



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**ESTUDIO DEL SISTEMA *Rsm* EN LA PRODUCCIÓN  
DE POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO EN CEPAS  
MUTANTES *pycA* DE *Azotobacter vinelandii***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:  
**C. AIDÉ RODRÍGUEZ CORTÉS**

DIRECTORA DE TESIS:  
**D. C. LILIANA LÓPEZ PLIEGO**

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
**D. C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO**

PUEBLA, PUE DICIEMBRE, 2024



**Asunto: Aprobación de Tesis**

Fecha: 9 de diciembre 2024

Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

*Presente*

Hago constar que la estudiante

**Rodríguez Cortés Aidé** con matrícula número: **201844897** y perteneciente a la licenciatura en Biotecnología, me entregó su trabajo de tesis el cual se titula “**Estudio del sistema Rsm en la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato en cepas mutantes *pycA* de *Azotobacter vinelandii*”**, después de haber revisado la tesis en su totalidad puedo concluir que el trabajo realizado es aceptable para que **Aidé Rodríguez Cortés** proceda a realizar sus trámites de titulación para obtener el grado de Biotecnólogo.



---

**Dra. Liliana López Pliego**  
Director de tesis



---

**Aidé Rodríguez Cortés**  
Sustentante del proyecto

## DEDICATORIA

### **A mis abuelos:**

Alfonso Cortés Medrano e Hilda Huerta Flores, gracias por alentar los objetivos de mi madre; a Candelaria (Hermelinda) porque a pesar de las dificultades siempre apoyaste a mi abuela Hilda y a mi madre; al abuelo Dolores Huerta por ser la voz de tus paisanos y luchar por sus derechos; a Elisa Flores pues tu sabiduría aún sigue presente con cada consejo y palabra de aliento que le diste a mi madre.

A María Romero Vidal por permanecer siempre fuerte como mujer, esposa y madre; y a Adrián Rodríguez Mendoza por dejarme a través de mi padre tantas enseñanzas, por tu entrega y compromiso constante para hacer que todo funcionara de la mejor manera, y por las narraciones fantásticas que nos dejaste.

### **A mis padres:**

Gracias por ser siempre mi fortaleza, por sus consejos, y por las anécdotas maravillosas sobre los lugares de los que formaron parte como guías en la vida de tantos niños.

A mi tío Ignacio A. R. R. por todo el apoyo que nos has brindado en esta etapa como foráneos.

### **A mi hermana:**

Gracias por todo el amor que me das, por los ratitos de diversión que compartimos en el jardín o disfrutando de la comida; por dejarme ser parte de tus proyectos y de tu arte.

### **A la danza:**

Gracias a mis profesores y amigos de los grupos de danza folklórica "Halcones" y de la BUAP por todos los momentos felices e inigualables que he pasado en cada ensayo y en las presentaciones a lo largo de los años.

### **A mis amigos:**

Dianita, Laura, Ale, Steven R., Luis y Enrique por todos los momentos compartidos, siempre están en mi mente y mi corazón.

A Yolito, Yuyito, Güerito y Luna por su cariño incondicional.

*A la ciencia por permitirme vivir cada día.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por proporcionarme los espacios y la formación necesaria para culminar la licenciatura.

A mi directora de tesis, Dra. Lili gracias por permitirme ser parte de este proyecto, por guiarme, por su tiempo y paciencia, y brindarme las herramientas necesarias para culminar esta investigación.

A mi codirector de tesis, Dr. Migue gracias por darme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana y por sus valiosas aportaciones sobre la realización de este trabajo.

A las Dras. Dalia y Paulina, por su disposición para la revisión de este proyecto.

A los docentes de la licenciatura en Biotecnología, gracias por su dedicación y su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio: Ara, Clau, Fer, Itzel, Pao, Aby, Juan Carlos, Cris, Arantxa y Yareth, gracias a todos por su compañerismo, sus buenos deseos y por las tardes que pasamos en el laboratorio.

