



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Instituto de Ciencias

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Posgrado en Microbiología

**Análisis de la sobreexpresión de los genes *phbA* y *phbB* en
Azospirillum brasilense Sp7.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON ORIENTACIÓN EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

Presenta:

BQ. María de los Ángeles Martínez Martínez

Director:

DC. Luís Javier Martínez Morales

Puebla, Pue.

Noviembre, 2014

AGRADECIMIENTOS

A aquel que es poderoso para hacer todas las cosas mucho más abundantemente de lo que pedimos o entendemos.

A mi familia, por todo su apoyo y comprensión.

A mi mejor amigo, Antonio Reyes, por estar conmigo aun en la distancia.

A todos los profesores del Posgrado en Microbiología.

A mis amigos (as), Lilia, Esmeralda, Maricruz, Elena y Arturo y a todos compañeros de generación, gracias por todos los momentos compartidos.

A mis amigos de laboratorio, Ramiro, Luis, Araceli, Maru, Alma, Sandra, Gamaliel, Elena.

A los niños de servicio, Mayra, Fabiola, Alexis, Saúl, por su amistad y apoyo.

A la D.C. Astrid Vivas, por todo su apoyo durante mi estancia.

A mi comité tutorial, D.C. Beatriz Eugenia Baca, D.C. Candelario Vázquez Cruz y D.C. Miguel Castañeda Lucio.

A la D.C. Rosario Azcón y D.C. José Miguel Barea.

Al D.C. Luís Javier Martínez y D.C. Lucía Soto.

DEDICATORIA

**Al ser que me dio la vida,
gracias por estar siempre conmigo y
apoyarme en todas mis locuras,
aunque no siempre estés de acuerdo,
¡te adoro MAMÁ!**

DEDICATORIA

**Sólo pido sentir tu
presencia dondequiera yo esté,
PAPÁ.**

"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir".

Albert Einstein (1879-1955)

ABREVIATURAS

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
T _m	Temperatura de fusión (Temperature melting)
Et-Br	Bromuro de etidio
ADB	Buffer de unión a DNA
ADN	Ácido desoxirribonucleico (DNA)
kb	10 ³ pb
C	Carril
Nx	Ácido Nalidíxico
Ap	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
Sm	Estreptomicina
Tc	Tetraciclina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
i	Cultivo inducido
ni	Cultivo no inducido
BSA	Albúmina sérica bovina
DO/DO _{600nm}	Densidad óptica/densidad óptica medida a λ = 600 nm
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetro
UV	Ultravioleta
rpm.	Revoluciones por minuto
vol	Volumen(es)
c	Concentración
PP	Polipropileno
PHA (´s)	Polihidroxialcanoato (s)
SCL _{PHA}	Short chain length PHA/PHA de cadena corta
MCL _{PHA}	Medium chain length PHA/PHA de cadena media
LCL _{PHA}	Long chain length PHA/PHA de cadena larga
PHB	Poli β-hidroxitirato
HBCoA	β-hidroxitiril Coenzima A

HB	β -hidroxibutiril
HV	Hidroxivalerato
BOHB-DH	Hidroxibutirato deshidrogenasa
GAP's	Granule Associated Proteins/Proteínas asociadas a gránulo
ADP	Adenosín difosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
Wt	Wild type/Cepa silvestre
PGPR	Rizobacteria Promotora de Crecimiento Vegetal
BGN	Bacilo Gram Negativo
BGP	Bacilo Gram Positivo
MMKM	Medio Mínimo K-Malato
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
RC	Medio de cultivo Rojo Congo
SSI	Solución salina isotónica
PBS	Buffer salino de fosfatos
UFC	Unidad formadora de colonia
$\mu_{(máx)}$	Velocidad específica (máxima) de crecimiento
s	Segundo(s)
min	Minuto(s)
h	Hora(s)
T	Tiempo
V	Volts
°C	Grados centígrados
L	Litro
μ L	Microlitro
mM	Milimolar
μ M	micromolar
g	Gramo
mg	Miligramo
cm	Centímetro

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	3
El género <i>Azospirillum</i>	3
<i>Azospirillum brasilense</i>	3
Polihidroxicanoatos.....	4
Rutas metabólicas.....	6
Poli- β -hidroxibutirato	8
Vía de síntesis.....	8
Biogénesis de los gránulos de PHB.....	9
Funciones del PHB en bacterias.....	10
Aplicaciones	11
ANTECEDENTES	12
HIPÓTESIS	14
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	14
General:.....	14
Específicos:.....	14
ESQUEMA DE TRABAJO	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Medios utilizados y condiciones de cultivo	16
Extracción de DNA genómico.....	17
Diseño de oligonucleótidos.....	17

Amplificación por PCR	18
Purificación de fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa	18
Clonación de los genes <i>phbA</i> y <i>phbB</i> en el vector pJET1.2/blunt.....	19
Extracción de DNA plasmídico (Miniprep).....	19
Subclonación en el vector de expresión pMMB206.....	19
Conjugación de las cepas <i>E. coli</i> S17-1 p206A, p206B y p206 con <i>A. brasilense</i> Sp7 ..	20
Cinéticas de crecimiento de cepas <i>A. brasilense</i> Sp7	21
Determinación de proteínas totales.....	21
Cuantificación de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en cepas <i>A. brasilense</i> Sp7	21
RESULTADOS	23
Amplificación y clonación de los genes <i>phbA</i> y <i>phbB</i>	23
Subclonación de los genes <i>phbA</i> y <i>phbB</i> en el vector de expresión pMMB206	27
Conjugación cepas <i>E. coli</i> S17-1 p206A, p206B y p206 con <i>A. brasilense</i> Sp7.....	30
Cinéticas de crecimiento cepas transconjugantes <i>A. brasilense</i>	30
Determinación del contenido de PHB en cepas de <i>A. brasilense</i>	32
DISCUSIÓN.....	37
Producción de PHB.....	37
Sobreexpresión del gen <i>phbA</i> en <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	37
Sobreexpresión del gen <i>phbB</i> en <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	39
CONCLUSIONES.....	42
PERSPECTIVAS	43
LITERATURA CITADA.....	44
ANEXO I. Curva de calibración BSA.....	53
ANEXO II. Curva de calibración PHB	54
ANEXO III. Preparación de medios de cultivo	55
ANEXO IV. Técnicas de laboratorio	58
ANEXO V. Preparación de soluciones	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica del género <i>Azospirillum</i>	3
Figura 2. Microfotografía electrónica de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	4
Figura 3. Representación esquemática del gránulo de PHA.	6
Figura 4. Rutas metabólicas empleadas en la síntesis de PHA´s.	6
Figura 5. Estructura general de los PHA´s	7
Figura 6. Estructura del P(3HB), P(3HV) y su copolímero PHBV (P(3HB)-co-P(3HV)).....	8
Figura 7. Ruta de biosíntesis (a) y reacciones enzimáticas para la síntesis de PHB	9
Figura 8. Estructura de tipo micela.....	9
Figura 9. Modelo membrana naciente	10
Figura 10. Mapa físico de los genes <i>phbBAC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	12
Figura 11. Esquema de amplificación por PCR.	18
Figura 12. Análisis de la amplificación de <i>phbA</i> y <i>phbB</i>	23
Figura 13. Análisis del plásmido pJETA.....	24
Figura 14. Análisis del plásmido pJETB.....	25
Figura 15. Dominios conservados en PhbB de <i>A. brasilense</i> Sp7	27
Figura 16. Análisis del plásmido p206A	28
Figura 17. Análisis del plásmido p206B	29
Figura 18. Análisis de la amplificación de <i>phbA</i> y <i>phbB</i>	30
Figura 19. Cinéticas de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Sp7, Ab7A, Ab7B y Ab7-206.....	31
Figura 21. Curva de calibración BSA por el método de Bradford.	53
Figura 22. Curva de calibración PHB por el método de digestión ácida.	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos productores de PHA´s (Koller <i>et al.</i> 2010).	5
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de PHB, poli (3HB-co-3HV) y PP.....	11
Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	16
Tabla 4. Antibióticos utilizados.....	17
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes <i>phbA</i> y <i>phbB</i>	18
Tabla 6. Alineamiento BLASTN del inserto clonado en el plásmido pJETA.....	24
Tabla 7. Alineamiento BLASTN del inserto clonado en el plásmido pJETB.	26
Tabla 8. Tiempo de duplicación cepas <i>A. brasilense</i>	31

RESUMEN

La bacteria Gram Negativa (BGN) *Azospirillum brasilense* Sp7 acumula poli- β -hidroxibutirato (PHB), un polímero biodegradable que posee características similares a las del polipropileno. En *A. brasilense* la síntesis del biopolímero ocurre ante un desbalance C/N. El PHB es sintetizado y acumulado en forma de gránulos al interior del citoplasma. Se ha documentado que, en bacterias, el PHB ejerce funciones de reserva de carbono y energía, principalmente, así mismo se le han otorgado funciones de resistencia al estrés.

Se ha reportado que la biosíntesis del polímero involucra la participación de 3 enzimas clave: β -cetotiolasa, Acetoacetyl CoA reductasa y PHB sintasa, codificadas por los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, respectivamente. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue analizar la producción de PHB en cepas transconjugantes de *A. brasilense* Sp7. Para ello, los genes *phbA* y *phbB*, fueron clonados en el vector de expresión pMMB206. Los plásmidos resultantes, p206A y p206B respectivamente, fueron introducidos en *A. brasilense* Sp7. Las cepas transconjugantes obtenidas se denominaron Ab7A y Ab7B. De la misma manera, el vector pMMB206 fue movilizado a *A. brasilense* Sp7 obteniendo la cepa Ab7-206.

Los datos obtenidos por la cuantificación de PHB mostraron menor producción del biopolímero en las cepas Ab7A y Ab7B. *A. brasilense* Wt y Ab7-206 presentaron mayor acumulación de PHB tras 72 h de incubación. No obstante, de las 4 cepas analizadas, Ab7-206 fue la que reportó mayores niveles de PHB.

La clonación de los genes *phbA* y *phbB*, y su expresión en *A. brasilense* Sp7 resultó en una menor producción de poli- β -hidroxibutirato, sin embargo no se observó una relación clara entre la expresión de estos genes y la producción del biopolímero. Lo que permite inferir que la producción de PHB no se favorece al sobreexpresar los genes codificantes para β -cetotiolasa y Acetoacetyl CoA reductasa.

ABSTRACT

Gram Negative bacteria (GNB) *Azospirillum brasilense* Sp7 accumulates poly- β -hydroxybutyrate (PHB), a biodegradable polymer with similar characteristics to the polypropylene. In *A. brasilense*, biopolymer synthesis occurs under an imbalance C/N. PHB is synthesized and accumulated forming granules into the cytoplasm. It has been documented that, in bacteria, PHB exercises functions of carbon and energy reserves, mainly, also it have given functions on stress resistance.

It has been reported that polymer biosynthesis involves the participation of three key enzymes: β -ketothiolase, Acetoacetyl CoA reductase and PHB synthase, encoded by *phbA*, *phbB* and *phbC* genes respectively. Therefore, the aim of this study was to analyze the production of PHB in *A. brasilense* Sp7 transconjugants strains. For this, *phbA* and *phbB* genes were cloned into the expression vector pMMB206. The resulting plasmids, p206A and p206B respectively, were introduced into *A. brasilense* Sp7. The transconjugants strains were designated Ab7A and Ab7B. Likewise, pMMB206 vector was mobilized to *A. brasilense* Sp7 obtaining Ab7-206 strain.

The data obtained in PHB quantification showed lower production of biopolymer in Ab7A and Ab7B strains. *A. brasilense* Wt and Ab7-206 had a greater accumulation of PHB after 72 h incubation. However, of all strains tested, Ab7-206 reported the highest levels of PHB.

Cloning of *phbA* and *phbB* genes, and its expression in *A. brasilense* Sp7 resulted in less production of poly- β -hydroxybutyrate, however a clear relationship between the expression of this genes and biopolymer production was not observed. So, it can be inferred that the production of PHB is not favored by overexpressing genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl -CoA reductase.

INTRODUCCIÓN

Muchas bacterias acumulan gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB). La bacteria PGPR (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria) *Azospirillum brasilense* Sp7 acumula PHB en un 75% de su peso seco celular (Tal *et al.* 1990). La síntesis de PHB ocurre bajo condiciones de crecimiento desfavorables ocasionadas por una relación C/N elevada. En bacterias, el PHB funciona como reserva de C y energía (Bright *et al.* 2003; Kim y Lenz, 2001) principalmente, aunque se ha descrito también su participación en el enquistamiento, esporulación (Kim y Lenz, 2001) y resistencia al estrés (Sadasivan y Neyra. 1985). Incluso se ha sugerido que la acumulación, degradación y utilización de PHB por bacterias sometidas a estrés favorece su establecimiento, proliferación, supervivencia y competencia, en entornos donde las fuentes de carbono y energía son limitantes, tales como las que se encuentran en el suelo y la rizósfera (Okon y Itzigsohn, 1992).

Se ha reportado que *A. brasilense* Sp7 produce sólo monómeros de 3-hidroxibutirato (Itzigsohn *et al.* 1995), condicionando únicamente a la formación de PHB. Kadouri *et al.* (2002) reportaron la secuencia genética de *phbA*, *phbB* y *phbC*, genes que codifican para las enzimas necesarias en la formación del biopolímero, β -cetotiolasa, Acetoacetil CoA reductasa y PHB sintasa, respectivamente.

La ruta de síntesis de PHB por *A. brasilense* Sp7 no ha sido elucidada. Sin embargo, Kadouri *et al.* (2002) proponen que en *A. brasilense* la biosíntesis de PHB ocurre de la misma forma que en *Ralstonia eutropha*. En este modelo, la síntesis del biopolímero inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa. El producto formado, acetoacetil-CoA, es reducido a monómeros de β -hidroxibutiril-CoA mediante la acción de una enzima dependiente de NADPH (Acetoacetil-CoA reductasa). Finalmente, los monómeros son polimerizados hasta PHB por una PHB sintasa.

Existen pocos estudios acerca de la regulación de la producción de PHB. La mayoría están ligados al metabolismo del nitrógeno o bien, por limitación de nutrientes (O y P). Sin embargo, existen pocos estudios basados en la sobreexpresión de los genes ligados a la biosíntesis de PHB. Es por ello que, en la presente investigación, los genes *phbA* y *phbB*

fueron clonados en el vector de expresión pMMB206 y expresados en *A. brasilense* Sp7 obteniendo las cepas transconjugantes *A. brasilense* Ab7A y Ab7B, respectivamente. Finalmente se cuantificó el PHB producido, empleando el método de digestión ácida propuesto por Law y Sleepecky (1961).

Los resultados obtenidos por la cuantificación de PHB mostraron una producción estadísticamente menor en las cepas Ab7A y Ab7B. Sin embargo no se observó una relación clara entre la sobreexpresión de los genes *phbA* y *phbB* y la producción de PHB.

MARCO TEÓRICO

El género *Azospirillum*

Las especies de *Azospirillum* están ampliamente distribuidas en suelos de regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo (Magalhaes *et al.* 1983) y pueden encontrarse colonizando la rizósfera y la superficie de plantas, generalmente en la familia de las gramíneas (Döbereiner, 1992).

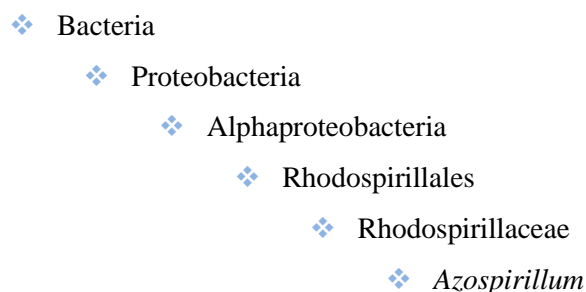


Figura 1. Clasificación taxonómica del género *Azospirillum*.

Las bacterias del género *Azospirillum* están comprendidas dentro de la familia Rhodospirillaceae (Figura 1). De las especies de *Azospirillum* reportadas, *A. lipoferum* y *A. brasilense* son las más estudiadas.

Azospirillum brasilense

A. brasilense son bacilos Gram negativos (BGN) tendientes a Gram variables en cultivos envejecidos (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Son pleomórficos alterando rápidamente sus actividades metabólicas en respuesta a cambios ambientales (Eskew *et al.* 1977). De tal manera que a baja tensión de oxígeno se muestran células vibroides (0.6-1.7 por 2.1-3.8 μm) muy móviles (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Cultivadas en medio líquido desarrollan un flagelo polar, mientras que en medio sólido o semisólido, desarrollan además, flagelos peritricos (Figura 2) (Tarrand *et al.* 1978). Por otro lado, bajo condiciones aeróbicas, y particularmente en cultivos envejecidos, las células vibroides experimentan una transición a formas capsulares, no móviles denominadas, cistos (Sadasivan y Neyra, 1985).

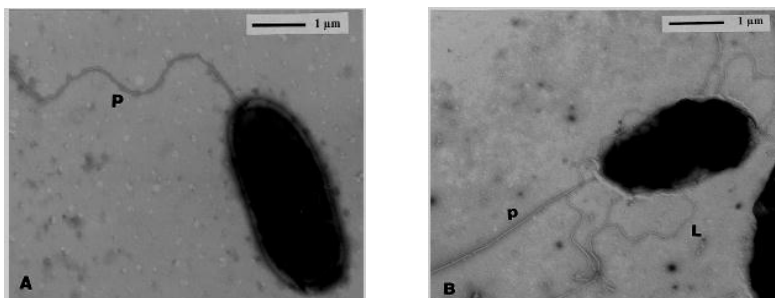


Figura 2. Microfotografía electrónica de *A. brasilense* Sp7. En medio líquido (A), se observa un flagelo polar (P), y en medio sólido o semisólido (B) se presentan además varios flagelos laterales (L) (Pereg *et al.* 2000).

A. brasilense posee un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil. Puede utilizar azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, y compuestos aromáticos como fuente de carbono (Reinhold *et al.* 1985). Mientras que como fuente nitrogenada puede asimilar amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular (Bashan, 1999). La fuente de carbono y nitrógeno en el medio influye en la biosíntesis de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un biopolímero perteneciente a la familia de los polihidroxicanoatos (PHA's) (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son poliésteres de ácidos hidroxicanoicos, sintetizados por una gran variedad de microorganismos (Tabla 1) que generalmente, están sometidos a un desequilibrio nutricional ocasionado por la limitación de elementos esenciales (N, P, O, S, K, Fe, Sn, y/o Mg) frente a un exceso de la fuente de C (Koller *et al.* 2010). No obstante, algunas bacterias son capaces de producir PHA's sin estar sometidas a un desequilibrio nutricional, tal es el caso de *Alcaligenes lactus* (Reddy *et al.* 2003).

Tabla 1. Microorganismos productores de PHA's (Koller *et al.* 2010).

