<i>P. putida</i> DOC21	MNDKPAKATAPTAAAYINVQSAVVGRLGRDLVSTLRHVGRHGLRHPLHTARHMLALGGQL	60
<i>P. putida</i> U	MTEKPKGKTTLPATSMNVQNA I LGLRGRDLVSTLRRVGRHGLTNPLHTARHLLAFGGQL	60
<i>P. putida</i> N	MKDPAKGSTTLPATRMNVQNA I LGLRGRDLLSTLRNVGRHGLRHPLHTAHHLLALGGQL	60
<i>P. putida</i> KT2440	MTDKPAKGSTTLPATRMNVQNA I LGLRGRDLLSTLRNVGRHGLRHPLHTAHHLLALGGQL	60
	*:* ..: ** :..*.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	GKVLGDTLHQPNPQDARFQDP SWRLNPFYRRTLQAYLAWQKQLLAWIDESNLDCDDRAR	120
<i>P. putida</i> DOC21	GRVLLGDAPYQPAARDNRFNDPAWTLNPFYRRGLQAWLAWQKQTRNWI DESQLSDDDRAR	120
<i>P. putida</i> U	GRVMLGDTPYQPNPRDRFSDPTWSQNPFYRRGLQAYLAWQKQTRQWIDESHLDDDDRAR	120
<i>P. putida</i> N	GRVMLGDTPYQPNPRDARFSDPTWSQNPFYRRGLQAYLAWQKQTRQWIDESHLNDDDRAR	120
<i>P. putida</i> KT2440	GRVMLGDTPYQPNPRDARFSDPTWSQNPFYRRGLQAYLAWQKQTRQWIDESHLNDDDRAR	120
	*.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	ARFLVALLSDAVAPSNSLINPLALKEFNTGGISLLNGVRHLLLEDLVHNGMPSQVKNKA	180
<i>P. putida</i> DOC21	AHFLFSLNDVAPSNTLLNPLAIKELFNSSGGLSVKGLGHLLDRLRHNHGMPRQVAKDA	180
<i>P. putida</i> U	AHFLFGMINDALAPSNSLLNPLAVKELNLTGGQSLVRGVVAHLLDRLRHNHGLPRQVDERA	180
<i>P. putida</i> N	AHFLFNLINDALAPSNSLLNPLAVKELFNTGGQSLVRGVVAHLLDRLRHNHGLPRQVDERA	180
<i>P. putida</i> KT2440	AHFLFNLINDALAPSNSLLNPLAVKELFNTGGQSLVRGVVAHLLDRLRHNHGLPRQVDERA	180
	*.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	FEIGRNLAATQGA VFRNEVELI IQYKPLGERQYAKPLLIVPPQINKFYIFDLSPEKSFV	240
<i>P. putida</i> DOC21	FEVGHNLAAATPGAVVFRNELLELIQYSMPSEKQYARPLVVPQINKFYVFDLNPANSLV	240
<i>P. putida</i> U	FEVGGSLAAATPGAVVFRNELLELIQYKPMSEKQHARPLLIVPPQINKFYIFDMQAHNSFV	240
<i>P. putida</i> N	FEVGANLAATPGAVVFRNELLEPIQYSMPSEKQHARPLLIVVSPQINKFYIFDLSATNSFV	240
<i>P. putida</i> KT2440	FEVGVNLAATPGAVVFRNELLELIQYSMPSEKQHARPLLIVPPQINKFYIFDLSATNSFV	240
	**.:* ..:***.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
<i>P. aeruginosa</i>	QYALKNNLQV FV I SWRNPD AQHREWGLSTYVEALDQAI E V SREITGSRVNLGACAGGL	300
<i>P. putida</i> DOC21	QYMLKNGLQTFMI SWRNPDPRHREWGLSSYVA AVEEALNVCRAITGSRVNLGACAGGL	300
<i>P. putida</i> U	QYMLKSGLQV FMI SWRNPDPRHREWGLSSYVQALEEALNACRSISGNRDPNLMGACAGGL	300
<i>P. putida</i> N	QYMLKSGLQV FV M V SWRNPDPRHREWGLSSYVQALEEALNACRSISGNRDPNLMGACAGGL	300
<i>P. putida</i> KT2440	QYMLKSGLQV FV M V SWRNPDPRHREWGLSSYVQALEEALNACRSISGNRDPNLMGACAGGL	300
	** *..*.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	

## Resultados y Discusión

<i>P. aeruginosa</i>	TVAALLGHLQVRRQLRKVSSVTYLVSLDLSQMESPAMLFADEQTLESSKRRSYQHGVLGD	360
<i>P. putida</i> DOC21	TMAALQGHLLQAKRQLRRVHSASYLVSLDLSALDSPASLFADEQTLEAAKRRSYQQGVLDG	360
<i>P. putida</i> U	TMAALQGHLLQAKHQLRKRIRSATYLVSLDLSKFDSPASLFADEQTVEAAKRRSYQRGVLDG	360
<i>P. putida</i> N	TMAALQGHLLQAKQQLRRVRSATYLVSLDLSKFEPSASLFADEQTI EAAKRRSYQRGVLDG	360
<i>P. putida</i> KT2440	TMAALQGHLLQAKQLRRVRSATYLVSLDLSKFEPSASLFADEQTI EAAKRRSYQRGVLDG	360
	*:*** **:::***: *.:***** :*** **:::***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	RDMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGRQPPAFDILYWNNDNTRLPAAFHGELLDLFFKH	420
<i>P. putida</i> DOC21	GEMSRVFAWMRPNDLVWNYFVNNYLLGKSPPAFDILYWNDCSRLPAALHGDLLDFFKYN	420
<i>P. putida</i> U	GEVARIFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGKAPPAFDILYWNADNTRLPAALHGDLLDFFKH	420
<i>P. putida</i> N	GEVARIFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGKTPPAFDILYWNADNTRLPAALHGDLLDFFKLN	420
<i>P. putida</i> KT2440	GEVARIFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGKTPPAFDILYWNADNTRLPAALHGDLLDFFKLN	420
	:::***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	PLTRPGALEVSGTAVDLGKVAIDS FHVAGITDHI TPWDVYRSALLLGGQRRFVLSNSGH	480
<i>P. putida</i> DOC21	PLAHSAGLEVCGTPI DLHKVTVD SFHVAGSNDHI TPWDVYRSALLLGGERRFVLSNSGH	480
<i>P. putida</i> U	PLTHPAGLEVCGTPI DLKQVDLDSFTVAGSNDHI TPWDVYRSALLLGGDRRFVLSNSGH	480
<i>P. putida</i> N	PLAYASGLEVCGTPI DLQVNI DSFTVAGSNDHI TPWDVYRSALLLGGERRFVLSNSGH	480
<i>P. putida</i> KT2440	PLTYASGLEVCGTPI DLQVNI DSFTVAGSNDHI TPWDVYRSALLLGGERRFVLSNSGH	480
	**:. .***.* ** : * : * : * * * * . *****:***:***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	IQSIINPPGNPKACYFENDKLSDDPRAWYDAKREEGSWWPVWLQWLERSGELGNPDFN	540
<i>P. putida</i> DOC21	VQSIINPPGNPKSHYVHNPKLSDPRAWYDAEKTDGSSWPLWLEWIQQRSALRETDAT	540
<i>P. putida</i> U	IQSIINPPGNPKAYYLENPKLSGDPRAWFYEAKRSDGSSWPLWLEWITPRSGPLKAPRTE	540
<i>P. putida</i> N	IQSIINPPGNPKAYYLANPKLSDPRAWFHDAKRSEGSWWPVWLWLEWITARSGLLKAPRTE	540
<i>P. putida</i> KT2440	IQSIINPPGNPKAYYLANPKLSDPRAWFHDAKRSEGSWWPVWLWLEWITARSGLLKAPRTE	540
	:***:***:***: * . * * * .*****:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	LGSAAHPLEAAPGTYVHIR*	560
<i>P. putida</i> DOC21	LGSANYPPMDPAPGKYVLVR*	560
<i>P. putida</i> U	LGNSTYPLGPAPGTYVLTR*	560
<i>P. putida</i> N	LGNATYPLGPAPGTYVLTR*	560
<i>P. putida</i> KT2440	LGNATYPLGPAPGTYVLTR*	560
	**:. : ** : * * * . * * * **	

### PhaD

<i>P. aeruginosa</i>	MKTRDRILECSLLLFNEQGEPNVSTLEIANELGISPGNLYYHFGKEPLVMALFERFQAE	60
<i>P. putida</i> DOC21	MKTRDRILECALHLFNQQGEPNVSTLEIANELGISPGNLYYHFGKEPLVLGLFRFEE	60
<i>P. putida</i> N	MKTRDRILECALQLFNQQGEPNVSTLEIANELGISPGNLYYHFGKEPLVLGLFRFEEA	60
<i>P. putida</i> KT2440	MKTRDRILECALQLFNQQGEPNVSTLEIANELGISPGNLYYHFGKEPLVLGLFRFEEA	60
<i>P. putida</i> U	MKTRDRILECALQLFNQQGEPNVSTLEIANELGISPGNLYYHFGKEPLVLGLFRFEEA	60
	*****: * * * . *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	LAPLLDPPEEVRGAEDYWFLHLIVERLAHYRFLFQDLSNLTGRPLRARGIRTWLGAL	120
<i>P. putida</i> DOC21	LTPLLDPPPLGVRDAEDYWFLHLIVERMAQYRFLFQDLSNLTGRPLKLRDMRTLLNGL	120
<i>P. putida</i> N	LMPLLDPPLEVRDAEDYWFLHLIVERMAQYRFLFQDLSNLTGRPLKLRDMRSLINAI	120
<i>P. putida</i> KT2440	LMPLLDPPLEVRDAEDYWFLHLIVERMAQYRFLFQDLSNLTGRPLKLRDMRSLINAI	120
<i>P. putida</i> U	LMPLLDPPLDVRLDAEDYWFLHLIVERMAQYRFLFQDLSNLTGRPLKLRDMRSLINAL	120
	* ***** ** . *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>P. aeruginosa</i>	KRTLATLLARLKADRQLRSDAPALGQVLEQITLTLFSLDYQVRLGSKGEVRTVVYQIMM	180
<i>P. putida</i> DOC21	KRTLAALLASLKAQQQIHSDFRALGQVLEQITLTLFSLDYQVRLAKDAEVGIVVYQVMM	180
<i>P. putida</i> N	KRTLAALLASLKSQGLVESDTQALGQVLEQITLTLFSLDYQVRLGREGDVGIVVYQVMM	180
<i>P. putida</i> KT2440	KRTLAALLASLKSQGLVESDTQALGQVLEQITLTLFSLDYQVRLGREGDVGIVVYQVMM	180
<i>P. putida</i> U	KRTLAALLASLKGQGLVESSETQALGQVLEQITMTLTLFSLDYQVRLGREADVGIVVYQVMM	180
	*****:*** ** : . : * : *	
<i>P. aeruginosa</i>	LVAPHLRSEAQRSAESLAQRYLGPE*	205
<i>P. putida</i> DOC21	LVAPHLEAPSRHAAEQALRYLEG*-	204
<i>P. putida</i> N	LVAPHLQAQARAAAEQLAVKYLEG*-	204
<i>P. putida</i> KT2440	LVAPHLQAQARAAAEQLAVKYLEG*-	204
<i>P. putida</i> U	LVAPHLQPQARAAAEQLAVRYLEG*-	204
	*****. : : *	

## Resultados y Discusión

### PhaF

<i>P. aeruginosa</i>	MAGKKKSEKE--SSWIGEIEKYSRQIWLAGLGAYSKVSKDGSKLFETLVKDGEKAEKEAKS	59
<i>P. putida</i> DOC21	MAGKKNTEKESSSWIGGIEKYSRKIWLAGLVYSKVEQDGSKFVESLVKDGEKAEKQAKK	60
<i>P. putida</i> N	MAGKKNTEKESSSWVGIEKYSRKIWLAGLGIYSKIDQDGPFLFDSLVDGEKAEKQAKK	60
<i>P. putida</i> U	MAGKKNTEKESSSWVGIEKYSRKIWLAGLGIYSKVDQDGPFLFDSLVDGEKAEKQAKK	60
<i>P. putida</i> KT2440	MAGKKNTEKESSSWVGIEKYSRKIWLAGLGIYSKIDQDGPFLFDSLVDGEKAEKQAKK *****::*** **:* *****:***** ***:..** *:::*****:***	60
<i>P. aeruginosa</i>	DVDAQVGAAKASARSASKSKVDEVRDRALGKWSELEEFDKRLNSAISRLGVP SRNEVKEL	119
<i>P. putida</i> DOC21	SVDAVKDTAKDSAKSATS SRVADVDRALGKWSELEGAFFDKRLNSAISRLGVP SKNEIKAL	120
<i>P. putida</i> N	TAEDVAETAKS---STTSRVSGVKDRALGKWSELEEFDKRLNSAISRLGVP SRNEIKAL	117
<i>P. putida</i> U	TAEDVAETAKS---STTSRVSGVKDLAMGKWSELEEFDKRLNSAISRLGVP SRNEIKAL	117
<i>P. putida</i> KT2440	TAEDVAETAKS---STTSRVSGVKDRALGKWSELEEFDKRLNSAISRLGVP SRNEIKAL .: ** *.:** *:* *:***** *****:*****:*** * *	117
<i>P. aeruginosa</i>	HSKVDTLTKQIEKLTGVSVKPAAKAAAK---PAAKPAKPAAKTAAKPAKPAKAAKAAK	176
<i>P. putida</i> DOC21	HAKVDTLTKQIEKLTGASVTPISAKSSTATKAAAKPLAKPAAKTAAK-----	168
<i>P. putida</i> N	HQQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSRATAKPAASKAAAKPLAKAA-AK-----	164
<i>P. putida</i> U	HQQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSRAASKPAASKAAAKPLAKAAAK-----	165
<i>P. putida</i> KT2440	HQQVDSLTKQIEKLTGASVTPISSRAATKPAASKAAAKPLAKAA-AK----- * :*:*****.*** : : *:* ** **:* **	164
<i>P. aeruginosa</i>	PAAKPAAKKTAAKTAAKPAKPAAKPTAKAAAKPATKPAKAAAKPAKPAAKPAAKP	236
<i>P. putida</i> DOC21	PAAKPAAKPAAKAAAKPAAA---KPAAK-----PVAAPAAKPAVAKPA---	212
<i>P. putida</i> N	PAAKTAAPKPAAGKTAAPKPAK---TAAE-----KPAAPAAKPAKPAK---	206
<i>P. putida</i> U	PAAKTAAPKPAKTAAPKPAKPAAPAAA-----KPAAKPAKPAAPKPA---	211
<i>P. putida</i> KT2440	PAAKTAAPKPAAGKTAAPK---AAKTAEE-----KPAAPAAKPAKPAKPA---	206
	**** * *.:***** :* ***** *	
<i>P. aeruginosa</i>	AAKPAATAAKPAKPAKPAKPAKPAKPAKPAAPAAASSSA--PAAPATPAA	294
<i>P. putida</i> DOC21	-----AAKKPVARKAPAAKPAKPAAPAAASAPAAASAPAAASAP	252
<i>P. putida</i> N	-----AAKKPAVKKAPAAKPAKPAAPAAASTAPAAATAPAPAPA-	245
<i>P. putida</i> U	-----AAKKPAVKKAPAAKPAKPAAPAAASAPAAATAP--APV-	248
<i>P. putida</i> KT2440	-----AAKKPAVKKAPAAKPAKPAAPAAASAPAAATAP--ATA- *****.:* * *****: : ** :.	243
<i>P. aeruginosa</i>	SAPAANAPATPSSQG*---	309
<i>P. putida</i> DOC21	ATPAPSAPVTPSHT*---	267
<i>P. putida</i> N	ATPASSTPSAPTGTGLI*	263
<i>P. putida</i> U	AAPASSAPSAPNGTGLI*	266
<i>P. putida</i> KT2440	ATPASSTPSAPTGTGLI*	261
	::** .:* :*..	

### PhaI

<i>P. aeruginosa</i>	MAKIALKKKTVSESTSLVSEIRHYARQIWLAGLGAYSRLGTEGSDYFKELVKAGEALEKK	60
<i>P. putida</i> DOC21	MAKVILKKKD--DVQSSLSEVRGYARKIWLAGLGAYTRVQGESADYVKDLIKAGETVEKR	58
<i>P. putida</i> N	MAKVIVKKKD--EALGTLGEVRGYARKIWLAGIGAYARVQGESDYFQELVKAGEGVEKR	58
<i>P. putida</i> U	MAKVIVKKKD--EALGTLGEVRGYARKIWLAGIGAYARVQGESDYFQELVRAGEGVEKR	58
<i>P. putida</i> KT2440	MAKVIKKKD--EALDTLGEVRGYARKIWLAGIGAYARVQEGADYFKELVRAGEGVEKR ***: ** : . :.* ***:*****:***:* * :*.***:***:*** :*:	58
<i>P. aeruginosa</i>	GKSLVTSQVDSAN---DSVKTGLSSVKGKVEDQLDRIEQAFDSRVASTLNRIGIPSRNDV	117
<i>P. putida</i> DOC21	GKKVIDHELDAANAEIDSVKHDLSVTKGKVEVQLDKIEKAFDTRVASALNRIGIPSKHDV	118
<i>P. putida</i> U	GKKRIDKELDAANHQLDEAAEEVSRVRGKVEIQDKIEKAFDARVGRALNRLGIPSKHDV	118
<i>P. putida</i> N	GKKRIDKELDAANHQLDEVGEEVNRVRGKVEIQDKIEKAFDARVGRALNRLGIPSKHDV	118
<i>P. putida</i> KT2440	GKKRIDKELDAANHQLDEVGEEVSRVRGKVEIQDKIEKAFDARVGRALNRLGIPSKHDV ** . : :*:** *.. :. *:***** ***:**:* ***:** :***:*****:***	118
<i>P. aeruginosa</i>	EALSAKLDELSAVLERVARTQ*	138
<i>P. putida</i> DOC21	EALSAKLDELTAALLERVTKK*	139
<i>P. putida</i> U	EALSVKLEQLHELLERVAHKP*	139
<i>P. putida</i> N	EALSIKLEQLHELLERVAHKP*	139
<i>P. putida</i> KT2440	EALSIKLEQLHELLERVAHKP* **** **:* :****: . *	139

La comparación de los genes que integran el *cluster* se hizo por alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, con las especies *P. putida* N, *P. putida* DOC21, *P. putida* U, *P. putida* KT2440 y *P. aeruginosa*. Dicha comparación se realizó con la herramienta bioinformática BLAST. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Comparación de los genes y de las proteínas correspondientes a los *clusters pha* de *P. putida* N y *P. putida* DOC21 con las de otros pseudomonádidos. Se indica la identidad (obtenida mediante alineamiento global con la herramienta Clustal Omega<sup>1</sup>) y similitud (obtenida por alineamiento local con el programa BLASTP).

Cepa	Cluster <i>pha</i> ( <i>pb</i> ) <sup>2</sup>	Proteína	Aminoácidos			
			<i>P. putida</i> N		<i>P. putida</i> DOC21	
			Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>Pseudomonas putida</i> N	6286	PhaC1 <sub>N</sub>	100	100(559/559)	86,76	93(521/559)
		PhaZ <sub>N</sub>	100	100(283/283)	93,64	97(272/280)
		PhaC2 <sub>N</sub>	100	100(560/560)	78,57	90(507/560)
		PhaD <sub>N</sub>	100	100(204/204)	86,76	93(191/204)
		PhaF <sub>N</sub>	100	100(263/263)	73,85	91(135/147) <sup>3</sup>
		PhaI <sub>N</sub>	100	100(139/139)	69,06	82(114/138)
<i>Pseudomonas putida</i> DOC21	6539	PhaC1 <sub>DOC21</sub>	86,76	93(521/559)	100	100(559/559)
		PhaZ <sub>DOC21</sub>	93,64	97(272/280)	100	100(283/283)
		PhaC2 <sub>DOC21</sub>	78,57	90(507/560)	100	100(560/560)
		PhaD <sub>DOC21</sub>	86,76	93(191/204)	100	100(204/204)
		PhaF <sub>DOC21</sub>	73,85	91(135/147) <sup>3</sup>	100	100(267/267)
		PhaI <sub>DOC21</sub>	69,06	82(114/138)	100	100(139/139)
<i>Pseudomonas putida</i> U	6297	PhaC1 <sub>U</sub>	96,24	98(549/559)	86,23	93(522/559)
		PhaZ <sub>U</sub>	96,47	98(279/283)	92,58	97(272/280)
		PhaC2 <sub>U</sub>	90,71	95(533/560)	77,50	88(497/560)
		PhaD <sub>U</sub>	94,61	97(199/204)	86,27	92(188/204)
		PhaF <sub>U</sub>	93,10	98(140/142) <sup>3</sup>	75	90(131/145) <sup>3</sup>
		PhaI <sub>U</sub>	94,96	97(136/139)	69,78	82(114/138)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	6280	PhaC1 <sub>KT2440</sub>	99,46	99(557/559)	86,40	92(519/559)
		PhaZ <sub>KT2440</sub>	98,94	100(283/283)	92,93	97(272/280)
		PhaC2 <sub>KT2440</sub>	98,93	99(555/560)	78,75	90(508/560)
		PhaD <sub>KT2440</sub>	100	100(204/204)	86,76	93(191/204)
		PhaF <sub>KT2440</sub>	96,90	96(253/263)	75	77(151/194)*
		PhaI <sub>KT2440</sub>	96,40	97(136/139)	71,22	82(114/138)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6749	PhaC1 <sub>aeru</sub>	79,43	87(491/559)	79,07	89(499/559)
		PhaZ <sub>aeru</sub>	84,10	93(270/279)	85,16	94(264/279)
		PhaC2 <sub>aeru</sub>	69,11	82(464/560)	68,93	83(466/560)
		PhaD <sub>aeru</sub>	76,47	88(178/202)	77,45	84(171/202)
		PhaF <sub>aeru</sub>	69,69	82(115/139) <sup>3</sup>	72,80	87(122/139) <sup>3</sup>
		PhaI <sub>aeru</sub>	58,09	77(107/138)	66,18	84(116/137)

<sup>1</sup>La identidad indicada por el software de alineamiento (Clustal Omega) se calcula sobre el total de aminoácidos de la secuencia.

<sup>2</sup>El tamaño de los *cluster pha* se determinó teniendo en cuenta la secuencia comprendida desde el primer nucleótido del gen *phaCI* hasta el primer nucleótido del gen *phaI*.

<sup>3</sup>Los valores de similitud calculados por el alineamiento realizado por BLASTP son inferiores a los reales.

Como puede observarse en los alineamientos y en la Tabla 6, la similitud de las secuencias aminoacídicas de PhaC1 y PhaC2 de *P. putida* N es prácticamente total con las de *P. putida* KT2440, (99%), variando solo 3 y 6 aminoácidos respectivamente. Ambas cepas comparten valores similares para el resto de los genes analizados, siendo las similitudes siempre superiores al 95%. Como era de esperar, las mayores diferencias se observan al realizar la comparación con los genes de *P. aeruginosa*, lo que es lógico ya que se trata de una especie diferente. En este caso, las polimerasas PhaC1 y PhaC2 comparten una similitud del 87% y 82% respectivamente, como resultado de una variabilidad de 63 aminoácidos sobre un total de 559 en PhaC1 y de 96 aminoácidos del total de 560 en el caso de PhaC2.

Las diferencias observables entre *P. putida* DOC21 y el resto de las agrupaciones génicas *pha*, aunque mayores, no son especialmente significativas, es decir, el grado de conservación es muy alto. Las polimerasas presentan una similitud de en torno al 90% con las de otras cepas de *P. putida* comparadas (93% con la PhaC1 de las estirpes N y U, y 90% con la PhaC2 de las estirpes N y KT2440). Los porcentajes de similitud que se obtienen al alinear las polimerasas con las de *P. aeruginosa* no son muy diferentes, 89% en el caso de PhaC1 y 83% en el de PhaC2.

En todas las estirpes comparadas, la triada catalítica que constituye el centro activo de PhaC1 se encuentra muy conservada y estaría formada por los residuos Cys296, Asp451 y His479 (Amara y Rehm, 2003; Wahab *et al.*, 2006). En el caso de PhaC2, los residuos catalíticos son Cys 296, Asp 452 y His 480, que se encuentran igualmente conservados entre las distintas estirpes, y cuyas posiciones prácticamente coinciden con las de PhaC1. De este modo, y como ya había sido descrito previamente para las polimerasas de otros pseudomonádidos, la cisteína reactiva también forma parte en *P. putida* N y *P. putida* DOC21 de una caja lipasa conservada del tipo G-X-C-X-G (G-A-C-S-G en todas las estirpes comparadas de PhaC1 y G-A-C-A-G en PhaC2) (Amara y Rehm, 2003; Wahab *et al.*, 2006).

El alineamiento del resto de genes del locus (*phaZ*, *phaD*, *phaF* y *phaI*) reveló también elevados porcentajes de similitud, siendo ésta ligeramente superior entre los genes de las especies utilizadas en esta comparación y los de *P. putida* N que con los de *P. putida* DOC21 (Tabla 6).

Si bien el *cluster pha* está compuesto por seis genes, las proteínas que codifican se pueden clasificar en cuatro tipos distintos atendiendo a su función: polimerasas (PhaC1 y PhaC2), despolimerasas (PhaZ), reguladores transcripcionales (PhaD) y proteínas estructurales



(PhaF y PhaI). A continuación describiremos los resultados derivados de los estudios comparativos entre aquellas proteínas que desempeñan funciones similares, ya que como queda recogido en la bibliografía, su elevado parecido en otras estirpes se asocia con un origen y una estructura común (Prieto *et al.*, 1999; Steinbüchel y Hein, 2001).

Las dos polimerasas PhaC1 y PhaC2 de *P. putida* N comparten entre sí una identidad a nivel de sus secuencias aminoacídicas del 55% y una elevada similitud que alcanza el 71%. Al llevar a cabo el mismo análisis con las dos polimerasas de *P. putida* DOC21 se obtuvo una identidad y similitud del 55% y del 74% respectivamente. Teniendo en cuenta su función común (polimerización de unidades 3-hidroxiacil-CoA) y su similitud, es muy probable que sus estructuras tridimensionales sean muy parecidas. Por otro lado, es razonable pensar que la explicación a la diferente especificidad de sustrato que se ha asociado a cada una de las polimerasas en distintas estirpes como *P. putida* U, radique en la disparidad de los residuos aminoacídicos en los que difieren ambas (Arias *et al.*, 2008). Esas mismas diferencias podrían también explicar la coexistencia y su conservación dentro de un mismo *cluster*.

Al igual que con las polimerasas, se hizo una comparación de las fasinas entre sí. Hay que tener en cuenta que estas proteínas estructurales tienen un tamaño diferente, siendo mayor PhaF, en cuyo extremo C-terminal se ha descrito un dominio de unión a DNA con repeticiones AAKP (Prieto *et al.*, 1999) y que también se encuentra en *P. putida* N y *P. putida* DOC21. Las repeticiones del extremo C-terminal varían ligeramente de unas cepas a otras, y la herramienta de alineamientos locales BLASTP no las reconoce, comparando sólo la región N-terminal, por lo que los valores de similitud indicados en la Tabla 6 son inferiores a los reales al no compararse la totalidad de la secuencia proteica.

Así, el alineamiento local realizado con la herramienta BLAST arrojó similitud entre las regiones N-terminal de ambas proteínas. La identidad entre dicha región N-terminal de ambas fasinas se situaba en *P. putida* N en un 33%, mientras que su similitud fue del 61%. Por su parte, para *P. putida* DOC21 la identidad ascendió al 41%, mientras que la similitud fue prácticamente idéntica a la anterior, un 63%. Teniendo en cuenta que ambas proteínas se organizan en la superficie de los gránulos de PHAs interaccionando, posiblemente, con el polímero, parece *a priori* lógico que exista esta semejanza entre ellas. De hecho, a partir de dicha semejanza se ha postulado la existencia de un módulo de interacción con el gránulo de PHAs, constituido por la porción amino terminal de PhaF y la secuencia completa de PhaI, y

de un dominio hipotético de interacción con el DNA de la proteína PhaF que quedaría expuesto hacia el exterior del gránulo (Moldes *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 1999).

Todos los genes del *cluster pha* pertenecientes a las distintas estirpes o especies guardan una gran similitud, por lo que el mecanismo catalítico de las enzimas, la funcionalidad y la regulación de todos ellos son probablemente similares. Sin embargo, una elevada similitud y una organización funcional similar no implican que la capacidad para acumular polímero sea, ni tan siquiera, parecida. Por un lado, tal y como se apuntó en la *Introducción* y como se verá en el apartado 7, la variación en un único aminoácido puede modificar la capacidad catalítica de las polimerasas e incluso inactivarlas. Por otro lado, otros genes y enzimas, como aquellas pertenecientes a las rutas que proporcionan derivados 3-hidroxiacil-CoA susceptibles de ser utilizados como monómeros por las polimerasas, pueden modificar la capacidad de producción; véase el caso del acúmulo de PHAs a partir de fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos (glucosa o glicerol) en *P. putida* KT2440 y la incapacidad de *P. putida* U o *P. putida* N para producir PHAs a partir de los mismos sustratos.

Si bien las secuencias correspondientes al *cluster pha* presentes de estas dos cepas son similares a las ya existentes, cuanta más información se posea de los distintos aminoácidos que pueden ocupar cada posición en cada una de las proteínas implicadas en la síntesis de PHAs, más fácilmente se podrá mejorar y optimizar el proceso biosintético.

## **2. Producción de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida* N**

La capacidad de producción de PHAs de naturaleza alifática se evaluó en la cepa *Pseudomonas putida* N, y se comparó con la de *Pseudomonas putida* U que, como se indicaba anteriormente, ha sido la cepa modelo utilizada para el estudio de PHAs en nuestro laboratorio.

### **2.1. Producción en medio mínimo suplementado con octanoato**

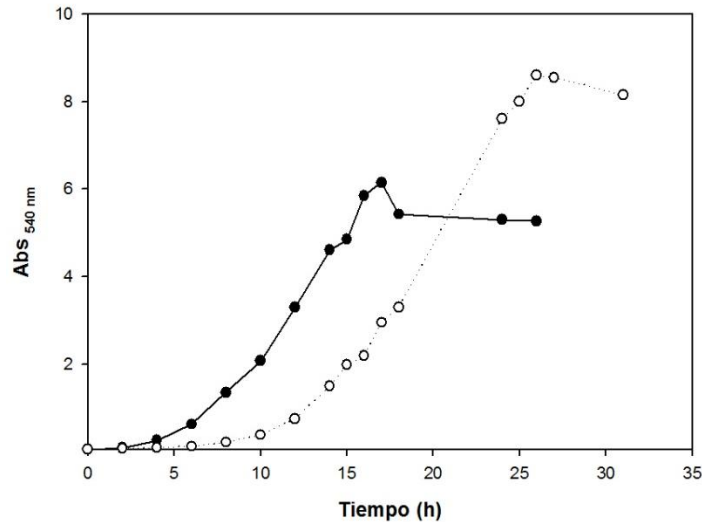
Estudios realizados anteriormente con *P. putida* U habían evaluado la capacidad de crecimiento y acúmulo de PHAs en esta bacteria a partir de diferentes ácidos alcanicos, tanto de cadena par como de cadena impar, utilizados como precursores de la síntesis de PHAs y/o fuentes de carbono y energía. De entre todos ellos, el octanoato era el sustrato con el que se conseguía un mayor crecimiento, y a partir del cual se obtenía una mayor producción de polímero (García, 2004). Por ello, para comparar la capacidad de producción de *P. putida* N

con la de *P. putida* U se llevaron a cabo cultivos utilizando un medio de composición química definida (abreviadamente MM) suplementado con octanoato (20 mM) como fuente de carbono (MMO).

El protocolo de producción de PHAs utilizado, está recogido en el apartado *Materiales y Métodos*. La producción y acúmulo de polímero en estas dos estirpes de *P. putida* transcurre ligado al crecimiento bacteriano, iniciándose en las primeras etapas del mismo. El máximo acúmulo se alcanza al final de la fase estacionaria de crecimiento, por lo que se hizo un seguimiento continuo de dicho crecimiento a través de la absorbancia del cultivo medida a 540 nm. A mayor número de células (crecimiento) y mayor tamaño de las mismas, como consecuencia del acúmulo de plástico, mayor es el valor de la absorbancia. También se realizaron preparaciones mediante tinción con fucsina de muestras tomadas del cultivo, con el fin de observar al microscopio óptico la progresión en el aumento de tamaño (y/o número) de los gránulos de bioplástico.

Las cinéticas de crecimiento muestran que existe diferencia en el comportamiento de ambas cepas. *Pseudomonas putida* N alcanza el punto álgido de crecimiento alrededor de las 17 h, obteniéndose un valor global de Abs<sub>540</sub> en torno a 6,2. Por su parte, la cepa *P. putida* U tarda más tiempo en alcanzar el máximo de absorbancia, unas 26 h, pero este valor también es mayor, llegando a 8,6 (Fig. 24). Sin embargo, el rendimiento obtenido para la producción de bioplástico con *P. putida* N una vez alcanzado el punto más álgido de la fase logarítmica de crecimiento es mayor (41,63 %) que con *P. putida* U (32,3 %), siendo esta diferencia (9%) considerable.

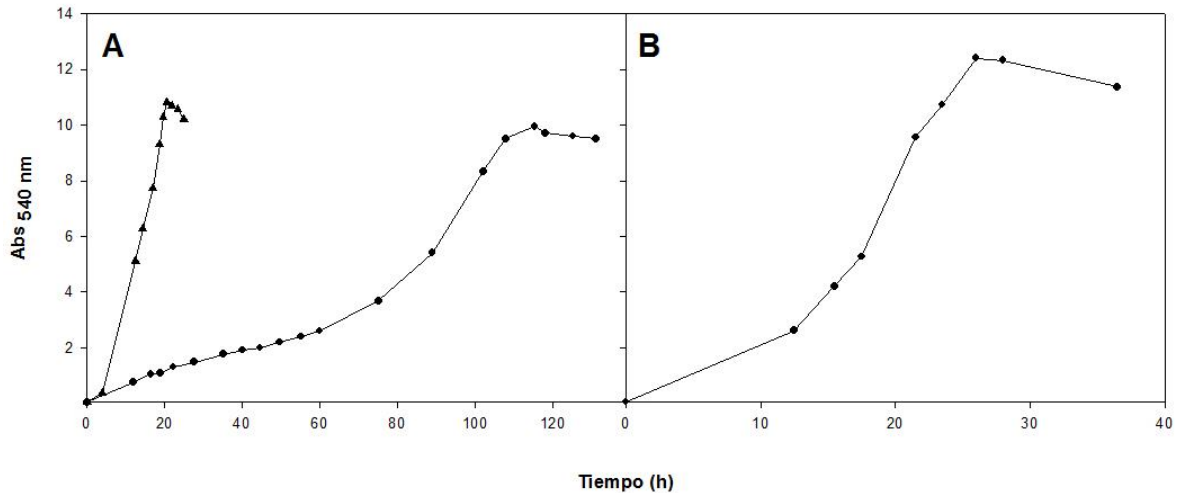
*P. putida* N alcanza el máximo crecimiento y, por tanto, agota la fuente de carbono, mucho antes que *P. putida* U. Teniendo en cuenta las diferencias en Abs<sub>540</sub> y acúmulo de PHAs entre ambas cepas, es posible que la bioconversión de octanoico en bioplástico sea más eficiente en *P. putida* N, habiendo un menor número de células (menor absorbancia) pero con mayor cantidad de PHAs. En el caso de *P. putida* U, un crecimiento más lento (flujo metabólico menor en la absorción y metabolismo de octanoato) propiciaría un agotamiento más tardío de la fuente de carbono (9 h más). En ese tiempo, *P. putida* U continuaría dividiéndose y consumiendo recursos para ello. La absorbancia, en este caso, sería mayor debido a que hay más células, pero con menos contenido en PHAs.