A mis amigos de la licenciatura: Kary, Etza, pero en especial a Elda, Oliany, Zoe y la tía Alex por ser parte de esta etapa en mi vida, por los momentos que pasamos haciendo proyectos juntos, y por nuestras largas conversaciones sobre todo y todos.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	i
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Biopolímeros como alternativa a los materiales plásticos convencionales .....	1
1. 2. Polihidroxicanoatos .....	2
1.3. Poli-Beta-Hidroxi-butirato (PHB) .....	3
2. ANTECEDENTES GENERALES .....	7
2.1. <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	7
2.1.1. Generalidades .....	7
2.1.2. Ciclo de vida .....	9
2.2. Ruta biosintética de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	10
2.3. Regulación metabólica de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	11
2.3.1. La enzima $\beta$ -cetotilasa .....	11
2.3.2. La enzima Piruvato Carboxilasa .....	12
2.4. Regulación genética de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	13
2.4.1. La transcripción del operón biosintético <i>phbBAC</i> .....	13
2.4.2. Los reguladores PhbR y RpoS .....	13
2.4.3. El sistema de regulación postranscripcional Rsm .....	14
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	19
3.1. Generación de la mutante <i>E<math>\Delta</math>algD::Km<math>\Delta</math>rsmA::Sm</i> .....	19
3.2. Generación de la mutante <i>E<math>\Delta</math>algD::Sp-pycA::Km</i> .....	22
3.3. Generación de la mutante <i>E<math>\Delta</math>algD::Sp-pycA::Km<math>\Delta</math>rsmA::Gm</i> .....	23
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
5. JUSTIFICACIÓN .....	25
6. HIPÓTESIS .....	25
7. OBJETIVOS .....	25
8. RESULTADOS .....	26
8.1. Comprobación de las mutantes en <i>rsmA</i> .....	26
8.2. Efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de PHB .....	27
8.2.1. Efecto de las fuentes gluconeogénicas sobre la producción de PHB .....	27

8.2.2. Efecto de las fuentes glucolíticas sobre la producción de PHB .....	29
8.3. Efecto de las mutaciones en los genes <i>algD</i> , <i>pycA</i> y <i>rsmA</i> sobre la producción de PHB .....	30
8.3.1 Cuantificación de PHB en medio líquido .....	30
8.3.2 Cuantificación de PHB en medio sólido .....	32
8.3.3. Influencia de la transferencia de oxígeno en el medio para la producción de PHB .....	34
9. DISCUSIÓN .....	35
10. CONCLUSIONES .....	37
11. PERSPECTIVAS .....	38
12. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
12.1. Medios de cultivo .....	39
12.2. Material biológico .....	40
12.3. Procedimientos de manejo de ácidos nucleicos .....	40
12.4. Métodos analíticos para la cuantificación de PHB .....	42
13. BIBLIOGRAFÍA .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Esquema de un gránulo de PHA. ....	3
<b>Fig. 2.</b> Estructura química del poli-β-hidroxi butirato. ....	4
<b>Fig. 3.</b> Productos comerciales fabricados con Biopol™. ....	5
<b>Fig. 4.</b> Productos comerciales fabricados con la línea de biopolímeros PHACT™. ....	6
<b>Fig. 5.</b> Micrografía electrónica de un quiste de <i>A. vinelandii</i> después de un período de diferenciación de 5 días. ....	9
<b>Fig. 6.</b> Micrografía electrónica de una célula vegetativa de <i>A. vinelandii</i> en división antes del enquistamiento. ....	9
<b>Fig. 7.</b> Esquema del Ciclo de Vida de <i>A. vinelandii</i> . ....	10
<b>Fig. 8.</b> Ruta biosintética de PHB y sus relaciones metabólicas en <i>Azotobacter vinelandii</i> . ....	11
<b>Fig. 9.</b> Regulación genética de la ruta biosintética de PHB en <i>A. vinelandii</i> . ....	13
<b>Fig. 10.</b> CsrA activa la glucólisis y reprime la gluconeogénesis y el ciclo del ácido tricarbóxico en <i>E. coli</i> . ....	16
<b>Fig. 11.</b> Interacción de RsmA con la región reguladora de <i>phbB</i> y <i>phbR</i> . ....	17
<b>Fig. 12.</b> Mecanismo general del sistema de regulación postranscripcional Rsm. ....	18
<b>Fig. 13.</b> La acumulación excesiva de glucógeno en la mutante $\Delta csrA::cat$ perjudica la viabilidad en fuentes de carbono glucolíticas. Las ....	20
<b>Fig. 14.</b> Cuantificación de alginato A) y PHB B) en la cepa silvestre (AEIV), la cepa que contiene el plásmido pKT 230 (AEIV / pKT 230), y la cepa AEIV / pKT 0.3 <i>rsmA</i> (derivada de la AEIV que porta un plásmido con la región estructural del gen <i>rsmA</i> ). ....	21
<b>Fig. 15.</b> Análisis de qRT-PCR de las transcripciones de <i>phbR</i> (a) y <i>phbB</i> (b) utilizando ARN aislado de cultivos de las cepas UW136 y <i>AhrsMA</i> . ....	22
<b>Fig. 16. A)</b> Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en <i>pycA</i> . <b>B)</b> Acumulación de PHB por las cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> UW136 (barras rellenas) y la mutante con una inserción mini-Tn5 en <i>pycA</i> (barras con líneas) ....	23
<b>Fig. 18.</b> Efecto de las mutantes sobre la producción de PHB, en medio sólido Burk (paneles superiores) y PY (paneles inferiores) adicionados con 2% de las fuentes de carbono gluconeogénicas. ....	28
<b>Fig. 19.</b> Efecto de las mutantes sobre la producción de PHB, en medio sólido Burk (paneles superiores) y PY (paneles inferiores) adicionados con 2% de las fuentes de carbono glucolíticas. ....	29
<b>Fig. 20.</b> Cuantificación de la producción de PHB en presencia de fructosa sacarosa, glucosa o succinato (2%) como fuente de carbono en medio líquido PY en las mutantes $E\Delta algD::Sp$ , $EpycA$ , $E\Delta rsmA::Sm$ y $EpycA\Delta rsmA$ de <i>A. vinelandii</i> . ....	31