Microorganismos productores de PHA's				
<i>Acidovorax</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Chloroflexus</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Chlorogloea</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Chromatium</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Stella</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Klebsiella</i> (rec)	<i>Oscillatoria</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Paucispirillum</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Defluviicoccus</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Derxia</i>	<i>Legionella</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Thiocapse</i>
<i>Axobacter</i>	<i>Delftia</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Physarum</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Escherichia</i> (rec)	<i>Methylocystis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Escherichia</i> (Wt)	<i>Methylomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cupriavidus</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Zoogloe</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Microvoleus</i>	<i>Rubrivivax</i>	

Los PHA's de origen bacteriano son sintetizados y acumulados intracelularmente como inclusiones citoplasmáticas (Wong *et al.* 2012) alcanzando hasta el 90 % del peso seco celular (Khanna y Srivastava, 2005). Se les encuentran formando gránulos de naturaleza hidrofóbica, rodeados por una monocapa de fosfolípidos y por proteínas GAP's (Granule Associated Proteins) (Prieto *et al.* 2007) (Figura 3).

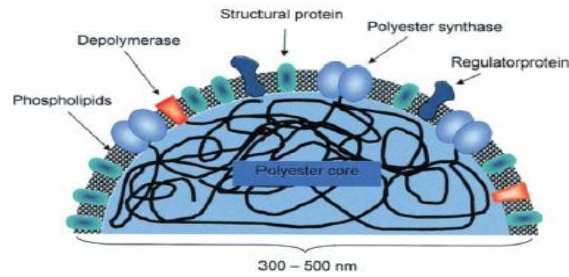
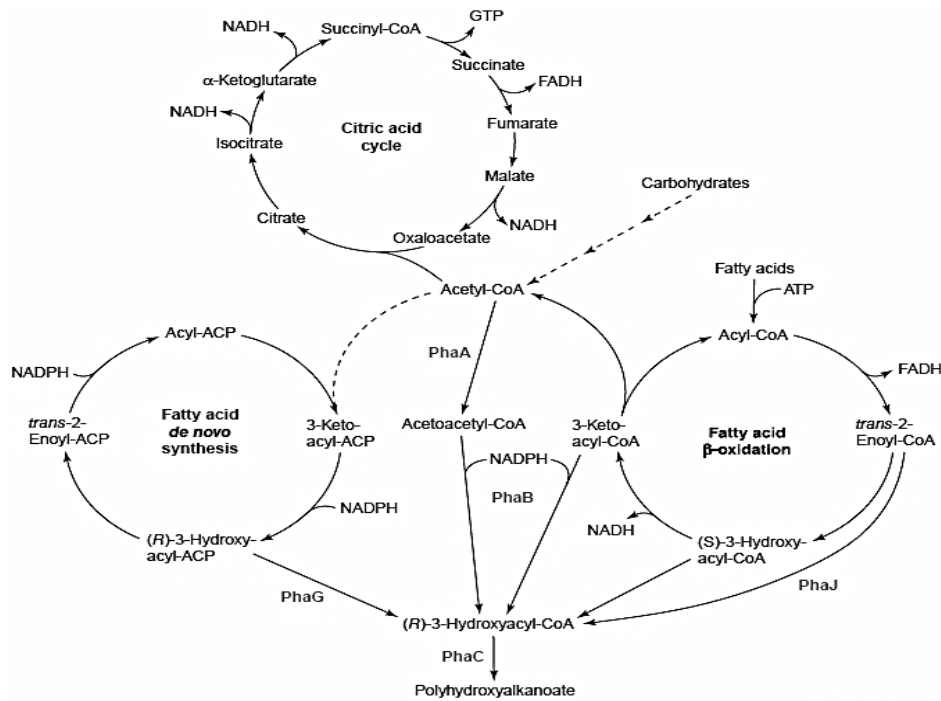


Figura 3. Representación esquemática del gránulo de PHA. Los gránulos están cubiertos por una monocapa de fosfolípidos (gris) y proteínas de unión a gránulos - GAP's - (sintasas, depolimerasas, y proteínas reguladoras y estructurales) (Rehm, 2003).

Rutas metabólicas

De acuerdo a las condiciones de cultivo los microorganismos hacen uso de una o más rutas metabólicas para obtener los intermediarios metabólicos y sintetizar PHA's. La disponibilidad de los precursores para la síntesis de PHA's dependen de vías metabólicas importantes como el ciclo de Krebs, síntesis *de novo* y degradación de ácidos grasos (β -oxidación), implicando además, metabolitos centrales como Acetil-CoA y cofactores como NADPH (Figura 4).



Current Opinion in Biotechnology

Figura 4. Rutas metabólicas empleadas en la síntesis de PHA's (Aldor y Keasling, 2003).

Los PHA varían en sus características fisicoquímicas debido a la diversidad de monómeros que contienen. Los factores que afectan el contenido de dichos monómeros incluyen: tipo de microorganismo (BGP o BGN), fuente de carbono, condiciones de fermentación y recuperación del producto (Castilho *et al.* 2009). De acuerdo a su composición monomérica, los PHA's se clasifican en:

- PHA de cadena corta (SCL_{PHA}): constan de monómeros de C3 - C5. Son considerados como termoplásticos (Poirier *et al.* 2001).
- PHA de cadena media (MCL_{PHA}): constan de monómeros entre C6 - C16. Son considerados como elastómeros y cauchos (Suriyamongkol *et al.* 2007).
- PHA de cadena larga (LCL_{PHA}): constan de monómeros de > C16 (Tian *et al.* 2000).

A la fecha se han reportado más de 150 tipos de PHA's producidos biológicamente (Rai *et al.* 2011). En los cuales el grupo "R" varía desde metil (C1) hasta hexadecil (C16) (Figura 5) (Suriyamongkol *et al.* 2007). No obstante el PHA de mayor importancia comercial es el poli-β-hidroxibutirato (Figura 6), descubierto en 1926 por Lemoigne (Lemoigne, 1926).

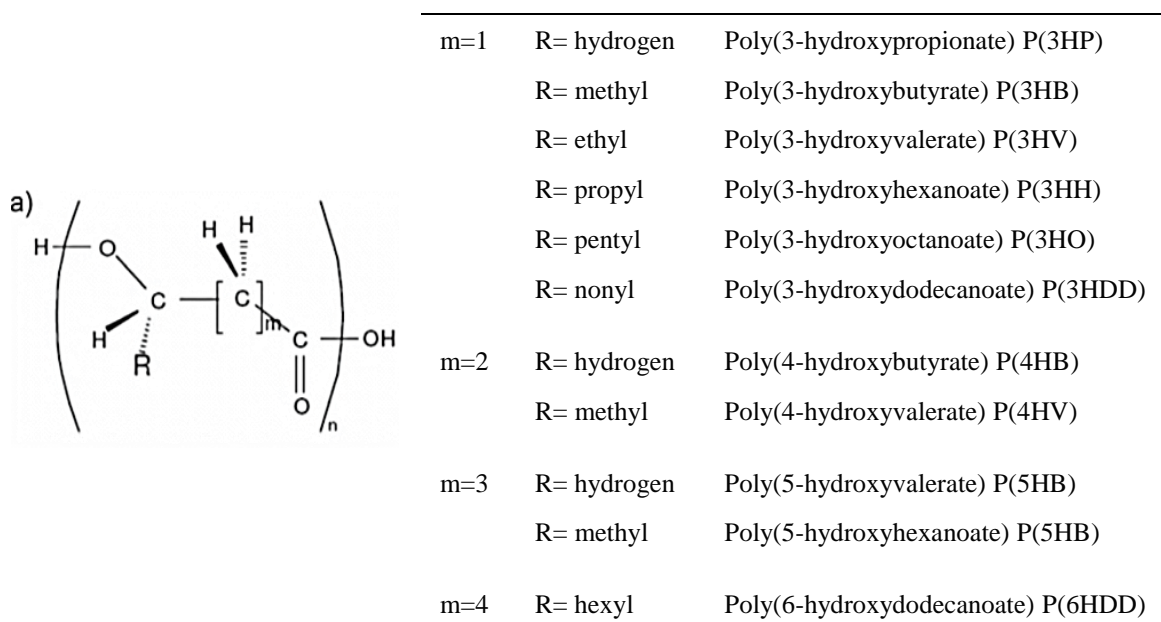


Figura 5. Estructura general de los PHA's (Lee, 1996).

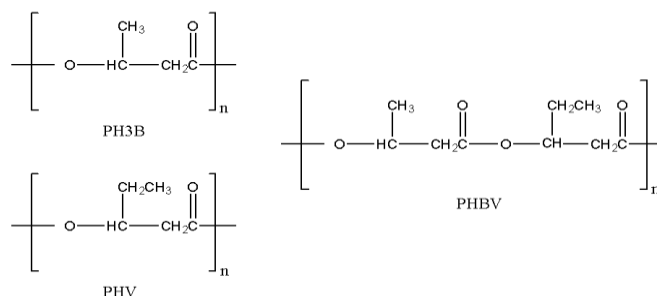


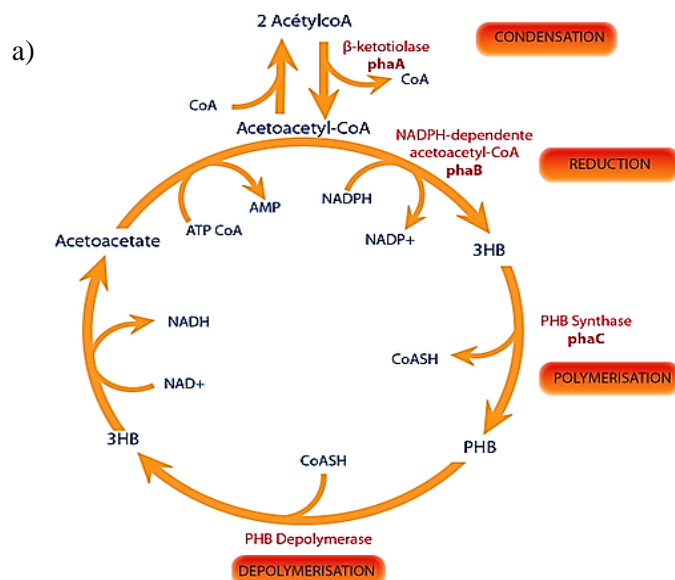
Figura 6. Estructura del P(3HB), P(3HV) y su copolímero PHBV (P(3HB)-co-P(3HV)).

Poli-β-hidroxibutirato

El poli-β-hidroxibutirato (PHB) es un homopolímero de cadena corta que contiene un radical metil en la posición β. Los monómeros de β-hidroxibutirato se unen por enlaces éster. Es el PHA más común, de ahí que la capacidad de las bacterias para acumular PHB se utilice como una característica taxonómica (Madison y Huisman, 1999).

Vía de síntesis

La síntesis de PHB involucra 3 reacciones enzimáticas. La primera requiere de la condensación de 2 moléculas de acetyl-CoA por la enzima β-cetotilasa (codificada por *phbA*) generando acetoacetyl-CoA. En la segunda, acetoacetyl-CoA es reducido a (R)-3-hidroxibutiril-CoA por acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por *phbB*). Por último, los monómeros de (R)-3 hidroxibutiril-CoA son polimerizados en PHB por PHB polimerasa (codificada por *phbC*) (Figura 7) (Madison y Huisman, 1999).



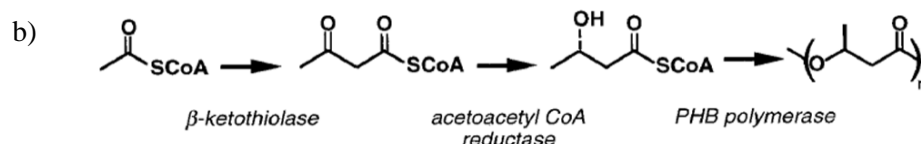


Figura 7. Ruta de biosíntesis (a) y reacciones enzimáticas para la síntesis de PHB (b) (Bergensen *et al.* 1990; Madison y Huisman, 1999).

Biogénesis de los gránulos de PHB

La formación del polímero es compleja, la reacción de homopolimerización se inicia con monómeros del sustrato soluble y progresa para generar inclusiones citoplasmáticas insolubles. A la fecha se reporta la existencia de 3 modelos de biogénesis para los gránulos de PHB:

- i) Estructura de tipo micela: involucra la agregación de PHB ligado a las sintasas para generar estructuras tipo micelas. En este modelo, las sintasas se encuentran unidas covalentemente a las cadenas crecientes de PHB y obtienen el sustrato soluble (HBCoA) del citosol (Figura 8). Las sintasas funcionan como oleosinas para prevenir la fusión y cristalización de los gránulos crecientes de PHB (Ellar *et al.* 1968).

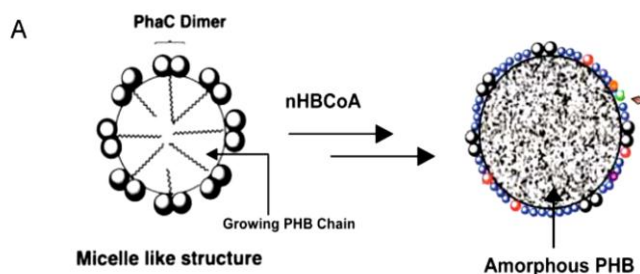


Figura 8. Estructura de tipo micela (tomado de Tian *et al.* 2005).

- ii) Membrana naciente: las sintasas se ubican en la periferia de la membrana unidas a proteínas y adheridas a la cara interna de la membrana plasmática (Figura 9). Su asociación con la membrana se ve facilitada por una molécula iniciadora (una cadena de ácido graso u oligómeros de HB) covalentemente unida a la cisteína del sitio activo de la sintasa. A medida que las cadenas de PHB se extienden y la sintasa

PhaP es producida, sobreviene el brote de una vesícula con una monocapa lipídica, propiciando la formación del gránulo (Stubbe y Tian, 2003).

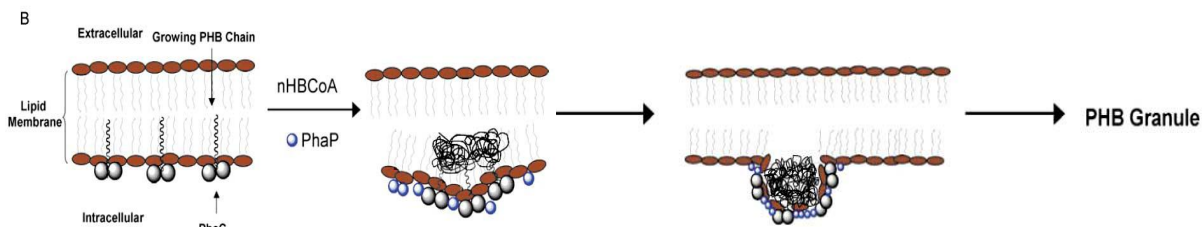


Figura 9. Modelo membrana naciente (tomado de Tian *et al.* 2005).

iii) Andamiaje: refiere a la existencia de “elementos de mediación” los cuales funcionan como sitios para la formación de gránulos por la sintasa. Luego de que el gránulo ha terminado de formarse, el “elemento de mediación” no es observado en el citosol, posiblemente debido a que es recubierto con gránulos, degradado o bien, distribuido sobre la superficie del gránulo (Tian *et al.* 2005).

Los gránulos de PHB se acumulan cerca de la membrana de las bacterias, representando hasta el 80% del peso seco celular (Bright *et al.* 2003). Investigaciones sobre los gránulos de PHA´s indican que éstos contienen aproximadamente 97.5 % de PHA, 2 % de proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Griebel *et al.* 1968).

Funciones del PHB en bacterias

El PHB es un material de reserva de carbono (Bright *et al.* 2003) que además sirve como almacén de energía (Kim y Lenz, 2001) y poder reductor (NADPH) (Anderson y Dawes, 1990). Influye también en la protección de macromoléculas y transporte de DNA, así como en la formación de esporas (*Bacillus* sp.), y enquistamiento (*Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.) (Kim y Lenz, 2001). Por otro lado, otorga resistencia al estrés (osmótico y UV) y a la desecación (Sadasivan y Neyra. 1985).

Aplicaciones

El PHB resulta ser un termoplástico (Lee, 1996) con características muy similares a las del polipropileno: es un polímero frágil con un alto punto de fusión, que a pesar de tener una menor resistencia a la disolución, tiene un comportamiento óptimo ante la luz ultravioleta (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de PHB, poli (3HB-co-3HV) y PP (Koller *et al.* 2010).

Características	PHB	Poli (3HB-co-3HV)	Polipropileno
M/(10 ⁵ g/mol)	1-8	3	2.2-7
Densidad (Kg/dm ³)	1.25	1.2	0.905
Punto de fusión/°C	171-182	75-172	176
Resistencia al UV	Buena	Buena	Mala
Resistencia a solventes	Mala	Mala	Buena
Biodegradabilidad	Sí	Sí	No

El PHB presenta grandes ventajas sobre los plásticos convencionales, principalmente porque se puede obtener de fuentes de carbono renovables como la glucosa. Otra ventaja es que se puede degradar en ambientes con microorganismos tales como *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Actinomicetos* y *Streptomicetes* (Chowdhury 1963).

Dentro de las aplicaciones más frecuentes del PHB destacan, la fabricación de envases para productos de limpieza, elaboración de prótesis, hilos de sutura y cápsulas de liberación para medicamentos (Bohmert *et al.* 2002; Wang *et al.* 2008), así también para la generación de soportes para crecimiento celular (Poirier *et al.* 1995; Gogolewski *et al.* 1993).

Así mismo se ha hecho uso del PHB en la producción de vitaminas (Bashan y Holguin, 1997) y vacunas (Parlane *et al.* 2012).

ANTECEDENTES

Desde hace varios años se han aislado y caracterizado genes de *Azospirillum* involucrados en procesos metabólicos importantes. Kadouri *et al.* (2002) establecieron el mapa físico del operón que contiene los genes implicados en la biosíntesis de PHB (Figura 10). Los genes *phbABC* codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis de PHB (β -cetotiolasa, Acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa, respectivamente).

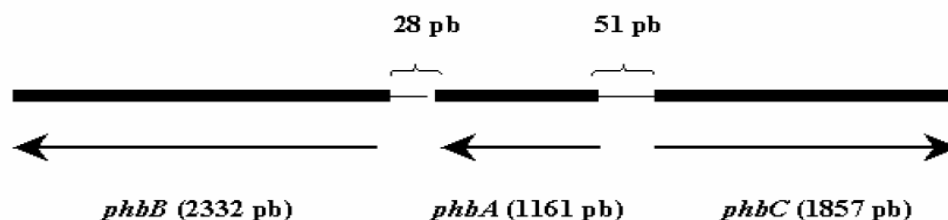


Figura 10. Mapa físico de los genes *phbBAC* de *A. brasilense* Sp7. Las flechas indican la localización y el inicio de la transcripción (Kadouri *et al.* 2002).

En *Zoogloea ramigera* se han identificado dos isoenzimas de β -cetotiolasa, una es específica para Acetoacetyl-CoA mientras que la otra es capaz de escindir β -cetoacil CoA de diferentes esqueletos carbonados (Peoples y Sinskey, 1989). Por otro lado, en *R. eutropha* se han descrito 3 enzimas con función de tiolasa: PhbA, BktB y BktC, las dos últimas utilizan eficientemente β -cetovaleril CoA (Slater *et al.* 1998). El genoma de *A. brasilense* Sp245 contiene dos β -cetotilasas PhbA (en diferentes plásmidos: AZOBR_p1 y AZOBR_p4) ambas específicas para Acetoacetyl CoA.