**Figura 24.** Cinéticas de crecimiento de *P. putida* N (●) y *P. putida* U (○) en MM suplementado con octanoato 20 mM.

## 2.2. Producción en medio mínimo suplementado con octanoato y glucosa

Con el fin de determinar el rendimiento en la producción de PHAs y tratando de incrementarlo, se variaron las condiciones de cultivo. Para ello, se aumentó la concentración de octanoato (30 mM), y se suplementó el medio con glucosa (1% p/v) (55,4 mM). Al disponer de una fuente de carbono alternativa como la glucosa, se esperaba que el octanoato se utilizase exclusivamente para la síntesis de PHAs. Si bien el cultivo se desarrolló adecuadamente con *P. putida* N cuando se aplicaron estas condiciones, en el caso de *P. putida* U se observó que esta bacteria crecía muy lentamente (Fig. 25A). Carnicero y colaboradores habían señalado, en trabajos previos sobre el transporte de octanoato en *P. putida* U, que al incrementar la concentración de 20 mM a 30 mM o a superiores, la capacidad para incorporar octanoato del medio se reducía considerablemente en esta cepa, señalando la existencia de un mecanismo que modula el transporte de octanoato a concentraciones que pueden ser tóxicas (Carnicero *et al.*, 1997). Dicho efecto no se observó con *P. putida* N como se puede apreciar en la figura 25A.

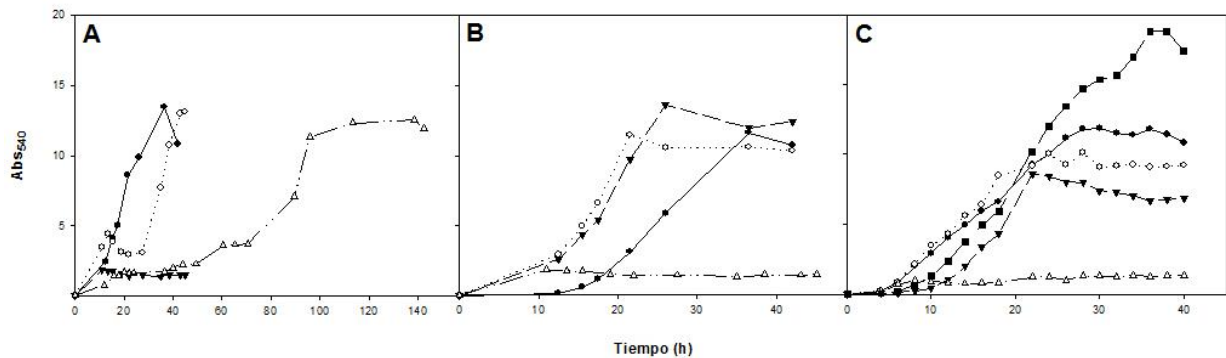


**Figura 25.** (A) Curvas de crecimiento de *P. putida* N (▲) y *P. putida* U (●) cultivadas en MM suplementado con octanoato 30 mM y glucosa 1% (p/v). Nótese que *P. putida* U tarda mucho más tiempo en alcanzar la fase estacionaria. (B) Cinética de crecimiento que describe *P. putida* U al ser cultivada en MM suplementada con octanoato 20 mM y glucosa 0,5% (p/v).

Adicionalmente, se realizaron distintos cultivos con *P. putida* U utilizando distintas concentraciones de octanoato y de glucosa (Fig. 26). A juzgar por las cinéticas de crecimiento, *P. putida* U es capaz de crecer razonablemente bien tanto en MM suplementado con glucosa 1% (p/v) como en MM suplementado con octanoato 30 mM. Sin embargo, existe algún tipo de interferencia entre ambas fuentes de carbono, ya que cuando se suplementan conjuntamente, el crecimiento de esta cepa se ralentiza notablemente. *P. putida* metaboliza la glucosa, previa conversión en gluconato, que es excretado al medio, reintroduciéndose luego en la célula, para ser degradado a través de la ruta de Ender-Doudoroff (Schleissner *et al.*, 1997). Dicha interferencia no se observa cuando se sustituye la glucosa por gluconato y se suplementa junto con el octanoato. Todos estos resultados sugieren que el octanoato afecta bien el transporte de glucosa o bien la conversión de ésta en gluconato.

Como puede observarse en la figura 25, una disminución significativa de las fuentes de carbono (glucosa 0,5% (p/v) y octanoato 20 mM) permite que el crecimiento de *P. putida* U sea mejor (Fig. 25B), alcanzando unos valores de Abs<sub>540</sub> superiores a los que se alcanzan en glucosa 1% (p/v) y octanoato 30 mM (Fig. 25A), en un lapso de tiempo mucho menor. El hecho de que se alcancen valores mayores de Abs<sub>540</sub> en un medio con una cantidad notablemente menor de fuente de carbono, puede ser debido a: i) que una vez alcanzado ese nivel de crecimiento se hubiese agotado algún nutriente esencial para continuar soportando el crecimiento, o se acumule algún subproducto tóxico; o a que ii) la interacción entre el metabolismo de la glucosa y del octanoato no sólo ralentice el crecimiento, sino que además altere los flujos metabólicos,

alcanzando un crecimiento menor al que se correspondería con esa cantidad de fuente de carbono.



**Figura 26.** Cinéticas de crecimiento de *P. putida* U en MM suplementado con distintas fuentes de carbono. A) glucosa 1% (p/v)(●) y glucosa 1% (p/v) con octanoato 10 mM (○), 20 mM (▼) y 30 mM (Δ). B) octanoato 30 mM (●) y octanoato 20 mM con glucosa 0,25% (p/v) (○), glucosa 0,5% (p/v) (▼) y glucosa 1% (p/v)(Δ). C) glucosa 1% (p/v) Rf (●), glucónico 1% (p/v) Rf (○), octanoato 20 mM Rf (▼), octanoato 20 mM y glucosa 1% (p/v) Rf (Δ), octanoato 20 mM y glucónico 1% (p/v) Rf (■).

Por ello, cuando se utilizó la cepa *P. putida* U, tanto el cultivo como los experimentos de producción se llevaron a cabo en medio que contenía octanoato 20 mM y glucosa al 0,5 % (p/v), condiciones en las que se observó que el crecimiento no sufría ningún comportamiento anómalo.

Los experimentos de producción se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior. En el caso de *P. putida* N, el crecimiento y acúmulo de PHAs alcanzaba el máximo a las 21 horas, con un valor para la Abs<sub>540</sub> de 10,8 y se obtuvo un rendimiento medio del 47,58% del peso seco de las bacterias (Fig. 25A). Este dato suponía un incremento del 6% con respecto al valor obtenido con octanoato 20 mM.

En el caso de *P. putida* U, el valor alcanzado en las condiciones indicadas fue del 28,15%, en un cultivo que alcanzó una Abs<sub>540</sub> de 12,4, y que se prolongó durante 26 horas (Fig. 25B). Este valor es ligeramente inferior al obtenido cuando se cultivaba únicamente en MMO. Al añadir una fuente adicional al medio, podría haberse esperado un mayor acúmulo de PHAs, ya que podría utilizar la glucosa para crecer y redirigir la mayor parte del octanoato hacia la síntesis de bioplástico. Sin embargo, teniendo en cuenta que la producción es menor (4% menos) que cuando solo se suministra octanoato en el medio, debemos asumir que existe algún tipo de interferencia entre ambas fuentes de carbono que tiene como resultado un menor acúmulo de PHAs.

Dado que la concentración de octanoato y de glucosa era menor que la empleada con *P. putida* N, no puede establecerse una comparación entre los rendimientos obtenidos con estas cepas. Sin embargo, sí podemos indicar que el hecho de que ambas cepas se comporten de forma distinta cuando se cultivan en un medio de cultivo análogo, pone de relieve diferencias metabólicas significativas entre ambas.

Se concluyó, pues, que *P. putida* N era mejor cepa productora de PHA que *P. putida* U, ya que cuando se cultivaron en las mismas condiciones (octanoato 20 mM) se obtuvo un mayor rendimiento con *P. putida* N (9% más) a pesar de que el valor de absorbancia era menor.

### 3. Construcción de cepas superproductoras de PHAs derivadas de *Pseudomonas putida* N

Uno de los principales aspectos en los que más se ha trabajado en los últimos años es la modificación genética de las cepas silvestres para incrementar los rendimientos obtenidos en la acumulación de polímero. En este sentido, se llevaron a cabo distintas estrategias para intentar obtener mutantes superproductores de PHAs con las cepas objeto de estudio en esta tesis. Modificaciones similares ya se habían llevado a cabo con éxito por miembros de nuestro grupo de investigación en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 2001b; Sandoval *et al.*, 2007), pero teniendo en cuenta que, como se ha visto en el apartado anterior, la cepa silvestre *P. putida* N produce más cantidad de polímero que ésta, se pretendía comprobar si realmente se podía incrementar el rendimiento obtenido con esta cepa o si, por el contrario, existe un límite por encima del cual no es posible incrementar la cantidad de PHAs acumulados mediante este tipo de aproximaciones.

#### 3.1. Expresión del gen *phaF* en *trans* en *P. putida* N

Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo (Sandoval *et al.*, 2007) habían demostrado que la expresión en *trans* del gen *phaF* en *P. putida* U comportaba un aumento del acúmulo de PHAs y una modificación apreciable en la organización de los gránulos de polímero (menor número y mayor tamaño de los mismos). Por ello, se llevaron a cabo experimentos similares en *P. putida* N esperando, como ya se había visto en *P. putida* U, alcanzar una mayor producción.

El gen *phaF* de *P. putida* U, clonado en el plásmido replicativo pBBR1MCS-3 (pMC), se utilizó para transformar *P. putida* N mediante conjugación triparental. También se obtuvo una cepa control mediante la introducción del plásmido sin inserto en la misma cepa. El plásmido lleva un gen de resistencia a tetraciclina (Tc, 25 µg/ml) que permite seleccionar ambos tipos de transconjugantes. Se comprobó la presencia del plásmido, con y sin inserto, en algunos recombinantes, y se secuenció este inserto en uno de ellos para verificar que la construcción genética introducida era la correcta.

A continuación se utilizó este recombinante para analizar su capacidad de producción. La expresión en *trans* del gen *phaF* en *P. putida* U y en *P. putida* U  $\Delta$ *fadBA* incrementaba la producción de estos bioplásticos en las cepas recombinantes y, además, contribuía decisivamente a la estructuración de los gránulos de PHAs (usualmente se acumulaban menos y de mucho mayor tamaño) (Sandoval *et al.*, 2007). Por ello, cabría esperar un efecto similar en *P. putida* N.

El medio de cultivo empleado fue MM suplementado con octanoato (30 mM) y glucosa (1%, p/v), ya que era en el que se habían logrado mejores resultados con la cepa silvestre. Al medio se le añadió el antibiótico tetraciclina (25 µg/ml) para ejercer una presión selectiva y evitar que los transconjugantes curasen el plásmido. El rendimiento de PHA obtenido (% de PHA/peso seco de bacterias (psb)) fue 49,4%. Teniendo en cuenta que el valor que se obtiene con la cepa silvestre *P. putida* N en estas condiciones es del 47,58%, se concluye que la expresión en *trans* de *phaF* no modificaba, al menos significativamente, la producción de PHA acumulado. El hecho de que no se incremente el rendimiento podría deberse a que la cantidad acumulada por esta cepa sea ya muy elevada, lo que imposibilitaría una variación en el número y tamaño de los gránulos.

Este transconjugante mostró un tamaño y una morfología particulares en algunos medios, siendo distintos a los exhibidos por la cepa silvestre. En el apartado 5 se describirán las observaciones y análisis realizados en este sentido.

### 3.2. Expresión de una copia adicional del *cluster pha* en *Pseudomonas putida* N

La segunda estrategia seguida para obtener un mutante superproductor fue la introducción de una copia extra del *cluster pha* en el genoma de *P. putida* N. Se partió de la hipótesis de que el flujo de intermediarios 3-hidroxiacil-CoA derivados de los ácidos grasos utilizados como fuente de carbono podría exceder la capacidad biosintética de PHAs de la



cepa. Esto tendría como consecuencia un menor acúmulo del potencial máximo alcanzable, y una deriva de intermediarios polimerizables hacia su catabolismo mediante  $\beta$ -oxidación. Ante esta situación, una copia adicional de cada gen comportaría una mayor expresión de dichos genes y propiciaría que las enzimas y proteínas implicadas en la síntesis y acúmulo de PHAs no constituyesen un factor limitante.

El plásmido pK18::*mob*, que contenía una copia del *locus pha* de *P. putida* U como inserto y que había sido obtenido previamente en nuestro laboratorio (García *et al.*, 2004), se transfirió a *P. putida* N. Este plásmido tiene un gen de resistencia a kanamicina y no es replicativo en *Pseudomonas*. Por ello, al hacer uso de estas dos presiones selectivas en una conjugación triparental, se fuerza que se produzca un evento de recombinación homóloga por alguno de los genes del *cluster pha* (prácticamente idénticos entre *P. putida* N y *P. putida* U). Los transconjugantes *PpNpK18pha*, que poseen dos copias del *locus pha*, se seleccionaron por la adquisición de la resistencia a kanamicina (Km, 25  $\mu$ g/ml).

La evaluación de la capacidad de producción se llevó a cabo, al igual que en ocasiones anteriores, en MM que contenía octanoato (30 mM) y glucosa (1% p/v). Cuando esta cepa se cultivó en el medio de producción el rendimiento medio (de las dos fermentaciones realizadas) de PHAs obtenido fue del 49,13%. Teniendo en cuenta que el rendimiento alcanzado con la cepa silvestre fue similar (47,58%), se puede concluir que la adición de una copia del *cluster pha* tampoco incrementa significativamente la producción de bioplástico.

Parecería lógico pensar que con una copia adicional del *locus pha*, la bacteria acumulara mucho mayor contenido de PHAs. La maquinaria bioquímica codificada en estos genes para la formación de bioplástico no se vería saturada, y al haber más polimerasas en el interior celular expresadas constitutivamente desde el promotor del plásmido, se podrían incorporar más residuos a las cadenas poliméricas. Sin embargo, se ha demostrado que el rendimiento en la producción de PHAs no es mucho mayor que en la cepa silvestre. Es posible que una férrea regulación postranscripcional no permita que se incremente el arsenal de síntesis de PHAs por más copias del *cluster* que se introduzcan en el genoma, impidiendo que esta estrategia tenga éxito. Además, es posible que el factor limitante se encuentre en los transportadores de ácidos grasos de la membrana celular o en las enzimas que conectan la  $\beta$ -oxidación con la síntesis de PHAs.

Como ya se apuntó en el apartado anterior, donde se refería la expresión de *phaF* en *trans*, la cantidad de plástico que acumula la cepa silvestre podría ser lo bastante elevada *per se*

cómo para que se pueda incrementar de manera notable mediante este tipo de modificaciones genéticas. Esto nos llevó al planteamiento de estrategias alternativas.

### 3.3. Delección de los genes *fadBA* en *Pseudomonas putida* N

La tercera estrategia empleada para incrementar el acúmulo de PHAs en *P. putida* N consistió en la delección de los genes responsables de la  $\beta$ -oxidación en esta bacteria.

Tal y como se explica en la *Introducción* de esta tesis doctoral, los ácidos grasos que se añaden al medio como precursores de monómeros para la síntesis de polímeros plásticos son degradados mediante un proceso de  $\beta$ -oxidación parcial generando los R- $\beta$ -hidroxialcanoil-CoA derivados de los precursores (o R- $\beta$ -hidroxifenilalcanoil-CoA en el caso de que los precursores fueran ácidos fenilalcanoicos), es decir, las moléculas sustrato de la polimerización. Como resultado de la degradación de los ácidos grasos a través del proceso de  $\beta$ -oxidación, se genera energía, poder reductor y acetil-CoA. El complejo proteico FadBA, codificado en los genes *fadBA*, es el responsable de las cinco actividades enzimáticas (enoil-CoA hidratasa,  $\beta$ -hidroxialcil-CoA deshidrogenasa, *cis*- $\Delta^3$ -*trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa,  $\beta$ -hidroxialcil-CoA epimerasa,  $\beta$ -cetoalcil-CoA tiasa) que constituyen esta  $\beta$ -oxidación (DiRusso, 1990; Yang *et al.*, 1988, 1990).

Además del complejo proteico FadBA, existe una  $\beta$ -oxidación secundaria, activa cuando no está disponible la primera (Olivera *et al.*, 2001a). Olivera y colaboradores observaron en *P. putida* U que al interrumpir los genes *fadBA* y, por tanto, en ausencia de la  $\beta$ -oxidación I, se induce la expresión de una  $\beta$ -oxidación II llevada a cabo por otras enzimas con actividad semejante presentes en la célula. A través de esta segunda ruta, los ácidos grasos alifáticos pueden ser degradados totalmente, mientras que los aromáticos sólo lo son parcialmente. Por ello, si se eliminase la ruta de  $\beta$ -oxidación principal, se podría conseguir un mayor acúmulo de PHAs de origen aromático, ya que no podrían ser degradados totalmente, y también podría esperarse un incremento en el acúmulo de PHAs de origen alifático, al depender su catabolismo de una ruta alternativa menos eficiente, tal y como ocurre con *Pseudomonas putida* U (Olivera *et al.*, 2001a).

El proceso de delección utilizado implica una doble recombinación homóloga sobre los extremos de los genes a deleccionar, por lo que el primer paso consistió en obtener la secuencia de los genes *fadBA* en esta cepa (3.355 pares de bases), para luego diseñar una construcción con la que provocar la delección. La secuenciación se llevó a cabo empleando oligonucleótidos

diseñados sobre *P. putida* U, en primer lugar, y después sobre la propia *P. putida* N (*Materiales y Métodos*, Tabla 5, oligonucleótidos fadBA5'BHI, fadBA3'XbaI, NfadBA1, NfadBA2, NfadBA3, NfadBA4), una vez obtenidas las primeras secuencias. La secuencia completa de los genes *fadBA* se indica en la figura 27.

Posteriormente, y ya sobre la secuencia de los genes *fadBA*, se llevó a cabo el diseño de la construcción para la delección. Para ello, se amplificaron por PCR dos fragmentos situados en los extremos de los genes *fadBA*. El primer amplicón, próximo al extremo 5' de *fadB*, se obtuvo amplificando con los oligonucleótidos NB4 y NB1BHI. El producto de PCR tenía un tamaño de 665 pb. El segundo se amplificó con los oligonucleótidos NA1 y NA3BHI y corresponde a un fragmento de 667 pb localizado en el extremo 3' del gen *fadA*. Ambos fragmentos incluían una diana de restricción BamHI que había sido incluida en los oligonucleótidos NB1BHI y NA3BHI utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos. La digestión con esta endonucleasa y la posterior ligación de ambos fragmentos conjuntamente en el plásmido pJQ200KS dio lugar a la construcción usada para la delección (Fig. 27).

```

1      TCAGACGCGTTCAAAGACAGTGGTGATACCTTGGCCCAGGCCGACGCACATGGTCGCAACACCCAGCGT
    AGTCTGCGCAAGTTTCTGTCAACCTATGGAACCGGGTCCGGCTGCGTGTACCAGCGTTGTGGGTGCGCA
    & V R E F V T T I G Q G L G V C M T A V G L T
70    ACCGCCATTTTGTTCATGACGTTGAGCAGGGTGCCGAAATC<CGCGCCCCGGAGCAACCAACCGGGTGGCCCAA
    TGGCGTAAAAACGAAGTACTGCAACTCGTCCACGGCCTTTAGCGCGGGGCTCGTTGGTTTGGCCACCGGGTT
    G G N Q K M V N L L T G S I R A G S C G F P H G L
145   AGCAATGGCGCCGCCGTGACGGTTAACCTTCTCATCCATCTTGTGAGCAGTTCAGTCTTTTCAGCAGGGGCG
    TCGTTTACCGCGCGGCACGTCGAATGGAAGAGTAGGTAGAACAGCTCGTGAAAGTTCAGAAAGTTCGTGCCCGTC
    A I A G G H L N V K E D M K D L V K L D K L V P L
220   GGCCTGTGCGAGCGAAGGCTTCGTTGAGCTCGATGAAGTCGATATCGGCCATGGTCAAGCCCGCAGCGTTGAGGGC
    CCGGACACGTCGCTTCCGAAGCAACTCGAGTACTTTCAGCTATAGCCGGTACCAGTTCGGGCGTGCCAACTCCCG
    A Q A A F A E N L E I F D I D A M T L G A R K L A
295   TTTCTGGGTCGATGGCACCGGGCCGTAGCCCATGATTGCCGGGTCGACACCGGCCACTGCCATCGAACGGATCAC
    AAAGACCCAGTACCGTGGCCCGGCATCGGGTACTAACGGCCAGCTGTGGCCGGTGACGGTAGCTTGCCTAGTG
    K Q T S P V P G Y G M I A P D V G A V A M S R I V
370   CGCCAATGGCTGGATACCGAGGTCCATGGCAGCTGACCGGACATGACGATCATGCACGAGGCGCGTCCGGTAT
    CCGGTTACCGACCTATGGCTCCAGGTACCGTGCAGTGGCCCTGTACTGCTAGTACGTGCTCCGCGGCAGCCACTA
    A L P Q I G L D M A R Q G S M V I M C S A G D T I
445   CTGCGACGAGGTACCGGCCGTGACCGTACCGCCTTTCGGGTTGAACGCAGGCTTCAGCGATGCCAGGCCTTCGAG
    GACGCTGCTCCATGGCCGGCACTGGCATGGCGGAAAGCCCAACTTGGCTCCGAAGTCGCTACGGTCCGGAAGCTC
    Q S S T G A T V T G G K P N F A P K L S A L G E L
520   GGTGGTTTCCGGGCGAATGGTTTCGTCGAAATCGAACACCTTCAGGAAGCCGTTCTCGTTCGTAGCCCTGCATCGG
    CCACCAAGGCCCGCTTACCAAGCAGCTTTAGCTTGTGGAAGTCCTTCGGCAAGAGCAGCATCGGGACGTAGCC
    T T E P R I T E D F D F V K L F G N E D Y G Q M P
595   GATGATCTCGTCTTGAACCTGACCTTCGACCGTGGCCTTGTGGCCAGCTGGTGCAGAACGCAAGCCGAACAGGTC
    CTACTAGAGCAGGAACCTTGAACGGAAGCTGGCACCGGAACACCCGGTGCAGCACGCTTGGCTTCGGCTTGTCCAG
    I I E D K F K G E V T A K H A L Q H S R L G F L D
670   CTGCTGCTCACGGGTGATGCCGTGCATCTTGCCGAGCATTTCTGCAGTCAGGCCCATCATCCCGGAAGCCTTGGC
    GACGACGAGTCCCCTACCGCACGTAGAACGGCTCGTAAAGACGTCAGTCCGGGTAGTAGGGCCTTCGGAACCG
    Q Q E R T I G H M K G L M E A T L G M M G S A K A

```

## Resultados y Discusión

745 GGCATGCAAGGACAGGTGCGGGTTGGGGTCTACGCCATGCATCATGCTGACGTGGCCCATGTGCTCCACGCCACC  
CCGTACGTTCTGTCCACGCCAACCCAGATGCGGTACGTAGTACGACTGCACCGGGTACACGAGGTGCGGGTGG  
A H L S L H P N P D V G H M M S V H G M H E V G G  
◀ FRAGMENTO DELECIÓN *fadA*

820 GACCACGAACACATCACCGTTACCGGTCATGATCGCCTGGGCGCCGTGTGCAGCGCGCTCATGGACGAGCCGCA  
CTGGTCTGTGTAGTGGCAATGGCCAGTACTAGCGGACCCGCCGGCACACGTGCGCGAGTACCTGCTCGGCGT  
V V F V D G N G T M I A Q A A T H L A S M S S G C

895 CAGGCGGCTGACGGTCTGCGCCGCGGAAGTGTGCGGATCTGGGTCATCAGCGAGGCCATGCGGGCGATGTTCCA  
GTCCGCCGACTGCCAGACGCGCGCCTTACACGCCCTAGACCCAGTACTGCTCCGCTACGCCCGTACAAGGT  
L R S V T Q A A S T H P I Q T M L S A M R A I N W

970 GCCCTGCTCCAGGGTCTGGTTGACGCAGCCCCAGATCAGTCTCGACTTCTTTGCGGTCAACCTTGCCGTTGCG  
CGGGACGAGGTCCAGACCACTGCTCGGGTCTAGTGCAGGAGCTGAAGAAAGCCAGTTGGAACGGCAACGC  
G Q E L T Q N V C G W I V D E V E K P D V K G N R

1045 TTCCAGCAGCTTGCTGATCAGGTGCGCCGACATGTCTTTCGGCGGGGTGTGCGGTGCATGCCACCCTTGAGCGG  
AAGTCTGTAACGACTAGTCCACGCGGCTGTACAGAAGCCCGCCACAACGCCAGTACGTGGGAACTCGC  
E L L K S I L H A S M D E A R T N R H M G G K S R

1120 GCCATTGGCGTGGACCCGAAGTCGACAATCACACGCTCTCTGGATTGAGGCTCATATCAAATCTCTGCTCTA  
CGGGTAACCGCAGCTGGCTTTCAGCTGTAGTGGTGACAGAACCTAAGTCCGAGTATAGTTAGAGAGCGAGAT  
G M P T R G F D V I V V D R P N L S M  
◀ *fadA*

1195 GCTCGTTGACCGCTCAGTTGAAGAAGCGCTGGCCGTTCTTGCCATTTACGCAGCTTGCGGGTGGGTGATA  
CGAGCAACTGGCGAGTCAACTTCTTCGCGACCGGCAAGAACCGGTAAGTGCCTGCAACCGCCAGCCACCATGT  
& N F F R Q G N K A M E R L K A T P H Y L

1270 GCGGCCCCAGGTGCGCATACTGATCGGCCAGGGCGACGAATTCGGCCACACCGATCGAGTGCATGTAACGCAGCG  
CGCGGGTCCAGCCGTATGACTAGCCGGTCCCGCTGCTTAAGCCGGTGTGGCTAGCTCAGTACATTGCGTGGC  
P G L D A Y Q D A L A V F E A V G I S D I Y R L A

1345 CACCACCGCGAAGGGAGGAAACCAATGCCGTAGACCAGGCCATGTGCGGCTTCGGCAGCGGTTTCGACGATGC  
GTGGTGGCCCTTCCCTCCCTTTGGTTACGGCATCTGGTCCGGGTACAGCCGAAGCCGTCGCCAAAGCTGTACTG  
G G R F P P F G I G Y V L G M D A E A A T E V I G

1420 CGTCTTCCAGGCAACGCACCGTCTCCAGGCACAGCGGGACCATCATCCAGTTGATGATGTCTTCGTCAGTGACTT  
GCAGAAGGTCGGTTCGCTGCCAGAGGTCCGTGTGCGCCTGGTAGTAGTCACTACTACAGAAGCAGTCACTGAA  
D E L C R V T E L C L P V M M W N I I D E D T V E

1495 CGCGTGCTCGAACACGATCGGTTTGGACACGTCGAGCAGGTTGGCATCGAAAACCTTCTTCGGCTTGCCGCGCT  
GCGCGACGAGCTTGTGCTAGCCAACTCGTGCAGCTCGTCCACCGTAGCTTTTGAAGAAGCCGAACGGCGCGA  
R Q E F V I P K L V D L V T A D F V K K P K G R K

1570 TGTCGGTTTCGTAGGCGTAGAAGCCCTTACCCTTCTTTCGGCCAGGCGGTTGGCCTCGTACAACCGCTGACTG  
ACAGCCAAAGCATCCGCATCTTCGGGAATGGCAAGAAGACCGGGTCCGCCAACCGGAGCATGTTGCGCAGCTGAC  
D T E Y A Y F G K G N K Q G L R N A E Y L A D V A

1645 CCGAGCGCGCTCGTCTTTCATGCGATCCGGGAAGCCTTCGGCCATGACGTCACGGCGTGGTGGCCGGTGTGCA  
GGCTCGCCGAGCAGGAAGTACGCTAGGCCCTTCGGAAGCCGGTACTGCAGTGCAGGACCCAGCCACAGCT  
S R R E D K M R D P F G E A M V D R G H H G T D I

1720 TGCCGACCACGTCCATCAAGTAGGCTGGGCCATCGGCCAGCCGAACCTTCTCCATGACCTTGTGATGCGCACGA  
ACGGCTGGTGCAGGTAGTTCATCCGACCCGGTAGCCGGTGGCTTGAAGAGGTACTGGAACAGCTACGCGTGTCT  
G V V D M L Y A P G M P W G F K E M V K D I R V F

1795 AGTCGACACCGCGCTGACCAGCTTGGCAAAACCGCCAAAGTACGGGAACAGCAGCGGTTGACCAAAAAGCCCG  
TCAGCTGTGGCCGCGACTGGTCAACCGTTTTGGCGGTTTCATGCCCTTGTGCTGCCAACTGGTTTTTCGGGC  
D V G A S V L K A F G G F Y P F L V R N V L F G P

1870 GGCAGTCGTTGACCACGATCGGGTCTTTCGCCATTTTCTTGGCGTAGGCCACGGTGGTGGCGACCGCCACGTCAC  
CCGTGACCAACTGGTGTAGCCCAAGAACGGGTAAGAAGCCGATCCGGTGCACCCAGCCGCTGGCGGTGCAGTG  
C D N V V I P N K G M K K A Y A V T T A V A V D S

1945 TGGACTTCTCACACGGATCACTTCCACCAGCGGCATCATGTGCACCGGGTTGAAGAAGTGCATGCCGACGAAGT  
ACCTGAAGAGTGGTGCCTAGTGAAGGTGGTCCGCTAGTACAGTGGCCCAACTTCTTACGTACGGCTGCTTCA  
S K E G R I V E V L P M M H V P N F F H M G V F N

2020 TTTCCGGGCGCTTGGCGCCTTGGCCAGCAGGTTGATAGAGATGGTAGAGGTGTTGAAGCGAGGATCGCATCGT  
AAAGGCCCGCAACTCGCGGAACCGGTGCTCCAATATCTTACCATCTCCACAACCTTCGCTCCTAGCGTAGCA  
E P R K L A K A L L N I S I T S T N S A L I A D D

2095 CCTTCACTGGCCTTCCACTTCCGCCAGTACCGCTTGTGACCTTCGGGTTCTCGACCACCTGCTCGACGACGA  
GGAAGTGGACCGGAAGGTGAAGGCGGTCATGGCGAAGCAACTGGAAGCCCAAGAGCTGGTGCAGGAGCTGTGCT  
K V Q G E V E A L V A Q K V K P N E V V A E V V I

## Resultados y Discusión

2170 TGTCGACATTGGCAAATCGCCATAGGACAGGGTCGGTCAATGGCGTTGAGGGCCTCGGCCATCTTGGCTGGGG  
 ACAGCTGTAACCGTTTTAGCGGTATCCTGTCCCAGCCAGCTTACCGCAACTCCCGGAGCCGGTAGAACCGACCCC  
 D V N A F D G Y S L T P R I A N L A E A M K A P T

2245 TCAGGCGGCCCTTCTCGACGCGGTTGCCAAGCAACTTGGAGGCCTCGTTTACAGCCAGCTGAATGGCTTCTTCGC  
 AGTCCGCGGGAAGAGCTGCGCAACGGTTCGTTGAACCTCCGGAGCAAGTCTGGGTGACTTACCGAAGAAGCG  
 L R G K E V R N G L L K S A E N L G L Q I A E E R

2320 GGATGTCTTTTCATCAGGATCGGCGTACCTTTGACCGCCGACTGGTAGGCGATACCGCCGCCATGATGCCGGCGC  
 CCTACAGAAAGTAGTCTAGCCGCATGGAACCTGGCGGCTGACCATCCGCTATGGCGGCGGGTACTACGGCCGCG  
 I D K M L I P T G K V A S Q Y A I G G G M I G A G

2395 CGAGCACGGCGGCCTGCTTCACGTCTGGGCGATCTCGTATGCGCCTTGGCCTTGCCTTGAGTTCCTGATCGT  
 GCTCGTGGCGCGGACGAAGTGCAGCACCCGCTAGAGCAGTACGCGGAACCGGAACGCGAACTCAAGGACTAGCA  
 L V A A Q K V D H A I E D H A K A K R K L E Q D N

2470 TGAGGAACAAGCCGATCAGGCTCTCGGCGACCGAGGCTTGGCCAGCTTGGCAAAGCCTGCGGCTTCAACTTCCA  
 ACTCCTTGTTCGGCTAGTCCGAGAGCCGCTGGCTCCAGAACCAGCTTTCGAGCCGCGAAGTGAAGGT  
 L F L G I L S E A V S T K A L K A F G A A E V E L

FRAGMENTO DELECIÓN *fadB* ▶

2545 GGGCCTTGTCGCGACCGAAGTTGGCGGCTTTCTGGATGCTCTTATTGCTTCGACCGGGGCTGGGTAGTTCGGGC  
 CCCGGAACAGGCTGGCTTCAACCGCCGAAAGACCTACGAGAATAACGAAGCTGGCCCGACCCATCAAGCCCG  
 A K D R G F N A A K Q I S K I A E V P A P Y N P G

2620 CGGCCTGGCCAGCGACGAAGCCCTTGGCCGCTCTCGAAGCCATCATCTGCTCGATGGCATTGAGCTTGGCTTTT  
 GCCGGACCGGTCGCTTCCGGAACCGGCAGAGCTTCCGGTAGTAGACGACTACCGTAACTCGAACTCGAAAA  
 A Q G A V F G K A T E F A M M Q E I A N L K L K E

2695 CCAGCTTCGGCTGGCGCTTGGCCTTGTAGTCCAGCTCGCCACTGATGGCACGCTTGATCAGGTCGAGGGCACCGG  
 GCTCGAAGCCGACCGGAACCGGAACATCAGGTGAGCGGCTACTACCGTGCGAACCTAGTCCAGTCCCGTGGCC  
 L K P Q R K A K Y D L E G S I A R K I L D L A G A

2770 CCAGCAGCAGCTCAGGGGCGACCACCGCGTCGACGGCCCCACTTTTCAGGGCGTCTTCGGCACGGTTTTCTTGC  
 GTCGCTCGTAGTCCCGCTGGTGGCGCAGCTGCCGGGGTGAAGTCCCGCAGAAGCCGTGCCAAAAGGAACG  
 L L L E P A V V A D V A G V K L A D E A R N E K G

2845 CGGCGGCGATCCACTCGATGGCGTTGTCCGAGCCGATCAGGCGCGGAGGCGCACGGTACCGCCAAAGCCCGGT  
 GCCCGCTAGGTGAGCTACCGCAACAGGCTCGGCTAGTCCCGCCGCTCCCGCTGCCATGGCGGTTTTCCGGCCCA  
 A A I W E I A N D S G I L R P L R V T G G F F G P Y

2920 AGATAACCAGCTTGACTTCCGGCAGGCCGATCTGGCGCTGGTGGACATGACCCGGTAGTCGGCCGCCAGGCACA  
 TCTATGGTTCGAACTGAAGGCCGTCGGCTAGGACCCGACCACTGTACTGGCCATCAGCCGGCGGTCCTGCT  
 I G L G V E P L G I R A S T S M V R Y D A A L C M

2995 TTTCCAGGCCCGCCCGCCAGCGCATGCCGTTGATGGCGCAACGGTCGGCACTTCGAGGTCTTCGAAGGCGTTGA  
 AAAGTCCGGCGGCGGTCGCGCTACGGCAACTACCGCCGTTGCCAGCCGTGAAGCTCCAGAAGCTTCCGCACT  
 E L G G G L A I G N I A A V T P V E L D E F A N F

3070 AGATACGATTGGCTTCCAGGTTGCCGGCGACCACTTCCGGCCTCAGGCGACTTGAAGTTGTTCGACGAACTCGGTGA  
 TCTATGCTAACCGAAGGTCCAACGGCCGCTGGTCAAGCCGAGTCCGTCGAACTTCAACAGCTGCTTGAGCCACT  
 1 I R N A E L N G A V L E A E P L K F N D V F E T I

3145 TGTCGGCGCCGACGATGAACACGTCCTTGCCTGCTGACGATCACGCCTTTGACCGAGGCATCGGCCTGGATGG  
 ACAGCCGCGCTGCTACTTGTGCAGGAACGGTGACGACTGCTAGTGCAGAACTGGCTCCGTAGCCGACCTACC  
 D A G V I F V D K G S S V I V G K V S A D A Q I A

3220 CATCGACGGCCTGGCGCAGCTCGTTTCAAGGCGGTTGAACCTTGTGACGGACTCACCCCTGAGGTGCAACT  
 GTAGCTGCCGGACCGCTCGAGCAAGTCCCATTCCGCCAATTGAACAACCTGCCTGAGTGGGAACCTCCAGCTTGA  
 D V A Q R L E N L T L R N F K N V S E G K L D F K  
 ◀

3295 TGAGCTCGACGATGCCACTTTCAAGAGCCTTAACCGTGATGGCTTTACCTTCGTAATCATCAACTGATCTCCAC  
 ACTCGAGCTGCTACGGTGAAGTTCTCGGAATTGGCACTACCGAAATGGAAGCATTTA GTA GTTACTAGAGGTG  
 L E V I G S E L A K V T I A K G E Y I M  
 ◀ *fadB*

3370 GATATGGAAGCTGAACTGTACACGC  
 CTATACCTTCGACTTGACATGTGCG

**Figura 27.** Secuencia de los genes *fadBA* de *P. putida* N. Sobre la secuencia se indican los oligonucleótidos con los que se amplificó cada uno de los fragmentos utilizados para la construcción de delección y la secuencia de los amplicones específicos.