<b>Fig. 21.</b> Cuantificación de la producción de PHB en presencia de fructosa, sacarosa o glucosa (2%) como fuente de carbono en medio sólido PY en las mutantes <i>EΔalgD::Sp</i> , <i>EpycA</i> , <i>EΔrsmA::Sm</i> y <i>EpycAΔrsmA</i> de <i>A. vinelandii</i> .....	33
<b>Fig. 22.</b> Comparación de la producción de PHB en medio PY sólido y líquido (adicionado con 2% de fructosa, sacarosa o glucosa) en las mutantes <i>EΔalgD::Sp</i> , <i>EpycA</i> , <i>EΔrsmA::Sm</i> y <i>EpycAΔrsmA</i> de <i>A. vinelandii</i> .....	34

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, Gram negativa, fijadora de nitrógeno en condiciones aeróbicas. Produce metabolitos secundarios de interés biotecnológico relacionados con la diferenciación morfológica que sufre esta bacteria para formar quistes, entre ellos encontramos el exopolisacárido alginato y el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). El PHB cumple con los criterios para denominarse como bioplástico: se produce a partir de fuentes renovables, es biodegradable y biocompatible; por lo tanto, es un candidato prometedor para la elaboración de productos que actualmente son manufacturados predominantemente con plásticos a base de materiales petroquímicos, además su expansión desempeñaría un papel clave en la reducción de las consecuencias ecológicas adversas y la huella ambiental generada por el uso de plásticos convencionales de origen fósil. Sin embargo, la producción de PHB a gran escala conlleva altos costos de producción, unas diez veces mayores que el de los plásticos petroquímicos. Para reducir costos de producción e incrementar la acumulación intracelular del biopolímero, las investigaciones recientes se enfocan en la optimización de las condiciones de cultivo y en estudiar los sistemas que regulan su producción.