Acetoacetyl CoA reductasa también posee dos isoenzimas. Una es específica para L(+)- β -hidroxibutiril CoA (emplea NADH como coenzima) (Shuto *et al.* 1981) y la segunda para D(-)- β -hidroxibutiril-CoA (utiliza NADPH) (Fukui *et al.* 1987). En *A. brasilense* Sp7 se ha sugerido que la enzima PhbB es específica para el enantiómero D(-)- β -hidroxibutiril-CoA (Kadouri *et al.* 2002; Tal *et al.* 1990).

A. brasilense sólo produce PHB y no otros monómeros de PHA's. El PHB es sintetizado y acumulado intracelularmente hasta en un 80% del peso seco celular (Itzingsohn *et al.* 1995). Tal y Okon (1985) mostraron que la síntesis de PHB se ve favorecida en condiciones limitantes de O y un desbalance nutricional generado por una relación C/N elevada.

También se han identificado y caracterizado los genes que participan en la ruta de despolimerización del PHB en *A. brasilense* (Kadouri *et al.* 2003). De acuerdo con Okon e Itzigsohn (1992), bajo condiciones de inanición la síntesis del biopolímero cesa y comienza su degradación. Una despolimerasa unida a membrana degrada el PHB a su monómero β -hidroxibutirato, el cual es oxidado a acetoacetato por hidroxibutirato deshidrogenasa (BOHB-DH) con reducción de NAD. La enzima acetoacetyl succinil-CoA transferasa cataliza la transferencia del grupo CoA de succinil-CoA al acetoacetato para producir acetoacetyl-CoA haciéndolo disponible como fuente de carbono.

La agregación y la formación de quistes mejora la sobrevivencia de *Azospirillum* sp. En este estado la acumulación de PHB parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía (Okon *et al.* 1976). También se ha demostrado mayor resistencia a la desecación (Sadasivan y Neyra, 1987), luz ultravioleta y al choque osmótico en células ricas en PHB.

Tal y Okon (1985) y también Kadouri *et al.* (2002) observaron que, en condiciones de inanición, las bacterias ricas en PHB sobreviven y proliferan en mayor número que las que poseen menor cantidad del polímero intracelular, lo cual se puede comprobar por resultados que muestran mutantes deficientes en la producción de PHB que son más susceptibles a morir en corto tiempo.

Por otro lado, Sun *et al.* (2000) analizaron la producción de PHB con concentraciones altas y bajas de NH_4Cl , reportando que los genes *ntrB* y *ntrC* de *A. brasilense* regulan la producción de PHB. Lo anterior debido a que la inactivación de los genes en estudio, no sólo acopló la producción de PHB y el crecimiento activo, sino también eliminó el efecto negativo del amonio sobre la biosíntesis de PHB. También se observó que los genes relacionados con la regulación global del metabolismo del nitrógeno (*glnB*, *glnZ* y *glnD*), participan en el control de la producción de PHB en *A. brasilense* cuando hay un exceso en las cantidades de nitrógeno (Sun *et al.* 2002).

HIPÓTESIS

La sobreexpresión de los genes *phbA* (β -cetotiolasa) y *phbB* (Acetoacetyl-CoA reductasa) en *A. brasilense* Sp7 redundará en la alteración de la producción de PHB.

JUSTIFICACIÓN

El problema de contaminación ambiental generado por el uso de plásticos ha sido abordado de manera ineficiente. Lo anterior hace necesaria la búsqueda de alternativas que permitan minimizar el uso de los mismos. Una de ellas, es la producción de polihidroxicanoatos. No obstante, pese a los grandes esfuerzos realizados en las últimas décadas, el precio final de los PHA's es demasiado alto a comparación con los plásticos convencionales (1 vs 5 dólares estadounidenses). A causa de ello diversos estudios se enfocan en la búsqueda de microorganismos productores de PHA's. El uso de técnicas de ingeniería genética ha permitido la obtención de microorganismos recombinantes para producir PHA's, sin embargo, pocos estudios describen la producción de biopolímeros por el aumento (en el número de copias) de los genes involucrados en su síntesis.

OBJETIVOS

General:

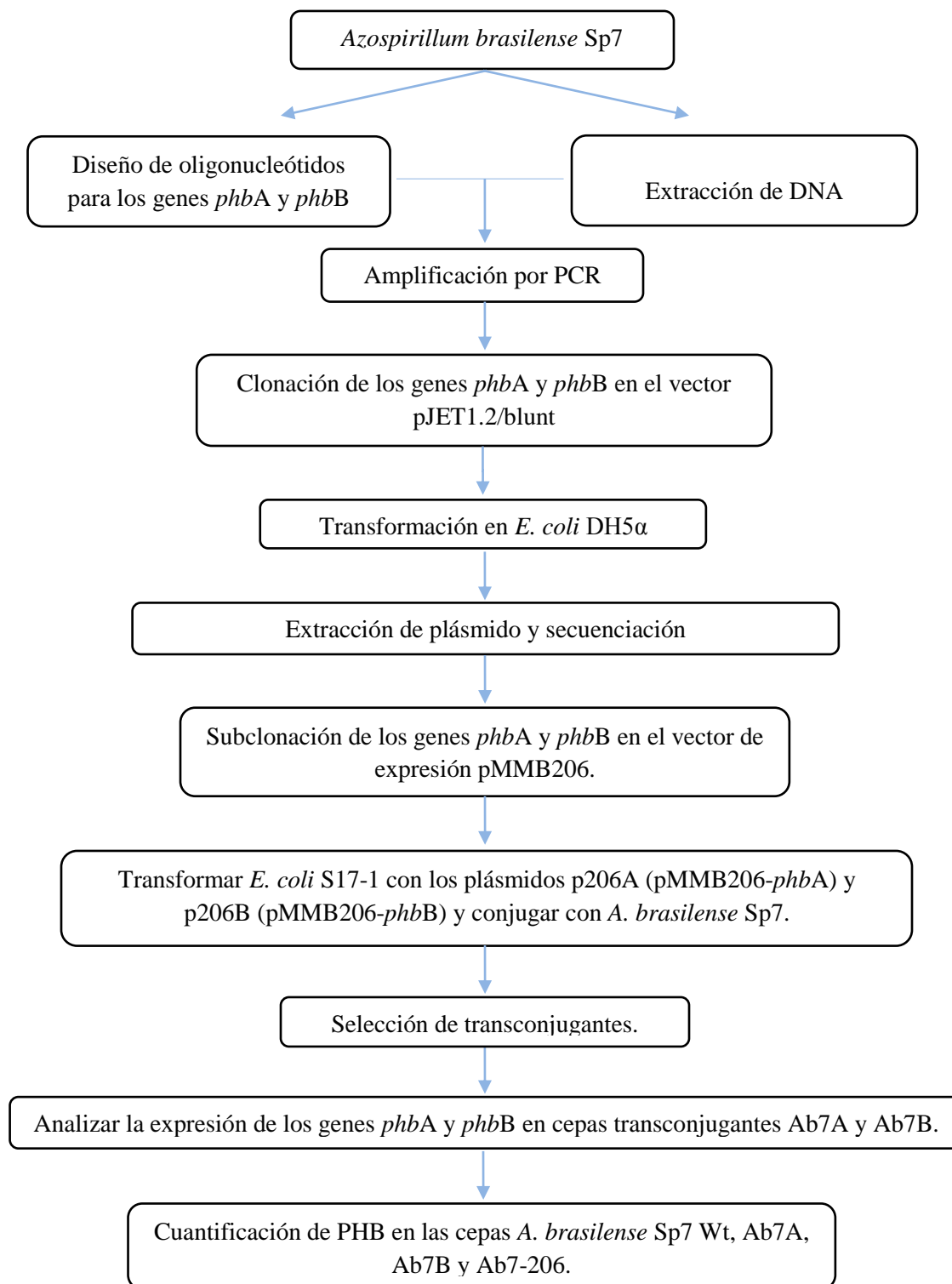
- ✓ Analizar la acumulación de poli- β -hidroxibutirato en cepas de *A. brasilense* Sp7 cuando se sobreexpresan los genes *phbA* y *phbB*.

Específicos:

- ✓ Sobreexpresar el gen *phbA* en *A. brasilense* Sp7.
- ✓ Sobreexpresar el gen *phbB* en *A. brasilense* Sp7.
- ✓ Analizar la producción de poli- β -hidroxibutirato por las cepas recombinantes de *phbA* y *phbB*.

ESQUEMA DE TRABAJO

Sobreexpresión de los genes *phbA* y *phbB* en *Azospirillum brasilense* Sp7



MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa de trabajo	Tarrand <i>et al.</i> (1978)
<i>A. brasilense</i> Ab7A	<i>A. brasilense</i> Sp7 que porta el plásmido p206A	Éste trabajo
<i>A. brasilense</i> Ab7B	<i>A. brasilense</i> Sp7 que porta el plásmido p206B	Éste trabajo
<i>A. brasilense</i> Ab7-206	<i>A. brasilense</i> Sp7 conteniendo el vector pMMB206	Éste trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	$\Delta lacU169$ <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thiL relA1</i>	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> DH5 α A25	<i>E. coli</i> DH5 α que porta el plásmido pJETA	Éste trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α B2	<i>E. coli</i> DH5 α que porta el plásmido pJETB	Éste trabajo
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96 thiL recA1 relA1 lac glnV44 F'[] hsdR17</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue p206A	<i>E. coli</i> XL1-Blue que porta el plásmido p206A	Éste trabajo
<i>E. coli</i> XL1-Blue p206B	<i>E. coli</i> XL1-Blue que porta el plásmido p206B	Éste trabajo
<i>E. coli</i> S17-1 λ pyr	<i>Sm^r, recA, thi, pro, hsdR^r M+RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, λpir</i>	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>E. coli</i> S17-1 p206A	<i>E. coli</i> S17-1 λ pyr que porta el plásmido p206A	Éste trabajo
<i>E. coli</i> S17-1 p206B	<i>E. coli</i> S17-1 λ pyr que porta el plásmido p206B	Éste trabajo
<i>E. coli</i> S17-1 p206	<i>E. coli</i> S17-1 λ pyr que porta el plásmido pMMB206	Éste trabajo
Plásmidos		
pJET1.2/blunt	Vector de clonación. Ap ^r	Fermentas
pJETA	<i>phbA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 clonado en pJET1.2/blunt	Éste trabajo
pJETB	<i>phbB</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 clonado en pJET1.2/blunt	Éste trabajo
pMMB206	Vector de expresión. Cm ^r	Morales <i>et al.</i> (1991)
p206A	<i>phbA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 clonado en pMMB206	Éste trabajo
p206B	<i>phbB</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 clonado en pMMB206	Éste trabajo

Medios utilizados y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados se muestran en la tabla 3. La cepa *A. brasilense* Sp7 fue recuperada a partir de cultivos con glicerol (50% v/v) conservados a -70 °C. De éstos, se tomó una alícuota de 50 μ L para inocular 5 mL de medio de cultivo LB (Luria Bertani - ANEXO III) suplementado con el antibiótico de selección (Tabla 4). Los tubos se incubaron durante 12 - 18 h a 30 °C y 150 rpm. Además se utilizaron los medios selectivos Rojo Congo y Medio Mínimo K-Malato (MMKM).

Las cepas de *E. coli*, se recuperaron a partir cultivos conservados en glicerol (50% v/v) a -70 °C. Para su recuperación se inocularon 50 µL en tubos conteniendo 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección, llevando a incubación toda la noche a 37 °C y 150 rpm.

Tabla 4. Antibióticos utilizados.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración de trabajo
<i>A. brasilense</i> Sp7	Ampicilina (Ap)	100 µg/ml
<i>A. brasilense</i> Ab7A	Ampicilina (Ap); Cloranfenicol (Cm)	100 µg/ml; 35 µg/ml
<i>A. brasilense</i> Ab7B	Ampicilina (Ap); Cloranfenicol (Cm)	100 µg/ml; 35 µg/ml
<i>A. brasilense</i> Ab7-206	Ampicilina (Ap); Cloranfenicol (Cm)	100 µg/ml; 35 µg/ml
<i>E. coli</i> DH5α	Ácido Nalidíxico (Nx)	15 µg/ml
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Tetraciclina (Tc)	20 µg/ml
<i>E. coli</i> S17-1 λpyr	Estreptomycin (Sm)	20 µg/ml

Extracción de DNA genómico

Se estriaron 10 µL de cultivo de *A. brasilense* Sp7 en una placa de medio Rojo Congo con el antibiótico de selección y se incubó de 48 a 72 h a 32 °C. De este cultivo se tomó una colonia para inocular 5 mL de MMKM suplementado con Ap. El cultivo se incubó a 32 °C y 150 rpm hasta alcanzar la fase pre-estacionaria (16-18 h). Posteriormente se centrifugaron 3 mL de cultivo a 8,000 rpm durante 6 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se usó para la extracción de DNA de acuerdo a Miller *et al.* (1998). Una vez obtenido el DNA se procedió a su verificación mediante una electroforesis (5 V/cm) en gel de agarosa al 1 %. El gel fue teñido en Bromuro de etidio (Et-Br) y revelado bajo luz ultravioleta (UV).

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *phbA* y *phbB* de *A. brasilense* Sp7 (Tabla 5) fueron diseñados a partir de las secuencias depositadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) con los números de acceso AF353206 y AY046923, respectivamente. Para el diseño de iniciadores se empleó el software *Primer Select* de **DNAsstar**. Adicionalmente se agregaron sitios de restricción a los extremos 5' y 3' de los genes *phbA* (*EcoRI* - *BamHI*) y *phbB* (*EcoRI* - *PstI*).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *phbA* y *phbB*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Tm	Amplifican
<i>phbA</i> -FEco	AGG ↓ AAT TCA ATG ACC TCG GCG CCT TTG ACC	65.3 °C	1134 pb
<i>phbA</i> -RBam	CGG ↓ GAT CCT CAG ACC GCT TCC AGG ACC	67.3 °C	
<i>phbB</i> -FEco	GGG ↓ AAT TCA ATG CAG ATC AAA CGC GCC GC	65.5 °C	2334 pb
<i>phbB</i> -RPst	CTG CA ↓ G TCA GTT CCG CAG CGG CTT GC	67.8 °C	

Amplificación por PCR

La amplificación de los genes *phbA* y *phbB* se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fermentas®) empleando una mezcla de las enzimas DNA polimerasas *Pfu* y *Dream Taq* recombinantes. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 94 °C x 5 min (1 ciclo), 94 °C x 30 s, Tm x 45 s, 72 °C x 1:30 - 2:30 min (30 ciclos), 72 °C x 30 min (1 ciclo), y enfriamiento a 4 °C x tiempo indefinido (Figura 11).

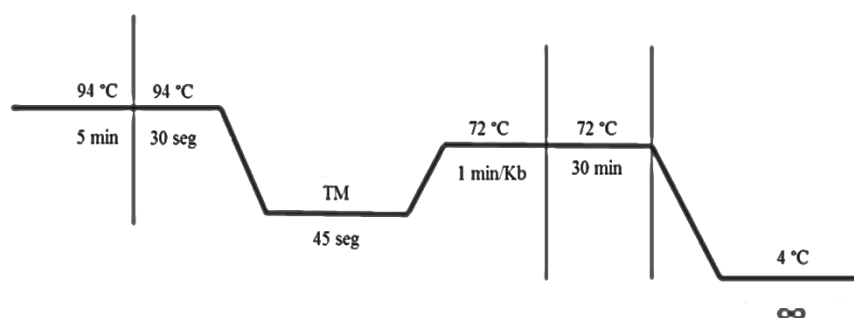


Figura 11. Esquema de amplificación por PCR.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, se procedió a realizar un corrimiento electroforético (5 V/cm) con 5 µL de la muestra de PCR en gel de agarosa al 1%. El gel fue teñido en una solución de Et-Br y visualizado bajo luz UV.

Purificación de fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa

Después de visualizar el gel de agarosa bajo luz UV, se procedió a realizar un segundo corrimiento electroforético con la finalidad de extraer las bandas correspondientes

a los genes *phbA* y *phbB*. Para ello se empleó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery[®], el protocolo de extracción de banda se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Zymo Research[®]).

Clonación de los genes *phbA* y *phbB* en el vector pJET1.2/blunt

La clonación de los genes *phbA* (1134 pb) y *phbB* (2334 pb) en pJET1.2/blunt se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fermentas[®]). La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 20 µL y se incubó toda la noche a 18 - 20 °C. La reacción de ligación fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α. La selección de las transformantes se realizó sobre placas LB con Ap y Nx. Las clonas transformantes conteniendo los genes *phbA* (pJETA) y *phbB* (pJETB) se sembraron en tubos LB conteniendo los antibióticos de selección y se incubaron toda la noche a 37 °C y 200 rpm. A continuación se extrajo DNA plasmídico.

Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Se centrifugaron 3 mL de un cultivo en medio LB a 8,000 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue desechado y el paquete celular fue utilizado para la extracción de plásmido de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.* (1989) (ANEXO IV). Una vez obtenido el DNA se realizó un corrimiento electroforético en agarosa al 1 %. El gel fue teñido en Et-Br y revelado con luz UV.

Posteriormente se realizaron pruebas comprobatorias (PCR y digestión con *Bgl*III) para corroborar la presencia del inserto de interés en los plásmidos pJETA y pJETB.

Subclonación en el vector de expresión pMMB206

El plásmido pJETA y el vector de expresión pMMB206 fueron doblemente digeridos con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI. Los productos de la digestión fueron usados para la reacción de ligación, la cual se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1-Blue.

Por otro lado el plásmido pJETB fue digerido con la enzima *Bgl*III, seguido de restricción con la enzima *DNA Blunting* para remover los extremos 3' y rellenar los extremos 5' sobresalientes. Posteriormente la mezcla de reacción fue sometida a digestión con *Eco*RI, mientras que el vector pMMB206 fue digerido con las enzimas *Eco*RI y *Sma*I. Los productos de digestión se utilizaron para la reacción de ligación, misma que fue empleada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1-Blue.

La selección de transformantes se realizó sobre placas LB conteniendo Tc y Cm. Las clonas positivas se seleccionaron en base a la adición de X-gal (80 µg/ml) e IPTG (1 mM). Después de la extracción de DNA plasmídico se realizaron pruebas confirmatorias (PCR y digestión) para corroborar la presencia del inserto. Los plásmidos pMMB206 conteniendo los genes *phbA* (p206A) y *phbB* (p206B) fueron utilizados para transformar la cepa conjugativa *E. coli* S17-1 λpyr. Las cepas obtenidas se denominaron *E. coli* S17-1 p206A y *E. coli* S17-1 p206B, respectivamente.

De igual manera, el vector de expresión pMMB206 fue utilizado para transformar células quimiocompetentes *E. coli* XL1-Blue. Posteriormente se transformó la cepa conjugativa *E. coli* S17-1λpyr. La cual se denominó *E. coli* S17-1 p206.