Esta construcción en el plásmido pJQ200KS, dio lugar al plásmido pJQ $\Delta$ *fadBA*. La cepa *E. coli* DH10B se utilizó como hospedador de este plásmido, tras la selección de aquellas colonias recombinantes que expresaban el marcador genético del plásmido, la resistencia a gentamicina. De este modo, se obtuvo la cepa *E. coli* pJQ $\Delta$ *fadBA*. La integridad de la construcción se comprobó mediante secuenciación.

A continuación se transfirió esta construcción a *P. putida* N mediante conjugación triparental. La selección de los transconjugantes se realizó en medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml, resistencia natural de *P. putida* N) y gentamicina (30  $\mu$ g/ml, resistencia aportada por el vector). Dado que el plásmido pJQ200KS no es replicativo en *Pseudomonas*, los transformantes sólo serían capaces de sobrevivir en un medio suplementado con gentamicina si tiene lugar una recombinación homóloga mediada por una de las regiones homólogas de los genes *fadBA* que componen la construcción de delección.

De entre los diferentes transconjugantes obtenidos en esta primera recombinación, se seleccionó una colonia para ser resuspendida en 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril y se sembraron en placas Petri conteniendo medio LB suplementado con ampicilina y sacarosa al 10%.

El plásmido pJQ200KS contiene el gen *sacB*, que codifica una proteína que hidroliza la sacarosa presente en el medio, dando lugar a levanos (polímeros de fructosa) los cuales se acumulan en el espacio periplásmico de las bacterias y causan su muerte por estrés osmótico.

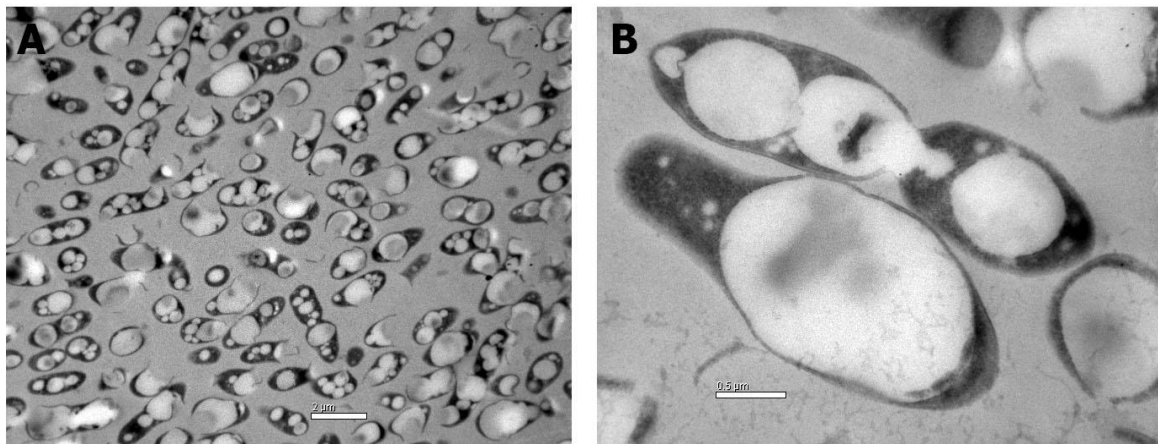
Para evitar el efecto provocado por la acción de esta sacarasa, la bacteria fuerza una segunda recombinación homóloga en presencia de sacarosa en un intento de desembarazarse del plásmido. Esta segunda recombinación, con pérdida de plásmido, puede producirse de dos maneras diferentes, dando como resultado, bien la restauración de los genes completos, es decir, la vuelta a la situación original; o bien causar la delección de los genes *fadBA* (en teoría, en el 45 % de los recombinantes se deberían perder esos genes, aunque en nuestro laboratorio hemos comprobado que la eficiencia del proceso suele estar en el 25%) (Donnenberg y Kaper, 1991; Hmelo *et al.*, 2015; Quandt y Hynes, 1993). La baja eficiencia del proceso de delección se debe a que puede haber mecanismos (mutación del gen *sacB* o de su promotor, entre otros) en los que no se produce la eliminación del plásmido pero sí la supervivencia celular.

La comprobación de la eliminación del fragmento genético deseado se realizó llevando a cabo amplificaciones por PCR sobre el DNA de los transconjugantes. Los oligonucleótidos utilizados se encontraban situados sobre las regiones exteriores a los fragmentos empleados en

la construcción de deleción, y se verificó que la eliminación del fragmento génico correspondiente había tenido lugar (*Materiales y Métodos*, Tabla 5, oligonucleótidos fadBA5'BHI y fadBA3'XbaI).

### 3.3.1. Producción de PHAs utilizando *P. putida* N $\Delta$ fadBA en distintos medios de producción

Por analogía con lo que ocurre en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 2001b), la cepa de *P. putida* N con los genes *fadBA* delecionados (*PpN $\Delta$ fadBA*) debería acumular más PHAs de naturaleza aromática, y quizás también de naturaleza alifática, teniendo en cuenta que los ácidos grasos no podrían ser catabolizados (aromáticos) o lo eran más lentamente (alifáticos) por los mutantes delecionados en los genes *fadBA*. Para comprobar este fenotipo se realizaron varios cultivos en los medios MM suplementado con glucosa 1% (p/v) y distintas fuentes de monómeros (octanoato, 6-fenilhexanoato, 7-fenilheptanoato, 8-feniloctanoato), tanto con la cepa delecionada como con la cepa control (Tabla 7).



**Figura 28.** Microfotografías de TEM de *P. putida* N $\Delta$ fadBA cultivada en MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato 10 mM y 7-fenilheptanoato 10 mM.

En la Tabla 7 se muestra la cantidad de polímeros plásticos, tanto de naturaleza aromática como alifática, acumulado en los medios suplementados con los precursores indicados.

**Tabla 7.** Cantidad de PHAs acumulados por *P. putida* N o su mutante *PpNΔfadBA* cuando ambas cepas se cultivaron en MM suplementado con glucosa (1%, p/v) y distintos precursores de polihidroxicanoatos. La cantidad se expresa como porcentaje de PHA/psb. Los porcentajes aquí mostrados son la media aritmética de dos experimentos diferentes.

Cepa	Medio de Cultivo (MM suplementado con)			
	Octanoato 30mM + Glucosa 1%	6-fenilhexanoato 15 mM + Glucosa 1%	7-fenilheptanoato 15 mM + Glucosa 1%	8-feniloctanoato 15 mM + Glucosa 1%
<i>P. putida</i> N (Control)	47,58%	17,31%	36,21%	40,59%
<i>P. putida</i> N $\Delta$ <i>fadBA</i>	53,06%	49,67%	55,97%	61,26%

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 7) podemos concluir que la cepa *Pseudomonas putida* N  $\Delta$ *fadBA* produce mucha más cantidad de polímero plástico que la cepa silvestre en todos los casos, siendo particularmente evidente cuando se utilizan precursores aromáticos (un 20% más con 7-fenilheptanoico y 8-feniloctanoico, y un 30% más con 6-fenilhexanoico).

Es importante destacar que el rendimiento obtenido con la cepa delecionada (*P. putida* N  $\Delta$ *fadBA*) cultivada en MM con 8-feniloctanoato 15 mM y glucosa 1% (p/v) es muy alto, situándose en un 61,26%. Teniendo en cuenta que una fracción importante del peso siempre se corresponderá con toda la masa celular que no es PHA, parece difícil que se pueda incrementar mucho más la cantidad de PHAs acumulados por estas bacterias.

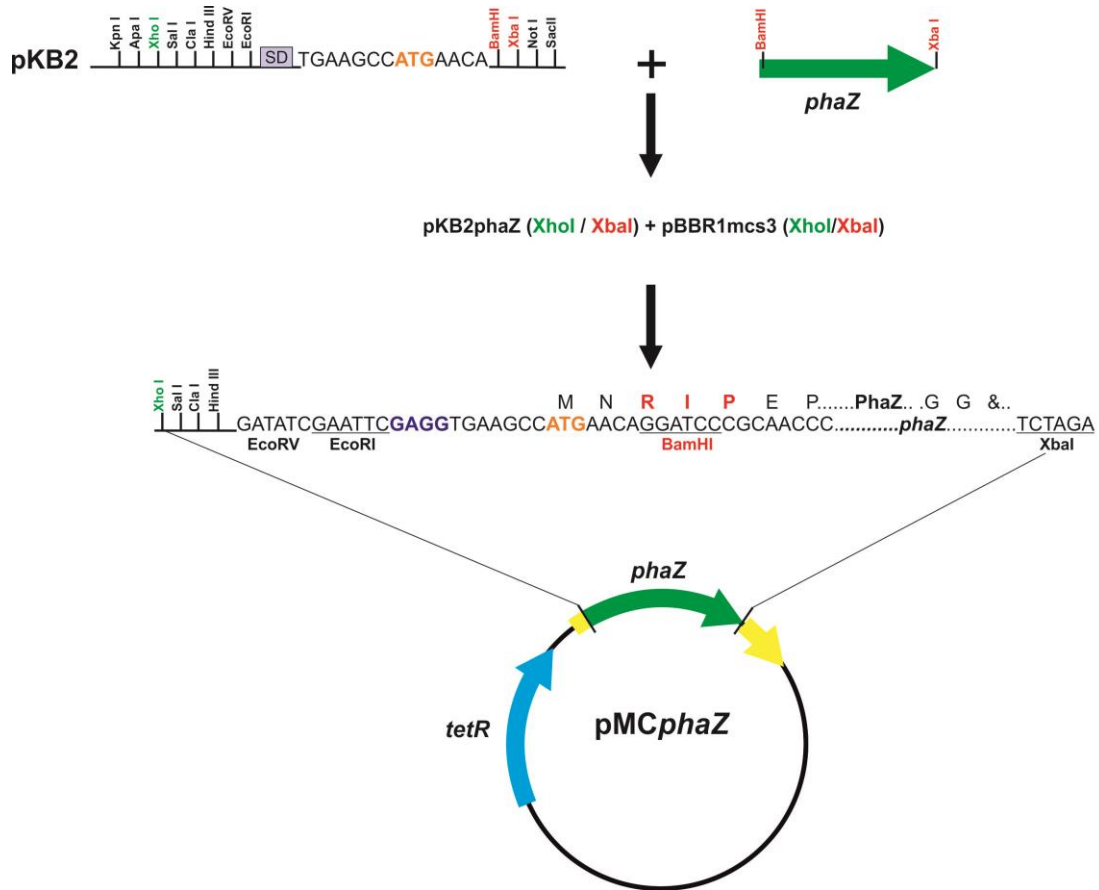
#### 4. Expresión en *trans* del gen *phaZ* de *Pseudomonas putida* U en *Pseudomonas putida* N y en *Pseudomonas putida* N $\Delta$ *fadBA*

El estudio genético y metabólico de las bacterias productoras de PHAs es interesante desde una perspectiva industrial para tratar de incrementar la producción de polímero y, en última instancia, lograr un proceso rentable maximizando la producción. Sin embargo, también es interesante la producción de otras moléculas, como los 3-hidroxiderivados de los monómeros constituyentes de los PHAs. La síntesis química de estas moléculas no suele ser sencilla, y una vez obtenidas pueden servir como compuestos de partida (sintonas) utilizados para la síntesis de antibióticos, vitaminas, antimicrobianos,  $\beta$ -aminoácidos o biocombustibles



(Park *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2010b; Sandoval *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Debido a esto, la modificación de las bacterias productoras de PHAs en biofactorías que generan 3-hidroxiácidos podría ser biotecnológicamente muy interesante. En este aspecto, independientemente de incrementar el acúmulo, se debería favorecer la liberación de los monómeros acumulados y polimerizados por la PHA despolimerasa. Sandoval y colaboradores demostraron que esto era técnicamente posible en una cepa derivada de *P. putida* U, mediante la expresión constitutiva del gen de la despolimerasa, *phaZ*. Puesto que *P. putida* N es capaz de acumular una cantidad mayor de polímero plástico, la expresión en *trans* del gen *phaZ* podría dar lugar a una mayor liberación de 3-hidroxiderivados, siendo un mejor productor de estas moléculas. Partiendo de esta premisa, se transformaron las cepas *P. putida* N y *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* con el gen *phaZ* de *P. putida* U.

El gen *phaZ* se obtuvo mediante amplificación por PCR sobre DNA genómico de *P. putida* U con los oligonucleótidos DepolBamHI y DepolXbaI (Sandoval *et al.*, 2005). Como puede observarse, ambos oligonucleótidos contenían una diana de restricción que fue utilizada para la clonación del producto de PCR en el plásmido pBBR1MCS-3. Debe indicarse que la incorporación de la diana BamHI en el oligo DepolBamHI supone el cambio de la proteína codificada mediante la introducción de tres aminoácidos extra en el extremo amino de la depolimerasa (Fig. 29). La construcción resultante se denominó pMC*phaZ*. Esta construcción se transfirió a *E. coli* DH10B mediante transformación por shock térmico. La integridad de la secuencia del gen *phaZ* se comprobó por secuenciación.



**Figura 29.** Representación esquemática del proceso llevado a cabo para la clonación de *phaZ* en el plásmido pBBR1MCS-3. Se introdujeron los cortes BamHI y XbaI en los oligonucleótidos con los que se amplificó *phaZ*. Con dichas dianas de restricción se clonó el gen de la despolimerasa en el plásmido pKB2. Este plásmido posee una secuencia Shine-Dalgarno (SD) artificial previa al ATG que señala el inicio de la transcripción. La despolimerasa se clonó en pBBR1MCS-3 con los cortes de restricción XhoI y XbaI. Como consecuencia del proceso de clonación la despolimerasa presenta la adición de 3 aminoácidos adicionales (RIP) (Sandoval et al., 2005).

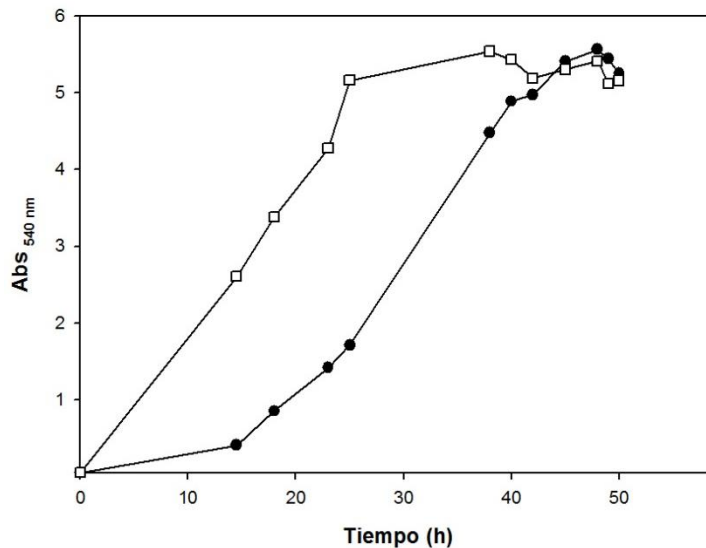
La transferencia del plásmido pMC*phaZ* a la cepa *P. putida* N se llevó a cabo mediante conjugación triparental. Para ello se cultivaron conjuntamente la cepa donadora (*E. coli* pMC*phaZ*), la receptora (*P. putida* N), y una cepa adicional de *E. coli* ("helper"), que permite la transferencia del plásmido. De este modo, se obtuvo la cepa recombinante *P. putida* N pMC*phaZ*, que posee una resistencia natural a ampicilina (100 µg/ml) y a tetraciclina (aportada por el plásmido, 25 µg/ml). Para comprobar que el transconjugante contenía ese plásmido, éste se extrajo y se secuenció. Adicionalmente, la presencia de este plásmido se comprobó mediante PCR, extrayendo DNA total de la cepa *P. putida* N pMC*phaZ* y amplificando el inserto *phaZ* utilizando oligonucleótidos específicos del plásmido y que, por lo tanto, no anillan en el genoma de *P. putida* N. De ambos modos se demostró que la cepa contenía la construcción deseada y que la secuencia del inserto (*phaZ*) era correcta.

Para obtener el mutante *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* pMC*phaZ* se siguió el mismo procedimiento, con la diferencia de que, al realizar la conjugación triparental, la cepa receptora del plásmido era *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA*. Todos los controles y las comprobaciones se hicieron tal y como se indicaba en el proceso anteriormente descrito.

Finalmente, comprobamos que todas las cepas aisladas no solo habían incorporado el plásmido pMC*phaZ* sino que, además, expresaban eficientemente la despolimerasa. Este hecho se verificó comprobando la producción de PHAs cuando los recombinantes se cultivaron en un medio de producción (placas de medio mínimo suplementadas con octanoato 10 mM como única fuente de carbono y Tc, 25  $\mu$ g/ml). Al observar los citados mutantes al microscopio no se apreciaba ni el más mínimo indicio de PHAs. Por el contrario, en los controles de estas cepas (transformadas con el plásmido sin inserto) sí se observaban acúmulos de PHAs (ocupaban prácticamente todo el interior de la bacteria).

También se llevó a cabo el cultivo de *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* pMC*phaZ* en medio líquido, MM suplementado con glucosa 1% (p/v), 6-fenilhexanoato 15 mM y Tc (25  $\mu$ g/ml), en las condiciones habituales para el cultivo de *P. putida* (30 °C y 250 rpm). Se realizaron preparaciones para observar al microscopio óptico si se sintetizaban PHAs, y en ningún momento se observó acúmulo. Previsiblemente, la mayor actividad despolimerásica evita que se lleguen a acumular PHAs visibles, y los 3-hidroxiácidos producto de la despolimerización serían excretados al exterior de la célula. El cultivo control, la misma cepa cultivada en MM suplementado únicamente con glucosa 1% (p/v) como fuente de carbono, alcanzó valores de Abs<sub>540</sub> similares a la cepa cultivada con monómeros polimerizables (Fig. 30). En ambos medios se añadió Tc al medio para prevenir que la cepa curase el plásmido.

Basándonos en los trabajos previos realizados con *P. putida* U, en los que no se observaba acúmulo, podemos concluir que en los transconjugantes *P. putida* N pMC*phaZ* y *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* pMC*phaZ* la actividad depolimerásica es muy superior a la polimerásica, lo que previene el acúmulo de PHAs, y produce 3-hidroxiderivados, que son expulsados al caldo de cultivo.



**Figura 30.** Cinética de crecimiento de *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* pMC*phaZ* cultivada en MM suplementado con glucosa 1% (p/v) y Tc (□), y en MM suplementado con glucosa 1% (p/v), 6-fenilhexanoato 15 mM y Tc (●).

## 5. Efecto de la fasina PhaF en la morfología y en el tamaño de *Pseudomonas putida* N

Si bien la expresión en *trans* del gen *phaF* en *P. putida* N no comportó un incremento en el acúmulo de PHA, como se indicó en el apartado 3, esta cepa recombinante exhibía una morfología interesante en medios suplementados con ampicilina, muy diferente de la que se apreciaba en las cepa parental *P. putida* N y en el control *P. putida* N pMC.

### 5.1. Morfología de *P. putida* N a concentraciones subinhibitorias de ampicilina

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* se caracterizan por presentar un aspecto típicamente bacilar, con un tamaño y longitud que oscila entre 0,5-0,8  $\mu$ m por 1,5-3  $\mu$ m (Iglewski, 1996). Uno de los aspectos que caracterizan a *P. putida* N es la morfología que adquiere cuando se cultiva en distintos medios, siempre suplementados con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). En estas condiciones, las bacterias se observan como células mucho más largas (en torno a 25  $\mu$ m) y anchas (1,5  $\mu$ m) de lo que es habitual para otras estirpes de *Pseudomonas putida* (e. g. *P. putida* U) y, además, muestran estructuras microtubulares que parecen conectar unas células con otras (Fig. 31 y 32).

El estudio de este cambio morfológico, y del aumento del volumen celular, resulta especialmente interesante en situaciones de acúmulo de PHAs. Como se ha observado anteriormente en algunas cepas superproductoras (Fig. 28), hay un momento en el que el PHA

acumulado en el interior de las células constriñe el citoplasma celular, sugiriendo que las células se podrían encontrar al máximo de sus posibilidades de acúmulo. Quizás, un aumento de su volumen implicase un incremento de sus capacidades de almacenamiento. Esta idea nos animó a profundizar en el estudio de estos fenómenos.

La bacteria adquiere esta morfología alargada tanto en medios de producción de PHAs (MM con octanoato) como en medios que no contienen precursores de polímero (LB y MM con 4-hidroxifenilacetato), razón por la que no se podría establecer una relación directa entre el acúmulo de bioplástico y la adquisición de esta morfología. Se observó que las diferencias en el aspecto de la bacteria se encuentran asociadas con la presencia o ausencia de ampicilina. Al suplementar el medio con este antibiótico (100 µg/ml), por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC), tiene lugar la filamentación de las bacterias; sin embargo, en los mismos medios que no se suplementan con ampicilina, *P. putida* N presenta una morfología típicamente bacilar con un tamaño próximo a la norma (Fig. 31 y 32).

Una modificación similar de la morfología bacteriana, causando alargamiento de las células, se ha descrito en numerosas ocasiones y en distintas especies. La descripción en la literatura del desencadenante de este cambio morfológico es diversa, pudiendo deberse a factores físicos, químicos o metabólicos que generan situaciones de estrés en la bacteria (Aertsen y Michiels, 2005; Jensen y Woolfolk, 1985; Lee *et al.*, 1994; Potluri *et al.*, 2012; Steel *et al.*, 2004). En el caso que nos ocupa, y como ya se describiera para especies de *Pseudomonas*, *Klebsiella* o para *E. coli*, la filamentación se produce por la presencia de concentraciones de antibiótico por debajo de la MIC, que impiden la formación adecuada de la pared bacteriana en el proceso de división celular (Noguchi *et al.*, 1978; Rolinson *et al.*, 1977). El registro de observaciones similares en la morfología bacteriana, y el estudio del efecto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a distintas concentraciones subinhibitorias se encuentra bien documentado en la literatura científica desde hace décadas (Basker *et al.*, 1979; Gardner, 1940; Klainer y Perkins, 1970; Rolinson *et al.*, 1977).

La ampicilina es un antibiótico  $\beta$ -lactámico que impide el entrecruzamiento adecuado del peptidoglucano en el proceso de formación de la pared bacteriana, al competir con las PBPs (del inglés *penicillin binding protein*, o proteínas que se unen a penicilina), responsables de que dicho entrecruzamiento tenga lugar (Goffin y Ghuysen, 2002; Macheboeuf *et al.*, 2006). Las bacterias resistentes a este tipo de antibióticos poseen  $\beta$ -lactamasas que los escinden, impidiendo su efecto sobre la división celular. En este caso, *P. putida* N presenta resistencia al

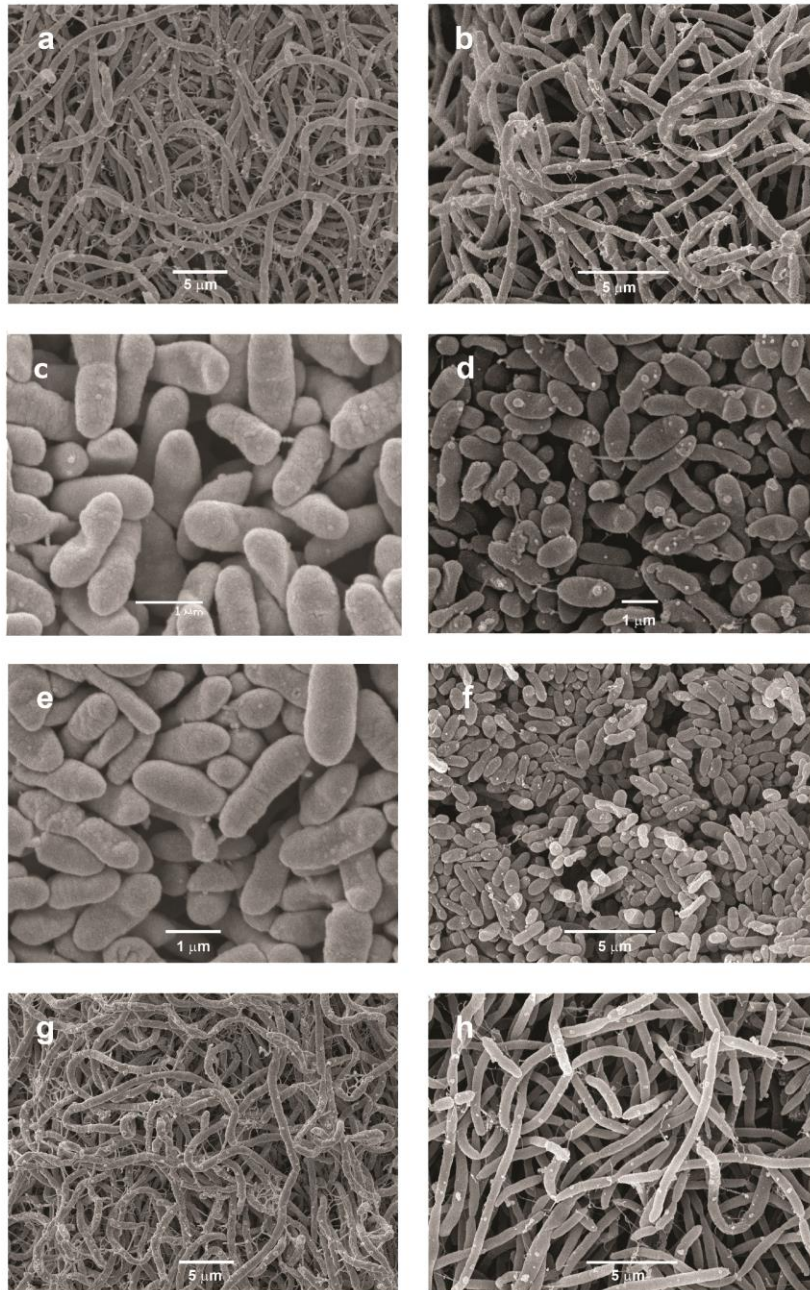
antibiótico, ya que la presencia del mismo no impide ni dificulta su cinética de crecimiento. Sin embargo, el fenotipo alargado que exhibe en medio suplementado con ampicilina sugiere que esa concentración de antibiótico sí afecta la división bacteriana, y que es superior a la concentración máxima que sus  $\beta$ -lactamasas son capaces de degradar.

Al mismo tiempo, no se pueden descartar efectos del antibiótico sobre otras proteínas como FtsZ, cuya polimerización forma un anillo que constriñe y separa las células hijas, y su inhibidor MinC, así como sobre los complejos proteicos que interactúan y regulan a éstos (Bi *et al.*, 1991; Dajkovic *et al.*, 2008; Mingorance *et al.*, 2010).

## **5.2. Efecto de la expresión en *trans* de PhaF en la morfología de *P. putida* N**

Como se indicaba en el apartado 3.1, una de las estrategias seguidas para incrementar la producción de bioplástico en esta cepa fue la expresión en *trans* del gen que codifica la faseina PhaF de *P. putida* U. Se partió de la hipótesis de que la expresión de dicha proteína podía proporcionar una disposición distinta de los gránulos de PHAs en aquellas bacterias de *P. putida* N cultivadas en medio de producción de PHAs, ya que *phaF* contribuye a la coalescencia y a la reducción del número de gránulos de bioplástico, si bien con este transconjugante no se logró incrementar la producción significativamente.

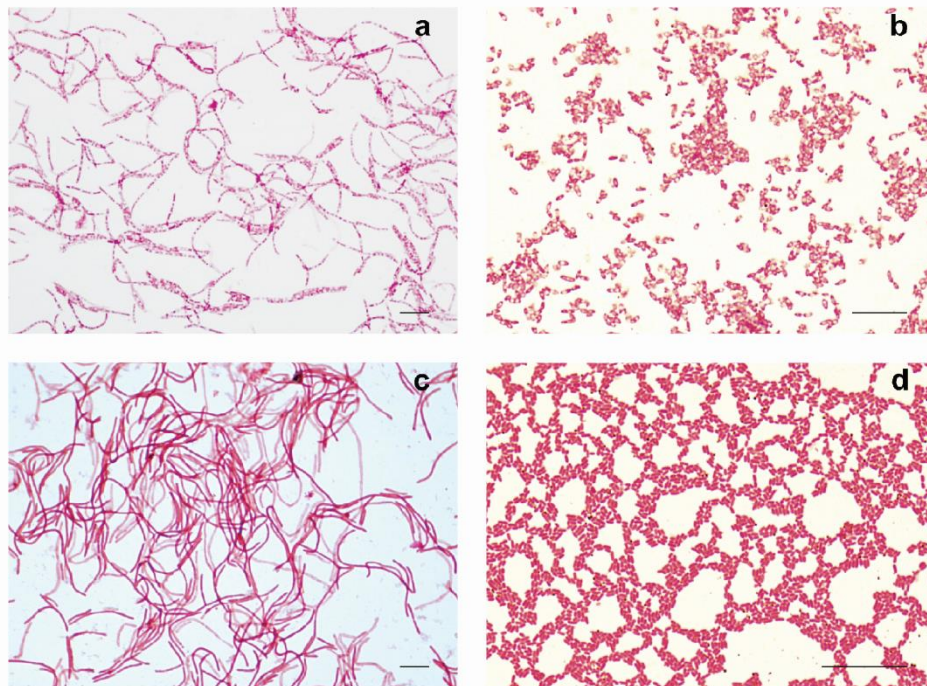
Sorprendentemente, la cepa *PpNpMCphaF*, cultivada en presencia de ampicilina, no mostraba un fenotipo alargado al ser observada al microscopio. Todo lo contrario, las bacterias se presentaban como bacilos cortos en todos los medios suplementados con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Por su parte, el control *PpNpMC* sí tenía una morfología alargada similar a la de la cepa silvestre (Fig. 31).



**Figura 31.** Aspecto morfológico de *P. putida* N (a-d), *P. putida* NpMC (e y f) y *P. putida* NpMC*phaF* (g y h). El cultivo se llevó a cabo en MM suplementado con octanoato 30 mM y glucosa 60 mM (a, c, e y g) o con 4-hidroxifenilacetato (10 mM) (b, d, f y h) y en presencia de ampicilina (100 µg/ml) (a, b, e, f, g y h) o en ausencia de la misma (c y d).