Se ha demostrado que la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* es regulada a través de diferentes niveles de regulación. El sistema de regulación postranscripcional Rsm participa en la regulación de la producción de alginato y PHB, en este sistema la proteína RsmA actúa como represor de la expresión de los RNA mensajeros de los genes *algD*, *phbB* y *phbR* que son claves en la producción de alginato y PHB. El gen *phbR* codifica el activador transcripcional PhbR que activa la transcripción de *phbB* y consecuentemente del operón *phbBAC*, la posterior traducción del RNA mensajero de *phbBAC* da origen a las enzimas que participan en la biosíntesis de PHB a partir del acetil-CoA. Además, a nivel metabólico la síntesis de PHB en esta bacteria se ha relacionado con el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA): en condiciones de crecimiento equilibradas, el acetil-CoA se incorpora principalmente en el ciclo TCA. El acetil-CoA se forma a partir de piruvato, este último también participa en la formación de oxalacetato a través de la actividad de la enzima piruvato carboxilasa (PYC), los genes *pycA* y *pycB* codifican las dos subunidades de esta enzima en *A. vinelandii*. Posteriormente el acetil-CoA se condensa con oxalacetato para generar citrato, producto que permite continuar el ciclo TCA, con lo cual se restringe el flujo del acetil-CoA hacia la síntesis de PHB. Sin embargo, en condiciones de desequilibrio como el suministro limitado de nutrientes (nitrógeno o fósforo) vitales para el crecimiento y en presencia de un exceso de

fuentes de carbono, se limita el flujo del acetil-CoA hacia el ciclo TCA, permaneciendo disponible para la vía de síntesis de PHB.

Previo a este trabajo, en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana se generó una mutante por remoción total del gen *rsmA* sobre el fondo genético de la cepa silvestre AEIV, la ausencia de *rsmA* ocasionó que la síntesis de alginato estuviera fuertemente favorecida, reduciendo el flujo de carbono hacia la síntesis de PHB y el ciclo TCA. Por tal motivo, se construyó una mutante no productora de alginato ( $E\Delta algD$ ) a través de la remoción del gen *algD* para dirigir la fuente de carbono hacia la síntesis de PHB; sobre este fondo genético se generaron las mutantes individuales  $E\Delta algD\Delta rsmA::Sm$  y  $E\Delta algD::pycA$ , y la triple mutante  $E\Delta algD::pycA\Delta rsmA$  a partir de la mutación conjunta de la proteína represora RsmA y la subunidad A de la enzima PYC, con el objetivo de generar una cepa super productora de PHB.

El objetivo del presente trabajo se centró en caracterizar las mutantes dobles y triples antes mencionadas relacionadas con la producción de PHB. Se determinó el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de PHB en medio sólido y líquido, se usaron tres fuentes de carbono glucolíticas (sacarosa, fructosa y glucosa) y una fuente de carbono gluconeogénica (succinato). Los resultados obtenidos demuestran que en presencia de sacarosa se genera el mayor incremento en la producción del biopolímero, seguido de glucosa y fructosa, mientras que con succinato se abate la producción de PHB. Además, las cepas presentan una mayor producción del polímero en medio líquido que en medio sólido. Finalmente, en medio líquido con sacarosa, en la triple mutante se observa un efecto aditivo en la producción del polímero considerando la producción en las mutantes dobles, efecto que no se observa al cultivar las mutantes en presencia de glucosa o fructosa, esto sugiere que podría existir un efecto sinérgico al mutar ambos reguladores negativos en la cepa  $E\Delta algD$ , dirigiendo tanto la fuente de carbono como el acetil-CoA hacia la síntesis de PHB y favoreciendo la expresión del operón *phbBAC*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biopolímeros como alternativa a los materiales plásticos convencionales

El uso de materiales polímeros sintéticos está muy extendido en todo el mundo, ya que son materiales versátiles y duraderos, presentando ventajas respecto a otros materiales como los metales y la madera. Se han aplicado en las áreas farmacéutica, doméstica e industrial, incluyendo estructuras de maquinaria, muebles, accesorios y empaques, generando productos de alta calidad y satisfacción para los usuarios finales. Se estima que el 99% de estos materiales poliméricos provienen de combustibles fósiles (Costa *et al.*, 2023; Azizi *et al.*, 2024).

En las últimas décadas, la demanda de productos a base de polímeros sintéticos ha aumentado considerablemente por la explosión demográfica y la velocidad de la modernización. Para la mayoría de las aplicaciones, es favorable que estos plásticos mantengan propiedades específicas en el tiempo, estéticas y de durabilidad; pero también es deseable desecharlos fácilmente después de usarlas. Sin embargo, estos materiales no son biodegradables, convirtiéndose en un peligro para la conservación del medio ambiente. Los métodos actuales para eliminar los plásticos, como el reciclaje, el enterramiento y la incineración, tienen varias desventajas: la incineración genera emisiones tóxicas y gases de efecto invernadero; por su parte, el reciclaje sólo pospone los efectos negativos de los plásticos fósiles al posponer el fin de vida de los materiales, propiciando la acumulación de microplásticos (MP) y nanoplásticos (NPS), los cuales representan un riesgo para la salud de los seres humanos, los animales y los ecosistemas por la transferencia trófica de organismos a lo largo de la cadena alimentaria (Costa *et al.*, 2023; Mahato *et al.*, 2023).