Conjugación de las cepas *E. coli* S17-1 p206A, p206B y p206 con *A. brasilense* Sp7

Las cepas *E. coli* S17-1 p206A, *E. coli* S17-1 p206B y *E. coli* S17.1 p206 (donadoras) se incubaron sin agitación a 37 °C. Paralelamente, la cepa receptora *A. brasilense* Sp7 se incubó a 30 °C y 175 rpm, ambas, donadoras y receptora, hasta alcanzar la fase logarítmica media. Posteriormente, sobre placas de medio LB sin antibióticos, se colocaron 125 µL de la cepa donadora y una vez adsorbidos, se agregaron sobre ellos, 250 µL del cultivo de la cepa receptora, dejándolos adsorber. Las placas de LB fueron incubadas durante 18 h a 32 °C. Pasado este tiempo, se recuperó el cultivo en 1 mL de SSI, posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³, las cuales se extendieron en placas de LB conteniendo los antibióticos de selección (Ap y Cm), y se incubaron a 32 °C durante 24 - 48 h. Las clonas transconjugantes obtenidas fueron sembradas en MMKM y

RC suplementado con Ap y Cm (Tabla 4). Las cepas transconjugantes obtenidas fueron denominadas *A. brasilense* Ab7A, *A. brasilense* Ab7B y *A. brasilense* Ab7-206.

Cinéticas de crecimiento de cepas *A. brasilense* Sp7

Se realizaron curvas de crecimiento a partir de cultivos puros de las cepas *A. brasilense* Sp7 Wt, Ab7A, Ab7B y Ab7-206. Para ello, se inoculó una colonia de cada cepa en un matraz de 125 mL conteniendo 25 mL de MMKM suplementado con los antibióticos apropiados. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 175 rpm, durante 48 h. Pasado éste tiempo se inoculó un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de MMKM ajustando a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1. Posterior a ello, se incubaron los matraces a 30 °C y 175 rpm. La $DO_{600\text{ nm}}$ fue medida cada 4 h, durante 24 h. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Determinación de proteínas totales

Se centrifugaron 100 μL del cultivo celular. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se lavó 2 veces con buffer PBS. Finalmente el paquete celular se resuspendió en 200 μL del mismo buffer y se adicionaron 200 μL de NaOH 1N. La mezcla resultante se sometió a ebullición durante 10 min. Transcurrido este tiempo las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente para después agregar 400 μL de HCl 0.5 N y 200 μL del reactivo de Bradford (BioRad[®]). La mezcla se incubó en oscuridad durante 5 min. Posteriormente se leyó $DO_{595\text{ nm}}$. La cuantificación de proteína total se realizó en base a una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma[®]) cuyo rango de concentraciones varió de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (ANEXO I).

Cuantificación de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en cepas *A. brasilense* Sp7

Se cuantificó la producción de PHB por las cepas *A. brasilense* Sp7 empleando MMKM con Malato y NH_4Cl como única fuente de C y N, respectivamente. Se utilizó un precultivo de 48 h para inocular matraces de 125 mL conteniendo 25 mL de MMKM a una $DO_{600\text{ nm}}$ ajustada a 0.1. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 175 rpm hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6. Una vez alcanzada la DO, los cultivos se dividieron en 2 matraces de 50 mL con 10 mL de cultivo. A uno de ellos se le adicionó el agente inductor -IPTG- a una concentración final de 0.5 mM. A este tiempo (0) se tomó 1 mL de cultivo de ambos

matraces, y así se realizó cada 3 horas durante 9 horas (T3, T6 y T9). Posteriormente los matraces se dejaron incubando hasta cumplir las 72 h (T72), para después tomar la alícuota correspondiente para la extracción de PHB. La extracción del biopolímero se realizó de acuerdo al protocolo de Law y Slepecky (1961), y el contenido del biopolímero se estimó a partir de una curva patrón de PHB (Sigma-Aldrich®) (ANEXO II). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran como la media \pm desviación estándar de PHB/mg proteína. Los datos se analizaron empleando el software *Statgraphics* con un nivel de significancia $P < 0.05$.

RESULTADOS

Amplificación y clonación de los genes *phbA* y *phbB*

Para amplificar los genes *phbA* y *phbB* de *A. brasilense* Sp7 se sintetizaron oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias genéticas reportadas por Kadouri *et al.* (2002) depositadas en el NCBI. Adicionando además sitios de restricción a los extremos 5' y 3' (gen *phbA*: *EcoRI* y *BamHI*; gen *phbB*: *EcoRI* y *PstI*). Los oligonucleótidos diseñados permitieron amplificar los genes de interés como se muestra en la figura 12.

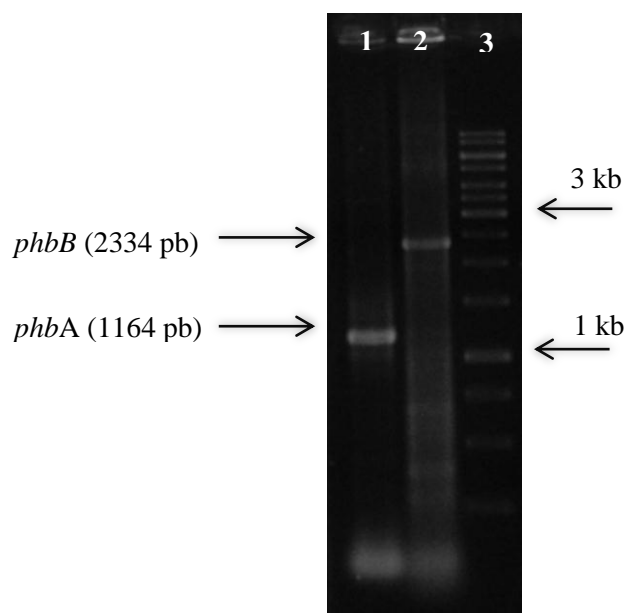


Figura 12. Análisis en gel de agarosa al 1 % de la amplificación por PCR de los genes *phbA* y *phbB* a partir de DNA total de *A. brasilense* Sp7. C1. Gen *phbA* (1.1 kb). C2. Gen *phbB* (2.3 kb). C3. Marcador 1 kb.

Los amplicones correspondientes a los genes *phbA* y *phbB* fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt. Los plásmidos pJET1.2/blunt conteniendo los genes *phbA* y *phbB* se denominaron pJETA y pJETB, respectivamente (Figuras 13 y 14). Mismas que se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . A las clonas transformantes obtenidas se les realizó extracción de DNA plasmídico y con él pruebas comprobatorias (PCR, digestiones) para verificar la presencia del inserto de interés. Finalmente las clonas seleccionadas para seguimiento fueron *E. coli* DH5 α A25 (pJETA) y *E. coli* DH5 α B2 (pJETB).

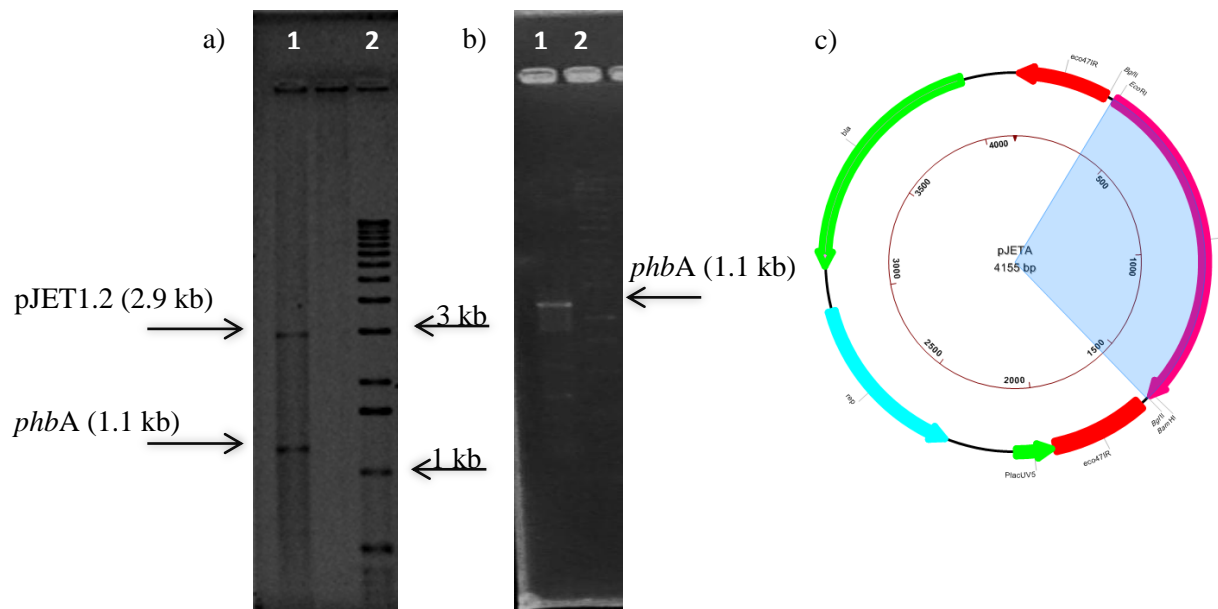


Figura 13. Análisis en gel de agarosa al 1 % del plásmido pJETA. a) C1. Digestión pJETA con *Bgl*III. C2. Marcador 1 kb. b) C1. PCR usando pJETA como DNA templado e iniciadores del gen *phbA*. C2. Marcador 1 kb. c) Plásmido pJETA.

Tabla 6. Alineamiento BLASTN del inserto clonado en el plásmido pJETA.

Description	Query cover	E-value	Ident	Accession
<i>A. brasilense</i> strain Sp7 beta-ketothiolase (<i>phaA</i>) gene, complete cds	95%	0.0	99%	AF353206.1
<i>A. brasilense</i> Sp245 plasmid AZOBR_p1 complete genome	95%	0.0	96%	HE577328.1
<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ39_p1, complete sequence	95%	0.0	96%	CP007794.1
<i>Azospirillum</i> sp. B510 plasmid pAB510c DNA, complete genome	94%	0.0	83%	AP010949.1

La electroforesis correspondiente a los ensayos de digestión y amplificación empleando el plásmido pJETA, mostró los perfiles de DNA esperados. La digestión mostró dos fragmentos de DNA correspondientes al vector pJET1.2/blunt linearizado (2.9 kb) y un inserto de 1.1 kb correspondiente al fragmento de interés. El perfil electroforético obtenido tras la reacción de PCR mostró un amplificado de 1.1 kb.

El alineamiento BLASTN de la secuencia clonada en pJETA mostró un 99 % de identidad con el gen *phbA* de *A. brasilense* Sp7 (Tabla 6) reportado por Kadouri *et al.* (2002). Por otro lado, se clonó el amplicón correspondiente al gen *phbB* en el vector pJET1.2/blunt. El plásmido obtenido se denominó pJETB (Figura 14).

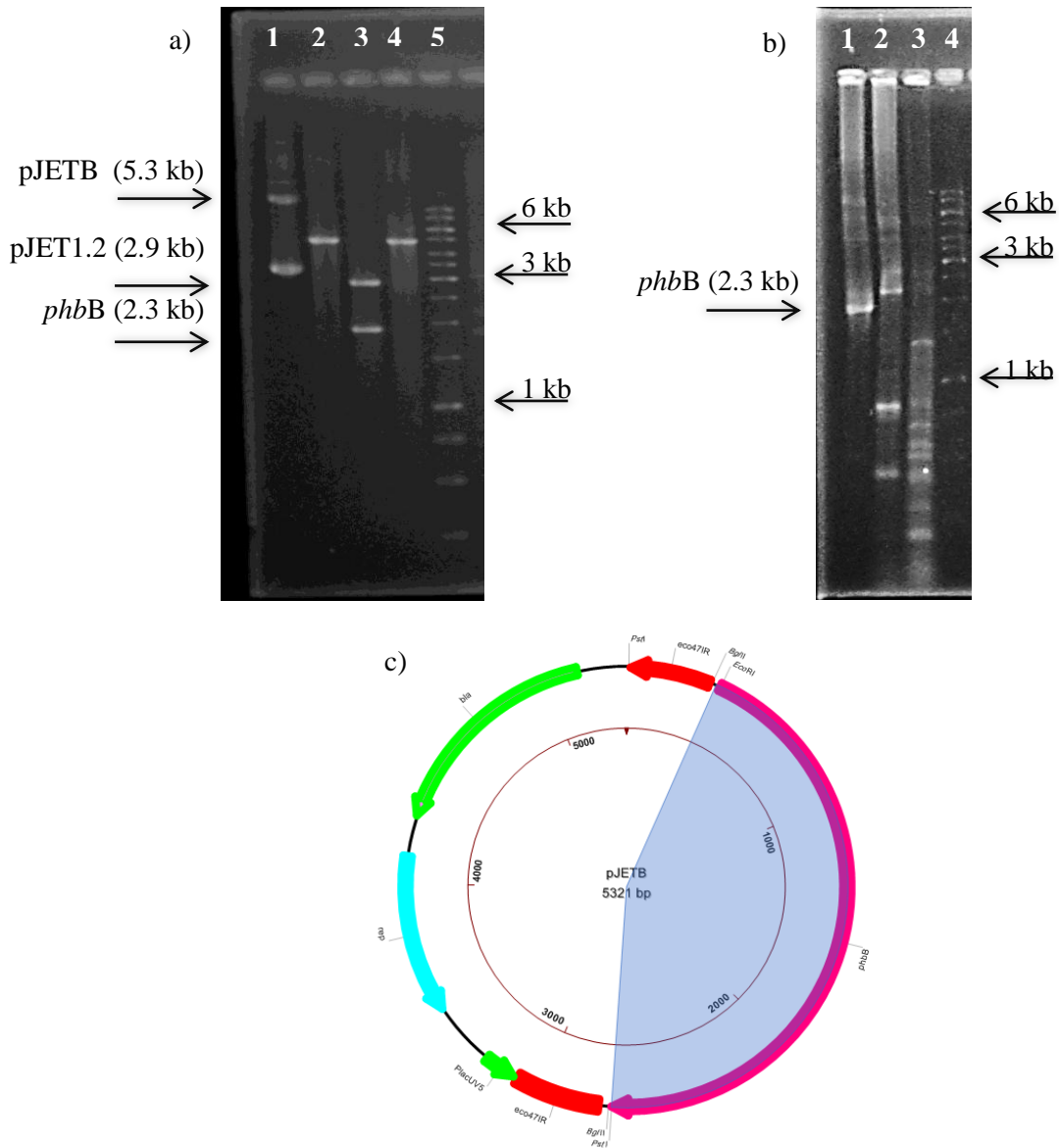


Figura 14. Análisis en gel de agarosa al 1 % del plásmido pJETB. a) C1. pJETB. C2-C4 Digestiones pJETB con *EcoRI*, *BglII* y *PstI*, respectivamente. C5. Marcador 1 kb. b) C1 y C2. PCR usando pJETB como DNA templado e iniciadores combinados (vector + gen *phbB*). C3. PCR con iniciadores del gen *phbB*. C4. Marcador 1 kb. c) Plásmido pJETB.

Cabe mencionar que la clonación del gen *phbB* en el vector pJET1.2/blunt no resultó como se esperaba. Los perfiles electroforéticos obtenidos después de realizar digestiones comprobatorias mostraron patrones de restricción con tamaños menores a los esperados. De ahí que, en el caso de la restricción con *EcoRI*, se obtuvo un fragmento menor a 5 kb, mientras que el esperado era de 5.3 kb. Así mismo, la enzima *BglII* liberó un inserto menor a 2 kb, habiendo clonado un inserto de 2.3 kb. Por otro lado, la digestión con *PstI*, dependiendo de la orientación del inserto, debió haber linearizado pJETB en 5.3 kb (no en 5 kb, como se observa en la figura 14 a)) o bien, liberado dos bandas, una de 2.3 kb (correspondiente al inserto) y otra de 2.9 kb (propia del vector).

Posterior a las restricciones comprobatorias se procedió a comprobar la presencia del inserto mediante reacciones de PCR (Figura 14, b)). Para ello, se realizaron amplificaciones del inserto utilizando el plásmido pJETB como DNA templado, además de emplear oligonucleótidos del vector pJET1.2/blunt y combinados (pJET1.2 reverse – *phbB*-FEco y pJET1.2 forward – *phbB*-RPst). El perfil electroforético mostró amplificación con los oligonucleótidos del vector y combinados utilizando el iniciador delantero del gen *phbB*. Sin embargo cuando se empleó el iniciador *phbB*-RPst no hubo amplificado del tamaño esperado. Los patrones electroforéticos de las reacciones de digestión y PCR dejaban claro que el extremo 5' del gen *phbB* no estaba en el plásmido pJETB, no obstante, el dato de cuántas pb estaban ausentes en la construcción, no estaba claro. Por tal motivo se procedió a secuenciar el inserto clonado en el vector pJET1.2/blunt (Tabla 7).

Tabla 7. Alineamiento BLASTN del inserto clonado en el plásmido pJETB.

Description	Query cover	E-value	Ident	Accession
<i>A. brasilense</i> acetoacetyl-CoA reductase (<i>phbB</i>) gene, complete cds	96%	0.0	99%	AY046923.1
<i>A. brasilense</i> Sp245 plasmid AZOBR_p1 complete genome	95%	0.0	95%	HE577328.1
<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ39_p1, complete sequence	95%	0.0	95%	CP007794.1
<i>Azospirillum</i> sp. B510 plasmid pAB510c DNA, complete genome	95%	0.0	84%	AP010949.1

Los resultados de la secuenciación mostraron que el fragmento clonado es 99 % idéntico al gen *phbB* de *A. brasilense* Sp7. Los alineamientos realizados señalaron que la región clonada equivale a 1.8 kb, y la región faltante (0.5 kb) se encontraban en el extremo carboxilo terminal. Dado lo anterior, se realizó un análisis de los dominios conservados en el gen *phbB* (Figura 15).

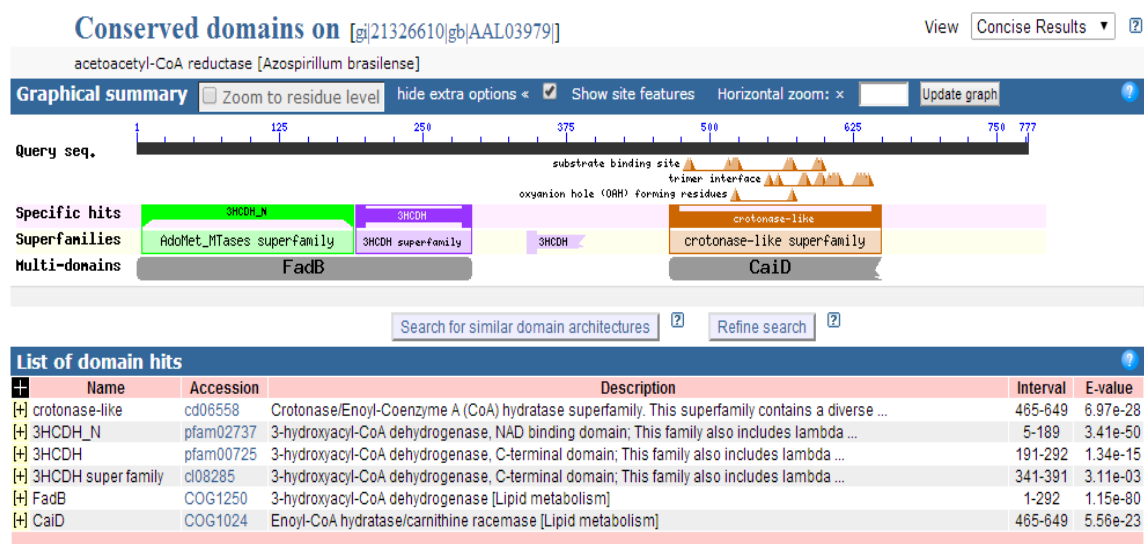


Figura 15. Dominios conservados en PhbB de *A. brasilense* Sp7 de acuerdo a la herramienta Conserved Domains Database (CDD) del NCBI.