A la vista del distinto comportamiento expresando o no el gen *phaF* de *P. putida* U, se llevó a cabo un experimento para comprobar estas observaciones, y evaluar el crecimiento y morfología de las cepas *P. putida* N, *PpNpMC* y *PpNpMCphaF* a distintas concentraciones de ampicilina (Ap), tetraciclina (Tc) y con ambos antibióticos, para descartar una posible interferencia por la Tc. De este modo, se sembraron las cepas *P. putida* N, *PpNpMC* y

*PpNpMCphaF* en placas tanto de LB como de 4-hidroxifenilacetato con 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$  de Ap, y se realizaron tinciones con fucsina de Gram a distintos tiempos de crecimiento en medio sólido (a las 15, 20 y 24 horas) para su observación al microscopio óptico. Dichas observaciones revelaron que las bacterias silvestres y las cepas silvestres conteniendo el plásmido pMC en *trans* se muestran alargadas en todos los medios en los que está presente la Ap. A las 15 horas estas dos cepas sólo crecen a concentraciones de 100  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que a 200  $\mu\text{g/ml}$  y 400  $\mu\text{g/ml}$  la concentración es inhibitoria. *PpNpMCphaF* crecía a las 15 h en todos los medios, observándose con una morfología típicamente bacilar a 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que se aprecia más alargada a 400  $\mu\text{g/ml}$ . Conforme se incrementa el número de horas de cultivo, se observa un mayor crecimiento, tal vez ocasionado por la degradación paulatina de la Ap con el paso del tiempo. Es entonces cuando en las placas con las concentraciones más bajas de ampicilina las cepas *P. putida* N y *PpNpMC* se observan como bacilos más cortos, mientras que en las que la concentración del antibiótico era mayor (200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ) hay crecimiento, observándose morfologías filamentosas. La cepa *PpNpMCphaF*, a las 24 h presentaba una morfología bacilar, que se mantiene a lo largo del tiempo.



**Figura 32.** Fotografías de microscopía óptica de *P. putida* N (a y c) y *P. putida* pMC*phaF* (b y d) cultivadas en MM líquido suplementado con octanoato (30 mM) y glucosa (60 mM) (a y b) o 4-hidroxifenilacetato (10 mM) (c y d) y ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (a-d). Las barras indican un tamaño de 10  $\mu\text{m}$ .



Los resultados obtenidos mostraron que la longitud de la bacteria está asociada con el tiempo de crecimiento y la concentración de antibiótico. En un medio sólido rico como el medio LB, la observación de *P. putida* N al microscopio óptico a las 15 horas de crecimiento mostraba algunas bacterias alargadas, pero también otras con una morfología más corta, fragmentada. En MM el crecimiento es más lento y a las 15 horas las bacterias se muestran largas, igual que a las 24 horas.

La cepa control *PpNpMC* (aquella que contiene al plásmido pBBR1MCS-3 sin inserto) exhibía el mismo aspecto filamentoso que se observaba en la cepa silvestre. Por su parte, *PpNpMCphaF* mostraba una morfología típicamente bacilar. Sorprendentemente, esta cepa no presentaba dificultad para crecer en un medio, tanto mínimo como complejo, al que se cuadruplicaba la concentración de ampicilina (400 µg/ml).

Cuando se cultivaron estas cepas en los mismos medios variando las concentraciones de Ap (0, 100, 200 y 400 µg/ml) pero suplementados con Tc (25 µg/ml) se observan resultados semejantes, salvo en el caso de la cepa silvestre que no creció en ningún medio por no poseer resistencia a Tc. Estos resultados sugieren que no existe ningún tipo de efecto sobre la morfología celular por parte de la Tc.

La única diferencia existente entre las cepas que mostraban morfología filamentosa o bacilar cultivadas en las condiciones descritas, era la expresión en *trans* de *phaF* en las células bacilares. En resumen, todos estos resultados nos permiten concluir que, ya sea de forma directa o indirecta, PhaF evita la filamentación de *P. putida* N causada por la ampicilina. Por consiguiente, de acuerdo con las observaciones realizadas, los transconjugantes que llevaran una copia adicional de *phaF* presentarían un incremento en la resistencia al antibiótico ampicilina, siendo, por lo tanto, capaces de crecer a concentraciones de Ap que resultarían inhibitorias para la cepa silvestre.

Se llevó a cabo un experimento en el que se sembraron *P. putida* N y *P. putida* N pMC*phaF* en MM sólido suplementado con 4-hidroxifenilacetato y concentraciones crecientes de Ap. Las concentraciones empleadas fueron 100, 400, 600, 800, 1.000, 1.200, 1.500, 2.000, 5.000 y 10.000 µg/ml. Se comenzó sembrando las cepas en el medio con concentración más baja y una vez crecido, se hacía el pase al siguiente medio. Con las concentraciones más bajas (100–600 µg/ml) el transconjugante crecía en 24 h, y conforme se fue aumentando la concentración el crecimiento se ralentizaba, tardando 48 h en medios con 2.000 µg/ml o 5.000

µg/ml. Al alcanzar los 10.000 µg/ml (10 mg/ml) el crecimiento se produce en forma de colonias más o menos individualizadas, es decir, hay resistencia a esta concentración tan elevada. Por su parte, el control crecía bien a la concentración de 100 µg/ml, pero apenas crecían unas pocas colonias a 400 µg/ml transcurridas 48 h.

La siembra de *PpNpMCphaF* en concentraciones crecientes de ampicilina, demostró que esta cepa crecía incluso a concentraciones superiores a 10 mg/ml, lo que supone un incremento en la resistencia a este antibiótico de dos órdenes de magnitud con respecto a la cepa silvestre.

La proteína PhaF ha sido descrita, como ya se ha indicado anteriormente, como un regulador transcripcional del *cluster pha*, caracterizándose por poseer un dominio de unión a DNA (Prieto *et al.*, 1999). A la luz de los resultados obtenidos, y de algún modo que desconocemos, PhaF favorecería la resistencia a los efectos antimicrobianos del antibiótico ampicilina. Se podría especular que este fenómeno fuese debido a una competencia entre PhaF y el antibiótico (como ocurre con PBP-3, responsable de que durante la formación del septo la síntesis de peptidoglucano tenga lugar principalmente en la invaginación que separará las células hijas) o por un incremento de la cantidad de β-lactamasa sintetizada propiciado por PhaF. Huse y colaboradores, en sus trabajos con *Pseudomonas aeruginosa*, describieron que en esta cepa, PhaF actúa como un regulador post-transcripcional, incrementando la síntesis del exopolisacárido PsI y, por ende, la formación de biofilm (Huse *et al.*, 2013). Este exopolisacárido incrementaría la resistencia a antibióticos impermeabilizando la célula (Yang *et al.*, 2011). De acuerdo con la bibliografía existente, *Pseudomonas putida* no produce el exopolisacárido PsI, pero sí otros exopolisacáridos (Fazli *et al.*, 2014), por lo que no es descartable que un mecanismo similar sea el responsable del incremento de la resistencia a ampicilina en *P. putida* N. Otra posibilidad, muy frecuente en la adquisición de resistencia a antibióticos, sería que se alterase la expresión de algún transportador de membrana y que en respuesta a la expresión de *phaF*, incrementase la expulsión de la Ap del periplasma (Fernández y Hancock, 2012).

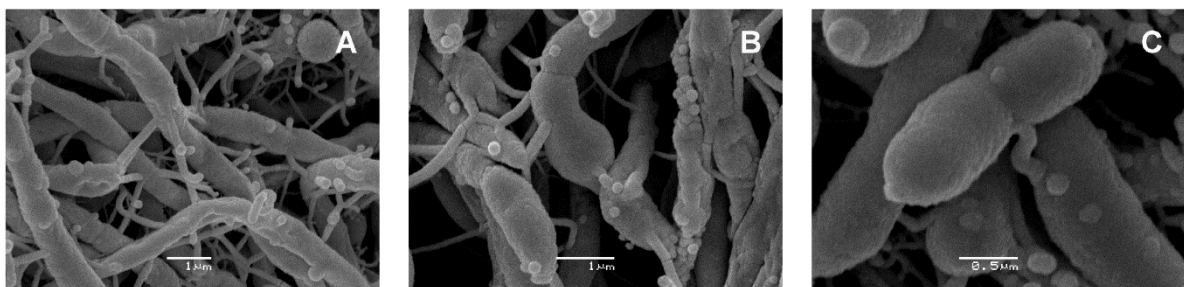
### 5.3. Observaciones ultraestructurales entre las células de *P. putida* N

Otro aspecto interesante que se observó al realizar las microfotografías de barrido (SEM) de *P. putida* N fue la presencia de estructuras microtubulares que unen las células cuando crecen en medio sólido con ampicilina. Estas conexiones parecen comunicar unas células con otras dentro de las comunidades bacterianas (Fig. 33).

Algunas publicaciones señalan que las posibles comunicaciones entre células son en realidad la disposición que adquiere la matriz extracelular que segregan las bacterias en la formación de biofilms cuando dichas bacterias se someten al procesamiento por deshidratación para SEM (Kachlany *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2014). Sin embargo, otros trabajos, en los que las muestras se han sometido a la deshidratación característica para obtener microfotografías por SEM, demuestran la existencia de “nanotubos” y el intercambio de moléculas entre células (Pande *et al.*, 2015).

La comunicación y la cooperación entre células dentro de comunidades microbianas han sido descritas ampliamente y están implicadas en numerosos procesos, desde la bioluminiscencia mediada por *quorum sensing* a la producción de antibióticos o la inhibición del crecimiento de estas comunidades microbianas (Ng y Bassler, 2009). En los últimos años se han publicado varios artículos en los que se señala la existencia de microtúbulos o nanotubos entre las bacterias de las comunidades microbianas de distintas especies, como *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Acinetobacter baylyi* (Dubey y Ben-Yehuda, 2011; Dubey *et al.*, 2016; Pande *et al.*, 2015). La existencia de apéndices que comuniquen células no es nueva, ya que los *pili F* se conocen desde hace mucho tiempo para el intercambio de información genética en el proceso de conjugación bacteriana (Curtiss *et al.*, 1969).

Los trabajos publicados atribuyen a estas prolongaciones la participación en el intercambio de metabolitos o de elementos genéticos (*pili F*), lo que permitiría que las células sobrevivieran en condiciones metabólicas complejas (Pande *et al.*, 2015). En este sentido, la función sería similar a la que se ha descrito para las vesículas de membrana (MV) tanto en células eucariotas como procariotas (Marguet *et al.*, 2013).



**Figura 33.** Microfotografías de *P. putida* N en las que se aprecian las estructuras microtubulares que conectan unas células con otras.

En la cepa que ocupa este estudio, el intercambio de metabolitos podría ser importante para unas células sometidas a unas condiciones de estrés celular que se refleja en la morfología

filamentosa que adquieren. Las células que expresan en *trans* el gen *phaF* podrían habilitar estos intercambios para colaborar y contrarrestar los efectos asociados al exceso de ampicilina. Si bien estas hipótesis están pendientes de ser contrastadas, ahondar en ellas puede ser importante para entender cómo las comunidades bacterianas se adaptan y se superponen a este tipo de situaciones de estrés. En última instancia, estos experimentos podrían contribuir a diseñar estrategias contra aquellos microorganismos patógenos que adquieren resistencia a antibióticos y que, por lo tanto, son cada vez más difíciles de erradicar.

#### 5.4. Disrupción del gen *phaF* en *Pseudomonas putida* N

El incremento de la resistencia a ampicilina que provoca la expresión en *trans* de PhaF, y la hipótesis de que esta fasina previene de alguna manera la acción del antibiótico sobre el entrecruzamiento del peptidoglucano en la pared celular, sirvieron de premisas para plantear una nueva aproximación experimental que intentase explicar la relación entre esta proteína y el efecto del antibiótico.

Si PhaF previene la actividad de la ampicilina sobre la pared celular, es posible que en ausencia de la fasina la célula sea más sensible al antibiótico, al no contrarrestar su efecto. Se puso a prueba esta hipótesis interrumpiendo el gen *phaF* de *P. putida* N, para posteriormente sembrar el mutante en medio suplementado con ampicilina y comparar su morfología con la cepa silvestre.

La disrupción de *phaF* se llevó a cabo con la construcción pK18*phaF*. Dicha construcción se obtuvo mediante digestión del propio *phaF* con las enzimas de restricción PstI y Sall, ambas con cortes internos en el gen, que liberan un fragmento interno de 307 pb. Dicho fragmento se clonó sobre los mismos cortes en el plásmido pK18::*mob*.

Para obtener la cepa *PpNpK18phaF* con el gen *phaF* interrumpido fue necesario realizar una conjugación triparental, en la que se utilizó la cepa *E. coli* pK18*phaF* como célula donadora y la cepa *P. putida* N como aceptora del plásmido. Además, se necesitó el concurso de *E. coli* *helper*. La selección de los transconjugantes se llevó a cabo en MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato y el antibiótico Km.

Tal y como se indica en el capítulo *Materiales y Métodos*, pK18::*mob* es un plásmido que al no replicarse en *Pseudomonas* actúa como integrativo. Contiene un gen de resistencia a Km. Por ello, ante la presión selectiva que imprime la presencia de Km en el medio, la única alternativa con la que contará la bacteria para su supervivencia será incorporar el plásmido

mediante un evento de recombinación homóloga que tenga lugar entre el fragmento de la fasina presente en el plásmido y el gen *phaF* situado en el genoma de *P. putida* N. Dicho evento permitirá a *P. putida* N adquirir resistencia a Km, pero el gen *phaF* quedará interrumpido por el plásmido, y por tanto, el transconjugante *PpNpK18phaF* no expresará PhaF.

El mutante que carece de una copia de *phaF* funcional se sembró en MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato y con distintas concentraciones de ampicilina: sin ampicilina, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml y 200µg/ml. Como cepa control para evaluar la sensibilidad a la ampicilina se utilizó *P. putida* N, sembrando ésta en las mismas placas.

En ningún caso el transconjugante con el gen *phaF* en el que se había interrumpido este gen mostró mayor sensibilidad a Ap que la cepa silvestre. Ambas cepas crecieron de forma similar cuando se utilizaron en los diferentes cultivos concentraciones crecientes de Ap.

Estos resultados indican que, cuando se superexpresa, la proteína PhaF juega un papel importante en la adquisición de resistencia a Ap. Sin embargo, la ausencia de PhaF no comporta un incremento de la sensibilidad frente al antibiótico. Después de todo, la bacteria cuenta con β-lactamasas que degradan la ampicilina, por lo que esté o no presente *phaF*, la sensibilidad no se va a incrementar. En este sentido, PhaF favorece e incrementa la resistencia, pero al no ser el sistema principal que previene la actividad de los antibióticos β-lactámicos sobre la pared celular, su ausencia no compromete la viabilidad celular.

### **5.5. Disrupción génica de *ftsZ* en *P. putida* U**

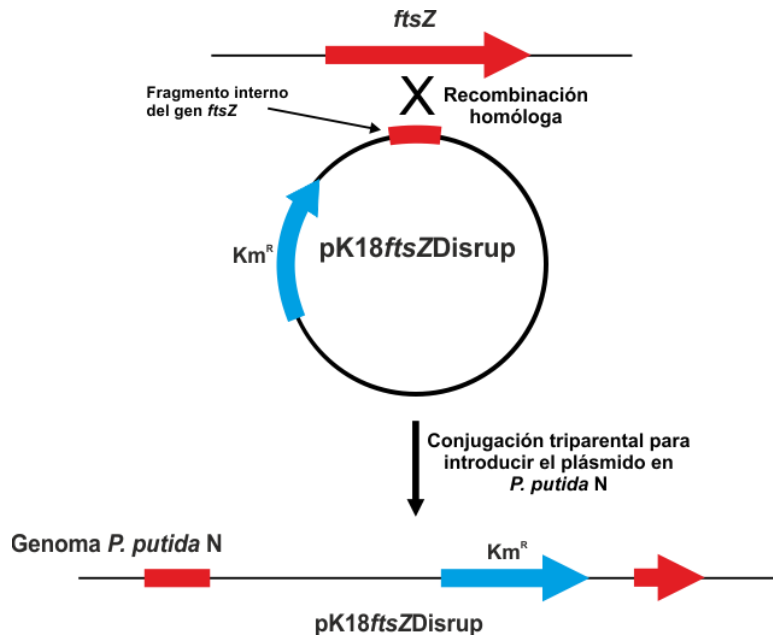
Como se apuntó en el apartado 5.1, las células de *P. putida* N adquieren una morfología alargada cuando se cultivan en medio con ampicilina. Dichas observaciones nos hicieron plantearnos si se podría diseñar una cepa capaz de modificar su morfología, incrementando su volumen, que acumulase más plástico que la cepa silvestre, y que no viese mermada su capacidad de crecimiento por una mayor sensibilidad al antibiótico suplementado en el medio (como ocurre con la ampicilina). Además, este tipo de mutantes permitiría abordar el estudio del reparto de los gránulos en el proceso de división celular.

De entre los numerosos genes que participan en el proceso de división celular, el más relevante, dada la función de la proteína que codifica, es *ftsZ*. Este gen codifica una proteína de la que depende el adecuado ensamblaje de la maquinaria de fisión binaria, y que es la responsable de la constricción en el proceso de división celular (Mingorance *et al.* 2010).

En *E. coli* se han descrito distintas estrategias para obtener fenotipos filamentosos que incrementen el acúmulo de PHB. Entre ellas se encuentran la delección del gen *mreB* (cuya proteína es responsable de la anchura y forma bacilar) y la expresión inducible en este mutante de Sula que inhibe FtsZ, o regulando la expresión de *ftsZ* y/o *mreB* a través de la técnica CRISPRi (Elhadi *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2015). Por lo tanto, siguiendo un planteamiento similar, se llevó a cabo la disrupción de *ftsZ* en *P. putida* U para, en el caso de que la mutación no resultase letal, producir un fenotipo filamentosos en esta cepa. Este mutante podría ser muy interesante desde el punto de vista de la producción de PHAs, ya que el incremento del volumen celular podría aumentar su capacidad para acumular biopolímero. Por otro lado, esta cepa podría proporcionar información sustancial sobre el proceso de síntesis de PHAs en pseudomonádidos, particularmente en el aspecto del reparto de los gránulos de PHA entre las células hijas tras el proceso de división celular.

Una vez identificado el gen *ftsZ* en *P. putida* U se llevó a cabo su disrupción. Para ello se amplificó un fragmento interno con los oligonucleótidos UDisrFtsZ1 y UDisrFtsZ4 (*Materiales y Métodos*, Tabla 5) utilizando el DNA genómico de *P. putida* U como molde. El producto de la amplificación (552 pb) se clonó en el plásmido de clonación pTZ57R/T, y se subclonó en un plásmido que actúa como integrativo en *P. putida* U (pK18::*mob*) con las dianas de restricción EcoRI y BamHI. Se obtuvo así la construcción pK18*ftsZ*Disrup, cuya integridad se comprobó por secuenciación. De este modo, la integración del plásmido en el genoma mediante un proceso de recombinación homóloga mediado por el fragmento interno del gen *ftsZ*, dio como resultado la disrupción de la secuencia codificante de este gen.

La interrupción del gen se llevó a cabo a través de una conjugación triparental en la que el plásmido pK18*ftsZ*Disrup cedido por *E. coli* se integra en el gen *ftsZ* de las cepas receptoras *Pseudomonas putida* U y *Pseudomonas putida* U  $\Delta$ *fadBA*. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con los antibióticos Rf (resistencia endógena de *Pseudomonas putida*) y Km (resistencia proporcionada por el plásmido), y, posteriormente, se sembraron en placas de MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato RfKm.



**Figura 34.** Representación esquemática del procedimiento seguido para interrumpir el gen *ftsZ* mediante recombinación homóloga mediada por el plásmido *pK18::mob*.

Cuando se observaron los transconjugantes al microscopio óptico, se observó que su morfología era típicamente bacilar, cuando se esperarí que fuese alargada como consecuencia de la interrupción del gen *ftsZ*. Se secuenció el gen *ftsZ* en los transconjugantes y se verificó que se encontraba interrumpido por el plásmido *pK18::mob*.

Este hecho es sorprendente, ya que cabría esperar que la disrupción del gen tuviese un efecto apreciable a simple vista en su morfología. Se obtuvieron tan solo 3-4 colonias transconjugantes por cada placa de siembra directa de la conjugación triparental, siendo llamativa la baja eficiencia de recombinación homóloga. En *E. coli*, se había descrito con anterioridad a través de experimentos de disrupción génica que *ftsZ* es un gen esencial (Bi *et al.*, 1991; Dai y Lutkenhaus, 1991). Es probable que la interrupción del gen *ftsZ* en *Pseudomonas putida* también sea letal, y que solo sobrevivan aquellos transconjugantes en los que tiene lugar algún evento extraño, como una duplicación o la recombinación homóloga con otro gen similar o por otro punto de la secuencia del plásmido.

## 6. Adaptación de *Pseudomonas putida* en medio de producción

Uno de los aspectos sobre los que más se ha trabajado para alcanzar la escala industrial en la producción de PHAs es la obtención de mutantes superproductores de estos polímeros. Nuestro grupo de investigación obtuvo, en trabajos anteriores, el mutante *Pseudomonas putida*

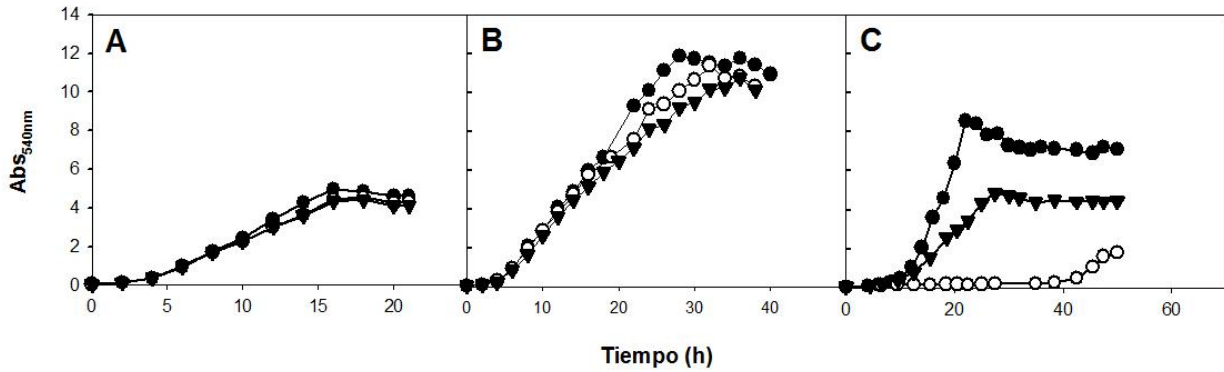
U  $\Delta$ *fadBA*, una cepa productora de mcl-PHAs en la que se eliminaron dos genes que codifican varias actividades enzimáticas críticas en la ruta de  $\beta$ -oxidación, y con el que se realizó este estudio. La observación de que este mutante superproductor creciese mejor en un medio de producción con cada resiembra, y que simultáneamente perdiese su capacidad para sintetizar el polímero, motivó que se estudiase este fenómeno para conocer sus causas.

### 6.1. Crecimiento de *P. putida* U y *P. putida* $\Delta$ *fadBA* en medio definido con distintas fuentes de carbono.

*P. putida* U es capaz de acumular PHA cuando se cultiva en medios mínimos químicamente definidos que contienen ácidos grasos alifáticos y/o aromáticos como fuente de carbono (García *et al.*, 1999). De entre las estrategias empleadas para incrementar la síntesis de polihidroxicanoatos en distintas estirpes de *P. putida*, la delección de los genes de la  $\beta$ -oxidación es la que ha proporcionado mejores resultados (Olivera *et al.*, 2001b; Ouyang *et al.*, 2007b; Park y Lee, 2004). El mutante superproductor de PHAs *P. putida*  $\Delta$ *fadBA* obtenido mediante la delección de los genes *fadBA* (Olivera *et al.*, 2001b) adquiere un color blanquecino y un aspecto céreo cuando se siembra en medio mínimo sólido que contiene precursores de polímero (como consecuencia de la gran cantidad de polímero que acumula). La observación al microscopio de las bacterias reveló que éstas presentaban una morfología más larga y grande que la de *P. putida* U, en las que se apreciaba la gran deformación que ejerce la presencia de polímero sobre la estructura bacilar de las células (Fig. 37, c y d).

El cultivo de *P. putida* U y de *P. putida*  $\Delta$ *fadBA* en MM suplementado con diferentes fuentes de carbono evidenció diferencias entre sus cinéticas de crecimiento, en función de la presencia de precursores de polímero. Así, cuando el MM contenía glucosa o 4-hidroxifenilacetato como fuente de carbono, que no pueden dar lugar a intermediarios susceptibles de ser polimerizados en PHAs, el crecimiento fue similar tanto para *P. putida* U como para *P. putida*  $\Delta$ *fadBA* (Fig. 35A y 35B). Sin embargo, cuando las cepas se cultivaron en MM con octanoato como única fuente de carbono (MMO), compuesto que podría ser empleado en la síntesis de mcl-PHAs, se observaron diferencias notables en la cinética de crecimiento y en los valores de absorbancia a 540 nm alcanzados por los diferentes cultivos (Fig. 35C).





**Figura 35.** Curvas de crecimiento de *P. putida* U (●), *PpUΔfadBA* (○) y *PpUΔfadBAPHA* (▼) cuando se cultivaron en MM suplementado con 4-OH-fenilacetato 20 mM (A), glucosa 40 mM (B) y octanoato 20 mM (C).

De este modo, cuando las cepas se cultivaron en un MM conteniendo octanoato (20 mM) como fuente de carbono, *P. putida* U alcanzó el máximo de absorbancia a las 22 horas, mientras que la cepa *PpΔfadBA* mostró un crecimiento muy escaso en el mismo medio, tal y como se puede apreciar en la gráfica (Fig. 35C). Su crecimiento se prolongó durante 50 horas, experimentando un aumento de la absorbancia a 540 nm (y por tanto del número de células) a partir de las 40 horas (Fig. 35C). Este comportamiento obedecería a que, una vez eliminados los genes de la  $\beta$ -oxidación, el complejo FadBA no se encontraría disponible para llevar a cabo las correspondientes actividades enzimáticas, por lo que se induciría una ruta de  $\beta$ -oxidación menos eficiente (una  $\beta$ -oxidación II que reemplaza las actividades enzimáticas de FadBA (Olivera *et al.*, 2001a)). En estas condiciones, tendría lugar un desequilibrio metabólico, en el que se reduciría tanto la formación de poder reductor (NADH) como de acetyl-CoA, ralentizando el metabolismo general. En otras cepas de *Pseudomonas* se ha descrito la existencia de una relación directa entre el metabolismo de PHA y la disponibilidad de equivalentes reductores. Así, una alta proporción de [acetyl-CoA]/[CoA] y [NADH]/[NAD<sup>+</sup>] inhibe la oxidación de los ácidos grasos y conduce a la acumulación de PHAs, mientras que una baja proporción promueve la movilización del polímero (Ayub *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009). La delección de los genes *fadBA* impediría que se genere poder reductor, e impediría el crecimiento, lo que podría estar relacionado con las observaciones realizadas en estos experimentos.

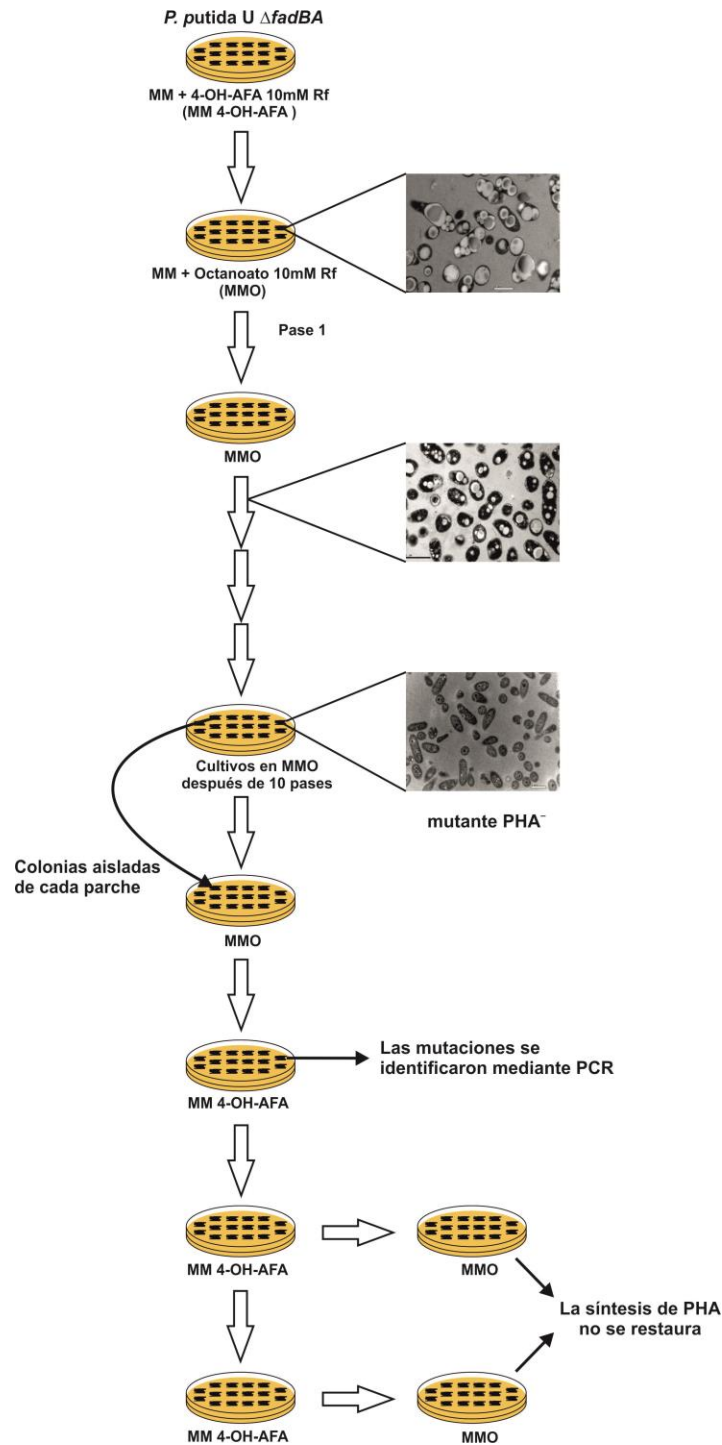
Otra consideración importante a la hora de evaluar las diferencias en el crecimiento que experimentan ambas cepas en medio de producción de polímero, es la alteración morfológica que se produce como consecuencia del acúmulo anormalmente elevado de PHA en *PpΔfadBA* (Olivera *et al.*, 2001b). Estos cambios en su tamaño y longitud podrían afectar a la

capacidad de esta cepa para llevar a cabo una división celular eficiente alterando, por lo tanto, el crecimiento bacteriano y produciendo una ralentización del mismo. Una relación similar entre la síntesis de PHAs y la alteración de la división celular fue descrita por Lee y colaboradores, quienes observaron una notable filamentación en cepas de *E. coli* recombinantes que expresaban los genes de la ruta biosintética del poli- $\beta$ -hidroxibutirato (*phb*) (Lee *et al.*, 1994).

Si bien es más probable que el escaso crecimiento de *Pp $\Delta$ fadBA* en MMO tenga su origen en la alteración del flujo metabólico de esta cepa, no se puede eliminar la posibilidad de que otros procesos, como el control del tamaño y la división bacteriana, en un mutante en el que se está acumulando intracelularmente una gran cantidad de polímero, sean los artifices de esa cinética de crecimiento anómala.

## 6.2. Aislamiento e identificación de mutantes de la cepa superproductora *PpU $\Delta$ fadBA* incapaces de sintetizar PHAs

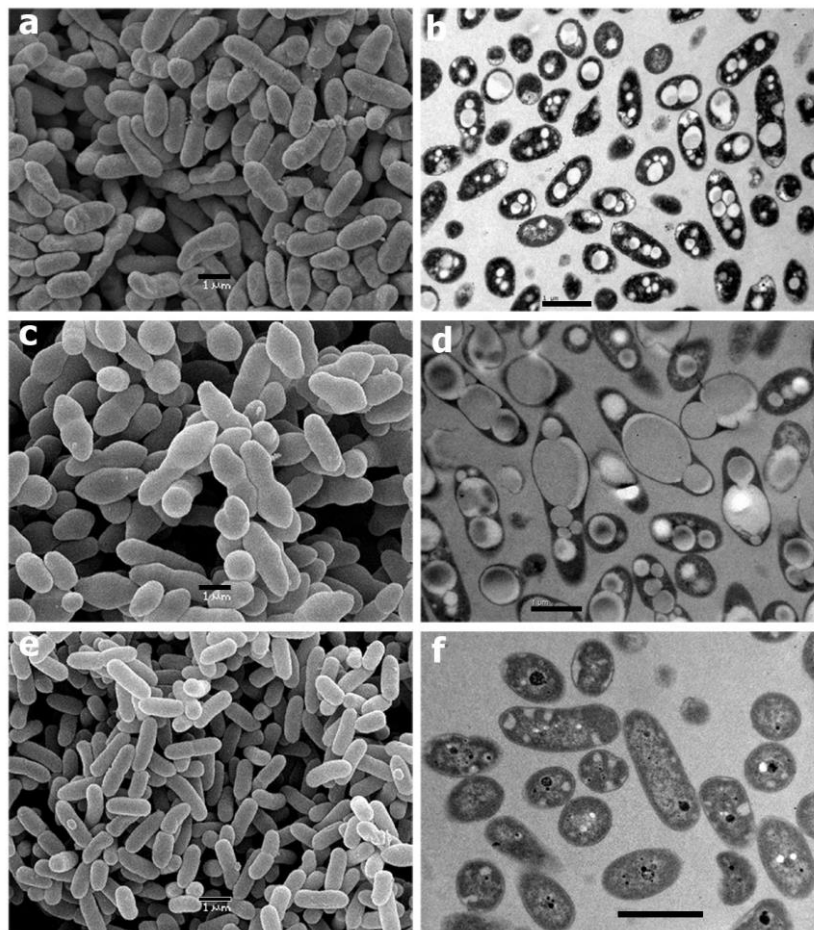
Una de las observaciones que se realizaron al trabajar con *PpU $\Delta$ fadBA* fue que su cultivo de forma repetida en MMO sólido durante 24 h a 30 °C disminuía gradualmente su capacidad para acumular PHA, al tiempo que se incrementaba la velocidad de crecimiento en este medio. Para analizar este efecto, se diseñó un protocolo que implicaba aislar colonias de *Pp $\Delta$ fadBA* y su resiembra, periódica (cada 24 h) y seriada, en MMO sólido durante un total de 10 pases consecutivos. Si bien durante los dos primeros pases el crecimiento era pobre y escaso, las siembras sucesivas incrementaban notablemente la tasa de crecimiento del cultivo. Además, la observación diaria al microscopio óptico de las cepas correspondientes a las diferentes resiembras permitió establecer una relación directa, según la cual, a mayor número de pases más crítica era la pérdida de la capacidad para acumular PHAs (Fig. 36). Mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo comprobar que tras cuatro pases, más del 80% de las bacterias habían perdido la capacidad para acumular PHAs, mientras que tras siete pases ninguna bacteria acumulaba cantidades apreciables de PHAs. Esto es, las bacterias, a las que en adelante denominaremos “adaptadas”, no sintetizaban PHAs. Este hecho se confirmó mediante observación directa al microscopio y mediante el protocolo de extracción de PHAs con solventes orgánicos (Lageveen *et al.*, 1988b). El procedimiento utilizado para aislar cepas derivadas de *P. putida  $\Delta$ fadBA* incapaces de producir PHA (*Pp $\Delta$ fadBAPHA<sup>-</sup>*, abreviadamente PHA<sup>-</sup>) se resume en la figura 36.