El 1% restante de plásticos se produce a partir de polímeros naturales y se denominan bioplásticos o biopolímeros. Por tanto, se definen “polímeros naturales” como aquellos que son simultáneamente (Mukherjee & Koller, 2023):

- a. Producidos a partir de fuentes de carbono renovables como carbohidratos y ácidos grasos.
- b. Biosintetizados: se producen en plantas o microorganismos mediante la acción de enzimas in vivo.
- c. Biodegradables: implica la descomposición del polímero mediante la acción de enzimas naturales in vivo o mediante enzimas extracelulares secretadas por plantas, microorganismos o animales. Generalmente, la descomposición implica la eventual transformación en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), agua y humus.

- d. Biocompatibles: no ejercen efectos nocivos sobre el medio ambiente o los sistemas vivos, incluidos los humanos.

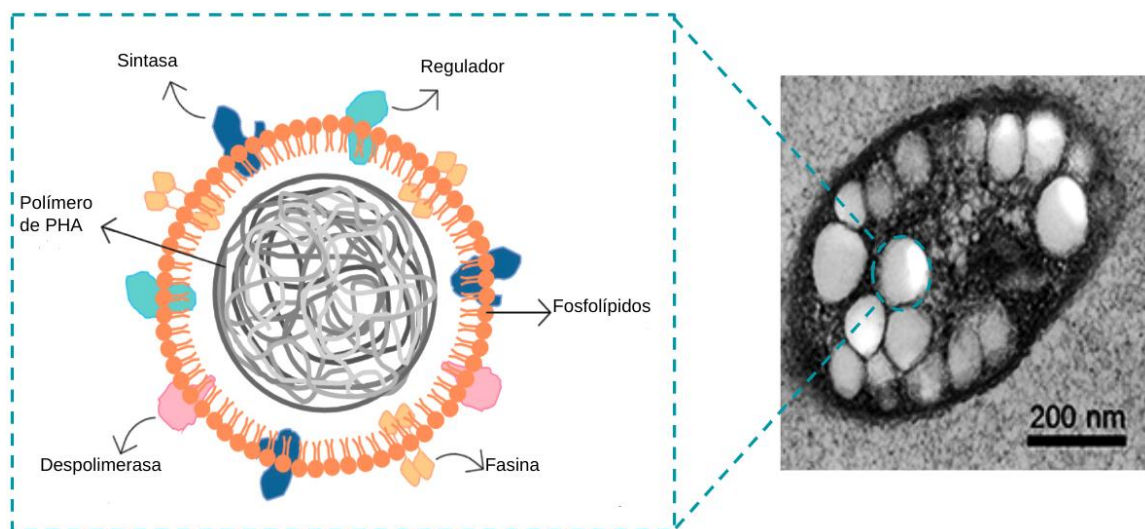
Tomando en cuenta los criterios mencionados, los biopolímeros pueden ser candidatos prometedores para reemplazar a los plásticos convencionales de origen fósil y desempeñar un papel clave en la reducción de sus consecuencias ecológicas adversas y su huella ambiental.

## 1. 2. Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) cumplen todos los criterios establecidos en la definición de polímero natural o biopolímero. Son poliésteres lineales producidos en la naturaleza por fermentación bacteriana de azúcares o lípidos. En los PHA, los monómeros son 3-hidroxicanoatos. Un canoato es simplemente un ácido graso que es una molécula lineal que contiene solo carbono e hidrógeno (un cano) con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo (lo que forma un canoato). Además, estos monómeros tienen un grupo hidroxilo (-OH) en el tercer carbono (posición beta), lo que los convierte en beta o 3-hidroxicanoatos. El grupo hidroxilo de un monómero está unido al grupo carboxilo de otro mediante un enlace éster; Por tanto, estos plásticos son poliésteres. El enlace poliéster crea una molécula que tiene segmentos de 3 carbonos separados por átomos de oxígeno. El resto del monómero se convierte en una cadena lateral de la cadena principal del polímero (Do Santos *et al.*, 2009). Su estructura química tiene un grupo radical alquilo (R), del que dependerán las características del polímero y su nombre (Zambrano & Antonieta, 2021).