De acuerdo al análisis de los dominios conservados en la proteína codificada por el gen *phbB* (Acetoacetyl CoA reductasa), el fragmento contenido en el plásmido pJETB cubre el dominio crotonasa like casi en su totalidad. Por lo anterior se decidió darle seguimiento a dicho plásmido.

Subclonación de los genes *phbA* y *phbB* en el vector de expresión pMMB206

Para subclonar el gen *phbA*, el plásmido pJETA fue digerido con *EcoRI* y *BamHI*, el producto correspondiente al inserto de interés fue purificado y ligado con el vector de expresión pMMB206 similarmente digerido. La reacción de ligación fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. A las clonas transformantes obtenidas se les extrajo DNA plasmídico, el cual se empleó para realizar pruebas comprobatorias (PCR y restricciones). El plásmido resultante de la clonación del gen *phbA* en el vector pMMB206 se denominó p206A (Figura 16).

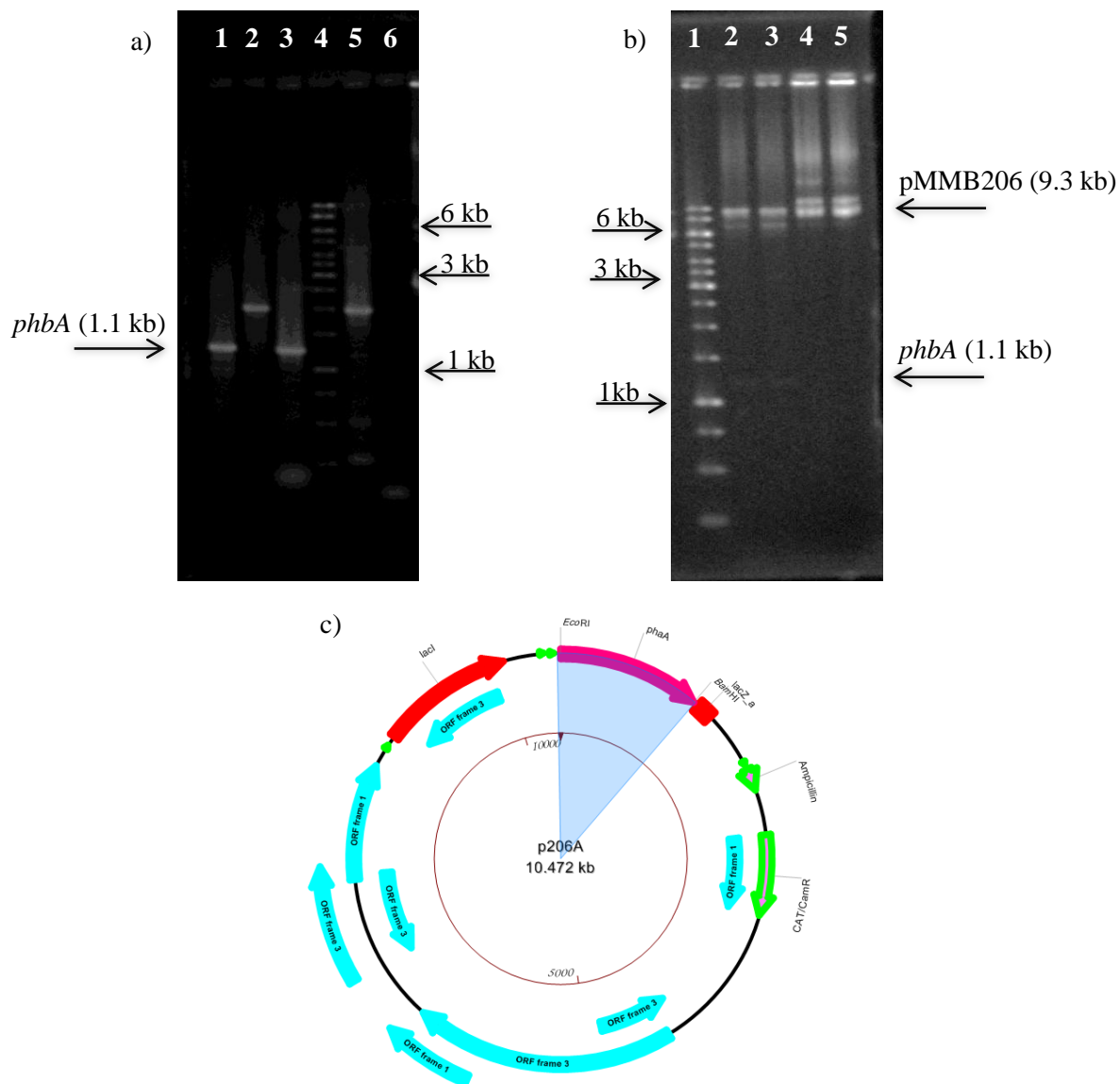


Figura 16. Análisis en gel de agarosa al 1 % del plásmido p206A. a) PCR con oligonucleótidos M13. C1 y C3 (templado p206A) y C6 (templado p206). C4. Marcador 1 kb. b) Restricciones C1. Marcador 1 kb. C2 y C3 digestión p206A con *EcoRI* y *BamHI* C4 y C5 p206A. c) Plásmido p206A.

El gen *phbB* se subclonó a partir del plásmido pJETB. Para ello, pJETB se digirió con *BglII* para liberar el inserto de interés. El cual se sometió a una segunda restricción con la enzima *DNA blunting*, para remover los extremos 3' y rellenar los extremos 5' sobresalientes. Y a continuación fue digerido con *EcoRI*. Finalmente el producto de la digestión correspondiente al fragmento de *phbB* fue purificado y ligado con el vector de expresión pMMB206 doblemente digerido con *EcoRI* y *SmaI*. La reacción de ligación fue utilizada

para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. A las clonas transformantes obtenidas se les practicó extracción de DNA plasmídico, el cual se empleó para realizar pruebas comprobatorias (PCR y restricciones). La digestión del plásmido p206B con *Bam*HI resultó en 2 fragmentos: 10 Kb (9.3 kb -pMMB206- y 0.6 kb -*phbB*-) y 1.2 kb (fragmento de *phbB*). La construcción resultante de la clonación del fragmento de *phbB* en el vector pMMB206 se denominó p206B (Figura 17).

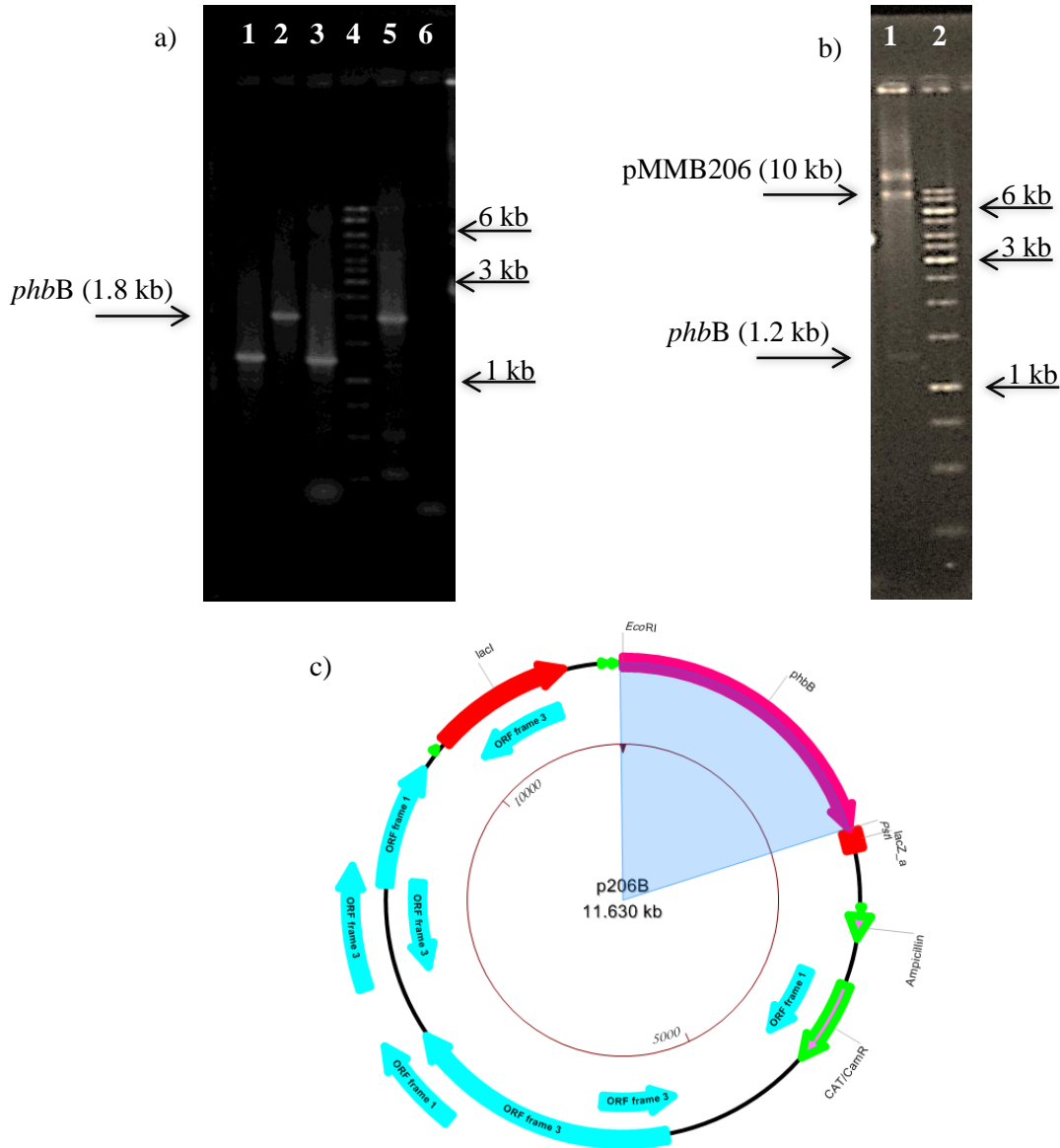


Figura 17. Análisis en gel de agarosa al 1 % del plásmido p206B. a) PCR con oligonucleótidos M13. C2, C5 (templado p206B) y C6 (templado p206). C4. Marcador 1 kb. b) C1. Digestión p206B con *Bam*HI. C2. Marcador 1 kb. c) Plásmido p206B.

Una vez confirmada la presencia de los genes *phbA* y *phbB* en los plásmidos p206A y p206B, respectivamente, se procedió a utilizar estos y el vector pMMB206 para transformar células quimiocompetentes de la cepa conjugativa *E. coli* S17-1 λ pyr. Las cepas conjugativas obtenidas se denominaron *E. coli* S17-1 p206A, *E. coli* S17-1 p206B y *E. coli* S17-1 p206.

Conjugación cepas *E. coli* S17-1 p206A, p206B y p206 con *A. brasilense* Sp7

La selección de las transconjugantes se realizó en medios de cultivo RC y MMKM suplementados con Ap y Cm. Las cepas transconjugantes obtenidas se nombraron como *A. brasilense* Sp7 Ab7A, Ab7B y Ab7-206. La presencia de los plásmidos se verificó mediante reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos universales M13 contenidos en el vector pMMB206 (Figura 18).

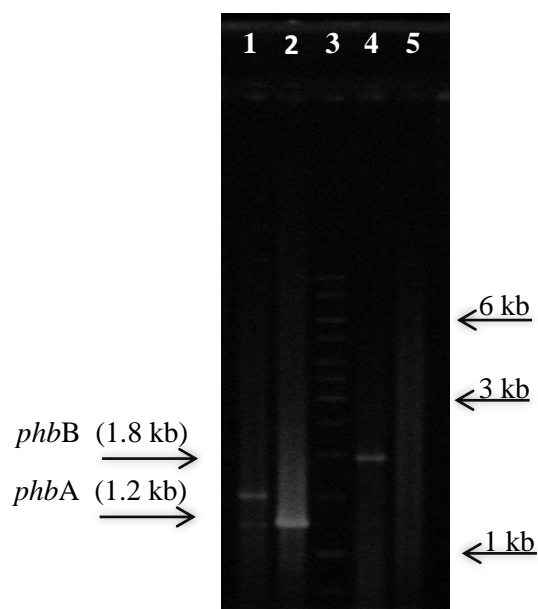


Figura 18. Análisis en gel de agarosa al 1 % de la amplificación de los genes *phbA* y *phbB* en cepas transconjugantes de *A. brasilense* Sp7 empleando oligonucleótidos M13. C2. PCR cepa Ab7A. C3. Marcador 1 kb. C4. PCR cepa Ab7B. C5. PCR cepa Ab7-206.

Cinéticas de crecimiento cepas transconjugantes *A. brasilense*

Se realizaron cinéticas de crecimiento a las cepas obtenidas con la finalidad de observar si la modificación genética alteraba el comportamiento de las mismas (Figura 19).

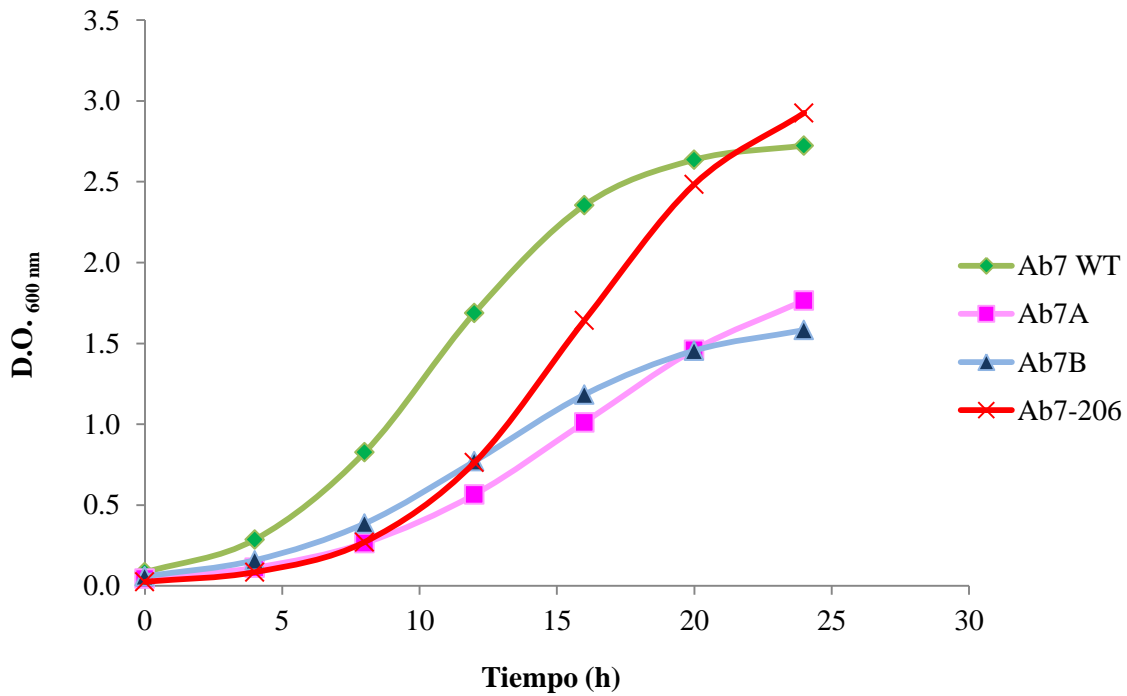


Figura 19. Cinéticas de crecimiento de las cepas *A. brasilense* Sp7, Ab7A, Ab7B y Ab7-206. Los cultivos iniciaron a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1. Las mediciones se realizaron cada 4 h durante 24 h.

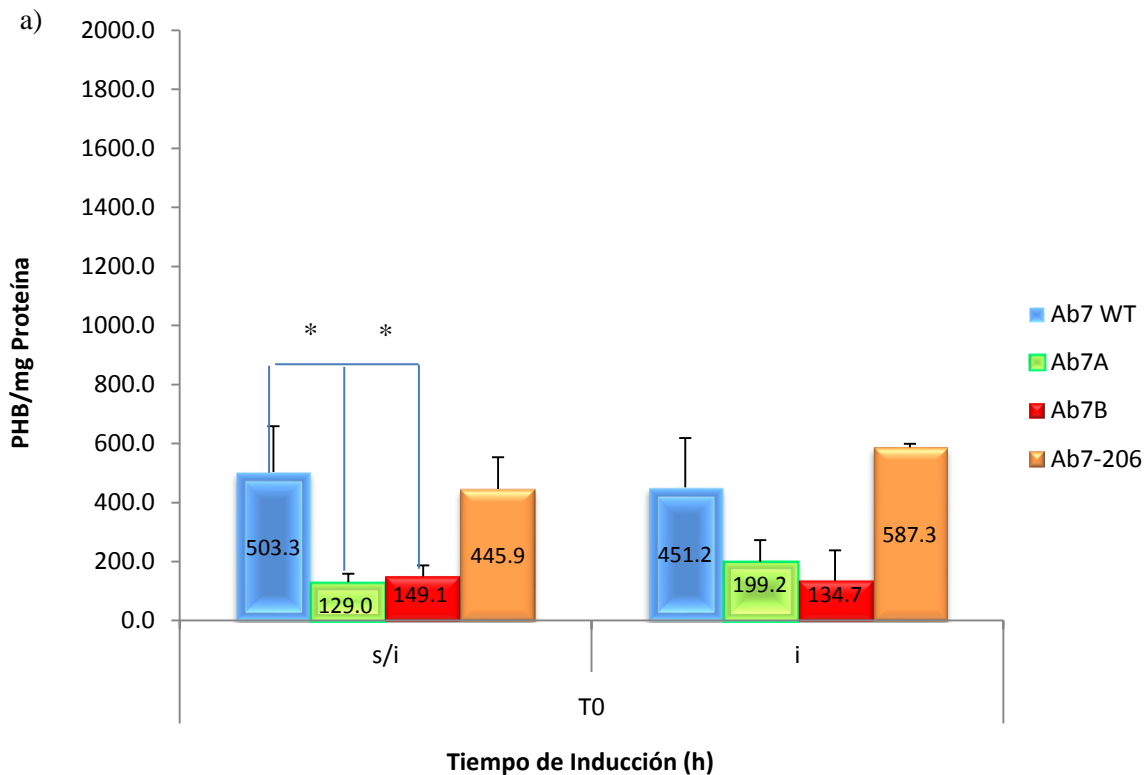
Para las cinéticas de crecimiento se emplearon como inóculo cultivos de cepas en fase estacionaria. Los datos observados en las cinéticas de crecimiento muestran un comportamiento desfasado, con fase lag más larga y la fase log menos pronunciada, de las cepas Ab7A y Ab7B respecto a las cepas Ab7-206 y Wt. Así mismo se encontró que bajo las condiciones ensayadas, la cepa Wt se duplica cada 2:07 h, mientras que las cepas genéticamente modificadas reportan tiempos de duplicación de 2:56, 2:37 y 2:16 h (Ab7A, Ab7B y Ab7-206, respectivamente) (Tabla 8).