**Figura 36.** Procedimiento seguido para aislar los mutantes derivados de *P. putida*  $\Delta fadBA$  no productores de PHAs (mutantes  $PHA^-$ ).

Cuando las bacterias  $PHA^-$  se cultivaron en medios mínimos que contenían como fuentes de carbono tanto precursores de PHAs (MM + 4-hidroxifenilacetato + 7-hidroxifenilheptanoato) como compuestos que no eran precursores (MM + glucosa, MM + 4-hidroxifenilacetato), y se efectuaron resiembras periódicas en los mismos, comprobamos que en ningún caso se recuperaba su capacidad para sintetizar PHAs al ser cultivadas en MMO.

Por el contrario, cuando se cultivó la cepa silvestre *P. putida* U en los mismos medios y con las mismas condiciones, dicha cepa mantuvo su capacidad para sintetizar PHAs, incluso cuando el número de resiembras periódicas en MMO fuese mucho mayor (20 o más). A la luz de estos resultados, y puesto que la única diferencia entre ambas cepas era la delección de los genes *fadBA*, la hipótesis más inmediata sería que la ausencia de estos genes fuese la responsable de los eventos que tienen lugar para que una cepa superproductora de PHAs se convierta, tras el cultivo repetido en un medio de producción con precursores de PHA como única fuente de carbono, en una cepa incapaz de producir PHAs. La adaptación de estas bacterias en MMO, sugiere que al eliminar la ruta de  $\beta$ -oxidación y al forzar su crecimiento en un medio con una única fuente de carbono y de precursores de PHAs, se seleccionan aquellas que pierden la capacidad para acumular polímero.



**Figura 37.** Microfotografías de SEM (a, c y e) y de TEM (b, d y f) de *P. putida* U (a y b), *P. putida* U  $\Delta$ *fadBA* (c y d), y *P. putida* U  $\Delta$ *fadBA* PHA<sup>-</sup> cuando se cultivan en MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato (10 mM) y octanoato (10 mM). Las barras indican un tamaño de 1  $\mu$ m.

Además, el cultivo repetido de la cepa *Pp* $\Delta$ *fadBA* en medio sólido con octanoato (10 mM) y 4-hidroxifenilacetato (10 mM), no condujo a la pérdida de su capacidad para

superproducir PHAs. Estos datos indican que en presencia de una fuente de carbono adicional que restaura el balance energético, los eventos que evitan el acúmulo de PHAs no se ponen de manifiesto.

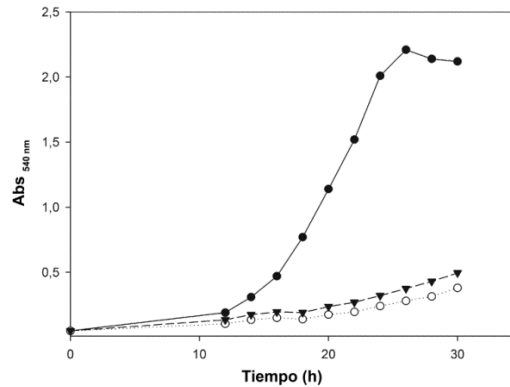
Las cepas adaptadas (PHA<sup>-</sup>) no eran capaces de sintetizar PHA y tampoco recuperaban dicha capacidad aunque se variasen las condiciones de cultivo. La alteración que habían sufrido era permanente y, por lo tanto, probablemente, dicha modificación se había fijado genéticamente, es decir, se debía a la introducción de mutaciones en el genoma de *PpΔfadBA* que afectaban a la síntesis de PHAs. Puesto que el *cluster pha* contiene todos los elementos necesarios y suficientes para la síntesis de PHAs, las mutaciones podrían haber tenido lugar en estos genes (Sandoval *et al.*, 2007). Por esta razón, el análisis de este *cluster* era un buen punto de partida para comenzar la búsqueda de las mismas en el genoma de *PpΔfadBA*.

### 6.3. Análisis de las causas responsables de las diferencias de crecimiento observadas. Cultivo en MM con butirato

La ausencia de un complejo FadBA que catalizara las reacciones enzimáticas correspondientes para degradar el octanoato justificaría por sí sola las dificultades que presentaba la célula para crecer en MMO. Sin embargo, tal y como se apuntaba anteriormente, esta deficiencia metabólica, podría tener un efecto, bien acumulativo o bien sinérgico, con las alteraciones que originan una morfología anormal cuando se acumulaban PHAs.

Para evaluar si esta morfología contribuía a ralentizar el crecimiento, se sembraron las cepas *P. putida* U, *PpUΔfadBA* y *PpΔfadBAPHA<sup>-</sup>* en una fuente de carbono cetogénica y sustrato de la ruta de β-oxidación, pero que no condujese al acúmulo de polímero. El MM se suplementó con 20 mM de butirato (MMB), cuyo intermediario 3-hidroxi-butiril-CoA no puede ser utilizado por *P. putida* U como precursor para sintetizar PHA, ya que esta cepa no poseía ni los genes *phb* para la síntesis de PHB, ni podía obtener el polímero mediante síntesis *de novo* de ácidos grasos (García *et al.*, 1999). *P. putida* U catabolizaría el butirato a través de la β-oxidación, utilizando FadBA, mientras que *PpUΔfadBA* y *PpΔfadBAPHA<sup>-</sup>* lo harían a través de la β-oxidación II. Puesto que no se produce acúmulo, las diferencias de crecimiento entre las cepas, en caso de que las hubiera, no podrían ser atribuibles a cambios morfológicos, y sólo podrían explicarse por el desequilibrio metabólico impuesto por la delección de los genes *fadBA*.

A pesar de que las cepas no podían sintetizar PHAs, las diferencias entre el crecimiento de *P. putida* U y de *PpΔfadBA* se mantenían, por lo que el pobre crecimiento de esta última parece ser debido a las consecuencias metabólicas derivadas de la delección (Fig. 38).



**Figura 38.** Curva de crecimiento de *P. putida* U (●), *PpUΔfadBA* (○) y *PpΔfadBAPHIA*<sup>-</sup> (▼) en MM suplementado con butirato 20 mM.

Por su parte, el cultivo de *PpΔfadBAPHIA*<sup>-</sup> y *PpΔfadBA* en MMB no arrojó diferencias observables en el crecimiento de ambas cepas, mientras que cuando se cultivaron en MMO los valores de crecimiento alcanzados por *PpΔfadBAPHIA*<sup>-</sup> eran más altos que aquellos alcanzados por *PpΔfadBA* (Fig. 35C). El distinto comportamiento de las cepas en estos medios sugiere, por un lado, que la  $\beta$ -oxidación II es menos eficiente que la  $\beta$ -oxidación I, especialmente en el catabolismo de los ácidos grasos de cadena corta, como es el caso del butirato. Esta observación ya había sido realizada en trabajos anteriores por Olivera y colaboradores (Olivera *et al.*, 2001a). Por otro lado, el acúmulo de PHAs en *PpΔfadBA* a partir de octanoato restaría intermediarios acil-CoA derivados de la  $\beta$ -oxidación utilizándolos como monómeros, en lugar de ser degradados y utilizados como fuente de crecimiento. Esta podría ser la causa del pobre crecimiento observado en esta cepa cultivada en el medio de producción, que es muy inferior al observado cuando esa misma cepa se cultivó en un medio carente de precursores de PHAs.

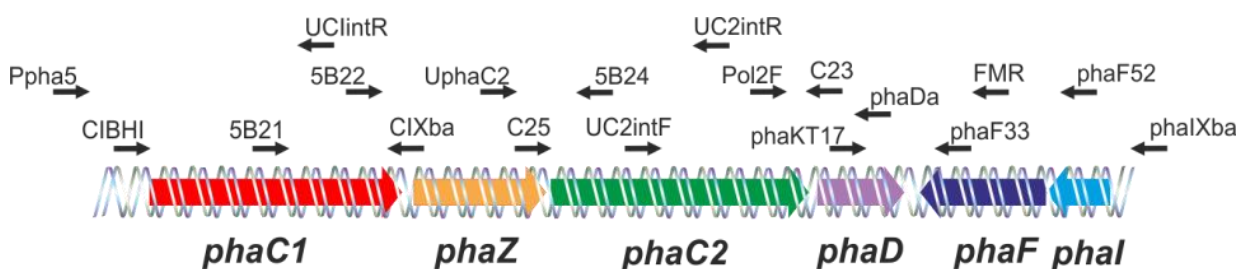
En un experimento adicional, *PpΔfadBA* se sembró en MMB haciendo diez pases seriados, del mismo modo que se hizo previamente en MMO. Se observó que, en ningún caso, el mutante perdía la capacidad de sintetizar mcl-PHAs. Puesto que el butirato, al igual que el octanoato, es un compuesto cetogénico, estos resultados sugieren que la aparición de mutaciones que afectan a la síntesis de PHAs, como las observadas cuando *PpΔfadBA* se cultiva en MMO, requiere que se den una serie de circunstancias al mismo tiempo, como son la presencia de una  $\beta$ -oxidación menos eficiente, el cultivo en un medio que contenga una

molécula cetogénica como única fuente de carbono, y que, además, se pueda producir a partir de ella la síntesis y acumulación de PHAs.

#### 6.4. Identificación de las secuencias mutadas en el *cluster pha* en los mutantes PHA<sup>-</sup>

Para determinar si existían secuencias mutadas en el *cluster pha* tras someter las cepas *PpΔfadBA* al estrés que suponía el acúmulo de PHAs y, en caso de haberlas, identificar los genes mutados y la naturaleza de las mutaciones producidas, se procedió a secuenciar las 6,3 Kb que componen este *cluster* en los mutantes espontáneos obtenidos. La secuenciación comenzó 350 pb aguas arriba del comienzo de la agrupación génica, puesto que podrían haberse producido alteraciones en la región promotora que determina la expresión de PhaC1, y que pudiesen ser el agente causal de la ausencia de síntesis de polímero.

Se llevaron a cabo cinco experimentos de adaptación tal y como se describe en la figura 36. Se seleccionaron 22 colonias de *PpΔfadBA* que no sintetizaban PHAs (aisladas a partir de resiembras diarias llevadas a cabo durante 10 días). Se amplificó mediante PCR la agrupación génica *pha* completa cuatro veces en cada una de las cepas estudiadas, de manera que se pudieran descartar las mutaciones introducidas por la polimerasa durante la PCR. Para minimizar los errores de copia que podría introducir la polimerasa en las PCRs, se utilizó una combinación de *Taq* y *Pfu* polimerasas. Los distintos amplicones de cada una de las amplificaciones sobre un mismo mutante fueron secuenciados para descartar posibles errores de secuenciación. En todos los casos, como control, se amplificó y secuenció una copia del *cluster* de la cepa *PpΔfadBA* sin adaptar.



**Figura 39.** Representación esquemática de la posición que ocupan los oligonucleótidos empleados en la secuenciación del *cluster pha* de *P. putida* U.

La secuenciación de los genes que componen el *cluster* se llevó a cabo utilizando los siguientes oligonucleótidos: Ppha5, CIXba, CIBHI, 5B21, UCIintR, 5B22, 5B24, UphaC2,

C23, UC2intF2, UC2intR2, Pol2F, phaF33, phaDa, KT17, phaIXba, FMR, phaF52 (*Materiales y Métodos*, Tabla 5).

Tras la identificación de un punto de mutación, el fragmento de DNA que contenía la secuencia alterada fue amplificado por PCR (hasta 10 reacciones diferentes por mutación), resecuenciándose los productos de amplificación.

A la hora de abordar la búsqueda de mutaciones, se partió de la premisa de que, de haber ocurrido dentro del *cluster pha*, éstas se habrían introducido aleatoriamente y que se encontrarían a lo largo de todos los genes que integran el *locus*. Sin embargo, sorprendentemente, todas las mutaciones se localizaron en el gen *phaCI*, que codifica la PhaC1 polimerasa. No se encontró ninguna mutación en la secuencia del resto de genes del *cluster* en ninguno de los mutantes analizados.

El análisis de los puntos de mutación en *phaCI* permitió establecer que se habían producido 4 tipos de eventos (Tabla 8), todos los cuales provocaban un cambio de actividad en la polimerasa:

**Tabla 8.** Mutaciones presentes en el gen *phaCI* de los mutantes PHA incapaces de acumular PHAs.

Mutante	Cambio Aa.	Codon de Fin	Delección	Duplicación
1	I225T			
2	D232N (2)*			
3	S254N (5)*			
4	S254I			
5	T343P (2)*			
6	M369V			
7	W376R (3)*			
8	N419H			
9	N419T			
10	T432P (2)*			
11	P552L			
12		E8STOP		
13		L20STOP		
14		Q116STOP (2)*		
15		Y270STOP		
16		W519STOP		
17		W525STOP		
18		L60STOP		
19			5Aa 377-381	
20			30Aa 328-358	
21			84Aa 288-372	
22				38Aa 410-448

\*Entre paréntesis se indica el número de mutantes aislados que presentan la misma mutación.



En 11 mutantes, un nucleótido se había reemplazado por otro (transiciones o transversiones), lo que suponía un cambio de aminoácido en PhaC1. Algunos de los mutantes presentaban afectado el mismo residuo aminoacídico, pero mediante su sustitución por un aminoácido diferente. Este es el caso de los mutantes 3 y 4, ambos afectados en la posición 254 (en los que una serina cambia en los mutantes por una asparagina o una isoleucina). El mismo fenómeno se observó en los mutantes 8 y 9 en la posición 419, en los que se sustituye el aminoácido asparagina por histidina (mutante 8) o por treonina (mutante 9). En los distintos experimentos de adaptación, se identificaron distintos mutantes que presentaban la misma mutación (el número de ellos se indica en la Tabla 4 entre paréntesis). Esto podría indicar una pseudoaleatoriedad en el proceso de mutación, posiblemente dirigido por la utilización preferencial de codones por parte de la cepa *P. putida* U.

En 7 casos se había generado un codón de fin. Dicha señal se produjo a lo largo de la secuencia por distintos eventos. En el caso del mutante 12, por inserción de una A en la posición 9 de la secuencia nucleotídica, que origina un cambio en el marco de lectura y un codón de terminación TGA (octavo codón); en los mutantes 13 y 18 tuvieron lugar sendas deleciones de un único nucleótido, una G en posición 57 y de una C en posición 163 respectivamente, que provocan un cambio en el marco de lectura y la subsecuente formación de un codón de fin TGA; en los mutantes 14 (cambio del nucleótido C en posición 346 por T, originando un codón de fin TGA), 15 (mutación en el nucleótido C ubicado en la posición 810 por A), 16 (cambio G en posición 1557 por A) y 17 (sustitución de la G que ocupa la posición 1575 por A) se produjo un cambio de nucleótido que conducía a la formación de un codón de fin de la traducción (Tabla 9).

**Tabla 9.** Proteínas truncadas por la presencia de un codón de fin en la proteína PhaC1.

Proteína PhaC1 o variante	Número de aminoácidos	Secuencia	Mw (kDa)
<b>PhaC1(Nativa)</b>	559	MSN.....HER	62,31
<b>PhaC1mut.12</b>	432 (128-559)	MTE.....HER	47,75
<b>PhaC1mut.13</b>	432 (128-559)	MTE.....HER	47,75
<b>PhaC1mut.14</b>	432 (128-559)	MTE.....HER	47,75
<b>PhaC1mut.15</b>	269 (1-269)	MSN.....LST	30,36
	267 (292-559)	MLG.....HER	29,67
<b>PhaC1mut.16</b>	518 (1-518)	MSN.....DSW	57,67
<b>PhaC1mut.17</b>	524 (1-524)	MSN.....WQS	58,50
<b>PhaC1mut.18</b>	432 (128-559)	MTE.....HER	47,75

En 3 mutantes, se había producido la deleción de 15, 90, y 252 nucleótidos, que darían lugar a proteínas sin los correspondientes aminoácidos (mantienen el marco de lectura).

Por último, en un mutante había tenido lugar una gran duplicación de 114 nucleótidos (equivalente a 38 aminoácidos), que mantenía el marco de lectura.

Al aislar distintas bacterias provenientes de un mismo parche se observó que presentaban mutaciones puntuales distintas en *phaCI*, como es el caso de colonias 3, 10 y 21. Por ello, aunque muchas mutaciones puntuales podrían haber tenido lugar durante el mismo proceso adaptativo, los pases sucesivos resultaron en la selección únicamente de aquellas bacterias con mutaciones que comportaban un incremento de la tasa de crecimiento de la cepa asociado a una pérdida de la capacidad para sintetizar PHAs.

El estudio de las cinéticas de crecimiento llevadas a cabo en MMO con *P. putida* U, *PpΔfadBA* y *PpΔfadBA* PHA<sup>-</sup> demostró que los mutantes PHA<sup>-</sup>, al estar liberados del estrés metabólico producido por el acúmulo intracelular de PHAs respecto a la cepa *PpΔfadBA*, mostraban una cinética de crecimiento más rápida. Por otro lado, al no derivar intermediarios hacia la síntesis de PHAs, estos podrían ser utilizados plenamente por la β-oxidación II, proporcionando, en última instancia, energía, poder reductor y carbono para el crecimiento. Además, *P. putida* U aún posee la β-oxidación I, permitiendo una mejor utilización metabólica de la fuente de carbono que los mutantes y, por lo tanto, alcanzando un mayor crecimiento. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el acúmulo de PHAs en *P. putida* U aumenta el tamaño de las células, lo que incrementa el valor de absorbancia a 540 nm (Fig. 35C).

El comportamiento de las cepas en los cultivos realizados, pone de relieve que la pérdida de la capacidad para acumular PHAs, que bien podría estar asociada a las mutaciones observadas en *PhaC1*, supone una ventaja metabólica para los mutantes.

### **6.5. Análisis funcional de las proteínas mutadas: restauración de la capacidad para sintetizar PHAs**

Hasta el momento, se han detectado una serie de mutaciones en el gen *phaCI* de cepas *PpΔfadBA* cuyas poblaciones, tras un proceso de adaptación en MMO, habían perdido su capacidad para acumular polímero plástico. El siguiente paso consistió en evaluar si las polimerasas *PhaC1* mutantes eran funcionales y la posible relación entre estas mutaciones y la incapacidad para producir PHAs.

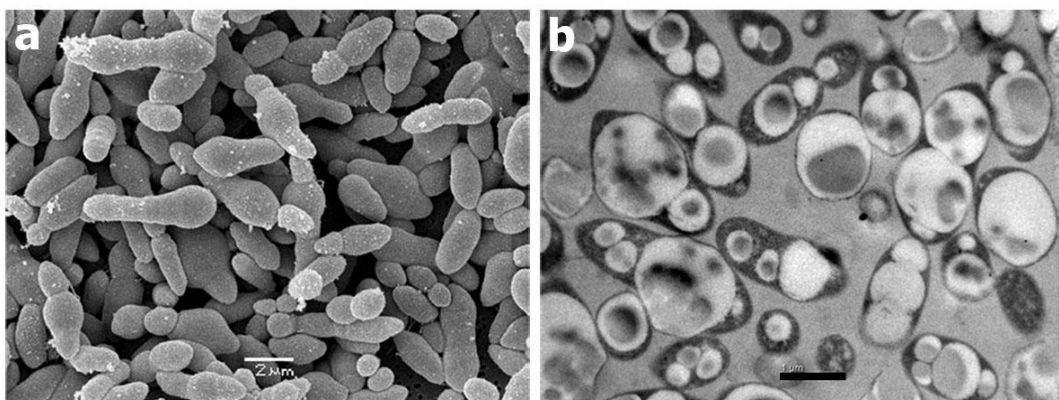
Para ello, se elaboró un diseño experimental según el cual se expresarían cada uno de los genes *phaCI* con mutaciones tanto en las cepas mutantes PHA<sup>-</sup> como en una cepa que

permitiese evaluar la funcionalidad sin que ésta se pudiera ver alterada por otros elementos genéticos implicados en la ruta de síntesis de PHAs (*PpΔpha*) (Sandoval *et al.*, 2007). Como control del experimento, se expresaría un gen *phaC1* que mantuviese la integridad genética (sin mutaciones).

#### 6.5.1. Expresión de *phaC1*, *phaC1*<sup>\*</sup> y *phaC2* en las cepas mutantes PHA<sup>-</sup>

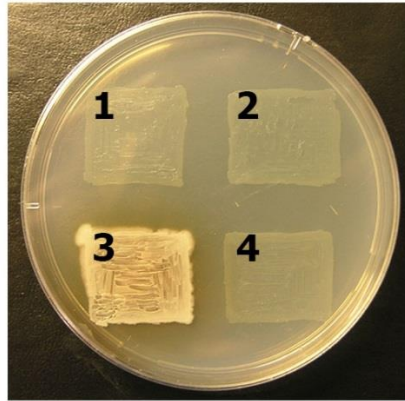
Con el fin de estudiar la funcionalidad de las diferentes PhaC1, se procedió, en primer, lugar a transformar cada uno de los distintos mutantes PHA<sup>-</sup> con una construcción genética en la que se había clonado el gen *phaC1* silvestre de *P. putida* U. Para ello, se amplificó por PCR el gen *phaC1* con los oligonucleótidos CIBHI y CIXba, tal y como en su momento hicieron Sandoval y colaboradores.

La amplificación de 1,68 Kb obtenida se clonó en el plásmido pTZ57R/T. Una vez comprobada la integridad genética mediante secuenciación, se clonó este fragmento de DNA con cortes *ApaI/XbaI* en el plásmido pBBR1MCS-3 (pMC). La cepa *E. coli* DH10B que contenía esta construcción se utilizó como donadora en las conjugaciones triparentales que se realizaron para introducir el plásmido en cada uno de los mutantes PHA<sup>-</sup> (receptoras). Se obtuvieron así cepas recombinantes (*P. putida ΔfadBAPHA<sup>-</sup>pMCphaC1*, a las que nos referiremos como *PpΔfadBAPHA<sup>-</sup>pMCphaC1*) que se seleccionaron por la adquisición de resistencia a tetraciclina en placas de MM suplementadas con 4-hidroxifenilacetato, Rf y Tc. Todas estas bacterias recuperaron la capacidad para sintetizar bioplástico, lo que sugería que una copia sin modificaciones de la polimerasa PhaC1 era suficiente para que tuviese lugar la síntesis de PHAs (Fig. 40).



**Figura 40.** Micrografías de SEM (a) y TEM (b) realizadas a la cepa *P. putida* U  $\Delta$ *fadBAPHA<sup>-</sup>* pMC*phaC1* cultivada en MM que contenía como fuente de carbono y monómeros 4-hidroxifenilacetato (10 mM) y octanoato (10 mM).

Se repitió el mismo procedimiento para clonar en el plásmido pMC copias de *phaCI* mutadas (*phaCI*\*). Cuando los mutantes correspondientes se transformaban con la construcción que contenía la copia de *phaCI* mutada, ninguno de ellos era capaz de acumular PHAs (Fig.41 y 42b).



**Figura 41.** Placa de Petri de MM sólido suplementado con 4-hidroxifenilacetato (10 mM) y octanoato (10 mM). Se observa el aspecto que adquieren las cepas sembradas en medio sólido de producción. 1) *P. putida* U  $\Delta$ *fadBAPHA*<sup>-</sup> pMC, 2) *P. putida* U  $\Delta$ *fadBAPHA*<sup>-</sup>, 3) *P. putida* U  $\Delta$ *fadBAPHA*<sup>-</sup> pMC*phaCI*, 4) *P. putida* U  $\Delta$ *fadBAPHA*<sup>-</sup> pMC*phaCI*\*.

La secuenciación del *cluster pha* de los mutantes PHA<sup>-</sup> adaptados en MMO indicaba que el único gen afectado por mutaciones era *phaCI*. Por tanto, la copia del gen *phaC2* se encontraba intacta y, sin embargo, no se detectaba polímero alguno en las cepas PHA<sup>-</sup>. Con el fin de recabar más datos para explicar por qué si existía una copia intacta del gen *phaC2*, y por tanto se podría expresar una polimerasa funcional PhaC2, no se producía síntesis de polímero, se expresó el gen de esta polimerasa de forma constitutiva desde el plásmido pMC en los mutantes PHA<sup>-</sup> y se observó si eran capaces de acumular plástico.

Para ello se siguió el mismo proceso empleado para clonar la polimerasa I. Se amplificó por PCR el gen *phaC2* de *P. putida* U con los oligonucleótidos C23 y C25 (*Materiales y Métodos*, Tabla 5) (Arias *et al.*, 2008):

El producto de la amplificación se clonó en el plásmido pTZ57R/T y posteriormente se subclonó en el plásmido pBBR1MCS-3 utilizando las dianas de restricción *ApaI/XbaI* obteniéndose la construcción pMC*phaC2*. Tras la obtención del clon deseado, se secuenció el plásmido para comprobar la integridad genética del fragmento a expresar. A continuación, se introdujo esta construcción pMC*phaC2* en los mutantes PHA<sup>-</sup>, llevando a cabo para ello la correspondiente conjugación triparental.

Los transconjugantes *PpUΔfadBAPHA* pMC*phaC2* obtenidos se cultivaron en medios de producción con diferentes fuentes de carbono y precursores monoméricos: MMO y MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato (10 mM) y con 5-fenilvalerato (10 mM), 6-fenilhexanoato (10 mM) o 7-fenilheptanoato (10 mM). Se observó, mediante inspección directa al microscopio óptico, que los transconjugantes no acumulaban PHAs en ninguno de los medios. Este hecho era ciertamente extraño, ya que estudios previos habían demostrado que la expresión en *trans* de *phaC2* en *P. putida* U a la que se le había delecionado el *cluster pha*, era capaz de acumular PHAs, especialmente cuando se cultivaba en medios que contenían ácidos grasos de cadena impar (Arias *et al.*, 2008). Estos datos demostraban que la expresión de PhaC2 era suficiente para llevar a cabo la acumulación de polímero, al igual que pasaba con PhaC1 (Arias *et al.*, 2008). En este caso, quizás otros elementos estaban interfiriendo en el proceso de polimerización. Por ello, se optó por continuar el desarrollo experimental expresando la proteína PhaC1, tanto la versión mutada como la silvestre, y la PhaC2 en la cepa *P. putida* UΔ*pha* (en adelante *PpΔpha*), en la que no podrían interferir otros elementos genéticos del *cluster pha* al carecer de ellos.

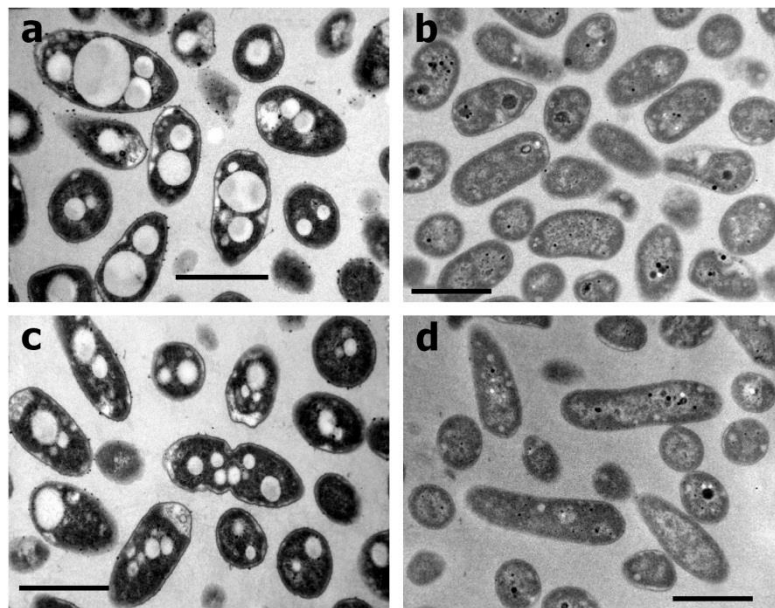
#### 6.5.2. Expresión en *trans* de *phaC1*, *phaC1\** y *phaC2* en *P. putida* U Δ*pha*

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación con el propósito de esclarecer la función de las proteínas implicadas en la síntesis de mcl-PHAs en *P. putida* U, habían demostrado que la expresión de *phaC1* en *trans* en *PpΔpha* era suficiente para restaurar la síntesis de PHAs (Sandoval *et al.*, 2007). Se utilizó esta cepa, que no disponía de ninguno de los elementos genéticos del *cluster pha*, para comprobar si las polimerasas con mutaciones habían perdido su funcionalidad, tal y como parecía indicar su expresión en *trans* en los propios mutantes.

La introducción, mediante un *mating* triparental, en el mutante *PpUΔpha*, de los plásmidos que contenían las copias mutantes de *phaC1* (*phaC1\**) dió lugar a recombinantes, seleccionados por su resistencia a tetraciclina. Estas cepas recombinantes se sembraron en medios de producción, tanto MMO como MM suplementado con 4-hidroxifenilacetato (10 mM) y 7-fenilheptanoato (10 mM). Este último medio genera un mayor acúmulo de PHAs por parte de *P. putida* U y sus mutantes superproductores, por lo que, de producirse síntesis de polímero, sería más fácilmente detectable. Todos los transconjugantes ensayados eran igualmente incapaces de acumular PHAs en estos medios. El único recombinante capaz de

acumular PHAs era el control que había sido transformado con una construcción que contenía la *phaC1* obtenida de la cepa silvestre (*P. putida* U) (Fig. 42 a y b).

Por otra parte, cuando se transformaba *PpUΔpha* con la construcción pMC*phaC2*, el transconjugante obtenido sí era capaz de acumular PHAs (Fig. 42), aunque la cantidad acumulada era menor que la obtenida con la cepa *PpUΔpha*pMC*phaC1* en las mismas condiciones, tal y como ya había sido demostrado por Arias y colaboradores (Fig. 42) (Arias *et al.*, 2008).



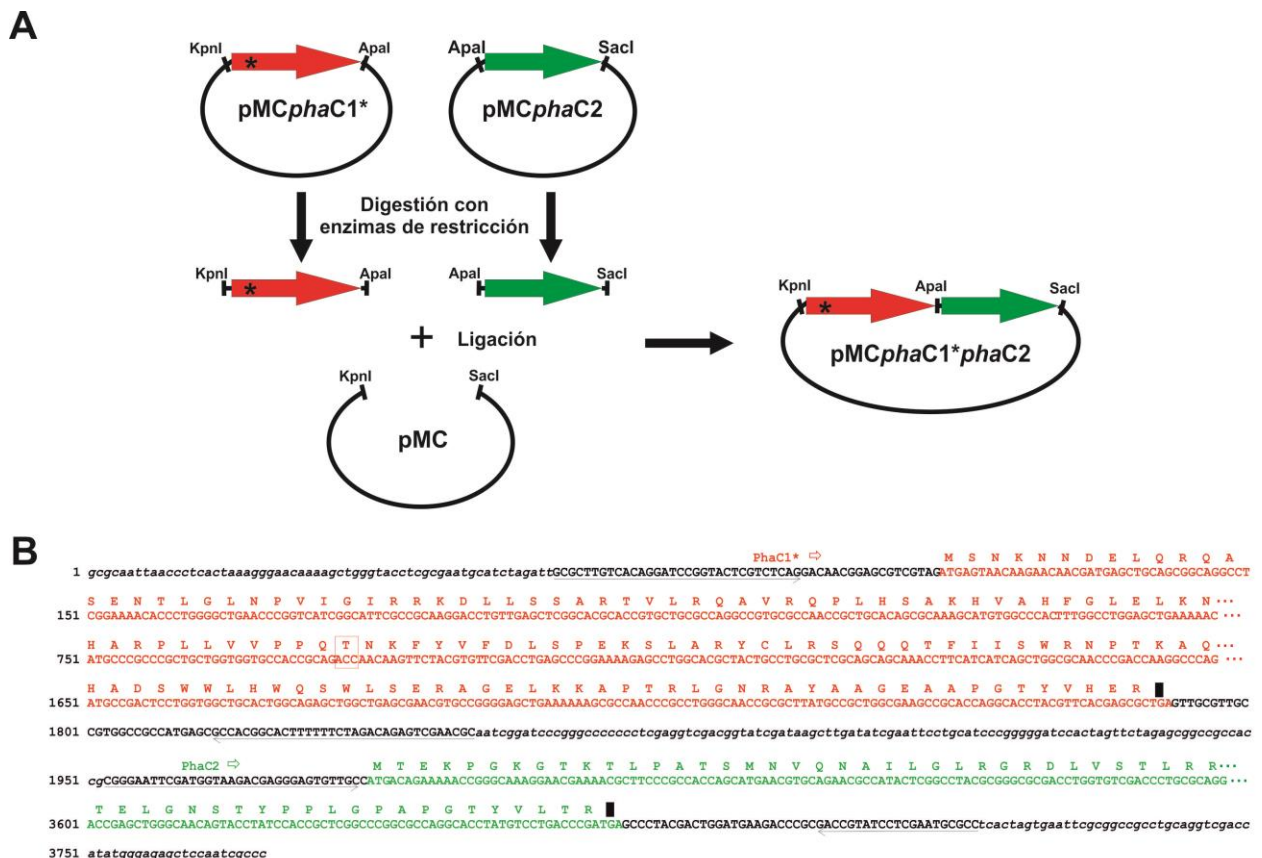
**Figura 42.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión. Cepas de a) *P. putida*  $\Delta$ *phapMCphaC1*, b) *P. putida*  $\Delta$ *phapMCphaC1*<sup>\*</sup>, c) *P. putida*  $\Delta$ *phapMCphaC2*, y d) *P. putida*  $\Delta$ *phapMCphaC1*<sup>\*</sup> *phaC2* cultivadas en MM octanoato 20 mM. El gen *phaC1*<sup>\*</sup> se corresponde con el gen *phaC1* mutado amplificado del mutante PHA<sup>-</sup> número 1. Resultados similares se obtuvieron con las cepas expresando las otras versiones mutadas de los genes *phaC1* obtenidos del resto de los mutantes. Las barras indicadas en cada microfotografía representan 1  $\mu$ m.

### 6.5.3. Coexpresión en *trans* de PhaC1<sup>\*</sup> y PhaC2 en *PpUΔpha*

Los resultados de los experimentos llevados a cabo hasta el momento revelaban que la expresión de las polimerasas mutadas nunca conducía a la síntesis de PHAs en ninguna de las cepas en las que se habían clonado, mientras que la expresión de *phaC2* no conducía al acúmulo de PHAs en los mutantes PHA<sup>-</sup>. Sin embargo, la expresión de este gen *phaC2* en *PpUΔpha* sí condujo a la producción de PHAs en esta cepa. La única diferencia entre los diferentes transconjugantes productores y no productores era que en los primeros no se encontraba presente ninguna PhaC1<sup>\*</sup> mientras que en los segundos sí. Por ello, se diseñó una

construcción a partir de la que se expresasen conjuntamente *PhaC1*<sup>\*</sup> y *PhaC2* desde un único promotor constitutivo, para analizar así si se acumulaba plástico, tal y como sucedía cuando se expresaba únicamente *phaC2* en *PpUΔpha*, o si por el contrario, no tenía lugar, como sucedía cuando se expresaba *PhaC2* en los mutantes que contenían una copia de *PhaC1*<sup>\*</sup> (mutada).