Las unidades monoméricas de PHA se pueden clasificar en tres grupos según el número de átomos de carbono: PHA de cadena corta, media y larga. Los de cadena corta (scl-PHA) se componen de 3 a 5 átomos de carbono, estos tienen propiedades termoplásticas similares a las del polipropileno. Los de cadena media (mcl-PHA) constan de 6 a 14 átomos de carbono, como estos tienen una mayor longitud de cadena de carbono, muestran una cristalinidad reducida y una mayor flexibilidad que se asemeja a los elastómeros y propiedades similares al látex. Los PHA de longitud de cadena larga (lcl-PHA) están compuestos de 15 o más átomos de carbono. Además, los PHA pueden clasificarse como homopolímeros (compuestos por monómeros de la misma longitud de cadena de carbono) y copolímeros (una combinación de monómeros de diferente longitud) (González *et al.*, 2013; McAdam *et al.*, 2020; Azizi *et al.*, 2024). La longitud de la unidad de monómero, así como los grupos funcionales que conforman la estructura del polímero, son responsables de las propiedades (hidrofóbicas, termoplásticas, cristalinidad, fragilidad, ductilidad) del material plástico resultante (Acharjee *et al.*, 2023).

Los PHA se pueden acumular en aproximadamente el 94% (p/p) de la masa celular seca dentro de las células bacterianas. Se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos esféricos insolubles en agua, cuyo número por célula y tamaño varía en las diferentes especies. Los diámetros de estas inclusiones oscilan entre 200 y 500 nm, como sugieren los estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Están constituidas por aproximadamente 98 % (p/p) de PHA (en el núcleo del gránulo), 1.5 % de proteínas asociadas a la superficie del gránulo (PHA sintasas, PHA despolimerasas, fasininas, reguladores transcripcionales, hidrolasas, reductasas y otras enzimas implicadas en la síntesis de monómeros de PHA) y 0.5 % de fosfolípidos (**Fig. 1**) (Maestro & Sanz, 2017; Parlani *et al.*, 2017).



**Fig. 1.** Esquema de un gránulo de PHA. Adaptado de Vicente *et al.*, 2023.

La producción de PHA por bacterias depende de varios factores, como la especie de bacteria, el tipo de fuente de carbono, el período de cultivo, el pH, la temperatura, la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno y la disponibilidad de macro y microelementos (por ejemplo, fósforo, azufre y magnesio) (Azizi *et al.*, 2024).

### 1.3. Poli-Beta-Hidroxibutirato (PHB)

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), descubierto por el científico francés Maurice Lemoigne en 1926, es el poliéster más simple y común de la familia PHA (Julinová *et al.*, 2023). Como se muestra en la **Fig. 2** cada unidad monomérica del polímero se denomina  $\beta$ -hidroxibutirato porque contiene cuatro carbonos, incluyendo al grupo de enlace éster ( $-\text{COOR}$ ) y al grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) como radical alquilo (R), por lo tanto, pertenece a los PHA de cadena corta.

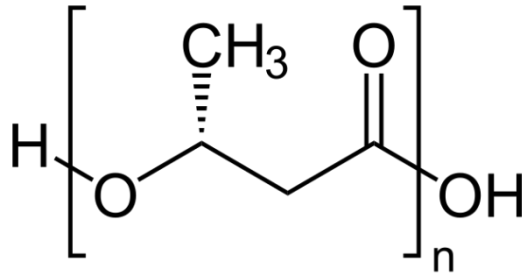


Fig. 2. Estructura química del poli-β-hidroxi-butilato.