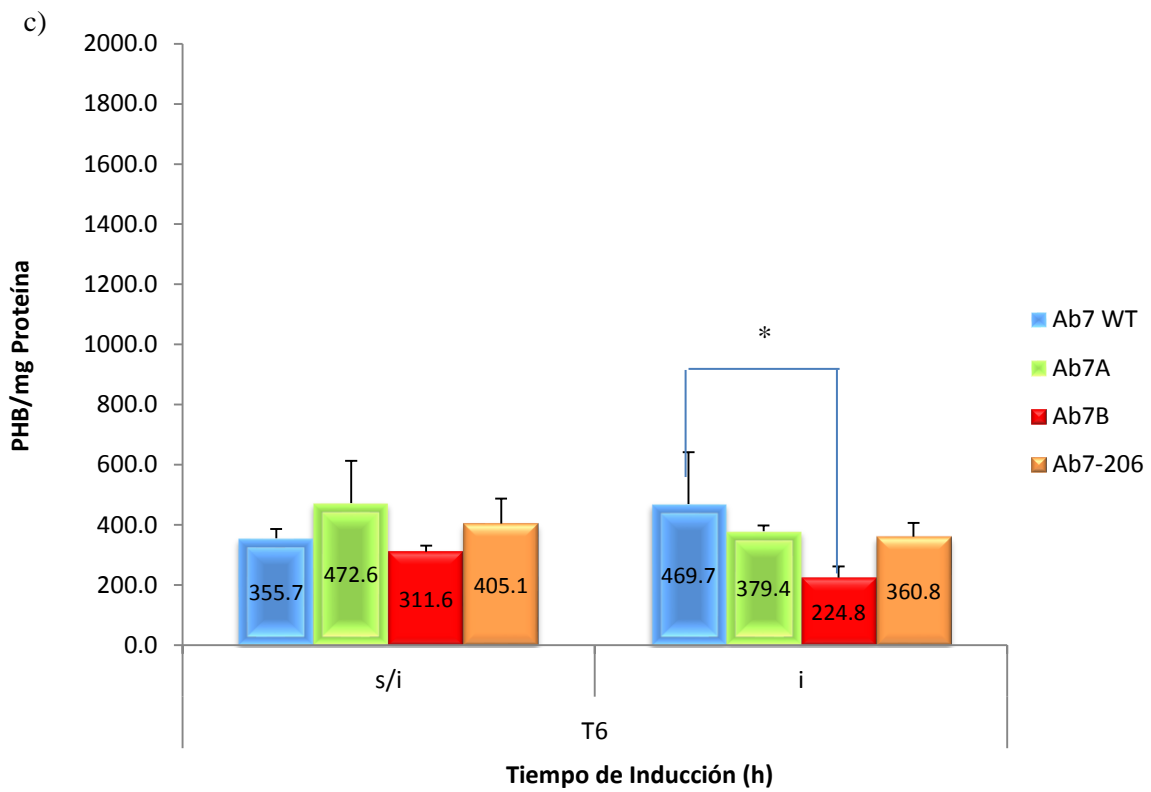
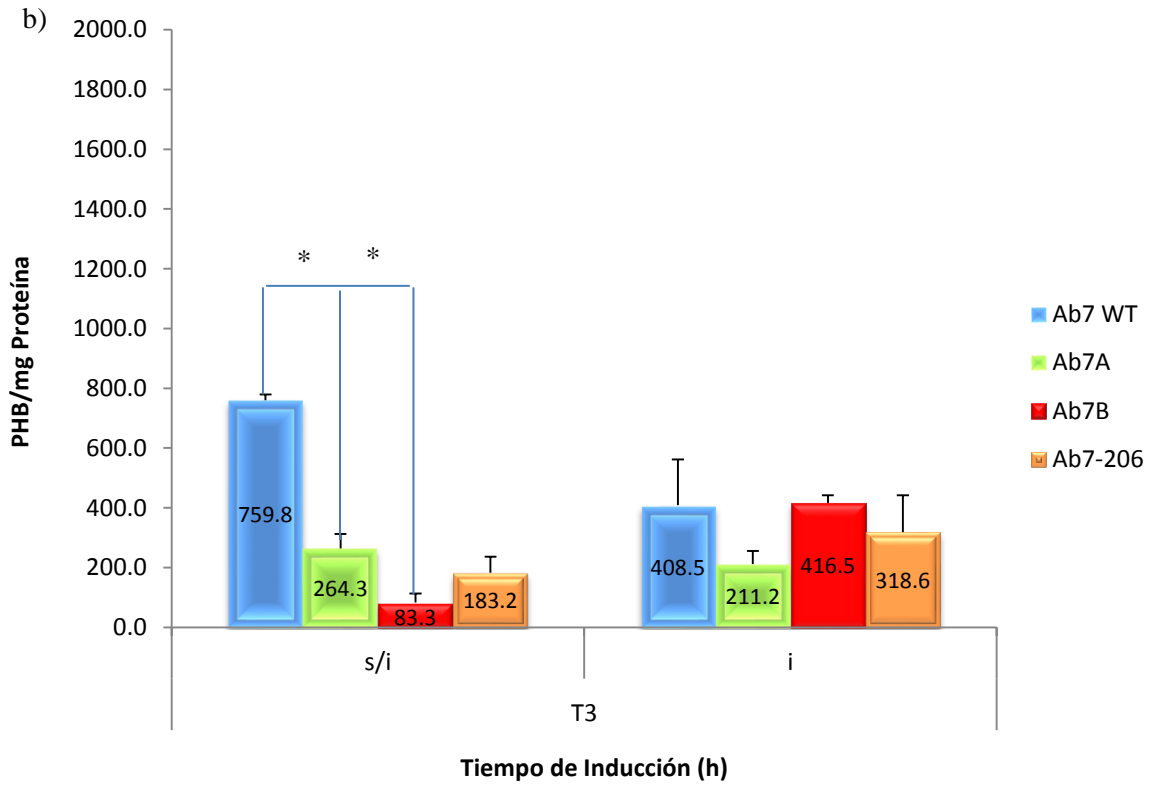
Tabla 8. Tiempo de duplicación cepas *A. brasilense* de acuerdo a la herramienta Solver en Microsoft Excel 2010.

Cepa	μ_{Max}	T. duplicación (h)
Ab7 Wt	0.32634407	2:07
Ab7A	0.235607301	2:56
Ab7B	0.26291339	2:37
Ab7-206	0.305503771	2:16

Determinación del contenido de PHB en cepas de *A. brasilense*

La estimación del contenido de PHB en cepas *A. brasilense* se realizó en MMKM conteniendo una relación C/N elevada. Como inóculo se emplearon cultivos en fase estacionaria. Las determinaciones de PHB se realizaron en cepas sometidas y no, al agente inductor -IPTG-. Para ello, una vez alcanzada la DO establecida, el cultivo se dividió en 2 matraces, uno sería inducido y el otro sin inducir. A éste momento se tomó una alícuota de cultivo de cada matraz (T0) y así se realizó cada 3 h hasta llegar a la hora 9. Finalmente el cultivo se incubó hasta alcanzar las 72 h, tiempo al cual se determinó también el contenido de PHB. La cuantificación de PHB se realizó de acuerdo con el protocolo de Law y Slespecky (1961). Los datos obtenidos se reportan en las gráficas a tiempos 0, 3, 6, 9 y 72 h, con y sin inductor (Figura 20). Los resultados se muestran como PHB/mg proteína. Para las determinaciones de PHB y proteína se analizó cultivo sin flóculos visibles.





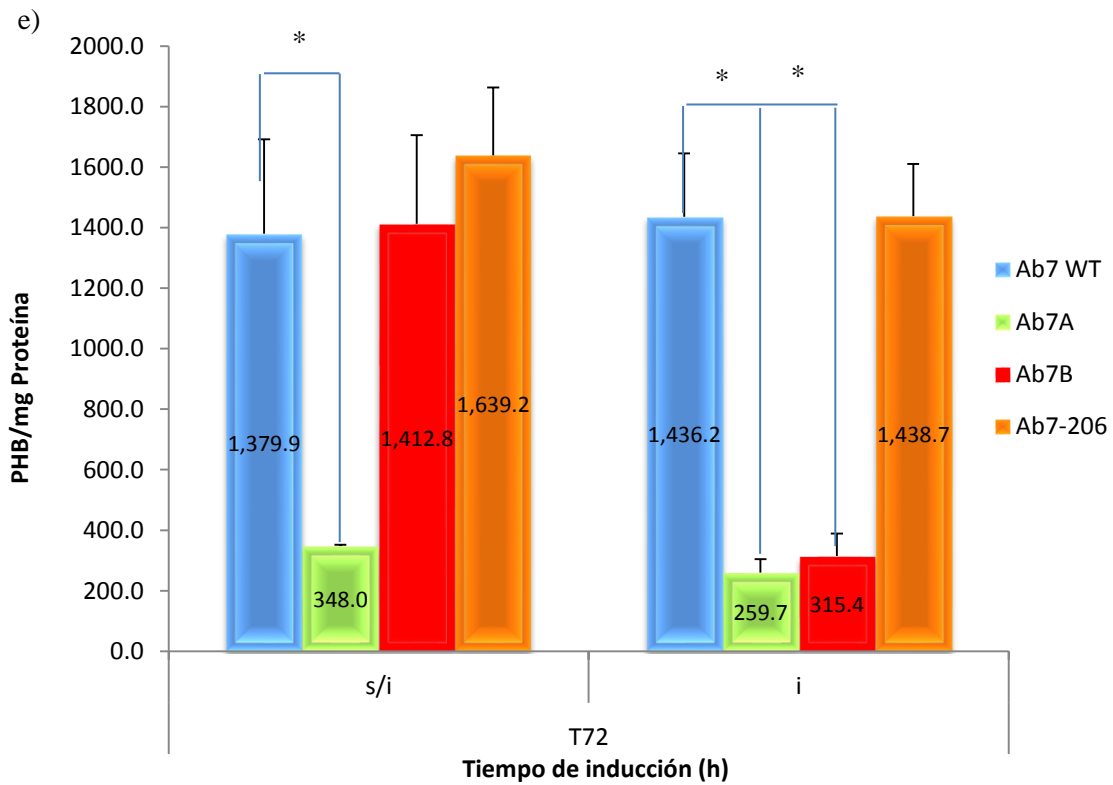
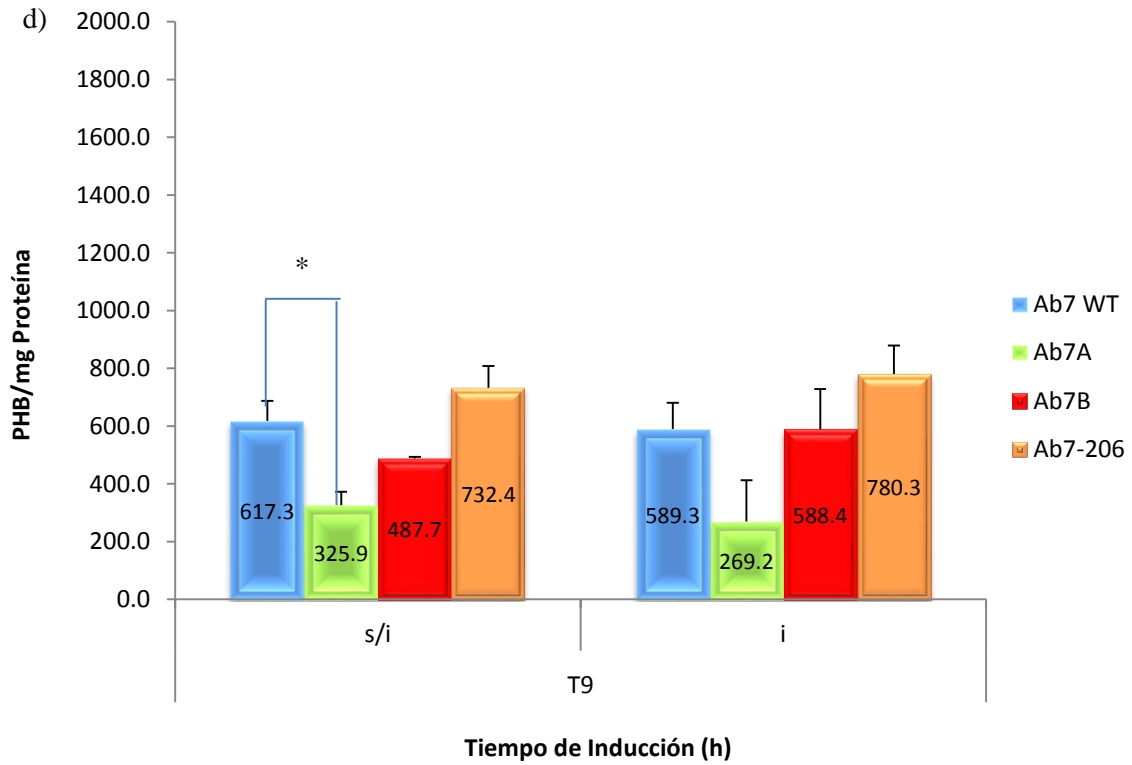


Figura 20. Contenido de PHB en cepas *A. brasilense*. Tiempos 0, 3, 6, 9 y 72 (a, b, c, d y e, respectivamente) (*) indica una diferencia significativa $P < 0.05$.

Los datos obtenidos por la cuantificación de PHB muestran que las cepas *A. brasilense* inician la producción de PHB a pocas horas de su inoculación. Se cuantificó la producción de PHB en las cepas Ab7 Wt y transconjugantes (Ab7A, Ab7B y Ab7-206) (Figura 21). La relación PHB/mg proteína se mostró estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a excepción de los tiempos T6 (n/i) y T9 (i).

A T0, la producción de PHB por las cepas Wt y Ab7-206 se observa más o menos similar tanto en cultivos no inducidos como inducidos. En contraste, las cepas Ab7A y Ab7B reportaron aproximadamente 70 % menor producción respecto a la cepa Wt, siendo estadísticamente significativos respecto a la misma. Mientras que los cultivos de estas cepas (Ab7A y Ab7B) sometidos a inducción; la producción del biopolímero se observó ligeramente aumentada en Ab7A, y similar en Ab7B, empero, estos no fueron significativos.

Respecto a la producción de PHB a tiempo 3 (T3) las cepas Wt y Ab7A muestran una tendencia de aumento. Caso contrario ocurre con las cepas Ab7B y Ab7-206. Sin embargo, bajo estas condiciones la relación PHB/mg proteína de las cepas Ab7A y Ab7B fue estadísticamente significativa.

En contraste, la producción de PHB a T3 en cultivos con adición de IPTG mostró un aumento considerable en la cepa Ab7B. Por el contrario la cepa Ab7A reportó acumulación de PHB en cantidad similar a la cepa no inducida.

Transcurridas 6 h post inducción, la cuantificación de PHB en cultivos Wt no inducidos disminuyó aproximadamente 50 % respecto al T3. Este comportamiento se observó ligeramente en Ab7A. No obstante las cepas Ab7B y Ab7-206 se observaron aumentados. Respecto a los cultivos inducidos, se observó una disminución significativa en la acumulación de PHB por la cepa Ab7B.

A tiempo 9 (T9), las cepas registraron un incremento en la producción de PHB. El análisis estadístico mostró que la acumulación de PHB por Ab7A (n/i) es significativa respecto a la cepa Wt.

De los tiempos ensayados, el análisis correspondiente a 72 h se reportó mayor acumulación de PHB en las cepas no sometidas a inducción, los datos fueron estadísticamente significativos respecto a la cepa Wt. De acuerdo a lo anterior, en los cultivos inducidos, hubo una acumulación similar de PHB en cepas Wt y Ab7-206. La adición de IPTG a las cepas Ab7A no mostró cambios significativos, contrariamente, la cepa Ab7B, sí lo hizo.

DISCUSIÓN

Producción de PHB

Se ha sugerido que frente a un exceso de Malato, la actividad enzimática de malato deshidrogenasa conduce a elevar los niveles de Acetil CoA/CoA y NAD(P)H/NAD(P), lo cual estimula la actividad enzimática β -cetotiolasa y Acetoacetil-CoA reductasa y por ende dirige la fuente de carbono hacia la síntesis de PHB consecuentemente disminuye la actividad del ciclo de Krebs (Bergersen *et al.* 1990). Adicionalmente, la fuente de nitrógeno juega un papel importante en la síntesis del biopolímero (Tal y Okon, 1985). De ahí que, para la cuantificación de PHB, las cepas fueron cultivadas en MMKM con ácido málico y NH_4Cl como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Lo anterior, aunado a que el preinóculo fue cultivado en las mismas condiciones de crecimiento y además se inoculó estando en fase estacionaria, lo que propició observar la acumulación temprana del biopolímero en las cepas estudiadas (Barbosa, 1998).

A. brasilense Sp7 acumula PHB en más del 70 % de su peso seco celular hacia el final de la fase exponencial (Tal *et al.* 1990). De acuerdo a las cinéticas de crecimiento realizadas, la toma de muestra para los ensayos de cuantificación se realizó cuando los cultivos se encontraban en fase log (T3 a T9), y estacionaria (T72), además de que las condiciones de cultivo empleadas permitieron detectar la acumulación temprana de PHB.

Los datos obtenidos en la cuantificación (Figura 20) muestran desviaciones estándar elevadas, esto puede atribuirse al grado de formación de agregados no visibles (flóculos). De acuerdo con Dufrene y Rouxhet (1996) *A. brasilense* incrementa de 30 a 50 % el contenido de proteína de superficie de la fase exponencial a estacionaria aumentando la adhesividad y por ende, formando agregados celulares, por lo que, cada cultivo analizado en el presente estudio, fue diferente en contenido y características celulares. Resultados similares fueron reportados por Barbosa (1998).

Sobreexpresión del gen *phbA* en *Azospirillum brasilense* Sp7

Teniendo el antecedente de la utilización de pMMB206 para la expresión de genes en *A. brasilense* Sp7 (Nagarajan *et al.* 2008) y en un intento por elevar la producción de

PHB mediante la sobreexpresión génica, el gen *phbA*, fue clonado en un vector de expresión inducible por IPTG. El plásmido resultante de la clonación, p206A, fue introducido en *A. brasilense* Sp7 obteniendo la cepa Ab7A.

Nagarajan *et al.* (2008) observaron la síntesis de carotenoides en *A. brasilense* Sp7 (cepa que carece de niveles detectables de carotenoides (Tarrand *et al.* 1978; Nur *et al.* 1981) luego de introducir el plásmido pAT5 (pMMB206-*rpoE*), indicando un nivel basal de la expresión en estado no inducido, mientras que en estado inducido (1 mM de IPTG), las células produjeron un intenso color anaranjado-rosa indicativo de la síntesis de carotenoides. Por lo anterior, en este estudio se realizó la inducción del promotor *Ptaclac* (contenido en p206A y p206B) empleando 0.5 mM de IPTG.