Para obtener la construcción, se partió de los plásmidos pMC*phaC1*<sup>\*</sup> (el mutante 1 que presenta el evento I225T) y pMC*phaC2*. Los genes *phaC1*<sup>\*</sup> y *phaC2* se liberaron del plásmido correspondiente mediante digestiones KpnI/ApaI y ApaI/SacI respectivamente. Los fragmentos de DNA, así digeridos y purificados, se ligaron conjuntamente en un plásmido pBBR1MCS-3 digerido en las dianas de restricción KpnI/SacI dando lugar a la construcción pMC*phaC1*<sup>\*</sup>*phaC2*. Tras transformar la cepa *E. coli* DH10B, las colonias que se obtuvieron de la transformación con esta ligación eran resistentes a tetraciclina, el marcador de resistencia presente en el plásmido pMC en el que se encuentran dispuestas *phaC1*<sup>\*</sup> y *phaC2* por este orden, tal y como se indica en la figura 43. La integridad de la construcción en los transformantes fue verificada mediante su secuenciación.



**Figura 43.** A) Representación gráfica del procedimiento seguido para clonar *phaC1*<sup>\*</sup> y *phaC2* en el plásmido pMC. B) Secuencia y disposición de los genes en la construcción, con la mutación puntual destacada.

La construcción pMC*phaC1*\**phaC2* se introdujo mediante un mating triparental en la cepa receptora *PpUΔpha*, obteniéndose así los transconjugantes *PpUΔpha* pMC*phaC1*\**phaC2*, seleccionados por su resistencia a rifampicina y tetraciclina. Dichos transconjugantes se cultivaron en medio de producción de PHAs (MMO -20 mM- y MM 4-hidroxifenilacetato -10 mM- suplementado con 7-fenilheptanoato -10 mM-). En ningún caso se observó el acúmulo de PHAs, a pesar de que todos ellos contenían copias funcionales de la polimerasa PhaC2.

A la luz de estos datos, cabe concluir que la capacidad para sintetizar PHA sólo podría recuperarse con la presencia de una PhaC1 funcional, y la expresión heteróloga de una polimerasa PhaC2 no revertiría, por lo tanto, el efecto de las mutaciones inactivantes de *phaC1*. Estas afirmaciones concuerdan con las observaciones realizadas de que ningún mutante PHA<sup>-</sup> era capaz de sintetizar PHAs, a pesar del hecho de que todos ellos portan una PhaC2 funcional. Además, en los transconjugantes *PpUΔphapMCphaC1*\**phaC2*, la expresión constitutiva de los genes que codifican PhaC1\* y PhaC2 desde el promotor del plásmido no conduce al acúmulo de plástico. Por tanto, podemos concluir la absoluta necesidad de una PhaC1 funcional para que se acumule polímero en estas cepas.

Los resultados obtenidos se podrían explicar argumentando una posible interacción PhaC1-PhaC2. Estudios previos indican que la polimerasa, en su forma activa, presenta una estructura dimérica, en la que la interacción entre dos polimerasas es necesaria para que tenga lugar la catálisis y la subsecuente polimerización (Jia *et al.*, 2001). De este modo, los heterodímeros PhaC1-PhaC2 darían lugar a la síntesis de PHAs en la cepa silvestre. En los mutantes PHA<sup>-</sup>, las distintas mutaciones puntuales darían lugar a PhaC1 alteradas, funcional o estructuralmente, por lo que los dímeros serían inactivos.

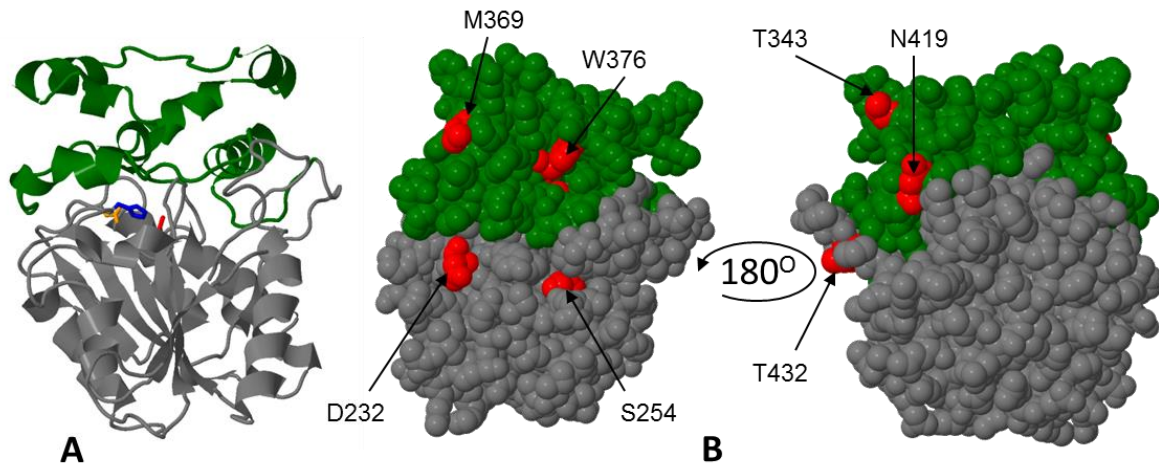
Un mecanismo similar al propuesto para *P. putida* U se ha descrito en *Rhodospirillum rubrum*, que cuenta con tres PHA polimerasas distintas que forman complejos heterodiméricos. Los distintos complejos formados por la combinación de las distintas polimerasas dan lugar a catálisis más eficientes que los homodímeros (Jin y Nikolau, 2012).

Estas posibilidades se analizarán en el siguiente apartado mediante la utilización de herramientas bioinformáticas.



## 6.6. Análisis estructural *in silico* de las mutaciones de PhaC1 y de una posible interacción proteína-proteína entre PhaC1 y PhaC2

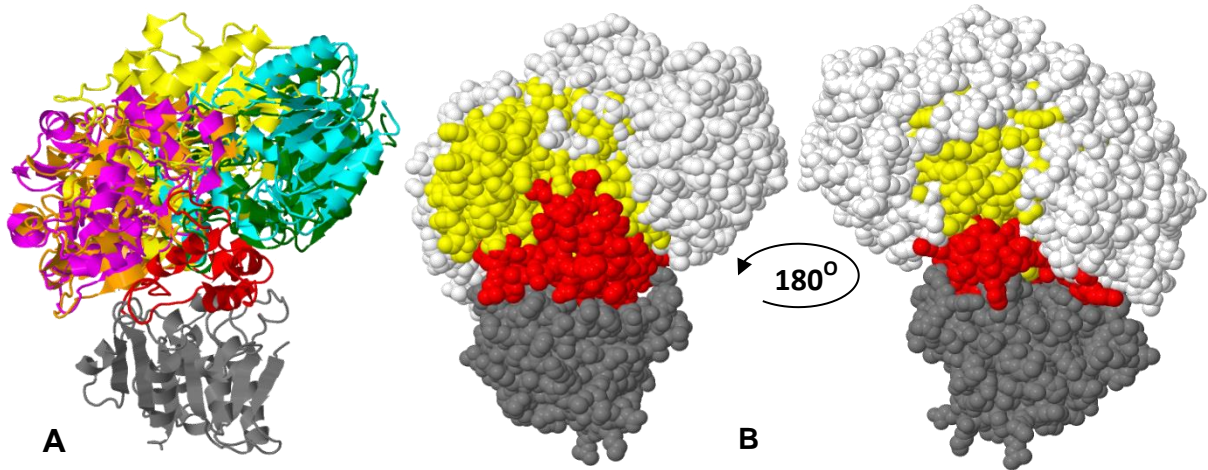
La estructura cristalina de las polimerasas PhaC1 y PhaC2 de *P. putida* aún no ha sido resuelta, por lo que se desconoce su configuración tridimensional. Sin embargo, sí existen herramientas bioinformáticas capaces de elaborar modelos estructurales hipotéticos fiables basados en homologías de secuencias. Para ello, estos programas parten de la secuencia de las proteínas objeto del modelado y se basan en su similitud con otras proteínas cuya estructura ya se conoce. Una de estas herramientas es el servidor Phyre2, con el que se modeló parte de la estructura tridimensional de las polimerasas partiendo de la homología de su secuencia con la de varias hidrolasas (Kelley y Sternberg, 2009; Kelley *et al.*, 2015). De este modo, PhaC1 y PhaC2 mostraron una similitud significativa con la lipasa gástrica humana y con una hipotética esterasa de *Sulfolobus solfataricus*, respectivamente. Los residuos 201-530 de ambas polimerasas se pudieron modelar con una confianza superior al 90%. Sin embargo, la falta de proteínas homólogas en la base de datos impidió que se pudiera obtener una predicción de la estructura que adquieren los residuos adyacentes (1-200 y 530-550). Los modelos obtenidos presentaban un plegamiento del tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasa cubierto por una tapa (residuos 330-425) que cubría la hipotética triada catalítica. Dicho centro activo estaría compuesto por los aminoácidos Cys296-Asp451-His479 en PhaC1, y por Cys296-Asp452-His480 en PhaC2. La disposición de la tapa o cubierta es similar a la que se encuentra en varias lipasas (Grochulski *et al.*, 1993; Nardini *et al.*, 2000; Ollis *et al.*, 1992; Willems *et al.*, 2017) y, al igual que en estas, podría desempeñar un papel importante durante el proceso de catálisis. Se han propuesto mecanismos de interacción similares entre las tapas de otras  $\alpha/\beta$  hidrolasas diméricas, como es el caso de la epóxido hidrolasa de *Aspergillus niger* (Zou *et al.*, 2000), el dominio tioesterasa de la poliquétido sintasa de eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea* (Tsai *et al.*, 2001), la picromicina tioesterasa de *Streptomyces venezuelae* (Giraldes *et al.*, 2006) y la tautomicetina tioesterasa de *Streptomyces* sp. CK4412 (Scaglione *et al.*, 2010).



**Figura 44.** Modelo de la proteína PhaC1 obtenido mediante modelado por homología utilizando como patrón la lipasa gástrica humana. La tapa (residuos 330-425) se muestra en verde, y los residuos catalíticos Cys296 (rojo), Asp451 (naranja) y His479 (azul) en representación de barras (A). Representación de van der Waals de PhaC1 con la disposición en la que se encontrarían las mutaciones puntuales (rojo) (B). Figuras obtenidas con Jmol 14.2.

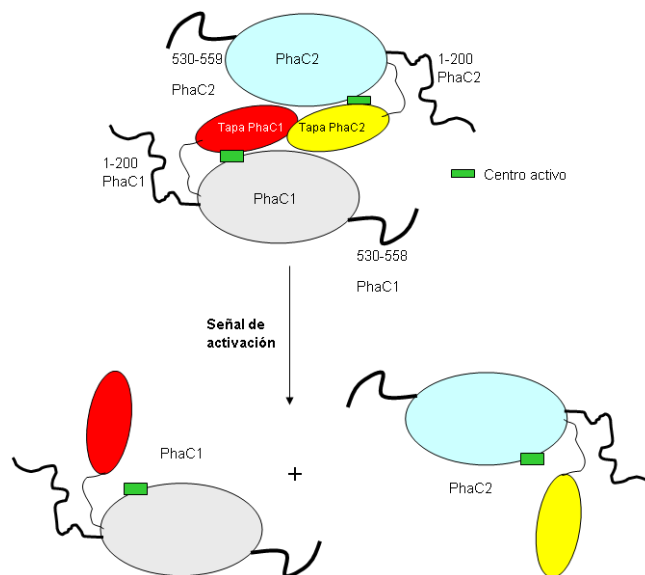
Como se muestra en la figura 44, la mayoría de los residuos de las mutaciones inactivantes de PhaC1 se sitúan en la propia tapa o bien en sus proximidades. Por ello, los cambios de unos residuos aminoacídicos por otros, producidos como consecuencia de las mutaciones, podrían interferir en el proceso de apertura de la tapa, que es imprescindible para que el sitio catalítico quede accesible al sustrato y que tenga lugar la catálisis.

La hipótesis de una posible interacción entre los modelos estructurales de PhaC1 y PhaC2, apuntada en el apartado anterior, se estudió con el algoritmo de predicción de interacción proteica ZDOCK (Pierce *et al.*, 2014). La figura 45 muestra la superposición de los cinco mejores complejos heterodiméricos obtenidos mediante esta herramienta, utilizando PhaC2 como referencia. A tenor de la disposición que podrían tomar las estructuras de las polimerasas para formar el complejo, la interacción tendría lugar a través de las regiones de las tapas expuestas hacia el solvente, puesto que la mayoría de las interacciones de van der Waals que se podrían establecer utilizan átomos que pertenecen a estos fragmentos.



**Figura 45.** Representación de los cinco mejores complejos PhaC1-PhaC2 superpuestos mediante predicción realizada con ZDOCK, tomando PhaC2 como receptor. (A) Las moléculas de PhaC1 se muestran en cian, amarillo, verde, naranja y magenta; el núcleo  $\alpha/\beta$  hidrolasa de PhaC2 se muestra en gris y su tapa en rojo. (B) Dos vistas de la representación de van der Waals de los complejos superpuestos. Los núcleos de la hidrolasa se muestran en blanco (PhaC1) y gris (PhaC2), y las tapas en amarillo (PhaC1) y rojo (PhaC2).

Según nuestro modelo, el dímero hipotético se formaría por una interacción proteína-proteína entre las tapas de ambas polimerasas. Los centros activos quedarían cubiertos por las tapas, y las enzimas en este estado se mantendrían inactivas. Cuando una señal de activación alcanzase el complejo, por ejemplo los derivados 3-hidroxiacil-CoA, los monómeros se separarían y las tapas permitirían el acceso de los sustratos al centro activo, en un proceso similar al descrito en las lipasas (Peters *et al.*, 1997) (Fig. 46).



**Figura 46.** Representación esquemática del modelo propuesto para la catálisis de PhaC1-PhaC2.

De acuerdo con esta hipótesis, los dímeros que se formen entre las proteínas mutadas de PhaC1 y PhaC2 serían complejos abortivos incapaces de producir PHAs. Las mutaciones, al encontrarse en la tapa o en sus proximidades, impedirían la disociación de los complejos inactivos y su posterior activación, evitando que se lleve a cabo la síntesis de polímero. Las proteínas truncadas carecerían de los extremos N-terminal o C-terminal que podrían estar implicados en la recepción de la señal, mientras en el resto de los mutantes (tanto con mutaciones puntuales como con fragmentos deletionados) las zonas de la tapa o adyacentes estarían afectadas, posiblemente impidiendo la transmisión de la señal de activación que permite que tenga lugar el paso de disociación-activación.

Finalmente, puesto que las secuencias de PhaC1 y PhaC2 tienen una similitud del 70%, se valoró la posibilidad de que se formasen homodímeros PhaC1-PhaC1 y PhaC2-PhaC2 y se observó que la formación de ambos complejos sería posible, de igual modo, a través de interacciones tapa-tapa. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis planteada, desde el punto de vista fisiológico, los heterodímeros prevalecerían con respecto a los homodímeros, ya que de lo contrario PhaC2 sería capaz de reemplazar a PhaC1 en la formación de complejos activos. Tampoco puede descartarse un posible efecto estabilizador de los heterodímeros con las fasinas u otras proteínas aún no identificadas.

### **6.7. El proceso de adaptación: una visión de conjunto**

Los resultados obtenidos en los experimentos expuestos, ofrecen una visión global y una explicación de los fenómenos que ocurren cuando tiene lugar la adaptación. Durante este proceso, el mutante *PpΔfadBA* se vio forzado a crecer en MMO, siendo el octanoato la única fuente de carbono disponible y actuando también como precursor de los PHAs. Teniendo en cuenta que este mutante tiene deletionados los genes que codifican la  $\beta$ -oxidación, y que esta ruta es la utilizada para degradar el octanoato, se produce una selección adaptativa. Se seleccionan aquellas bacterias que reconducen el flujo de octanoato (realmente octanoil-CoA) hacia una  $\beta$ -oxidación II, es decir, en aras de la supervivencia celular, aquellas enzimas que catalizan actividades enzimáticas similares a las que realiza FadBA llevarían a cabo el catabolismo del octanoil-CoA. En *E. coli* se han caracterizado los genes responsables (*fadII*) de una segunda  $\beta$ -oxidación anaeróbica que se activa en ausencia de la  $\beta$ -oxidación aeróbica codificada en los genes *fadBA* (Campbell *et al.*, 2003). La existencia de crecimiento indica que las bacterias están utilizando metabólicamente el octanoato, por lo que se formarían intermediarios metabólicos ( $\beta$ -hidroxiacil derivados) que podrían ser incorporados como

PHAs. Ante esta situación de estrés metabólico, la célula que deje de producir PHAs verá favorecido su crecimiento, ya que los acil-CoAs generados no se dirigirán hacia la síntesis de polímero, sino únicamente hacia la obtención de energía y poder reductor. Las mutaciones que inactivan PhaC1 proporcionan el escenario favorable que evita el acúmulo de biopolímero, y un mayor flujo de intermediarios hacia la degradación del octanoato a través de la  $\beta$ -oxidación II (Fig. 47).

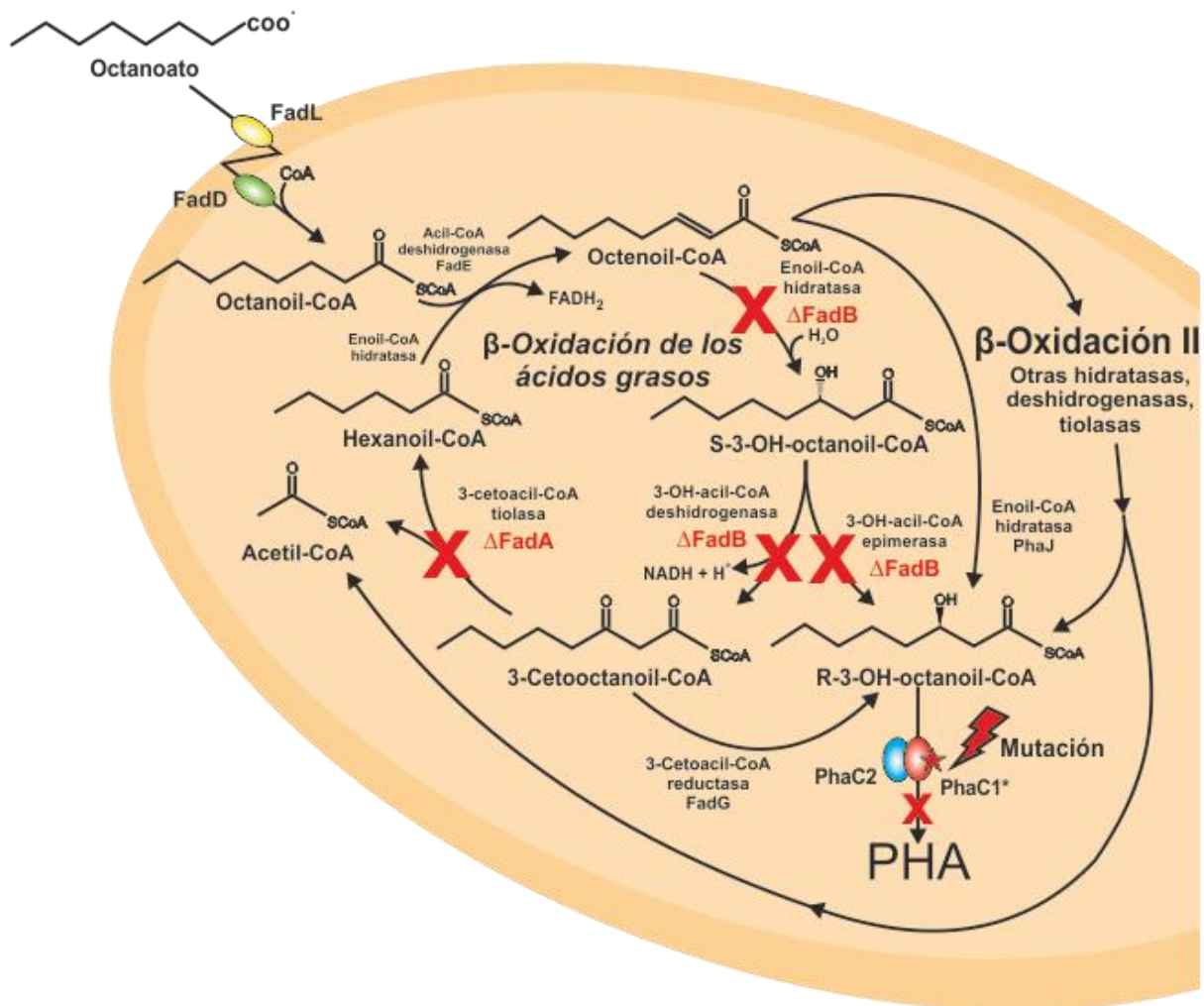
En la población inicial del mutante *Pp $\Delta$ fadBA* se podrían producir, aleatoriamente, muchas mutaciones, y sin lugar a dudas, éstas también se encontrarían en el resto de los genes del *cluster pha*. Sin embargo, sólo se seleccionarían aquellos mutantes cuyas mutaciones comporten ausencia de acúmulo de PHAs, siendo éstas las que tienen lugar en el gen *phaC1*.

El origen de estas mutaciones es motivo de controversia en el seno de la comunidad científica. De un lado, se posicionan quienes postulan que las mutaciones se introducen de forma aleatoria en el proceso de replicación, con independencia del estrés ambiental. En nuestro caso, este sector argumentaría que las mutaciones ya se encuentran presentes en alguna de las células de la población inicial que se utiliza como inóculo para su siembra en octanoato, que no se producen como consecuencia de la presión selectiva que supone el crecimiento en esta fuente de carbono, y que a través de los pases sucesivos se incrementaría su proporción dada su mejor adaptación al medio, tal y como propone la Teoría Sintética de la Evolución (Hershberg, 2015; Maisnier-Patin y Roth, 2015; Roth *et al.*, 2006).

Por otro lado, otros grupos de investigación defienden la mutagénesis adaptativa como agente causal de este tipo de mutaciones. Éstas serían introducidas, en este caso, por distintos tipos de sistemas de respuesta a estrés una vez que las bacterias se encuentran en un medio donde su crecimiento se muestra comprometido, siendo éste un mecanismo útil para incrementar la variabilidad de la población y lograr su supervivencia (Foster, 2007; Galhardo *et al.*, 2007; MacLean *et al.*, 2013; Wright, 2004). Entre los principales mecanismos moleculares que incrementarían la tasa mutagénica estarían la respuesta SOS y la respuesta general a estrés (a través del regulador transcripcional RpoS). En *E. coli*, en ambos mecanismos el incremento de la expresión de la polimerasa IV (llamada PolIV o DinB) implicaría mayor procesividad de las polimerasas para reparar las posibles roturas en la hebra de DNA, pero menor corrección de errores y, por tanto, mayor tasa mutagénica (Foster, 2007; Shee *et al.*, 2011). Otras polimerasa de baja fidelidad de copia también intervendrían en el caso de la respuesta a estrés mediada por RpoS (Frisch *et al.*, 2010). Además, se ha sugerido que la mutagénesis puede

producirse de forma independiente a la replicación celular a través de un mecanismo de retromutagénesis. Según este modelo, las lesiones en el DNA originan mutaciones en el proceso de transcripción (mutagenesis transcripcional), generando proteínas mutantes que permitirían escapar a la presión selectiva. Se origina así una célula capaz de dividirse, y es en ese proceso de replicación en el que la DNA polimerasa introduciría el mismo error de copia que la RNA polimerasa, fijando la mutación adaptativa (Morreall *et al.*, 2015).

Independientemente del origen y del momento en el que se produzcan las mutaciones, en el proceso de adaptación presentado en esta tesis doctoral, no acumular PHAs supone una ventaja adaptativa, por lo que se seleccionan las bacterias que incorporan esas mutaciones, que al crecer más rápidamente desplazarán al resto de la población que mantenga la capacidad de sintetizar biopolímero.



**Figura 47.** Representación esquemática del flujo metabólico que tiene lugar durante el proceso de adaptación. Los intermediarios acil-CoA son reconducidos hacia una β-oxidación II y, como consecuencia de las mutaciones presentes en PhaC1, no se produce acúmulo de PHAs.

La bibliografía existente recoge numerosos trabajos en los que distintas bacterias, incapaces de crecer en una fuente de carbono para la que no poseen la ruta catabólica correspondiente, se adaptan y acaban creciendo tras un largo periodo de inanición (Doten y Mortlock, 1984; Hegeman y Rosenberg, 1970; Lerner *et al.*, 1964; Olivera *et al.*, 2001a; Wright, 2004). Este fenómeno se debe a que estas bacterias disponen de la capacidad para degradar compuestos estructuralmente parecidos, y el acúmulo de una o varias mutaciones puntuales permiten a las enzimas codificadas en estos genes utilizar y degradar eficientemente compuestos similares, permitiendo la supervivencia de la bacteria. Es probable que ocurra lo mismo cuando, al cabo de un largo periodo de tiempo, *PpΔfadBA* comienza a crecer en octanoato, degradando este compuesto a través de una  $\beta$ -oxidación II, es decir, a través de enzimas con actividades similares a las que lleva a cabo el complejo FadBA.

Se han documentado numerosos ejemplos de fenómenos adaptativos en los que una presión selectiva conduce a la fijación de mutaciones puntuales en una población, lo que permite la supervivencia celular o incrementa su tasa de crecimiento (Notley-McRobb y Ferenci, 1999). Uno de los que ha alcanzado mayor relevancia e impacto es el incremento de la resistencia a antibióticos que están adquiriendo numerosas especies bacterianas, y que constituye un importante problema de salud global (Van den Bergh *et al.*, 2016). Dicha resistencia es adquirida como consecuencia de distintas mutaciones puntuales que impiden, de un modo u otro, la inhibición del crecimiento por parte del antibiótico (Fernández y Hancock, 2012). En algunos casos, las mutaciones puntuales disminuyen el número de porinas por las que el antibiótico tendría acceso a la célula; en otros se incrementa la expresión de los transportadores de membrana que bombean el antibiótico al exterior celular (Fernández y Hancock, 2012); o tienen lugar mutaciones puntuales en la diana del antibiótico que impiden la unión del mismo pero que aún permiten la función de la proteína diana (Blair *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014). Estas mutaciones se imponen cuando las células son expuestas a concentraciones de dichos antibióticos que disminuyen la tasa de crecimiento celular (Blair *et al.*, 2015). En este caso, al igual que ocurre con PhaC1, las mutaciones favorecen el crecimiento, por lo que las células que las incorporan se multiplican más rápidamente y dominan la población. Baym y colaboradores han llevado a cabo un diseño experimental en el que se aprecia claramente cómo los mutantes que adquieren resistencia al antibiótico se propagan y seleccionan a lo largo de una placa de agar con concentraciones crecientes de antibiótico, dominando finalmente la población (Baym *et al.*, 2016). Esta situación podría ser

similar a la que ocurre con los pases seriados de los mutantes PHA<sup>-</sup> en MMO, en los que éstos desplazan a *PpΔfadBA*, gracias a una mayor tasa de crecimiento.

En resumen, los experimentos llevados a cabo en esta tesis ponen de relieve el estrés metabólico que supone para la cepa *PpΔfadBA* el acúmulo de PHAs, y que motiva la selección adaptativa por mutagénesis para superarlo. Las mutaciones detectadas en *phaC1* señalan el papel crucial de esta enzima, y también sugieren una probable interacción PhaC1-PhaC2.

## 7. Expresión del *cluster pha* en *E. coli*

Una de las aproximaciones para la producción de grandes cantidades de polímero que se ha llevado a cabo de forma recurrente en nuestro campo de estudio es la utilización de la bacteria *E. coli*. Por su condición de microorganismo modelo, del que se tiene un amplio conocimiento de su fisiología y su genética, y el extraordinario papel que ha desempeñado en la producción de otros metabolitos y compuestos a nivel industrial, la obtención de un mutante superproductor de PHAs sería muy interesante. Sin embargo, si bien se ha logrado una producción notable de scl-PHAs en esta bacteria, el rendimiento alcanzado en la producción de mcl-PHAs es relativamente bajo, como máximo un 25% del peso seco, que dista mucho de lo que sería deseable para una cepa de uso industrial.

Por ello, nuestro grupo de investigación se planteó la posibilidad de utilizar el conocimiento y las construcciones genéticas obtenidas a lo largo de los años con el acervo genético de *P. putida* U, para obtener una cepa de *E. coli* productora de PHAs.

### 7.1. Expresión del *cluster pha* en *E. coli* DH10B

Sandoval y colaboradores demostraron que el *cluster pha* contiene todos los elementos necesarios para la síntesis de PHA en *P. putida* U (Sandoval *et al.*, 2007). Por ello, su expresión en *E. coli* pudiera conducir al acúmulo de polímero plástico en esta bacteria.

Para evaluar esta hipótesis, se utilizó la cepa *E. coli* pK18*pha* que se había utilizado como donadora en el apartado 3.2, y que contiene una construcción genética consistente en el *cluster pha* íntegro de *P. putida* U clonado en el plásmido pK18::*mob* (construcción pK18*pha*) (García *et al.*, 2004). Esta construcción había sido obtenida en trabajos anteriores en nuestro laboratorio.



Teniendo en cuenta el fondo genético de la cepa *E. coli* DH10B (presenta auxotrofías para varios aminoácidos), se diseñaron distintos medios de cultivo que pudiesen contener todos los elementos necesarios para la producción exitosa del bioplástico. Los medios fueron los siguientes:

Medio A: MM + aminoácidos obtenidos por hidrolizado de caseína (1%, p/v) + extracto de levadura (0,05% p/v) + glucosa (1%, p/v).

Medio B: Medio A + octanoato 10 mM.

Medio C: Medio A + aceite de soja (1%, v/v).

Medio D: Medio A + aceite de soja (0,2%, v/v).

Se sembró *E. coli* pK18pha en los medios indicados y se hizo seguimiento del crecimiento midiendo la absorbancia a 540 nm. Paralelamente, se realizaron preparaciones para observar al microscopio óptico la presencia o ausencia de PHAs.

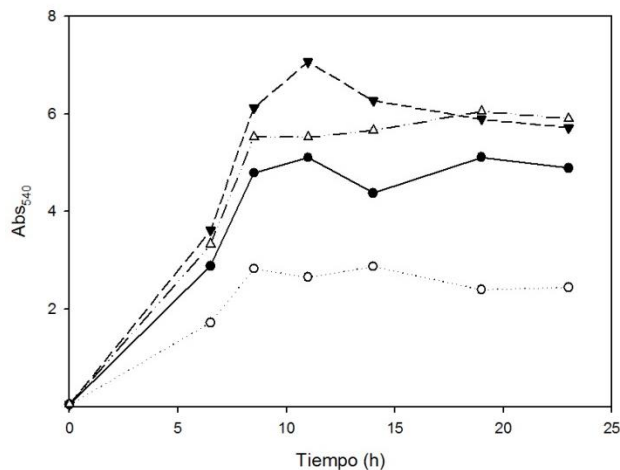


Figura 48. Curvas de crecimiento de *E. coli* pK18pha en distintos medios: A (●), B (○), C (▼), D (Δ).

En el medio A no se produjo acúmulo de PHAs. Es probable que la ruta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos a través de la que se podría acumular el polímero no esté completa. Sería necesaria la actividad de una  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa (FabG o similar) mediante la que se pudiese conectar la síntesis *de novo* de ácidos grasos con la síntesis de PHAs, proporcionando intermediarios R- $\beta$ -hidroxiacil-CoA a las polimerasas. Puesto que no se observa acúmulo alguno, no parece que haya ninguna enzima que se esté expresando y que pueda proporcionar esos sustratos.

Al suplementar el medio con glucosa y una fuente de carbono adicional, octanoato (medio B) o aceite de soja (medios C y D), se podría esperar una diauxia. La represión catabólica por la glucosa es un fenómeno muy bien caracterizado, que no permite que la adenilato ciclasa sintetice AMPc en el interior celular, impidiendo la activación de las rutas catabólicas de otras fuentes de carbono, como los ácidos grasos (Brückner y Titgemeyer, 2002; Gosset, 2005; Nunn, 1986; Pauli *et al.*, 1974). Una vez agotada la glucosa, existiría una masa crítica de células, que expresarían los genes *fad* y degradarían el octanoato o el aceite de soja, dirigiendo intermediarios acil-CoA a través de la  $\beta$ -oxidación, que podrían ser polimerizados por los genes del *cluster pha*. Sin embargo, tal y como se puede ver en la figura 48, no se produce diauxia, ni acúmulo de PHAs.

En la figura 48 se puede observar que el crecimiento en el medio B es menor que en el medio A. Puesto que la presencia de octanoato en el medio B es la única diferencia entre ambos, la concentración añadida (10 mM) podría ser tóxica para *E. coli* pK18*pha* en estas condiciones. La susceptibilidad de esta especie bacteriana a octanoato ya había sido descrita con anterioridad (Favre-Bulle y Witholt, 1992), y explica que no alcance valores similares a los que alcanza en el medio A. Los mecanismos moleculares responsables de la toxicidad del octanoato parecen relacionarse con el estrés oxidativo y el daño causado por ese compuesto sobre la membrana celular (Rodríguez-Moyá y Gonzalez, 2015; Royce *et al.*, 2013). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la expresión de los genes *fad* se encuentra bajo el control del regulador FadR, y sólo se activan ante la presencia en el medio de cultivo de ácidos grasos de cadena larga (Raman y DiRusso, 1995).

Por su parte, el crecimiento en los medios C y D es mayor que en el medio A, y siendo la única diferencia entre ellos la presencia o ausencia de aceite de soja. De ello se podría inferir que en los medios C y D, además de glucosa, *E. coli* pK18*pha* también está degradando el aceite de soja y, por ende, creciendo a expensas de él. Si así fuera, se podría atribuir la ausencia de bioplástico a que la ruta para la biosíntesis del mismo no esté completa. Puesto que el *cluster pha* se expresa de forma constitutiva y los ácidos grasos se degradarían vía  $\beta$ -oxidación, la reacción que provee intermediarios R-hidroxiacil-CoA a la polimerasa sería la única que podría no estar expresándose eficientemente en *E. coli* (Park y Yup Lee, 2004). Otra posibilidad sería que la cepa esté utilizando glicerol libre presente en el aceite, pero que no esté utilizando ácidos grasos, por lo que no se observaría acúmulo de PHAs.