El PHB no es tóxico por lo que puede usarse en la industria del embalaje (envases de cosméticos y alimentos), además al ser biocompatible puede utilizarse para fabricar dispositivos médicos (andamios, mallas, vendajes) y como material portador para la administración de medicamentos, ya que eventualmente serán absorbidos sin que queden rastros de PHB. La principal ventaja de este material sobre los polímeros sintéticos es su biodegradabilidad, que se produce en un plazo de tiempo razonable cuando el material entra en contacto con microorganismos degradadores en entornos biológicamente activos como suelos, agua dulce y compostaje aeróbico y anaeróbico (McAdam *et al.*, 2020; Sehgal & Gupta, 2020).

Entre las especies que son capaces de almacenar PHB se encuentran *Ralstonia eutropha* (también conocida como *Cupriavidus necator* o *Alcaligenes eutrophus*), *Azohydromonas lata* (también conocida como *Alcaligenes latus*), *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus spp.*, *Nocardia spp.*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium spp.*, y *Escherichia coli* recombinante, que expresa los genes biosintéticos de PHB de *C. necator*, *A. lata* o *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2014; McAdam *et al.*, 2020). La disponibilidad de un excedente de una fuente de carbono y el suministro limitado de nutrientes vitales para el crecimiento como el nitrógeno o el fósforo, estimulan la producción de PHB en las bacterias. El polímero puede actuar como reserva de carbono y fuente de energía en condiciones de limitación de nutrientes (Bhagowati *et al.*, 2015).

La primera empresa en producir bioplásticos fue Imperial Chemical Industries (ICI) en Reino Unido en 1983. A partir de la co-polimerización de monómeros de poli(β-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato), por fermentación de mutantes de *Ralstonia eutropha* H16 que utilizan glucosa, produjeron una resina totalmente biodegradable con el nombre comercial de Biopol™ que podía ser moldeada en una amplia variedad de productos incluyendo películas, chips, polvos y fibras. La alianza entre ICI y la empresa alemana Wella AG le permitió a esta última fabricar la primera botella de champú “Sanara” de Wella™, se podía biodegradar en nueve meses y se comercializó ampliamente a partir de 1991. Posteriormente, ICI se esforzó en abrir

un amplio abanico de aplicaciones, desde recipientes hasta productos para el cuidado personal (**Fig. 3**) (Pötter & Steinbüchel, 2006; Jaso, 2020). Se ha estudiado la biodegradabilidad de láminas finas de PHB de ICI, mostrando un 98.9% de degradación (pérdida de masa promedio de cinco muestras paralelas) en suelo de lodos activados a 37 °C después de 25 días, mientras que la degradación en suelo agrícola (68.8%), en suelo arenoso (10%) y el suelo forestal (7%) fueron considerablemente más lentos, lo que demuestra la importancia de la diversidad de los microorganismos presentes en los suelos en la biodegradabilidad del PHB (Kim *et al.*, 2000).