La cepa transconjugante Ab7A expresó el gen que codifica para la enzima β -cetotiolasa (*phbA*). Esta es la enzima clave en el metabolismo del PHB (Oeding y Schelegel, 1973), debido a que está involucrada en la reacción de condensación reversible de 2 moléculas de Acetil CoA, paso inicial en la síntesis del biopolímero. En este estudio, la sobreexpresión del gen *phbA* resultó en la acumulación similar de PHB tanto en cultivos inducidos como no inducidos. Sin embargo, la producción de PHB por la cepa Ab7A fue estadísticamente menor respecto a la reportada por la cepa Wt. Este comportamiento (menor acumulación de PHB) fue observado durante todas las etapas de cuantificación del biopolímero. Esto puede deberse a que la reacción enzimática de PhbA resulta en la liberación de CoA, lo cual disminuye la relación acetil-CoA/CoA ejerciendo efectos inhibitorios sobre la reacción de β -cetotiolasa. Además de que la enzima β -cetotiolasa está involucrada no sólo en la síntesis del polímero sino también en la utilización del mismo (Oeding y Schelegel, 1973).

Análisis BLASTN realizados con la secuencia genética de *A. brasilense* mostró que la cepa contiene dos genes *phbA*, por lo que se sugiere que la sobreexpresión de *phbA* en el vector pMMB206, pese a que es un vector de bajo número de copias (12 - 13 por bacteria; Morales *et al.* 1991) pudo haber ejercido efectos negativos en la cepa Ab7A como se reportó previamente por Bohmert *et al.* (2002) quienes al expresar el gen constitutivo *phbA* en plantas transgénicas, observaron una drástica reducción en la eficiencia de

transformación. De acuerdo a lo observado, los investigadores mencionan que los efectos tóxicos ejercidos por la expresión *phbA* podrían ser resultado de los intermediarios de la biosíntesis de PHB, del agotamiento del Acetil CoA o bien, por interacciones de β -cetotiolasa con otras proteínas. Sin embargo, resultaría interesante evaluar la actividad enzimática para corroborar el comportamiento de PhbA en ésta investigación.

Holguin y Glick, (2003) mencionaron que la transformación de *A. brasilense* Cd con plásmidos de alto peso molecular afecta la morfología y la tasa de crecimiento de la bacteria, tal como se observó en el presente. Esto podría explicar el comportamiento de Ab7A en las cinéticas de crecimiento realizadas (Figura 19) y en el tiempo de duplicación reportado (Tabla 8).

Sobreexpresión del gen *phbB* en *Azospirillum brasilense* Sp7

Existen pocos estudios acerca de la expresión del gen *phbB* para la producción de PHA's. Debido a ello, y con la finalidad de observar el comportamiento de la cepa *A. brasilense* cuando este gen es sobreexpresado, el gen *phbB* fue clonado en el vector pMMB206. Cabe destacar que el gen *phbB* no logró clonarse en su totalidad pese a todas las modificaciones realizadas a los procedimientos. Lo anterior nos llevó a buscar la causa por la que no se pudiera concretar la clonación. No se encontraron repetidos invertidos internos en el gen. Por otro lado, luego de que se demostró la presencia de una secuencia de inserción asociada a los genes *pha* en *Azotobacter* sp. FA8 (Pettinari *et al.* 2003), se optó por alinear el gen *phbB* con la base de datos IS FINDER sin encontrar identidad importante (datos no mostrados). Intentos posteriores de clonación utilizando pCR2.1TOPO, resultaron en 2 clonas probables. En la primera, el alineamiento de la secuencia nucleotídica mostró 99 % de identidad con el vector pCR2.1-sacB, el cual posee un marcador de contraselección basado en sacarosa (Rhol y Bruckbauer, sometido a revisión, 2013). Alineamientos de la secuencia nucleotídica de la segunda clona probable, mostraron identidad (98 %) con una DNA adenina metiltransferasa de *E. coli* K-12. Debido a que los datos mostrados por los análisis *in silico* no dilucidaron la causa de la no clonación, se realizaron análisis bioinformáticos en el fragmento de *phbB* clonado en pJET1.2/blunt.

Al analizar la secuencia del fragmento de *phbB* clonado inicialmente en pJET1.2/blunt, se encontró un 98 % de identidad con el gen *phbB* de *A. brasilense* Sp7 y cubre, casi en su totalidad, los dominios importantes de la proteína Acetoacetyl-CoA reductasa (Figura 13), por lo que se continuó con el proceso de manipulación genética utilizando el plásmido pJETB. La subclonación del fragmento de *phbB* en pMMB206 resultó en el plásmido p206B, el cual fue introducido en *A. brasilense* Sp7 obteniendo la transconjugante Ab7B.

La cepa transconjugante Ab7B se cultivó en las condiciones necesarias para propiciar la producción de PHB, MMKM con una relación C/N elevada. La cuantificación de PHB se realizó a las 0, 3, 6 y 9 h post-inducción, y adicionalmente, se estimó el contenido del biopolímero tras 72 h de cultivo (Figura 20), tiempo al cual se presenta la mayor acumulación del mismo (Barbosa, 1998). Los resultados muestran mayor contenido de PHB después de 3 y 9 h de inducción. Luego de 72 h, el contenido de PHB en la cepa Ab7B, disminuyó significativamente. Estos resultados pueden atribuirse a que, el contenido de la coenzima NADPH (necesaria para la reacción de Acetoacetyl-CoA reductasa) no estuvo en cantidad suficiente para reducir el sustrato (acetoacetyl-CoA) en la reacción enzimática. Por lo tanto, la producción de PHB en Ab7B a 72 h fue significativamente menor en el cultivo no inducido. Sin embargo, nulos resultados en la producción de PHB por aumento de las copias genéticas de *phbB* fueron reportados anteriormente por Bohmert *et al.* (2002), no obstante los autores no muestran evaluación de la actividad de PhbB, por lo que, es necesario ensayar la segunda reacción enzimática en la producción de PHB.

En contraste con los datos obtenidos en la cuantificación de PHB, la cepa Ab7-206 reportó una producción mayor o igual a la observada en las cepas recombinantes Ab7A y Ab7B. Este comportamiento fue similar al reportado por Sashidhar y Podile (2009), quienes encontraron los mismos efectos cuando sobreexpresaron el gen *gcd* (codificante para Glucosa deshidrogenasa) en el vector pMMB206 y lo movilizaron a *Azotobacter vinelandii*, introduciendo también el vector en *A. vinelandii* como control. Sus resultados mostraron efectos similares en la fijación de nitrógeno en ambas transconjugantes. Lo anterior, aunado a que se ha demostrado la participación del N en la producción de PHB, sugería la presencia de una secuencia involucrada con el metabolismo del nitrógeno. Sin embargo,

análisis BLASTN realizados con el vector pMMB206 no mostraron homología importante con las secuencias analizadas, descartando esa posibilidad.

La clonación de los genes *phbA* y *phbB*, y su expresión en *A. brasilense* mostró cambios importantes en la producción de PHB, sin embargo no se observó una clara relación directa entre el aumento de las copias de *phbA* y *phbB* y la producción del biopolímero, por lo que se infiere que la producción de PHB no se favorece por el aumento de los genes que codifican para β -cetotilasa y Acetoacetyl CoA reductasa.

CONCLUSIONES

- Se clonó el gen *phbA* en el vector de expresión pMMB206, conservando una identidad del 99 % con el gen que codifica para β -cetotiolasa en *A. brasilense* Sp7. El plásmido obtenido se denominó p206A.
- Se clonaron 1.8 kb del gen *phbB* en el vector pMMB206, el fragmento clonado presenta una identidad del 98 % con el gen codificante para la enzima Acetoacetyl CoA reductasa, conservando los dominios importantes para la actividad catalítica. El plásmido resultante se denominó p206B.
- Se obtuvieron las cepas transconjugantes *A. brasilense* Ab7A, Ab7B y Ab7-206.
- Bajo las condiciones ensayadas, las cepas recombinantes de *phbA* y de *phbB* no incrementaron la producción de PHB respecto a la cepa Wt.

PERSPECTIVAS

- Ensayar la actividad enzimática en las cepas transconjugantes obtenidas.

- Evaluar la posibilidad de clonar los genes en un vector de expresión que, por sí mismo, no altere la producción de PHB.

- Analizar la presencia de los intermediarios de la síntesis del biopolímero.

LITERATURA CITADA

1. **Aldor I, Keasling JD.** 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 475–483.
2. **Anderson AJ, Dawes EA.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450–472.
3. **Barbosa JX.** 1998. Estudio de la producción de PHB por una mutante de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. CICM. BUAP.
4. **Bashan Y, Holguin G.** 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* **43**: 103-121.
5. **Bashan Y.** 1999. Interactions of *Azospirillum* spp in solis. *Review Biol. Fertil. Soils* **29**: 246-256.
6. **Bergersen FJ, FRS, Turner GL.** 1990. Bacteroids from soybean root nodules: accumulation of poly- β -hydroxybutyrate during supply of malate and succinate in relation to N₂ fixation in floe-chamber reactions. *Proc. R. Soc. London B.* **240**: 39-59.
7. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol 2: The Proteobacteria.** Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR (Eds). 2nd ed. Springer US, 2005, XXVIII, 2816 págs. ISBN 0387950400, 9780387950402.
8. **Bohmert K, Balbo I, Steinbüchel A, Tischendorf G, Willmitzer L.** 2002. Constitutive expression of the ketothiolase gene in transgenic plants, a major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants, *Plant Physiol.* **128**: 1282-1290.
9. **Bright S, William J, Byrom D, Fentem PA.** 2003. Producción de polihidroxicanoatos en plantas. Metabolix, Inc. [Patente ES 2 182 819 T3]. Madrid; 2003.

10. **Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG.** 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* **100**: 5996–6009.
11. **Döbereiner J.** 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* **13**: 1–13.
12. **Dufrene YF, Rouxhet PG.** 1996. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense*—variation during growth. *Can J Microbiol.* **42** (6): 548-556.
13. **Ellar D, Lundgren DG, Okamura K, Marchessault RH.** 1968. Morphology of poly-beta-hydroxybutyrate granules. *J. Mol. Biol.* **35**:489-502.
14. **Eskew DL, Focht DD, Ting IP.** 1977. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 582–585.
15. **Fukui T, Ito M, Saito T, Tomita K.** 1987. Purification and characterization of NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera* 1-16-M. *Biochim. Biophys. Acta.* **917**:365-371.
16. **Gogolewski S, Jovanovic M, Perren S, Dillon J, Hughes M.** 1993. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J. Biomed. Mater. Res. A* **27**: 1135-1148.
17. **Griebel R, Smith Z, Merrick JM.** 1968. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **7**:3676–3681.

18. **Holguin G, Glick BR.** 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the *tetr* gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbiol Ecol* **46**: 122–133.
19. **Itzigsohn R, Yarden O, Okon Y.** 1995. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 73–76.
20. **Kadouri D, Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y.** 2002. Identification and isolation of genes involved in poly (β -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Appl. Environ. Microb.* **68** (6): 2943–2949.
21. **Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y.** 2003. Poly- β -hydroxybutyrate depolymerase (*PhaZ*) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch. Microbiol.* **180**: 309–318.
22. **Khanna S, Srivastava AK.** 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* **40**: 607–619.
23. **Kim YB, Lenz RW.** 2001. Polyesters from microorganisms, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**; 51–79.
24. **Koller M, Salerno A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G.** 2010. Modern biotechnological polymer synthesis: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **48** (3) 255-269.
25. **Law JH, Slepecky RA.** 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**: (1). 33-36.
26. **Lee SY.** 1996. Bacterial polyhydroalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 1-14.

27. **Lemoigne M.** 1926. Products of dehydration and of polymerization of P-hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **8**: 770-782.
28. **Madison L, Huisman GW.** 1999. Metabolic engineering of poly (3-hidroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **63**: 21-53.
29. **Magalhaes FM, Baldani JI, Souto SM, Kuykendall JR, Dobereiner J.** 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brasil Ciênc.* **55**: 417-430.
30. **Martínez CR.** 2014. Sobreexpresión del gen *phbC* y producción de Poli- β -hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. ICUAP-BUAP.
31. **Miller SA, Aylas DD, Polarslay AF.** 1988. A simple salting out procedure of extract DNA from human nucleotid cells. *Nucleic Acids Res.* **16** (3): 1215.
32. **Morales MV, Assar B, Michael B.** 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* **97**: 39-47.
33. **Nagarajan T, Mukti NM, Stijn S, Jos V, Carol AG, Anil KT.** 2008. An extra-cytoplasmic function sigma factor and anti-sigma factor control carotenoid biosynthesis in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* **154**: 2096-2105.
34. **Oeding V, Schlegel HG.** 1973. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* **134**(1):239–248.
35. **Okon Y, Albrecht SL, Burris RH.** 1976. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **128**: 592-597.

36. **Okon Y, Itzigsohn R.** 1992. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 131-140.

37. **Parlane NA, Grage K, Mifune J, Basaraba RJ, Wedlock DN, Bernard HA, Rehm BHA, Buddle BM.** 2012. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19** (1): 37.

38. **Peoples OP, Sinskey AJ.** 1989. Fine structural analysis of the *Zoogloea ramigera phbA-phbB locus* encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase: nucleotide sequence of *phbB*. *Mol. Microbiol.* **3**:349-357.

39. **Peoples OP, Masamune S, Walsh CT, Sinskey AJ.** 1987. Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. 111. Isolation and characterization of the structural gene. *J. Biol. Chem.* **262**:97-102.

40. **Pereg L, Gilchrist K, Kennedy I.** 2000. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*- wheat associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5): 2175-2184.

41. **Pettinari MJ, Chaneton L, Vazquez G, Steinbüchel A, Mendez BS.** 2003 Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid* **50**: 36-44.

42. **Poirier Y, Erard N, Petétot J.** 2001. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid β -oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5254-5256.

43. **Poirier Y, Nawrath C, Somerville C.** 1995. Production of polyhydroxyalkanoates a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. *Biotechnology* **13**: 142-150.
44. **Prieto MA, de Eugenio LI, Galan B, Luengo JM, Witholt B.** 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates, p. 397-428. *In* Ramos, J.L. y Filloux, A. (ed.), *Pseudomonas: a model system in biology*, vol. V. Springer, Berlin, Germany.
45. **Rai R, Keshavarz T, Roether JA, Boccaccini AR, Roy I.** 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater Sci. Eng. R.* **72**: 29–47.
46. **Ramírez CLM.** 2013. Aislamiento y caracterización de cepas mutantes nulas del gen *OppA* en *Yersinia pseudotuberculosis*. Tesis de Maestría. ICUAP-BUAP.
47. **Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC.** 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technol.* **87**:137–146.
48. **Rehm BHA.** 2003. PHA synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* **376**, 15-33.
49. **Reinhold B, Hurek T, Fendrik I.** 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* **162**: 190-195.
50. **Sadasivan L, Neyra CA.** 1985. Cysts of *Azospirilla* under various cultural conditions, p. 230–242. *In* W. Klingmüller (ed.), *Azospirillum*. III. Genetics, Physiology, Ecology. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
51. **Sadasivan L, Neyra CA.** 1987. Cyst Production and Brown Pigment Formation in Aging Cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* **169**(4): 1670–1677.

52. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
53. **Sashidhar B, Podile AR.** 2009. Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. *J. Microbial Biotech* 2 (4), 521–529.
54. **Shuto H, Fukui T, Saito T, Shirakura V, Tomita K.** 1981. An NAD-linked acetoacetyl CoA reductase from *Zoogloea ramigera* 1-16-M, *Eur. J. Biochem.* **118**: 53-59.
55. **Simon R, Priefer U, Pühler A.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology.* **1**: 784-790.
56. **Slater S, Houmiel KL, Tran M, Mitsky TA, Taylor NB, Padgett SR, Gruys KJ.** 1998. Multiple β -ketothiolases mediate poly- β -hydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 180(8): 79-87.
57. **Steenhoudt O, Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 487-506.
58. **Stubbe J, Tian J.** 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 445-457.
59. **Sun J, Peng X, Van I, Vanderleyden J.** 2000. The *ntrB* and *ntrC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 113-117.

60. Sun J, Dommelen A, Van I, Vanderleyden J. 2002. Involvement of *glnB*, *glnZ* y *glnD* genes in the regulation de poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2): 985-988.
61. Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants-review. *Biotechnol. Adv.* **25**:148–175.
62. Tal S, Okon Y. 1985. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Microbiol.* **31**: 608-613.
63. Tarrand JJ, Krieg NR, Dobereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov., and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **24**: 967-980.
64. Tian W, Hong K, Chen G, Wu Q, Zhang R, Huang W. 2000. Production of polyesters consisting of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas mendocina* 0806 from various carbon sources. *Antonie van Leeuwenhoek.* **77**: 31–36.
65. Tian J, Sinskey A, Stubbe J. 2005. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J. Bacteriol.* **187**: 3814-3824.
66. Tsuge T, Imazu S, Takase K, Taguchi S. 2004. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from *Delftia acidovorans* DS-17: its deletion effects and relation to cellular proteolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:77–83.
67. Williams SF, Palmer MAJ, Peoples OP, Walsh CT, Sinskey AJ, Masamune S. 1992. Biosynthetic thiolase from *Zooglea ramigera*. *J. Biol. Chem.* **267**: 16041-16043.

- 68. Wong YM, Brigham CJ, Rha C, Sinskey AJ, Sudesh K.** 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technol.* **121**: 320-327.

ANEXO I. Curva de calibración BSA

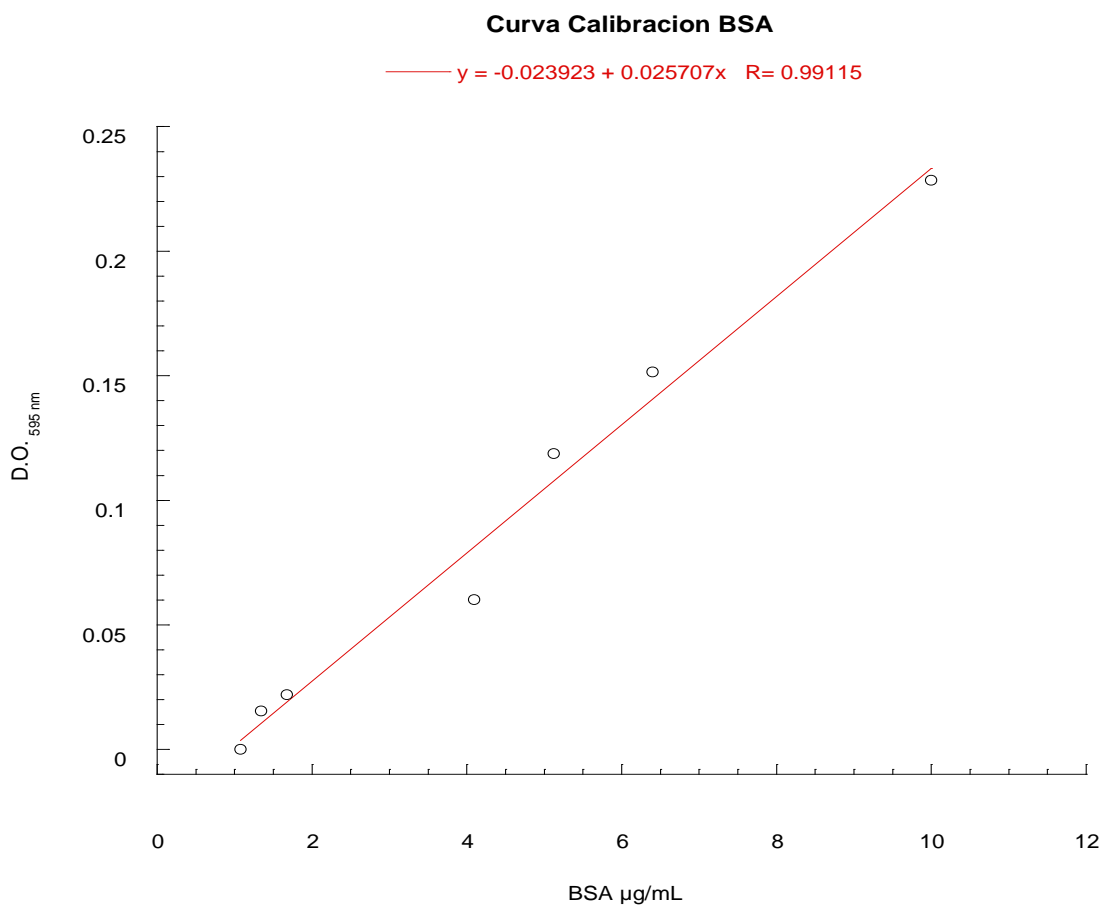


Figura 21. Curva de calibración BSA por el método de Bradford.