En *P. putida* U existe competencia entre el complejo FadBA y las proteínas responsables de redirigir el flujo metabólico hacia la síntesis de polímero [ya sean las PHA polimerasas (PhaC1 y PhaC2), la enoil-CoA hidratasa (PhaJ) o la 3-cetoacil-CoA reductasa (FadG)]. Es posible que el flujo de acil-CoAs que podrían ser utilizados por la polimerasa se dirija en su totalidad por la ruta de  $\beta$ -oxidación, y por ello no se observa acúmulo de PHAs. Si estos intermediarios no pudieran continuar su degradación por la ruta de  $\beta$ -oxidación, quizás se acumulasen como polímero. Esta estrategia fue seguida con éxito con anterioridad, para la expresión de la PhaC1 de *P. aeruginosa* en *E. coli* (Qi *et al.*, 1998).

En suma, en ninguno de los medios utilizados se observó acumulación de PHAs en *E. coli* DH10B transformada con el plásmido que contenía el *cluster pha*.

## 7.2. Expresión del *cluster pha* en *E. coli* pN131

Con objeto de corroborar la hipótesis anterior, se evaluó si, efectivamente, la interrupción de la  $\beta$ -oxidación en *E. coli* facilitaría el acúmulo de PHAs. Para ello se utilizó la cepa modificada *E. coli* pN131 cedida por la profesora Dra. C. DiRusso, y que corresponde a la cepa *E. coli* LE392 en la que el gen *fadB* ha sido interrumpido por el transposón Tn10 (*Tn10::fadB64*).

En primer lugar se definieron los medios adecuados para llevar a cabo este tipo de experimento. Se sembró el mutante en los medios A, B y C detallados en el apartado anterior y se observó que el crecimiento tenía lugar en los tres medios. El medio C era en el que se alcanzaba un mayor crecimiento bacteriano, mientras que el medio B se alcanzaban valores menores de absorbancia, siendo la diferencia notable con respecto a los otros dos medios. Como se apuntaba en el apartado anterior, la toxicidad del octanoato podría ser la causa más probable.

Una vez se hubo comprobado que los medios eran adecuados para el crecimiento del mutante de *E. coli*, se introdujo el plásmido pK18*pha* por conjugación triparental. La cepa donadora fue *E. coli* pK18*pha* y se contó con la participación de la cepa *helper*. Los transconjugantes se seleccionaron en medio LB suplementado con los antibióticos tetraciclina (resistencia de *E. coli* pN131) y kanamicina (resistencia aportada por el plásmido). Los transconjugantes *E. coli* pN131 pK18*pha* obtenidos se sembraron en los medios sólidos de producción B y C. En ningún caso se observó acúmulo de PHAs en los transconjugantes. También se sembró el mutante en placas de medio A sólido suplementado con 7-

fenilheptanoato 10 mM, y se observó que los parches de los transconjugantes adquirirían una coloración muy blanca, similar a la que adquiere *P. putida* cuando acumula PHAs. Sin embargo, al observar las bacterias al microscopio tras su tinción con fucsina no se apreciaba el acúmulo de bioplástico.

Aunque la ruta de  $\beta$ -oxidación se encuentre interrumpida, el mutante *E. coli* pN131 pK18pha no acumula PHAs cuando se cultiva en medio con precursores que pueden ser incorporados a la célula como acil-CoA derivados (e. g. octanoato o aceite de soja).

Las razones por las que no se canalizan intermediarios hacia la formación de PHAs pueden ser variadas. Quizás se deba a que la bacteria está utilizando la glucosa como fuente de carbono y energía, y no está incorporando las posibles fuentes de precursores, principalmente aceite de soja. La expresión constitutiva del gen *fadL* desde un plásmido podría solventar este problema, salvando una posible represión catabólica (Bae *et al.*, 2014). Otra posible explicación sería que la ruta de síntesis de PHAs se encuentre conectada con la de la  $\beta$ -oxidación a través de alguna otra proteína (enoil-CoA hidratasa) que no se está expresando en *E. coli*, por lo que su expresión desde un plásmido podría ser clave para proveer intermediarios R-3-hidroxiacil-CoA polimerizables por la polimerasa. Tanto la expresión de *fadL* como la del gen que codifique una enoil-CoA hidratasa (PhaJ) desde un plásmido ya ha dado buenos resultados en experimentos anteriores (Bae *et al.*, 2014; Davis *et al.*, 2008; Jian *et al.*, 2010).

En cualquier caso, en los trabajos que se han publicado hasta el momento no se obtiene un gran rendimiento en la síntesis de mcl-PHAs en *E. coli*, en torno al 15% del peso seco partiendo de fuentes de carbono no relacionadas como la glucosa y un 25% del peso seco partiendo de fuentes relacionadas (ácidos 2-alquenoicos) (Agnew *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012). En *Pseudomonas* se han alcanzado valores superiores al 70% del peso seco. Por el momento, se desconocen las razones por las que existe esta notable diferencia en la producción de mcl-PHAs.

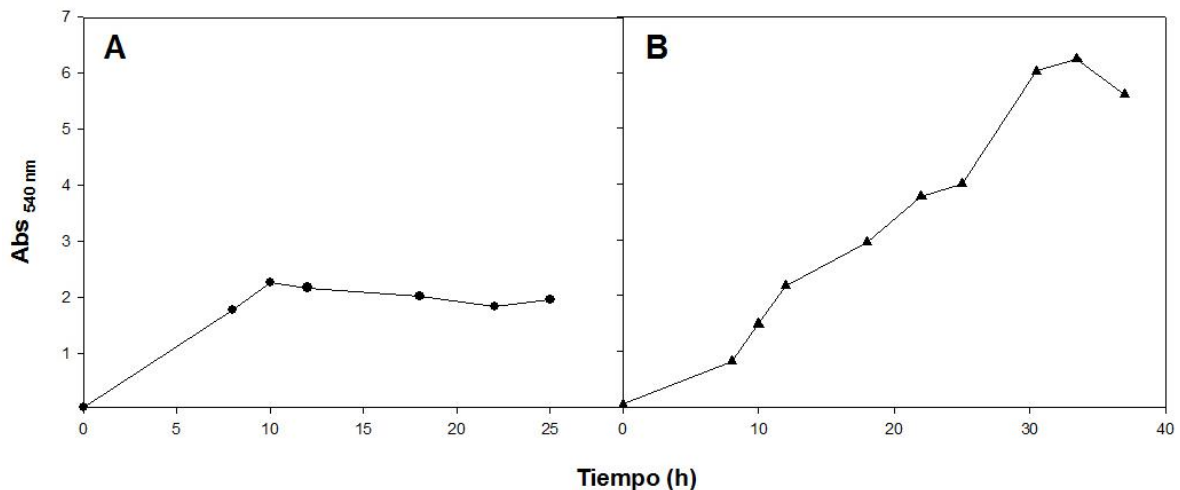
## 8. Cultivo de *P. putida* N $\Delta$ fadBA y *P. putida* U $\Delta$ fadBA en medios mínimos conteniendo ácido adípico

Las enzimas PhaC responsables de la polimerización de los monómeros que dan lugar a los PHAs (PhaC1 y PhaC2) tienen una baja especificidad de sustrato, razón por la que existen tantos polímeros distintos con una composición monomérica tan variable (Chen, 2009) y, por

lo tanto, con distintas propiedades físicas y mecánicas. Partiendo de esta premisa, y buscando nuevos monómeros que pudieran dar lugar a un bioplástico distinto de los que se conocen hasta el momento, se llevó a cabo un experimento para observar si las cepas *PpNΔfadBA* y *PpUΔfadBA* eran capaces de polimerizar ácidos dicarboxílicos como el ácido adípico.

Las cepas se sembraron con una fuente de carbono (glucosa o 4-hidroxifenilacetato) y se suplementaron adicionalmente con ácido adípico como fuente de monómeros. *PpNΔfadBA* se sembró en MM suplementado con glucosa 1% (p/v) y ácido adípico 10 mM. Por su parte *PpUΔfadBA* se sembró en medio mínimo suplementado con 4-hidroxifenilacetato 10 mM y ácido adípico 10 mM. En el caso de *PpUΔfadBA* no se utilizó la glucosa como fuente de carbono para evitar interferencias catabólicas, como vimos en el apartado 2.

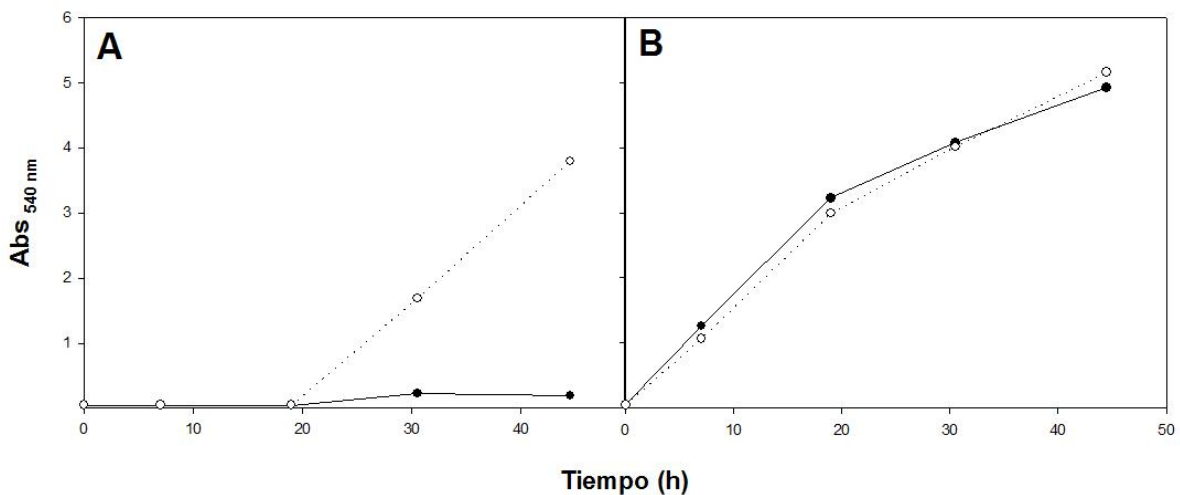
Se hizo un seguimiento del crecimiento de estas cepas, cultivadas en los medios descritos a 30 °C y 250 rpm de agitación, midiendo la absorbancia a 540 nm. A distintos tiempos de incubación se realizaron preparaciones para microscopía óptica de ambas cepas mediante su tinción con fucsina para observar en el microscopio óptico si se producía acúmulo de polímero plástico. Ninguna de las dos cepas mostró acúmulo de plástico en estos medios, por lo que parece que sus respectivas polimerasas son incapaces de utilizar acil-CoA derivados del ácido adípico como sustrato.



**Figura 49.** Cinéticas de crecimiento de (A) *P. putida* U  $\Delta$ *fadBA* cultivada en MM suplementado con 4-hidroxifenilacético 10 mM y ácido adípico 10 mM y (B) *P. putida* N $\Delta$ *fadBA* cultivada en MM suplementado con glucosa 1% (p/v) y ácido adípico 10 mM.

## 9. Cultivo de *P. putida* N y *P. putida* N $\Delta$ *fadBA* en MM con butirato

Algunas especies del género *Pseudomonas* poseen en su genoma, además del *cluster pha*, los genes *phbABC* que permiten la síntesis de PHB (Catone *et al.*, 2014; Matsusaki *et al.*, 1998). Si bien no se trata de una característica frecuente en la especie *P. putida*, no se puede descartar que alguna cepa posea este *cluster phb* en su genoma. Por ello, para evaluar si esta cepa disponía de la capacidad para producir PHB, se sembraron las cepas *P. putida* N y *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* en medio líquido que contenía butirato o 4-fenilbutirato con el fin de observar si eran capaces de acumular PHAs a partir de estos compuestos. Los medios utilizados fueron MM suplementado con glucosa al 1% (p/v) y con butirato 30 mM o 4-fenilbutirato 15 mM. El cultivo se realizó a 30 °C y 250 rpm (Fig. 50). El seguimiento del crecimiento y del acúmulo se realizó midiendo la absorbancia a 540 nm y realizando preparaciones teñidas con fucsina para su observación al microscopio óptico. En ningún caso se observó acúmulo de PHAs. Este hecho parece indicar que las polimerasa de las que dispone esta cepa no son capaces de sintetizar biopolímero scl-PHA utilizando ácidos grasos de cadena corta (4 átomos de C o menos).

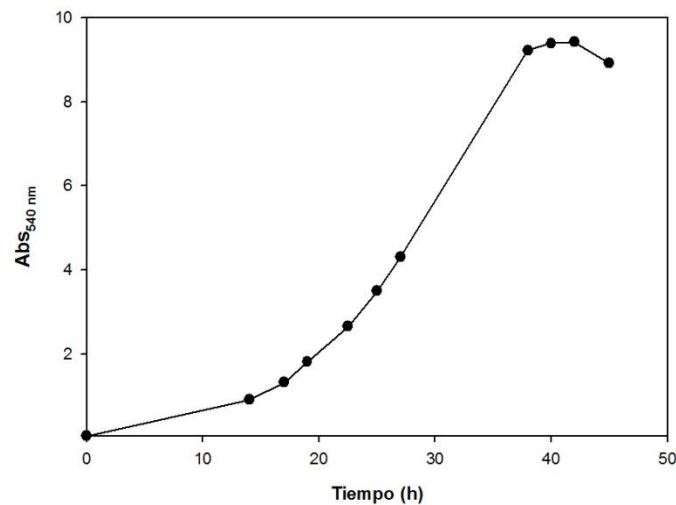


**Figura 50.** Cinéticas de crecimiento de *P. putida* N (●) y *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* (○) creciendo en MM suplementado con glucosa 1% (p/v) y (A) butirato 30 mM o (B) 4-fenilbutirato 15 mM.

## 10. Cultivo de *P. putida* N $\Delta$ *fadBA* en glicerol

Como se ha venido detallando a lo largo de los resultados, la cepa *P. putida* N, al igual que otras estirpes de *P. putida*, es capaz de crecer y acumular polímero plástico cuando crece con derivados de ácidos grasos como sustrato. Se han documentado cepas de

pseudomonádidos que son capaces de acumular PHAs, PHB y/o copolímeros de mcl-scl-PHAs cuando se cultivan con fuentes de carbono no relacionadas con ácidos grasos, ya sea a través de la síntesis *de novo* de ácidos grasos o por la ruta de síntesis de PHB (Abe *et al.*, 1994; Bertrand *et al.*, 1990; Escapa *et al.*, 2013; Young *et al.*, 1994). Para comprobar si *P. putida* N tiene la capacidad de llevar a cabo este tipo de síntesis, se cultivó esta cepa en MM suplementado con glicerol 1% (p/v) como fuente de carbono y energía (Fig. 51). El cultivo se realizó a 30 °C y 250 rpm. Se realizaron preparaciones para el microscopio óptico, no observándose acúmulo de PHAs en ningún caso.



**Figura 51.** Cinética de crecimiento de *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* cultivada en MM suplementado con glicerol 1% (p/v).

El seguimiento del cultivo y la ausencia de acúmulo de polímero señalan que esta cepa no es capaz de sintetizar bioplástico vía la síntesis *de novo* de ácidos grasos cuando se parte de glicerol, y que, como se había visto en los cultivos con butirato y fenilbutirato, tampoco parece contar en su genoma con una copia del *cluster phb*.

En resumen, la presente tesis doctoral recoge los trabajos realizados sobre la producción de PHAs en distintas cepas de *Pseudomonas putida*, concretamente en *P. putida* N y en *P. putida* U. Se han obtenido mutantes superproductores de bioplástico de estas cepas (apartado 3) y se ha analizado la capacidad productora de PHAs de dichos mutantes, así como la estabilidad genética de las cepas superproductoras (apartado 7). Además, se han realizado estudios para determinar la conexión existente entre el sistema de producción de polímeros de reserva y la morfología celular (apartado 5). En definitiva, se ha tratado de integrar estudios genéticos, fisiológicos y morfológicos en unas cepas con gran interés para la producción de

bioplástico y cuyo conocimiento es imprescindible para abordar con éxito la producción de estas moléculas a escala industrial.



## **Conclusiones**



A continuación se presentan las conclusiones alcanzadas en esta tesis doctoral:

1. Los *loci pha* de *Pseudomonas putida* N y de *Pseudomonas putida* DOC21 están compuestos por seis genes (*phaC1ZC2DFI*) al igual que sucede en otros pseudomonádidos. La elevada homología existente entre los genes *pha* estudiados en esta tesis doctoral y los descritos previamente, indica que desempeñan las mismas funciones en las distintas cepas comparadas.

2. La cepa *P. putida* N es capaz de acumular una mayor cantidad de PHAs que *P. putida* U cuando se cultiva en MM suplementado con octanoato 20 mM. Cuando *P. putida* N se cultivó en MM que contenía octanoato (30 mM) y glucosa (1% p/v) la cantidad de PHA acumulado fue superior al 47%. En estas mismas condiciones el crecimiento de *P. putida* fue muy lento.

3. Los mutantes *P. putida* N pMC*phaF* y *P. putida* N pK18*pha* no mejoraron la capacidad biosintética de PHAs con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, el mutante superproductor *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* produce más cantidad de PHAs que la cepa silvestre en cualquiera de los medios utilizados, destacando los resultados obtenidos cuando se utilizaron como precursores ácidos fenilalcanoicos. En estos casos la producción de PHAs llegó a ser del 61,26% respecto del peso seco de bacterias.

4. Cuando en las cepas *P. putida* N y *P. putida* N  $\Delta$ *fadBA* se expresa en *trans* el gen que codifica la despolimerasa (PhaZ) de *P. putida* U, estas acumulan diferentes 3-hidroxiácidos en el medio de cultivo.

5. La cepa *P. putida* N muestra una morfología filamentosa cuando se cultiva a concentraciones subinhibitorias de ampicilina, como consecuencia de la interacción de ese antibiótico con el proceso de división celular. Sin embargo, cuando se expresa en *trans* el gen *phaF* de *P. putida* U, este mutante presenta una morfología bacilar, probablemente debido a que la resistencia de esta cepa al antibiótico ampicilina se incrementa en dos órdenes de magnitud.

6. El cultivo reiterado del mutante superproductor *P. putida* U  $\Delta$ *fadBA* en medios que contienen exclusivamente octanoato como fuente de carbono, conduce a una pérdida de la capacidad para sintetizar PHAs. El análisis genético revela que en tales condiciones, y probablemente debido al estrés metabólico que supone la acumulación de PHAs, la población bacteriana acumula y selecciona mutaciones que conducen a la pérdida de función de la polimerasa I.

7. El análisis de esos mutantes adaptativos ha permitido identificar un total de 22 errores diferentes en la secuencia de *phaC1*. Todos ellos inactivan la enzima, y contribuyen a una mayor tasa de crecimiento.

8. Teniendo en cuenta que estas mutaciones inactivan PhaC1, que no se halló ninguna mutación en PhaC2, y que aquellas bacterias que contenían una copia de PhaC1 mutada y otra de PhaC2 nativa no sintetizaban PHAs, se ha propuesto un modelo según el cual la activación de las polimerasas estaría mediada por la formación de dímeros PhaC1-PhaC2. Estos dímeros heteroproteicos prevalecen funcionalmente sobre aquellos otros constituidos por dos copias de la misma proteína (PhaC1-PhaC1 y PhaC2-PhaC2).

## Bibliografía



- Abe, H., Doi, Y., Fukushima, T., y Eya, H. (1994) Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**: 115–119.
- Abe, T., Kobayashi, T., y Saito, T. (2005) Properties of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase with High Specific Activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **187**: 6982–6990.
- Abraham, G.A., Gallardo, A., San Roman, J., Olivera, E.R., Jodra, R., García, B., Miñambres, B., García, J.L., y Luengo, J.M. (2001) Microbial synthesis of poly(beta-hydroxyalkanoates) bearing phenyl groups from *Pseudomonas putida*: chemical structure and characterization. *Biomacromolecules* **2**: 562–567.
- Aertsen, A., y Michiels, C.W. (2005) SulA-dependent hypersensitivity to high pressure and hyperfilamentation after high-pressure treatment of *Escherichia coli lon* mutants. *Res. Microbiol.* **156**: 233–237.
- Aeschelmann, F., y Carus, M. (2015) Bio-based building blocks and polymers in the world. Capacities, production and applications: status quo and trends towards 2020. Nova Institut GmbH (Market Study). <http://bio-based.eu/markets/>(acceso: diciembre 2016).
- Agnew, D.E., Stevermer, A.K., Youngquist, J.T., y Pflieger, B.F. (2012) Engineering *Escherichia coli* for production of C12–C14 polyhydroxyalkanoate from glucose. *Metab. Eng.* **14**: 705–713.
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., y Roy, I. (2010) Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**: 732–743.
- Aldor, I.S., y Keasling, J.D. (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 475–483.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Amara, A.A., y Rehm, B.H.A. (2003) Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. *Biochem. J.* **374**: 413–421.
- Amara, A.A., Steinbüchel, A., y Rehm, B.H.A. (2002) In vivo evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 477–482.
- Anderson, A.J., y Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450–472.
- Aneja, K.K., Ashby, R.D., y Solaiman, D.K.Y. (2009) Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalkanoate) through expression of PHA synthase from *Allochromatium vinosum* ATCC 35206. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1601–1612.

- Aranda-Olmedo, I., Tobes, R., Manzanera, M., Ramos, J.L., y Marqués, S. (2002) Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res.* **30**: 1826-1833.
- Arias, S., Sandoval, A., Arcos, M., Cañedo, L.M., Maestro, B., Sanz, J.M., Naharro, G., y Luengo, J.M. (2008) Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies. *Microb. Biotechnol.* **1**: 170-176.
- Arias, S., Bassas-Galia, M., Molinari, G., y Timmis, K.N. (2013) Tight coupling of polymerization and depolymerization of polyhydroxyalkanoates ensures efficient management of carbon resources in *Pseudomonas putida*. *Microb. Biotechnol.* **6**: 551-563.
- Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., Chiellini, E., y Braunegg, G. (2011) Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 295-304.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., y Regoli, F. (2015) Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ. Pollut.* **198**: 211-222.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M., y López, N.I. (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extrem. Life Extreme Cond.* **13**: 59-66.
- Babel, W., Ackermann, J.U., y Breuer, U. (2001) Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 125-157.
- Babu, R.P., O'Connor, K., y Seeram, R. (2013) Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Prog. Biomater.* **2**: 8-24.
- Bae, J.H., Park, B.G., Jung, E., Lee, P.-G., y Kim, B.-G. (2014) *fadD* deletion and *fadL* overexpression in *Escherichia coli* increase hydroxy long-chain fatty acid productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8917-8925.
- Baekeland, L.H. (1910) Bakelite, a condensation product of phenols and formaldehyde, and its uses. *J. Frankl. Inst.* **169**: 55-60.
- Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A., y Davis, M.E. (2007) Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 15549-15554.
- Basker, M.J., Gwynn, M.N., y White, A.R. (1979) Comparative activities of ampicillin, epicillin and amoxycillin in vitro and in vivo. *Chemotherapy* **25**: 170-180.



- Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., y Kishony, R. (2016) Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* **353**: 1147-1151.
- Bear, M.-M., Leboucher-Durand, M.-A., Langlois, V., Lenz, R.W., Goodwin, S., y Guérin, P. (1997) Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *React. Funct. Polym.* **34**: 65-77.
- Bedia, J., Barrionuevo, R., Rodríguez-Mirasol, J., y Cordero, T. (2011) Ethanol dehydration to ethylene on acid carbon catalysts. *Appl. Catal. B Environ.* **103**: 302-310.
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., y Jensen, G.J. (2012) Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **194**: 1092-1099.
- van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., y Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* **147**: 1621-1630.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., y Wheeler, D.L. (2000) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 15-18.
- Bertrand, J.L., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., y Chavarie, C. (1990) Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3133-3138.
- Bi, E., Dai, K., Subbarao, S., Beall, B., y Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ and cell division. *Res. Microbiol.* **142**: 249-252.
- Bian, Y.-Z., Wang, Y., Aibaidoula, G., Chen, G.-Q., y Wu, Q. (2009) Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **30**: 217-225.
- Birnboim, H.C., y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Black, P.N. (1991) Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadL* gene encoding an outer membrane protein required for long-chain fatty acid transport. *J. Bacteriol.* **173**: 435-442.
- Black, P.N., y DiRusso, C.C. (1994) Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1210**: 123-145.
- Black, P.N., DiRusso, C.C., Metzger, A.K., y Heimert, T.L. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25513-25520.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., y Piddock, L.J.V. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 42-51.
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N., y Willmitzer, L. (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta* **211**: 841-845.

- Boyer, H.W., y Roulland-dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., y Genser, K.F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* **65**: 127-161.
- Bresan, S., y Jendrossek, D. (2017) New Insights in PhaM-PhaC-mediated localization of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e00505-17.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., y Jendrossek, D. (2016) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci. Rep.* **6**: 26612.
- Brückner, R., y Titgemeyer, F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 141-148.
- Budde, C.F., Mahan, A.E., Lu, J., Rha, C., y Sinskey, A.J. (2010) Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **192**: 5319-5328.
- Byrom, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* **5**: 246-250.
- Byrom, D. (1990) Industrial production of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. En *Novel biodegradable microbial polymers*. E.A. Dawes, (ed.). Dordrecht, Países Bajos: Springer Netherlands, pp. 113-117.
- Campbell, J.W., y Cronan, J.E. (2002) The enigmatic *Escherichia coli* *fadE* gene is *yafH*. *J. Bacteriol.* **184**: 3759-3764.
- Campbell, J.W., Morgan-Kiss, R.M., y Cronan, J.E. (2003) A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic beta-oxidation pathway. *Mol. Microbiol.* **47**: 793-805.
- Carnicero, D., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L.M., Schleissner, C., y Luengo, J.M. (1997) Octanoic acid uptake in *Pseudomonas putida* U. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 51-58.
- Catone, M.V., Ruiz, J.A., Castellanos, M., Segura, D., Espin, G., y López, N.I. (2014) High polyhydroxybutyrate production in *Pseudomonas extremaustralis* is associated with differential expression of horizontally acquired and core genome polyhydroxyalkanoate synthase genes. *PloS One* **9**: e98873.
- Chen, G.-Q. (2009) Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology monographs Vol. 14, Chen G.Q. (ed.). Berlin Heidelberg, Alemania: Springer, pp. 17-37.
- Chen, G.-Q. (2011) Biofunctionalization of polymers and their applications. En *Biofunctionalization of Polymers and Their Applications*, Nyanhongo G.S., Steiner W., y Gübitz G. (eds.). Berlin Heidelberg, Alemania: Springer, pp. 29-45.
- Chen, G.-Q., y Wu, Q. (2005a) Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 592-599.

- Chen, G.-Q., y Wu, Q. (2005b) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**: 6565–6578.
- Chen, G., Li, S., Jiao, F., y Yuan, Q. (2007) Catalytic dehydration of bioethanol to ethylene over TiO<sub>2</sub>/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts in microchannel reactors. *Catal. Today* **125**: 111–119.
- Chen, Y., Li, M., Meng, F., Yang, W., Chen, L., y Huo, M. (2014a) Optimal poly (3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) biosynthesis by fermentation liquid from primary and waste activated sludge. *Environ. Technol.* **35**: 1791–1801.
- Chen, Y.-J., Tsai, P.-C., Hsu, C.-H., y Lee, C.-Y. (2014b) Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. *Enzyme Microb. Technol.* **56**: 60–66.
- Choi, S.Y., Park, S.J., Kim, W.J., Yang, J.E., Lee, H., Shin, J., y Lee, S.Y. (2016) One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **34**: 435–440.
- Clarival, A.M., y Halleux, J. (2005) Classification of biodegradable polymers. En *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*. Smith R., (ed.). Woodhead Publishing, pp. 3–31.
- Coats, E.R., Loge, F.J., Wolcott, M.P., Englund, K., y McDonald, A.G. (2007) Synthesis of polyhydroxyalkanoates in municipal wastewater treatment. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* **79**: 2396–2403.
- Collias, D.I., Harris, A.M., Nagpal, V., Cottrell, I.W., y Schultheis, M.W. (2014) Biobased terephthalic acid technologies: a literature review. *Ind. Biotechnol.* **10**: 91–105.
- Curtiss, R., Caro, L.G., Allison, D.P., y Stallions, D.R. (1969) Early stages of conjugation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **100**: 1091–1104.
- Dagley, S., y Gibson, D.T. (1965) The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* **95**: 466–474.
- Dai, K., y Lutkenhaus, J. (1991) *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 3500–3506.
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S.X., Wirtz, D., y Lutkenhaus, J. (2008) MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr. Biol.* **18**: 235–244.
- Davis, R., Chandrashekar, A., y Shamala, T.R. (2008) Role of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratases of *Pseudomonas sp* in the production of polyhydroxyalkanoates. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 285–296.
- Davis, L.G., Dibner, M.D., y Battey, J.F. (1986) *Basic methods in molecular biology*. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Dawes, E.A., y Senior, P.J. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. En *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 10. Rose A.H. y Tempest D.W., (eds.). Londres, Reino Unido: Academic Press, pp. 135–266.

- de Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J.L., y Prieto, M.A. (2010a) The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ. Microbiol.* **12**: 207-221.
- de Eugenio, L.I., Galán, B., Escapa, I.F., Maestro, B., Sanz, J.M., García, J.L., y Prieto, M.A. (2010b) The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environ. Microbiol.* **12**: 1591-1603.
- de Eugenio, L.I., García, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., Román, J.S., García, J.L., y Prieto, M.A. (2007) Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**: 4951-4962.
- Diard, S., Carlier, J.-P., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Langlois, V., Guérin, P., y Bouvet, O.M.M. (2002) Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) from octanoate in different *Pseudomonas* belonging to the rRNA homology group I. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 183-188.
- DiRusso, C.C. (1990) Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. *J. Bacteriol.* **172**: 6459-6468.
- Díaz, E., y Prieto, M.A. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 467-475.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., y Soga, K. (1987) Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **8**: 631-635.
- Doi, Y., Segawa, A., Kawaguchi, Y., y Kunioka, M. (1990) Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 165-169.
- Donnenberg, M.S., y 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.
- Doten, R.C., y Mortlock, R.P. (1984) Directed evolution of a second xylitol catabolic pathway in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **159**: 730-735.
- Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W., y Ki Carol Lin, S. (2012) Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Curr. Chem. Biol.* **6**: 14-25.
- Dubey, G.P., y Ben-Yehuda, S. (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**: 590-600.
- Dubey, G.P., Malli Mohan, G.B., Dubrovsky, A., Amen, T., Tsipshtein, S., Rouvinski, A., Rosenberg, A., Kaganovich, D., Sherman, E., Medalia, O., y Ben-Yehuda S. (2016) Architecture and characteristics of bacterial nanotubes. *Dev. Cell* **36**: 453-461.

- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., *et al.* (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* **190**: 2597–2606.
- Elhadi, D., Lv, L., Jiang, X.-R., Wu, H., y Chen, G.-Q. (2016) CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification. *Metab. Eng.* **38**: 358–369.
- Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., y Reisser, J. (2014) Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLOS ONE* **9**: e111913.
- Escapa, I.F., García, J.L., Bühler, B., Blank, L.M., y Prieto, M.A. (2012) The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **14**: 1049–1063.
- Escapa, I.F., del Cerro, C., García, J.L., y Prieto, M.A. (2013) The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ. Microbiol.* **15**: 93–110.
- Favre-Bulle, O., y Witholt, B. (1992) Biooxidation of n-octane by a recombinant *Escherichia coli* in a two-liquid-phase system: Effect of medium components on cell growth and alkane oxidation activity. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 931–937.
- Fazli, M., Almlblad, H., Rybtke, M.L., Givskov, M., Eberl, L., y Tolker-Nielsen, T. (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ. Microbiol.* **16**: 1961–1981.
- Fernández, L., y Hancock, R.E.W. (2012) Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 661–681.
- Fiedler, S., Steinbüchel, A., y Rehm, B.H.A. (2002) The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.* **178**: 149–160.
- Foster, P.L. (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 373–397.
- Foster, L.J., Stuart, E.S., Tehrani, A., Lenz, R.W., y Fuller, R.C. (1996) Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **19**: 177–183.
- Foster, L.J., Lenz, R.W., y Fuller, R.C. (1999) Intracellular depolymerase activity in isolated inclusion bodies containing polyhydroxyalkanoates with long alkyl and functional substituents in the side chain. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 187–192.
- Frisch, R.L., Su, Y., Thornton, P.C., Gibson, J.L., Rosenberg, S.M., y Hastings, P.J. (2010) Separate DNA Pol II- and Pol IV-dependent pathways of stress-induced mutation during double-strand-break repair in *Escherichia coli* are controlled by RpoS. *J. Bacteriol.* **192**: 4694–4700.

- Fujimaki, T. (1998) Processability and properties of aliphatic polyesters, 'BIONOLLE', synthesized by polycondensation reaction. *Polym. Degrad. Stab.* **59**: 209–214.
- Fuller, R.C. (1999) Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**: 21–29.
- Gagnon, K.D., Lenz, R.W., Farris, R.J., y Fuller, R.C. (1992) Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **25**: 3723–3728.
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Sanz, J.M., García, J.L., y Prieto, M.A. (2011) Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Mol. Microbiol.* **79**: 402–418.
- Galhardo, R.S., Hastings, P.J., y Rosenberg, S.M. (2007) Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 399–435.
- Gao, X., Chen, J.-C., Wu, Q., y Chen, G.-Q. (2011) Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 768–774.
- García, B. (2004) Biosíntesis de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* U: Caracterización genética y bioquímica del sistema responsable de su acúmulo y movilización. Tesis doctoral, Universidad de León.
- García, B., Olivera, E.R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L.M., Prieto, M.A., García, J.L., Martínez, M., y 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.
- García, B., Olivera, E.R., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arias, S., Naharro, G., y Luengo, J.M. (2004) Strategy for cloning large gene assemblages as illustrated using the phenylacetate and polyhydroxyalkanoate gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5019–5025.
- Gardner, A.D. (1940) Morphological effects of penicillin on bacteria. *Nature* **146**: 837–838.
- Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A.J., y Peoples, O.P. (1993) Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *J. Bacteriol.* **175**: 5289–5293.
- Gilbert, M. (2017a) *Plastics Materials: Introduction and Historical Development*. En *Brydson's Plastics Materials* (Eighth Edition). Oxford, Reino Unido: Butterworth-Heinemann, pp. 1–18.
- Gilbert, M. (2017b) *Cellulose Plastics*. En *Brydson's Plastics Materials* (Eighth Edition). Oxford, Reino Unido: Butterworth-Heinemann, pp. 617–630.
- Giraldes, J.W., Akey, D.L., Kittendorf, J.D., Sherman, D.H., Smith, J.L., y Fecik, R.A. (2006) Structural and mechanistic insights into polyketide macrolactonization from polyketide-based affinity labels. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 531–536.
- Goffin, C., y Ghuysen, J.-M. (2002) Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-

susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 702–738.

Gosset, G. (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb. Cell Factories* **4**: 14.

Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., y Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 4645–4649.

Griebel, R., Smith, Z., y Merrick, J.M. (1968) Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **7**: 3676–3681.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., y Cygler, M. (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843–12847.

Gross, R.A., y Kalra, B. (2002) Biodegradable polymers for the environment. *Science* **297**: 803–807.

Gross, R.A., DeMello, C., Lenz, R.W., Brandl, H., y Fuller, R.C. (1989) The biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **22**: 1106–1115.