ANEXO II. Curva de calibración PHB

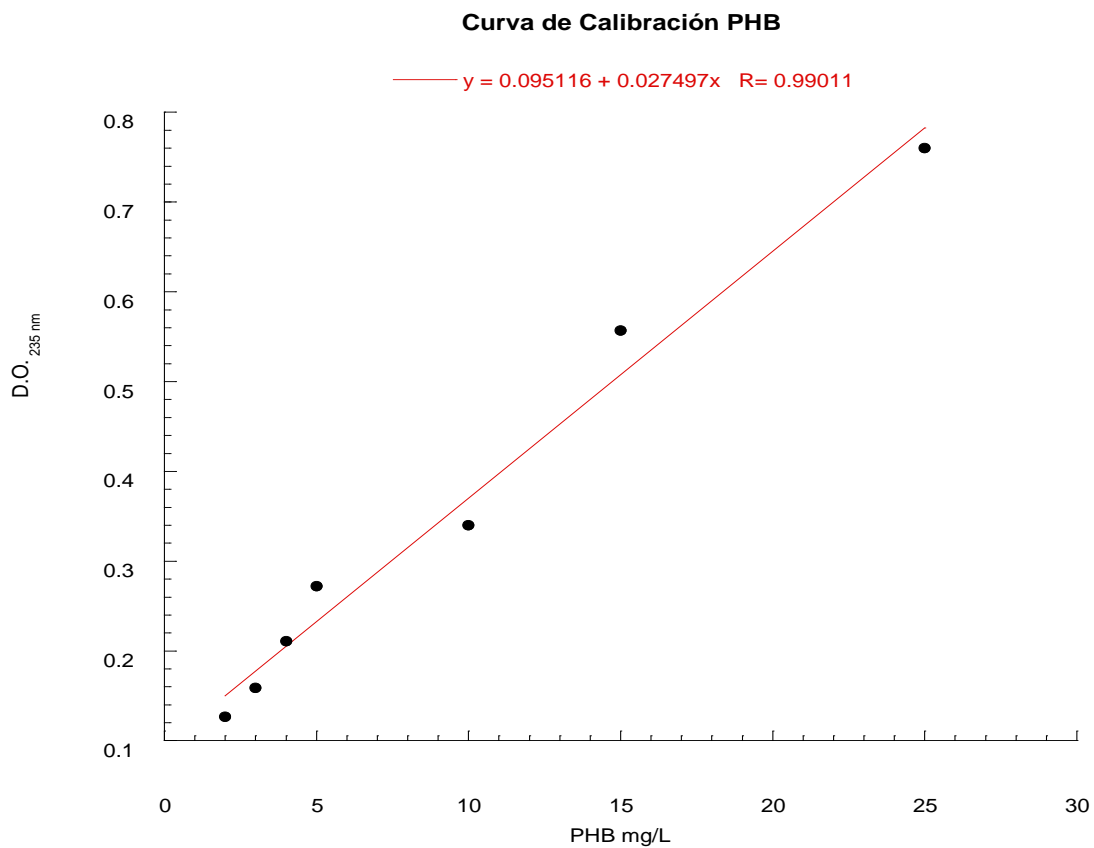


Figura 22. Curva de calibración PHB por el método de digestión ácida (Law y Slepecky, 1961).

ANEXO III. Preparación de medios de cultivo

I. Medio Luria Bertani (LB)

Reactivos para 1 L de medio LB

	Medio líquido	Medio sólido
➤ Extracto de levadura	5 g	5 g
➤ NaCl	10 g	10 g
➤ Peptona de caseína	10 g	10 g
➤ Agar	----	15 g
➤ Agua	Aforar a 1 L.	Aforar a 1 L.

Ajustar pH 7.0 antes de adicionar el agar. Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

II. Medio Mínimo K-Malato (MMKM)

Reactivos para 1 L de MMKM Preparar sales, oligoelementos y base K-Malato por separado.

Sales	Oligoelementos	
CaCl ₂ 0.7%	MnSO ₄	2.5 g
FeCl ₃ 1%	ZnSO ₄	0.7 g
NaMoO ₄ 0.5%	CoSO ₄	0.14 g
NH ₄ Cl 20%	CuSO ₄	0.125 g
	H ₃ BO ₄	0.03 g
	Agua	Aforar a 100 mL.

Base K-Malato

➤ KH ₂ PO ₄	0.87 g
➤ K ₂ HPO ₄	1.67 g
➤ MgSO ₄	0.29 g
➤ NaCl	0.48 g
➤ Acido Málico	4.5326 g
➤ Agua	Aforar a 973 mL

Ajustar pH 6.9. Esterilizar sales, oligoelementos y base K-Malato por separado 5 lb durante 30 min.

Posteriormente adicionar sales y oligoelementos estériles:

➤ CaCl ₂ 0.7%	10 mL
➤ FeCl ₃ 1%	1 mL
➤ NaMoO ₄ 0.5%	5 mL
➤ NH ₄ Cl 20%	1 mL
➤ Oligoelementos	10 mL

III. Medio SOC

Composición para medio de cultivo SOC

➤ Triptona	2 %
➤ Extracto de levadura	0.5 %
➤ NaCl	10 mM
➤ KCl	2.5 mM
➤ MgCl ₂	10 mM
➤ MgSO ₄	10 mM
➤ Glucosa	20 mM

Ajustar a pH 7.0. Esterilizar 15 lb durante 15 min. Almacenar a 4 °C

IV. Medio Difco

Reactivos para 1 L de medio Difco

➤ KCl	1 g
➤ MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
➤ MnCl ₂ .4H ₂ O	0.01 g
➤ Caldo Difco	8 g
➤ Agar bacteriológico	1%

Ajustar a pH 6.8 antes de adicionar el agar. Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

V. Medio Rojo Congo (RC)

Reactivos para 200 mL de medio RC.

➤ Acido Málico	1 g
➤ Extracto de Levadura	0.1 g
➤ K ₂ HPO ₄ 10%	1 mL
➤ MgSO ₄ 10%	4 mL
➤ NaCl 10%	0.2 mL
➤ FeCl ₃ 1%	0.28 mL
➤ Na ₂ MoO ₄ 0.1%	0.4 mL
➤ KOH	0.96 g
➤ Rojo Congo (1:400)	3 mL
➤ Agar Bacteriológico	3 g

Ajustar pH 6.8 antes de adicionar el indicador Rojo Congo y el agar. Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

ANEXO IV. Técnicas de laboratorio

I. Extracción de DNA genómico (Miller *et al.* 1988)

- Inocular una colonia de la cepa de interés en MMKM o LB con el antibiótico de selección.
- Incubar toda la noche a la temperatura óptima de crecimiento y a 175 rpm.
- Centrifugar 3 mL de cultivo y descartar el sobrenadante.
- Adicionar 570 mL de la solución SET, y resuspender el paquete celular.
- Agregar 30 µL de SDS 30 %. Agitar en vórtex durante 1 min.
- Incubar 5 min a 80 °C, dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 200 µL de NaCl 5 M y mezclar.
- Centrifugar 10 min a 12,000 rpm. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo.
- Agregar 1 vol de isopropanol. Mezclar y almacenar 10 min a -20 °C.
- Centrifugar 10 min a 12,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Lavar con 1 mL de Etanol 70 %. Centrifugar 5 - 7 min a 12,000 rpm. Repetir lavado. Descartar sobrenadante.
- Dejar secar completamente la pastilla.
- Resuspender en agua con RNAsa
- Incubar a 37 °C durante 30 min.
- Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1 % cargando una muestra del DNA extraído. Correr a 5 V/cm.
- Teñir el gel de agarosa en Et-Br. Revelar con luz UV.

II. Protocolo de extracción de banda en gel de agarosa (Zymoclean gel DNA Recovery kit)

- Pesar un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Cortar el agarosa correspondiente al fragmento de interés. Y colocarla en el tubo previamente pesado.
- Pesar nuevamente el tubo eppendorf y calcular el peso de la agarosa.
- Añadir 3 vol de la solución ADB e incubar a 55 °C durante 15 min o hasta que se funda la agarosa.
- Verter el contenido del eppendorf en una columna y centrifugar 1 min a máxima velocidad. Repetir cuantas veces sea necesario.
- Lavar la columna con 200 µL de la solución de lavado. Centrifugar 30 s a máxima velocidad. Repetir lavado 2 o 3 veces.
- Colocar la columna en un tubo eppendorf estéril nuevo. Agregar 6-15 µL de agua PISA estéril previamente calentada a 70 °C. Centrifugar 1 min a máxima velocidad.
- Realizar electroforesis de 1-3 µL del DNA extraído y correr a 5 V/cm.

III. Protocolo de elaboración de células químicocompetentes (Ramírez, 2013)

- Estriar una colonia de la cepa de interés en una placa de medio LB con agar, conteniendo el antibiótico de selección. Cultivar toda la noche a 37 °C.
- Inocular una colonia de la cepa de interés en un tubo con 5 mL de medio LB con antibiótico. Cultivar toda la noche a 37° C y 200 rpm.
- A partir del precultivo anterior, inocular un matraz conteniendo 100 mL de medio líquido LB y el antibiótico de resistencia. Cultivar a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una D.O._{.600 nm} de 0.4 - 0.5.
- Mantener el cultivo en hielo 20 min.
- Cosechar el cultivo centrifugando 15 min a 4 °C y 5000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla en 10 mL de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M.
- Alicuotar la suspensión anterior en 10 tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Mantener las alícuotas en hielo por 15 minutos.
- Cosechar el cultivo por centrifugación durante 1:30 min a 10,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla en 1 mL de la solución fría de CaCl₂. Mantener en hielo 15 minutos.
- Repetir los 2 últimos pasos 5 veces.
- En el 5^{to} lavado, cosechar el cultivo. Descartar sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µL de una solución fría de CaCl₂ 0.1M con glicerol 15%.
- Almacenar a -70 °C.

IV. Protocolo de transformación bacteriana (Sambrook *et al.* 1989)

- Agregar 1 µg de la construcción plasmídica en 100 µL de células químiocompetentes cuidadosamente descongeladas. Resuspender (no pipetear). Mantener en hielo 30 - 40 min.
- Aplicar choque térmico a 42 °C durante 45 - 90 s.
- Mantener en hielo durante 2 min.
- Agregar 250 µl de medio líquido LB precalentado a 42 °C.
- Incubar 1:30 - 2:00 h a 37 °C y a 200 rpm para favorecer la recuperación de las células.
- Espatular el contenido en 2 placas de medio LB con los antibióticos de selección. Incubar toda la noche a 37 °C.
- Analizar las clonas obtenidas.

V. Extracción de DNA plasmídico (Miniprep) (Sambrook *et al.* 1989)

- Estriar una colonia de la cepa de interés en una placa de medio LB con agar, conteniendo el (los) antibiótico (s) apropiados. Cultivar toda la noche a 37 °C.
- Inocular una colonia de la cepa de interés en un tubo con 5 mL de medio LB con antibiótico. Cultivar toda la noche a 37° C y 200 rpm.
- Centrifugar 3 mL de cultivo durante 5 minutos y a 12,000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y retirar exceso de medio.
- Resuspender en 200 µL de la Solución I.
- Agregar 400 µL de la Solución II y mezclar por inversión hasta obtener una solución viscosa y transparente.
- Añadir 300 µL de la Solución III y mezclar por inversión.
- Mantener 10 min en hielo.
- Centrifugar 10 min a 12,000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril.
- Adicionar 500 µL de Isopropanol, mezclar vigorosamente. Almacenar 10 - 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 min a 12,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Lavar la pastilla 2 veces con 1 mL de etanol 70 %, centrifugando 5-7 min a 12,000 rpm.
- Remover completamente el etanol, dejar secar la pastilla.
- Resuspender cuidadosamente en 35 - 75 µL de solución de RNAsa 40 µg/ml (996 µL de agua PISA estéril adicionados con 4 µL de RNAsa 10mg/mL).
- Incubar a 37 °C durante 30 min.

VI. Purificación de plásmido (Modificado por Martínez, 2014)

- Después de incubar la muestra de plásmido, aforar a un volumen final de 250 μ L usando agua PISA estéril.
- A la suspensión anterior, agregar un vol de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar vigorosamente en vórtex. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm.
- Separar la fase superior en un tubo eppendorf estéril y agregar un vol de cloroformo. Agitar vigorosamente y centrifugar 5 min a 12,000 rpm.
- Separar la fase superior en otro tubo eppendorf y agregar 0.5 vol de Acetato de amonio 7.5 M y 1 vol de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar vigorosamente y centrifugar 10 min a 12,000 rpm.
- Separar la fase superior en tubo eppendorf y agregar 1 vol de cloroformo. Agitar vigorosamente y centrifugar 5 min a 12,000 rpm.
- Separar la fase superior a tubo eppendorf y agregar 2 vol de etanol absoluto frío y 1 vol de isopropanol.
- Refrigerar la muestra durante 20 - 30 min.
- Centrifugar durante 10 min a 12,000 rpm y descartar sobrenadante.
- Lavar la pastilla 2 veces con 1 mL de etanol 70 %, centrifugando 5 - 7 min a 12,000 rpm.
- Descartar sobrenadante, dejar evaporar el excedente de etanol. Hidratar con agua PISA estéril.
- Almacenar a -20 °C.

VII. Determinación cuantitativa de PHB (Law y Sleepecky, 1961)

- Estriar una colonia de la cepa de interés en una placa de medio RC con agar, conteniendo el (los) antibiótico (s) apropiados. Cultivar en las condiciones de crecimiento apropiadas.
- Inocular una colonia de la cepa de interés en un tubo con 5 mL de MMKM con el (los) antibiótico (s) apropiados. Cultivar 10 - 12 h a 30 °C y 175 rpm.
- Usando el precultivo anterior, inocular un matraz de 25 mL de MMKM con antibiótico (s), mediante la fórmula del equilibrio de concentraciones ($C_1V_1=C_2V_2$), para obtener una DO_{600 nm} de 0.1.
- Incubar a 30 °C y 175 rpm durante 72 h.
- Centrifugar 5 mL de cultivo durante 6 min a 8,000 rpm. Descartar sobrenadante.
- Lavar el paquete celular con 1 mL de MgSO₄ 10 mM. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el paquete celular en 1.5 mL de hipoclorito de sodio (Cloralex) e incubar 1.5 h a 37 °C y 200 rpm.
- Centrifugar 10 min a 12,000 rpm y descartar cuidadosamente el sobrenadante.
- Lavar la pastilla con 1 mL de agua destilada. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Descartar sobrenadante.
- Lavar la pastilla con 1 mL de acetona. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Descartar sobrenadante.
- Lavar la pastilla con 1 mL de etanol 100 %. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Descartar sobrenadante. Dejar evaporar totalmente el etanol.
- Resuspender la pastilla en 1 mL de cloroformo y pasar la solución a un tubo de vidrio de 12 mL. Enjuagar el eppendorf con 1 mL de cloroformo y verterlo en el tubo de vidrio.
- Evaporar el cloroformo a 65 °C. Adicionar 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Mantener a 95 °C, durante 30 min y dejar enfriar.
- Leer absorbancia a 235 nm (luz UV) frente a una muestra blanco de H₂SO₄ concentrado y calentado previamente durante 30 min a 95 °C.

ANEXO V. Preparación de soluciones

Preparación de antibióticos

- **Ampicilina (Ap):** preparar stock de 100 mg/mL en agua tridestilada. Esterilizar por filtración usando filtros de 22 μ m. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 100 μ g/mL.
- **Cloranfenicol (Cm):** preparar stock de 35 mg/mL en etanol 100%. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 35 μ g/mL.
- **Estreptomicina (Sm):** preparar a 20 mg/mL en agua tridestilada. Esterilizar por filtración usando filtros de 22 μ m. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 20 μ g/mL.
- **Ácido Nalidíxico (Nx):** preparar stock de 15 mg/mL en agua tridestilada. Disolver con 40 μ L de NaOH 10 M. Esterilizar por filtración usando filtros de 22 μ m. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 15 μ g/mL.
- **Tetraciclina (Tc):** preparar a 5 mg/mL en etanol 70%. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 10 μ g/mL.

Preparación de soluciones

- Solución RNAsa (10 mg/ mL): Disolver en agitación 20 mg del enzima en 10 ml de agua destilada, calentar a 90 °C durante 10 min para inactivar DNAsas. Alicuotar y guardar a - 20 °C. La solución de trabajo se prepara adicionando 4 µL del stock a 996 µL de Agua PISA estéril.

- Solución Proteinasa K (20 mg/ mL): Disolver en agitación 100 mg de proteinasa K en 5 ml de agua destilada estéril. Alicuotar y guardar a - 20 °C.

Buffer PBS 1X

Composición Buffer PBS

➤ NaCl	137 mM
➤ KCl	2.7 mM
➤ Na ₂ HPO ₄	10 mM
➤ KH ₂ PO ₄	1.8 mM

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa

Buffer TAE 50 X pH 8.0

Tris base	242 g
Ác. acético glacial	57.1 mL
EDTA	37.2 g
Agua	Aforar a 1 L

Buffer de carga 6X

Marcador 1 kb plus

Azul de bromofenol	0.25 %	DNA ladder	10 µL
Xilene Cianol	0.25 %	Buffer de carga 6X	10 µL
Glicerol	30 %	Agua	40 µL
Agua	Aforar a 10 mL		

Soluciones para Miniprep y Maxiprep

Solución I		Solución II		Solución III	
Glucosa	50 mM	SDS	0.2 N	Ác. Acético	11.5 mL
Tris-HCl	25 mM	NaOH	1%	Acetato de Potasio 5M	60 mL
EDTA	10 mM			Agua	28.5 mL

Soluciones para extracción de banda

Buffer ADB (Buffer de Unión a DNA)		Buffer de lavado	
Tiocianato de guanidina	5 M	NaCl	25 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0	Etanol	80 %