Guo, J., Xiang, H.-X., y Wang, Q.-Q. (2012) Rheological, mechanical and thermal properties of polytrimethylene terephthalate. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **51**: 199–207.

Hajnal, I., Chen, X., y Chen, G.-Q. (2016) A novel cell autolysis system for cost-competitive downstream processing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 9103–9110.

Halley, P.J. (2005) Thermoplastic starch biodegradable polymers. En *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*. Smith, R. (ed.). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing, pp. 140–162.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.

Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L., y Dawes, E. A. (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.

Haywood, G.W., Anderson, A.J., Ewing, D.F., y Dawes, E.A. (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas sp.* strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3354–3359.

Hazer, B., y Steinbüchel, A. (2007) Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1–12.

- Hegeman, G.D., y Rosenberg, S.L. (1970) The evolution of bacterial enzyme systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **24**: 429-462.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 341-346.
- Hershberg, R. (2015) Mutation - The engine of evolution: studying mutation and its role in the evolution of bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**: a018077.
- Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S., Lin, C., Irie, Y., Storek, K.M., Yang, J.J., *et al.* (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat. Protoc.* **10**: 1820-1841.
- Hoffmann, N., y Rehm, B.H.A. (2005) Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads. *Biotechnol. Lett.* **27**: 279-282.
- Huijberts, G.N., Eggink, G., Waard, P. de, Huisman, G.W., y 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.
- Huijberts, G.N., Rijk, T.C. de, Waard, P. de, y Eggink, G. (1994) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J. Bacteriol.* **176**: 1661-1666.
- Huisman, G.W., de Leeuw, O., Eggink, G., y Witholt, B. (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1949-1954.
- Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., y Witholt, B. (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* **266**: 2191-2198.
- Hume, A.R., Nikodinovic-Runic, J., y O'Connor, K.E. (2009) FadD from *Pseudomonas putida* CA-3 is a true long-chain fatty acyl coenzyme A synthetase that activates phenylalkanoic and alkanolic acids. *J. Bacteriol.* **191**: 7554-7565.
- Huse, H.K., Kwon, T., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Marcotte, E.M., y Whiteley, M. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. *PLOS ONE* **8**: e82621.
- Iglewski, B.H. (1996) *Pseudomonas*. En *Medical Microbiology* (4<sup>a</sup> edición). Baron, S. (ed.). Galveston, EE. UU.: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Jendrossek, D. (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (Carbonosomes). *J. Bacteriol.* **191**: 3195-3202.
- Jendrossek, D., y Handrick, R. (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 403-432.



- Jendrossek, D., y Pfeiffer, D. (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* **16**: 2357-2373.
- Jensen, R.H., y Woolfolk, C.A. (1985) Formation of filaments by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 364-372.
- Jia, Y., Kappock, T.J., Frick, T., Sinskey, A.J., y Stubbe, J. (2000) Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. *Biochemistry* **39**: 3927-3936.
- Jia, Y., Yuan, W., Wodzinska, J., Park, C., Sinskey, A.J., y Stubbe, J. (2001) Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochemistry* **40**: 1011-1019.
- Jian, J., Li, Z.-J., Ye, H.-M., Yuan, M.-Q., y Chen, G.-Q. (2010) Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila*. *Bioresour. Technol.* **101**: 6096-6102.
- Jiang, X.-R., Wang, H., Shen, R., y Chen, G.-Q. (2015) Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. *Metab. Eng.* **29**: 227-237.
- Jin, H., y Nikolau, B.J. (2012) Role of genetic redundancy in polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerases in PHA biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **194**: 5522-5529.
- Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., y Ghiorse, W.C. (2001) Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* **3**: 774-784.
- Kalia, V.C., Lal, S., y Cheema, S. (2007) Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. *Gene* **389**: 19-26.
- Kaur, G., y Roy, I. (2015) Strategies for large-scale production of polyhydroxyalkanoates. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29**: 157-172.
- Kelley, L.A., y Sternberg, M.J.E. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**: 363-371.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., y Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**: 845-858.
- Kessler, B., y Witholt, B. (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* **86**: 97-104.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., y Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the P<sub>m</sub> promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 293-301.
- Khandal, D., Pollet E., y Avérous, L. (2015) Polyhydroxyalkanoate-based multiphase materials. En *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites*. RSC Green Chemistry No. 30. Roy, I., y Visakh, P.M. (eds.). Londres, Reino Unido: The Royal Society of Chemistry, pp. 119-140.

- Khanna, S., y Srivastava, A.K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* **40**: 607–619.
- Kim, J., Kim, Y.-J., Choi, S.Y., Lee, S.Y., y Kim, K.-J. (2016a) Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnol. J.* **12**: n/a, 1600648.
- Kim, M.P., Ta, A.H., Ellsworth, W.A., Marco, R.A., Gaur, P., y Miller, J.S. (2015) Three dimensional model for surgical planning in resection of thoracic tumors. *Int. J. Surg. Case Rep.* **16**: 127–129.
- Kim, Y.-J., Choi, S.Y., Kim, J., Jin, K.S., Lee, S.Y., y Kim, K.-J. (2016b) Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnol. J.* **12**: n/a, 1600649.
- Klainer, A.S., y Perkins, R.L. (1970) Antibiotic-induced alterations in the surface morphology of bacterial cells: a scanning-beam electron microscopy study. *J. Infect. Dis.* **122**: 323–328.
- Klinke, S., de Roo, G., Witholt, B., y Kessler, B. (2000) Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3705–3710.
- Kobayashi, T., Uchino, K., Abe, T., Yamazaki, Y., y Saito, T. (2005) Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **187**: 5129–5135.
- Koller, M., y Braunegg, G. (2015) Potential and prospects of continuous polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering* **2**: 94–121.
- Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., y Braunegg, G. (2010) Modern biotechnological polymer synthesis: A review. *Food Technol. Biotechnol.* **48**: 255–269.
- Koller, M., Salerno, A., y Braunegg, G. (2013) Polyhydroxyalkanoates: basics, production y applications of microbial biopolyesters. En *Bio-based plastics*, Kabasci, S. (ed.). Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd, pp. 137–170.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., y Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176.
- Kumar, N., Radhakrishnan, A., Wright, C.C., Chou, T.-H., Lei, H.-T., Bolla, J.R., Tringides, M.L., Rajashankar, K.R., Su, C.-C., Purdy, G.E., et al. (2014) Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **23**: 423–432.
- Kunasundari, B., y Sudesh, K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* **5**: 620–634.
- Kurian, J.V. (2005) A new polymer platform for the future – Sorona® from corn derived 1,3-propanediol. *J. Polym. Environ.* **13**: 159–167.

- La Rosa, R., de la Peña, F., Prieto, M.A., y Rojo, F. (2014) The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environ. Microbiol.* **16**: 278-290.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., y Witholt, B. (1988a) 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.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., y Witholt, B. (1988b) 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.
- Larson, E.R. (2015) Thermoplastic Material Selection. Waltham, EE. UU.: William Andrew Publishing, pp. 1-18.
- Lemoigne, M. (1923) Production d'acide  $\beta$ -oxybutyrique par certaines bactéries du groupe du *B. subtilis*. *C.R. Acad. Sci.* **176**: 1761.
- Lee, S.Y., Lee, K.M., Chan, H.N., y Steinbüchel, A. (1994) Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1337-1347.
- Lenz, R.W., y Marchessault, R.H. (2005) Bacterial biopolyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* **6**: 1-8.
- Lerner, S.A., Wu, T.T., y Lin, E.C. (1964) Evolution of a catabolic pathway in bacteria. *Science* **146**: 1313-1315.
- Levine, A.C., Heberlig, G.W., y Nomura, C.T. (2016) Use of thiolene click chemistry to modify mechanical and thermal properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Int. J. Biol. Macromol.* **83**: 358-365.
- Liang, W., Rudd, K.E., y Deutscher, M.P. (2015) A role for REP sequences in regulating translation. *Mol. Cell* **58**: 431-439.
- Liebergessell, M., y Steinbüchel, A. (1992) Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur. J. Biochem.* **209**: 135-150.
- Liebergessell, M., Schmidt, B., y Steinbüchel, A. (1992) Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 227-232.
- Lillo, J.G., y Rodriguez-Valera, F. (1990) Effects of culture conditions on poly(beta-hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2517-2521.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., y Li, L. (2009) Thermal processing of starch-based polymers. *Prog. Polym. Sci.* **34**: 1348-1368.

- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., y Olivera, E.R. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 251–260.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., y Dessen, A. (2006) Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 673–691.
- MacLean, R.C., Torres-Barceló, C., y Moxon, R. (2013) Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Nat. Rev. Genet.* **14**: 221–227.
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N.R., y John, R.P. (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour. Technol.* **101**: 8493–8501.
- Madison, L.L., y Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 21–53.
- Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M.A., y Sanz, J.M. (2013) A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS One* **8**: e56904.
- Maisnier-Patin, S., y Roth, J.R. (2015) The origin of mutants under selection: how natural selection mimics mutagenesis (adaptive mutation). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**: a018176.
- Marguet, E., Gaudin, M., Gaudiard, E., Fourquaux, I., le Blond du Plouy, S., Matsui, I., y Forterre, P. (2013) Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*. *Biochem. Soc. Trans.* **41**: 436–442.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L.B., y 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.
- Masamune, S., Walsh, C.T., Sinskey, A.J., y Peoples, O.P. (1989) Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by  $\beta$ -ketoacyl thiolase. *Pure Appl. Chem.* **61**: 303–312.
- Matsumoto, K., Takase, K., Aoki, E., Doi, Y., y Taguchi, S. (2005) Synergistic effects of Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. *Biomacromolecules* **6**: 99–104.
- Matsumoto, K., Murata, T., Nagao, R., Nomura, C.T., Arai, S., Arai, Y., Takase, K., Nakashita, H., Taguchi, S., y Shimada, H. (2009) Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of *Arabidopsis thaliana* using an engineered 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Biomacromolecules* **10**: 686–690.
- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., y Doi, Y. (1998) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas sp.* strain 61-3. *J. Bacteriol.* **180**: 6459–6467.

- Mayer, F., y Hoppert, M. (1997) Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *J. Basic Microbiol.* **37**: 45-52.
- McCool, G.J., y Cannon, M.C. (2001) PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **183**: 4235-4243.
- McQualter, R.B., Petrasovits, L.A., Gebbie, L.K., Schweitzer, D., Blackman, D.M., Chrysanthopoulos, P., Hodson, M.P., Plan, M.R., Riches, J.D., Snell, K.D., *et al.* (2015) The use of an acetoacetyl-CoA synthase in place of a  $\beta$ -ketothiolase enhances poly-3-hydroxybutyrate production in sugarcane mesophyll cells. *Plant Biotechnol. J.* **13**: 700-707.
- Medvedkin, V.N., Permyakov, E.A., Klimenko, L.V., Mitin, Y.V., Matsushima, N., Nakayama, S., y Kretsinger, R.H. (1995) Interactions of (Ala\*Ala\*Lys\*Pro)<sub>n</sub> and (Lys\*Lys\*Ser\*Pro)<sub>n</sub> with DNA. Proposed coiled-coil structure of AlgR3 and AlgP from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Eng.* **8**: 63-70.
- Mekonnen, T., Mussone, P., Khalil, H., y Bressler, D. (2013) Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *J. Mater. Chem. A* **1**: 13379-13398.
- de Mendoza, D., Klages Ulrich, A., y Cronan, J.E. (1983) Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J. Biol. Chem.* **258**: 2098-2101.
- Meng, D.-C., Shen, R., Yao, H., Chen, J.-C., Wu, Q., y Chen, G.-Q. (2014) Engineering the diversity of polyesters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**: 24-33.
- Merino, E., Barrientos, A., Rodríguez, J., Naharro, G., Luengo, J.M., y Olivera, E.R. (2013) Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: evidence of a common pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 891-904.
- Mingorance, J., Rivas, G., Vélez, M., Gómez-Puertas, P., y Vicente, M. (2010) Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends Microbiol.* **18**: 348-356.
- Mochizuki, M., y Hiramí, M. (1997) Structural effects on the biodegradation of aliphatic polyesters. *Polym. Adv. Technol.* **8**: 203-209.
- Moldes, C., García, P., García, J.L., y Prieto, M.A. (2004) In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3205-3212.
- Moldes, C., Farinós, G.P., de Eugenio, L.I., García, P., García, J.L., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Castañera, P., y Prieto, M.A. (2006) New tool for spreading proteins to the environment: CryIAb toxin immobilized to bioplastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 88-93.
- Morgan-Sagastume, F., Hjort, M., Cirne, D., Gérardin, F., Lacroix, S., Gaval, G., Karabegovic, L., Alexandersson, T., Johansson, P., Karlsson, A., *et al.* (2015) Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresour. Technol.* **181**: 78-89.

- Morreall, J., Kim, A., Liu, Y., Degtyareva, N., Weiss, B., y Doetsch, P.W. (2015) Evidence for retromutagenesis as a mechanism for adaptive mutation in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **11**: e1005477.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nardini, M., Lang, D.A., Liebeton, K., Jaeger, K.E., y Dijkstra, B.W. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**: 31219-31225.
- Ng, W.-L., y Bassler, B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 197-222.
- Niaounakis, M. (2015) Biopolymers: Applications and Trends. Norwich, NY, EE. UU.: William Andrew Publishing.
- Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S.T., Babu, R., Werker, A., y O Connor, K.E. (2013) Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **84**: 139-200.
- Nobes, G.A., Marchessault, R.H., y Maysinger, D. (1998) Polyhydroxyalkanoates: materials for delivery systems. *Drug Deliv.* **5**: 167-177.
- Noguchi, H., Matsushashi, M., Takaoka, M., y Mitsushashi, S. (1978) New antipseudomonal penicillin, PC-904: affinity to penicillin-binding proteins and inhibition of the enzyme cross-linking peptidoglycan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 617-624.
- Notley-McRobb, L., y Ferenci, T. (1999) The generation of multiple co-existing mal-regulatory mutations through polygenic evolution in glucose-limited populations of *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* **1**: 45-52.
- Numm, W.D. (1986) A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **50**: 179-192.
- Nunvar, J., Licha, I., y Schneider, B. (2013) Evolution of REP diversity: a comparative study. *BMC Genomics* **14**: 385.
- Oh, Y.H., Lee, S.H., Jang, Y.-A., Choi, J.W., Hong, K.S., Yu, J.H., Shin, J., Song, B.K., Mastan, S.G., David, Y., *et al.* (2015) Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution. *Bioresour. Technol.* **181**: 283-290.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M.A., Cañedo, L., Dirusso, C.C., Naharro, G., y Luengo, J.M. (2001a) Two different pathways are involved in the beta-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., Jodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Román, J.S., García, J.L., Naharro, G., *et al.* (2001b) Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* **3**: 612-618.

- Olivera, E.R., Arcos, M., Naharro, G., y Luengo, J.M. (2010) Unusual PHA Biosynthesis. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs Vol. 14. Chen, G.-Q. (ed.). Berlin Heidelberg, Alemania: Springer pp. 133–186.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., *et al.* (1992) The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng. Des. Sel.* **5**: 197–211.
- Osswald, T.A., y Menges, G. (2012) *Material Science of Polymers for Engineers* (Third Edition). Munich, Alemania: Hanser Publications.
- Ouyang, S.-P., Liu, Q., Fang, L., and Chen, G.-Q. (2007a) Construction of *pha*-operon-defined knockout mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their applications in poly(hydroxyalkanoate) production. *Macromol. Biosci.* **7**: 227–233.
- Ouyang, S.-P., Luo, R.C., Chen, S.-S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q., y Chen, G.-Q. (2007b) Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules* **8**: 2504–2511.
- Paik, H., Kim, Y.-R., Orth, R.N., Ober, C.K., Coates, G.W., y Batt, C.A. (2005) End-functionalization of poly(3-hydroxybutyrate) via genetic engineering for solid surface modification. *Chem. Commun.* **15**: 1956–1958.
- Painter, P.C., y Coleman, M.M. (2008) *Essentials of Polymer Science and Engineering*. Lancaster, Pennsylvania, EE. UU.: DEStech Publications, Inc.
- Pande, S., Shitut, S., Freund, L., Westermann, M., Bertels, F., Colesie, C., Bischofs, I.B., y Kost, C. (2015) Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nat. Commun.* **6**: 6238.
- Park, S.J., y Lee, S.Y. (2004) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **114**: 335–346.
- Park, S.J., y Yup Lee, S. (2004) New FadB homologous enzymes and their use in enhanced biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in FadB mutant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 681–686.
- Park, A.J., Surette, M.D., y Khursigara, C.M. (2014) Antimicrobial targets localize to the extracellular vesicle-associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a biofilm. *Antimicrob. Resist. Chemother.* **5**: 464.
- Park, S.H., Lee, S.H., y Lee, S.Y. (2001) Preparation of optically active  $\beta$ -amino acids from microbial polyester polyhydroxyalkanoates. *J. Chem. Res.* **11**: 498–499.
- Park, S.J., Kim, T.W., Kim, M.K., Lee, S.Y., y Lim, S.-C. (2012) Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnol. Adv.* **30**: 1196–1206.
- Parkes, A. (1866) On the properties of Parkesine, and its application to the arts and manufactures. *J. Frankl. Inst.* **81**: 264–271.

- Pärnänen, K., Karkman, A., Virta, M., Eronen-Rasimus, E., y Kaartokallio, H. (2015) Discovery of bacterial polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC) encoding genes from seasonal Baltic Sea ice and cold estuarine waters. *Extrem. Life Extreme Cond.* **19**: 197–206.
- Pauli, G., Ehring, R., y Overath, P. (1974) Fatty Acid Degradation in *Escherichia coli*: Requirement of cyclic adenosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate receptor protein for enzyme synthesis. *J. Bacteriol.* **117**: 1178–1183.
- Peoples, O.P., y Sinskey, A.J. (1989) Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15298–15303.
- Peters, G.H., Toxvaerd, S., Olsen, O.H., y Svendsen, A. (1997) Computational studies of the activation of lipases and the effect of a hydrophobic environment. *Protein Eng.* **10**: 137–147.
- Petrasovits, L.A., McQualter, R.B., Gebbie, L.K., Blackman, D.M., Nielsen, L.K., y Brumbley, S.M. (2013) Chemical inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase as a strategy to increase polyhydroxybutyrate yields in transgenic sugarcane. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 1146–1151.
- Pfeiffer, D., y Jendrossek, D. (2012) Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **194**: 5909–5921.
- Pfeiffer, D., y Jendrossek, D. (2014) PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 555–563.
- Pham, T.H., Webb, J.S., y Rehm, B.H.A. (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiol. Read. Engl.* **150**: 3405–3413.
- Pierce, B.G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.-H., Vreven, T., y Weng, Z. (2014) ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinforma.* **30**: 1771–1773.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., *et al.* (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1257–1262.
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K., y Somerville, C. (1992) Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* **256**: 520–523.
- Potluri, L.-P., de Pedro, M.A., y Young, K.D. (2012) *Escherichia coli* low-molecular-weight penicillin-binding proteins help orient septal FtsZ, and their absence leads to asymmetric cell division and branching. *Mol. Microbiol.* **84**: 203–224.
- Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., y Steinbüchel, A. (2002) Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **148**: 2413–2426.
- Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wiczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Friedrich, B., y Steinbüchel, A. (2004) The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four



- orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* **150**: 2301-2311.
- Pramanik, A., Pawar, S., Antonian, E., y Schulz, H. (1979) Five different enzymatic activities are associated with the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **137**: 469-473.
- Prieto, A., Escapa, I.F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., y Revelles, O. (2014) A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **18**: 341-357.
- Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., y Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* **181**: 858-868.
- Prieto, M.A., Eugenio, L.I. de, Galán, B., Luengo, J.M., y Witholt, B. (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. En *Pseudomonas*. Vol. 5. Ramos, J.L., y Filloux A. (eds.). Dordrecht, Países Bajos: Springer Netherlands, pp. 397-428.
- Qi, Q., y Rehm, B.H.A. (2001) Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* **147**: 3353-3358.
- Qi, Q., Steinbüchel, A., y Rehm, B.H.A. (1998) Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 89-94.
- Quandt, J., y Hynes, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
- Raiger-Iustman, L.J., y Ruiz, J.A. (2008) The alternative sigma factor,  $\sigma^S$ , affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**: 218-224.
- Raman, N., y DiRusso, C.C. (1995) Analysis of acyl Coenzyme A binding to the transcription factor FadR and identification of amino acid residues in the carboxyl terminus required for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **270**: 1092-1097.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., y Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 326-356.
- Ramos-González, M.I., y Molin, S. (1998) Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *ipoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**: 3421-3431.
- Rehm, B.H.A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* **376**: 15-33.
- Rehm, B.H.A. (2006) Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnol. Lett.* **28**: 207-213.
- Rehm, B.H.A. (2007) Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Curr. Issues Mol. Biol.* **9**: 41-62.

- Rehm, B.H., Krüger, N., y Steinbüchel, A. (1998) A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *J. Biol. Chem.* **273**: 24044–24051.
- Rehm, B.H.A., Antonio, R.V., Spiekermann, P., Amara, A.A., y Steinbüchel, A. (2002) Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**: 178–190.
- Reinecke, F., y Steinbüchel, A. (2009) *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 91–108.
- Ren, Q., Roo, G.D., Kessler, B., y Witholt, B. (2000) Recovery of active medium-chain-length-poly-3-hydroxyalkanoate polymerase from inactive inclusion bodies using ion-exchange resin. *Biochem. J.* **349**: 599–604.
- Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H., y Zinn, M. (2005) Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules* **6**: 2290–2298.
- Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., y Thöny-Meyer, L. (2009) Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* **10**: 916–922.
- Ren, Q., de Roo, G., Witholt, B., Zinn, M., y Thöny-Meyer, L. (2010a) Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U. *BMC Microbiol.* **10**: 254.
- Ren, Q., Ruth, K., Thöny-Meyer, L., y Zinn, M. (2010b) Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 41–52.
- Revelles, O., Tarazona, N., García, J.L., y Prieto, M.A. (2016) Carbon roadmap from syngas to polyhydroxyalkanoates in *Rhodospirillum rubrum*. *Environ. Microbiol.* **18**: 708–720.
- Rodríguez-Moyá, M., y Gonzalez, R. (2015) Proteomic analysis of the response of *Escherichia coli* to short-chain fatty acids. *J. Proteomics* **122**: 86–99.
- Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 658–684.
- Rolinson, G.N., Macdonald, A.C., y Wilson, D.A. (1977) Bactericidal action of beta-lactam antibiotics on *Escherichia coli* with particular reference to ampicillin and amoxycillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**: 541–553.
- Roth, J.R., Kugelberg, E., Reams, A.B., Kofoid, E., y Andersson, D.I. (2006) Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 477–501.

- Royce, L.A., Liu, P., Stebbins, M.J., Hanson, B.C., y Jarboe, L.R. (2013) The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 8317-8327.
- Ruth, K., de Roo, G., Egli, T., y Ren, Q. (2008) Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. *Biomacromolecules* **9**: 1652-1659.
- Ryan, W.J., O'Leary, N.D., O'Mahony, M., y Dobson, A.D.W. (2013) GacS-dependent regulation of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 1795-1802.
- Sambrook, J. y Russell D.W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Volumen 1-3. Nueva York, EE. UU.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval, A. (2005) Biosíntesis de polihidroxiálcanoatos en *Pseudomonas putida* U: Análisis genético y funcional de los elementos implicados en la estabilización intracelular del gránulo. Tesis doctoral, Universidad de León.
- Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Bermejo, F., Cañedo, L., Naharro, G., Olivera, E.R., y Luengo, J.M. (2005) Production of 3-hydroxy-n-phenylalkanoic acids by a genetically engineered strain of *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 97-105.
- Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E.R., y Luengo, J.M. (2007) Genetic and ultrastructural analysis of different mutants of *Pseudomonas putida* affected in the poly-3-hydroxy-n-alkanoate gene cluster. *Environ. Microbiol.* **9**: 737-751.
- Sato, S., Kanazawa, H., y Tsuge, T. (2011) Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 951-959.
- Sato, S., Ishii, N., Hamada, Y., Abe, H., y Tsuge, T. (2012) Utilization of 2-alkenoic acids for biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in metabolically engineered *Escherichia coli* to construct a novel chemical recycling system. *Polym. Degrad. Stab.* **97**: 329-336.
- Saxena, R.K., Anand, P., Saran, S., y Isar, J. (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.* **27**: 895-913.
- Scaglione, J.B., Akey, D.L., Sullivan, R., Kittendorf, J.D., Rath, C.M., Kim, E.-S., Smith, J.L., y Sherman, D.H. (2010) Biochemical and structural characterization of the tautomycetin thioesterase: analysis of a stereoselective polyketide hydrolase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**: 5726-5730.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schirmer, A., y Jendrossek, D. (1994) Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product. *J. Bacteriol.* **176**: 7065-7073.

- Schleissner, C., Reglero, A., y Luengo, J.M. (1997) Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. *Microbiology* **143**: 1595-1603.
- Schubert, P., Steinbüchel, A., y Schlegel, H.G. (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
- Serra, T., Planell, J.A., y Navarro, M. (2013) High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomater.* **9**: 5521-5530.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., y Lehtiniemi, M. (2014) Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* **185**: 77-83.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., y Ahmed, S. (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* **26**: 246-265.
- Shee, C., Gibson, J.L., Darrow, M.C., Gonzalez, C., y Rosenberg, S.M. (2011) Impact of a stress-inducible switch to mutagenic repair of DNA breaks on mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 13659-13664.
- Shen, L., Worrell, E., y Patel, M. (2010) Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **4**: 25-40.
- Sheu, D.-S., y Lee, C.-Y. (2004) Altering the substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase 1 derived from *Pseudomonas putida* GP01 by localized semirandom mutagenesis. *J. Bacteriol.* **186**: 4177-4184.
- Shrivastav, A., Kim, H.-Y., y Kim, Y.-R. (2013) Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Res. Int.* **2013**: e581684.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**: 539.
- Singh, A. k., y Mallick, N. (2008) Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**: 350-357.
- Slater, S., Houmiel, K.L., Tran, M., Mitsky, T.A., Taylor, N.B., Padgett, S.R., y Gruys, K.J. (1998) Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **180**: 1979-1987.
- Slater, S., Mitsky, T.A., Houmiel, K.L., Hao, M., Reiser, S.E., Taylor, N.B., Tran, M., Valentin, H.E., Rodriguez, D.J., Stone, D.A., *et al.* (1999) Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1011-1016.
- Smet, M.J. de, Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., y Wynberg, H. (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* **154**: 870-878.

- Snell, K.D., Singh, V., y Brumbley, S.M. (2015) Production of novel biopolymers in plants: recent technological advances and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**: 68–75.
- Södergård, A., y Stolt, M. (2002) Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci.* **27**: 1123–1163.
- van Soest, J.J., y Vliegthart, J.F. (1997) Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. *Trends Biotechnol.* **15**: 208–213.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A., y Marmer, W.N. (2006) Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 783–789.
- Somleva, M.N., Peoples, O.P., y Snell, K.D. (2013) PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 233–252.
- Song, J.J., y Yoon, S.C. (1996) Biosynthesis of novel aromatic copolyesters from insoluble 11-phenoxyundecanoic acid by *Pseudomonas putida* BM01. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 536–544.
- Steel, C., Wan, Q., y Xu, X.-H.N. (2004) Single live cell imaging of chromosomes in chloramphenicol-induced filamentous *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **43**: 175–182.
- Steinbüchel, A., y Fuchtenbusch, B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* **16**: 419–427.
- Steinbüchel, A., y Hein, S. (2001) Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 81–123.
- Steinbüchel, A., y Schlegel, H.G. (1991) Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**: 535–542.
- Steinbüchel, A., y Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219–228.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A., y Valentin, H.E. (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* **41**: 94–105.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., García-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Leinonen, R., Lin, Q., Lombard, V., López, R., Mancuso, R., Nardone, F., Stoehr, P., Tuli, M.A., Tzouvara, K., y Vaughan, R. (2001) The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **29**: 17–21.
- Storz, H., y Vorlop K.-D. (2013) Bio-based plastics: status, challenges and trends. *Appl. Agric. Forestry Res.* **63**: 321–332.
- Sudesh, K., Abe, H., y Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**: 1503–1555.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., y Ramsay, B.A. (2007) Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 475–485.

- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., y Shah, S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol. Adv.* **25**: 148-175.
- Tachibana, Y., Kimura, S., y Kasuya, K. (2015) Synthesis and verification of biobased terephthalic acid from furfural. *Sci. Rep.* **5**: 8249.
- Takase, K., Taguchi, S., y Doi, Y. (2003) Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and in vitro recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. *J. Biochem.* (Tokyo) **133**: 139-145.
- Tan, Y., Neo, P.-C., Najimudin, N., Sudesh, K., Muhammad, T.S.T., Othman, A.S., y Samian, R. (2010) Cloning and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis genes from *Pseudomonas sp.* USM 4-55. *J. Basic Microbiol.* **50**: 179-189.
- Tanaka, T., Yabe, T., Teramachi, S., y Iwata, T. (2007) Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near T<sub>g</sub>. *Polym. Degrad. Stab.* **92**: 1016-1024.
- Tian, J., Sinskey, A.J., y Stubbe, J. (2005) Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J. Bacteriol.* **187**: 3814-3824.
- Timm, A., y Steinbüchel, A. (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.
- Tortajada, M., da Silva, L.F., y Prieto, M.A. (2013) Second-generation functionalized medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: the gateway to high-value bioplastic applications. *Int. Microbiol.* **16**: 1-15.
- Tsai, S.C., Miercke, L.J., Krucinski, J., Gokhale, R., Chen, J.C., Foster, P.G., Cane, D.E., Khosla, C., y Stroud, R.M. (2001) Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: versatility from a unique substrate channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14808-14813.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., y Seeger, M. (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* **70**: 208-213.
- Ushimaru, K., y Tsuge, T. (2016) Characterization of binding preference of polyhydroxyalkanoate biosynthesis-related multifunctional protein PhaM from *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 4413-4421.
- Valentin, H.E., Lee, E.Y., Choi, C.Y., 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., Schönebaum, A., y Steinbüchel, A. (1996) Identification of 5-hydroxyhexanoic acid, 4-hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 261-267.

- Van Beilen, J.B., y Poirier, Y. (2008) Production of renewable polymers from crop plants. *Plant J.* **54**: 684-701.
- Van den Bergh, B., Michiels, J.E., Wenseleers, T., Windels, E.M., Boer, P.V., Kestemont, D., De Meester, L., Verstrepen, K.J., Verstraeten, N., Fauvart, M., *et al.* (2016) Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nat. Microbiol.* **1**: 16020.
- Vandamme, P., y Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2285-2289.
- Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., y Mattiasson, B. (2008) Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 420-428.
- Vo, M.T., Lee, K.-W., Jung, Y.-M., y Lee, Y.-H. (2008) Comparative effect of overexpressed *phaJ* and *fabG* genes supplementing (R)-3-hydroxyalkanoate monomer units on biosynthesis of mcl-polyhydroxyalkanoate in *Pseudomonas putida* KCTC1639. *J. Biosci. Bioeng.* **106**: 95-98.
- Wahab, H.A., Ahmad Khairudin, N.B., Samian, M.R., y Najimudin, N. (2006) Sequence analysis and structure prediction of type II *Pseudomonas sp.* USM 4-55 PHA synthase and an insight into its catalytic mechanism. *BMC Struct. Biol.* **6**: 23.
- Wang, L., Wang, Z.-H., Shen, C.-Y., You, M.-L., Xiao, J.-F., y Chen, G.-Q. (2010) Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials* **31**: 1691-1698.
- Weiner, R.M. (1997) Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.* **15**: 390-394.
- Whinfield, J.R. (1946) Chemistry of "Terylene". *Nature* **158**: 930-931.
- Wieczorek, R., Steinbüchel, A., y Schmidt, B. (1996) Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 23-30.
- Wierckx, N., Prieto, M.A., Pomposiello, P., de Lorenzo, V., O'Connor, K., y Blank, L.M. (2015) Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microb. Biotechnol.* **8**: 900-903.
- Willems, N., Lelimosin, M., Koldsø, H., y Sansom, M.S.P. (2017) Interfacial activation of M37 lipase: A multi-scale simulation study. *Biochim. Biophys. Acta* **1859**: 340-349.
- Williams, S.F., y Martin, D.P. (2005) Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy. En *Biopolymers Online. Part 4. Polyesters*. Doi, Y., y Steinbüchel, A. (eds.). Weinheim, Alemania: John Wiley & Sons, pp. 91-128.
- Williams, S.F., Rizk, S., y Martin, D.P. (2013) Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomed. Tech.* **58**: 439-452.
- Witholt, B., y Kessler, B. (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 279-285.

- Wittenborn, E.C., Jost, M., Wei, Y., Stubbe, J., y Drennan, C.L. (2016) Structure of the catalytic domain of the Class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*. *J. Biol. Chem.* **291**: 25264–25277.
- Wright, B.E. (2004) Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol. Microbiol.* **52**: 643–650.
- Xu, J., y Guo, B.-H. (2010) Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol. J.* **5**: 1149–1163.
- Yang, J.E., Choi, S.Y., Shin, J.H., Park, S.J., y Lee, S.Y. (2013) Microbial production of lactate-containing polyesters. *Microb. Biotechnol.* **6**: 621–636.
- Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., y Molin, S. (2011) Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol.* **13**: 1705–1717.
- Yang, S.Y., Li, J.M., He, X.Y., Cosloy, S.D., y Schulz, H. (1988) Evidence that the *fadB* gene of the *fadAB* operon of *Escherichia coli* encodes 3-hydroxyacyl-coenzyme A (CoA) epimerase, delta 3-cis-delta 2-trans-enoyl-CoA isomerase, and enoyl-CoA hydratase in addition to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **170**: 2543–2548.
- Yang, S.Y., Yang, X.Y., Healy-Louie, G., Schulz, H., y Elzinga, M. (1990) Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon. *J. Biol. Chem.* **265**: 10424–10429.
- Yao, Y.-C., Zhan, X.-Y., Zhang, J., Zou, X.-H., Wang, Z.-H., Xiong, Y.-C., Chen, J., y Chen, G.-Q. (2008) A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials* **29**: 4823–4830.
- Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., y Chen, G.-Q. (2014) Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **7**: 1433–1442.
- Young, F.K., Kastner, J.R., y May, S.W. (1994) Microbial production of poly-beta-hydroxybutyric acid from d-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4195–4198.
- Yuan, M.-Q., Shi, Z.-Y., Wei, X.-X., Wu, Q., Chen, S.-F., y Chen, G.-Q. (2008) Microbial production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by recombinant *Pseudomonas putida* KT2442 harboring genes *fadL*, *fadD* and *phaZ*. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**: 167–175.
- Zhang, X., Luo, R., Wang, Z., Deng, Y., y Chen, G.-Q. (2009) Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules* **10**: 707–711.
- Zimm, M., Witholt, B., y Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**: 5–21.
- Zou, J., Hallberg, B.M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S.L., y Jones, T.A. (2000) Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Struct.* **8**: 111–122.