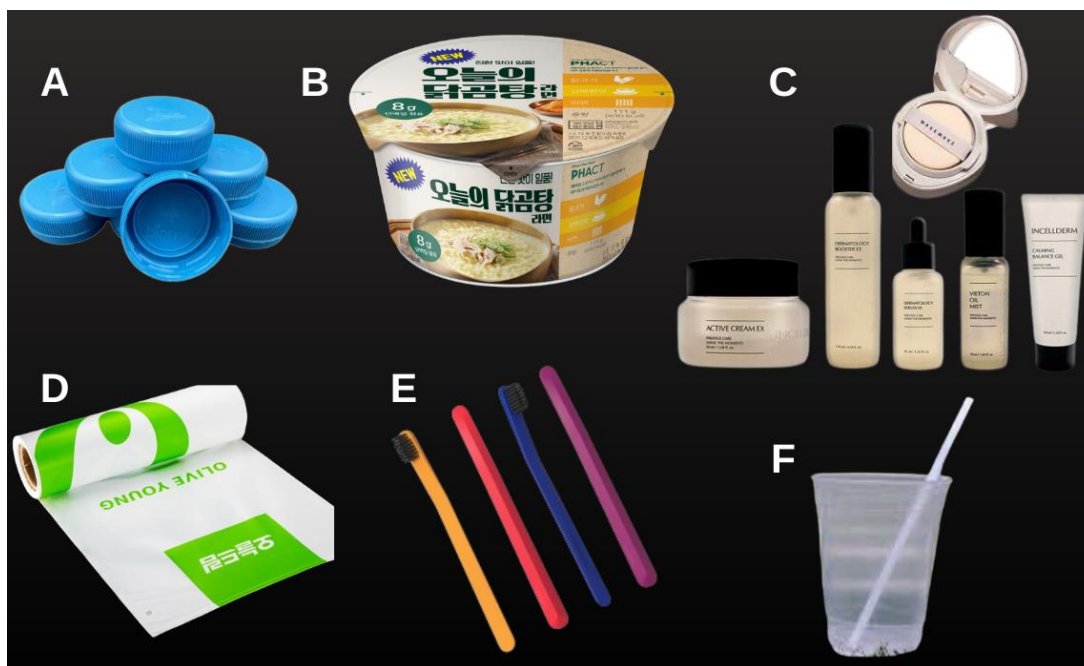


**Fig. 3.** Productos comerciales fabricados con Biopol™. **A** vasos tipo desechable; **B** rastrillo de afeitarse; **C** botellas de champú; **D** tees de golf.

En 2016, la empresa surcoreana CJ CheilJedang adquirió Metabolix Inc. (anteriormente ICI) y su tecnología PHA, y en 2021 fundó la empresa CJ Biomaterials que produce el copolímero poli( $\beta$ -hidroxibutirato-4-hidroxibutirato) comercializado en forma de resinas y gránulos bajo la línea de productos PHACT™. Los PHA de CJ Biomaterials se producen mediante la fermentación aeróbica a partir de cepas bacterianas modificadas utilizando azúcares provenientes de la caña de azúcar, mandioca y maíz o de biomasa celulósica. Los biopolímeros PHACT™ han recibido las cuatro certificaciones TÜV AUSTRIA Iberia: biodegradabilidad en suelos, biodegradabilidad marina, compost doméstico y compost industrial; además la

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha autorizado su uso para la fabricación de envases que entran en contacto con alimentos. CJ Biomaterials ha expandido las aplicaciones de PHACT™ produciendo las tapas de botellas biodegradables de Beyond Plastic; bolsas para el servicio de entregas a domicilio de la tienda de productos de salud y belleza CJ Olive Young; un vaso para fideos de CU Convenience Store; el cepillo de dientes LAUDUAL; envases para la línea premium de productos de cuidado de la piel IncellDerm de Riman Korea, envase del bálsamo Ceramide Cleansing de la línea 'Clean It Zero' de Banila Co y el envase compacto del WAKEMAKE Water Velvet Vegan Cushion; y popotes que ya han sido introducidas en la franquicia de panadería Tous les Jours operada por CJ Foodville (**Fig. 4**) (CJ Biomaterials, 2024).

La empresa alemana Biomer produce resinas y gránulos a partir de PHB que pueden manipularse en maquinarias de fabricación de productos de plástico de la misma forma que los plásticos clásicos producidos a partir de petróleo, la empresa ha confirmado que su PHB es totalmente biodegradable y compostable (Mukherjee & Koller, 2023). Así mismo, la empresa PhaBuilder (China) produce PHB que se degrada tanto en agua de mar como en tierra en un plazo de 3 a 6 meses, el producto final se vende actualmente en gránulos (Park *et al*, 2024).



**Fig. 4.** Productos comerciales fabricados con la línea de biopolímeros PHACT™. **A** tapas para botellas plásticas; **B** vaso de fideos; **C** envases de cosméticos; **D** bolsas; **E** cepillos dentales; **F** popotes.

Actualmente *Cupriavidus necator* antes llamada *Ralstonia eutropha* es la bacteria más utilizada a escala industrial para la producción de PHB, por tal motivo se han realizado varios

estudios con el propósito de optimizar las condiciones de cultivo para obtener una mayor producción del polímero en esta bacteria (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Producción de PHB en diferentes cepas de *Ralstonia eutropha*.

Cepa	Fuente de carbono	Producción de biomasa (g/L)	Producción de PHB (g/L)	Referencia
NRRL B14690	Fructosa	3.5	1.4	Khanna & Srivastava, 2005
PTCC 1615/ <i>phbC</i> (sobreexpresa el gen <i>phbC</i> )	---	1.32	0.102	Barati <i>et al.</i> , 2021
PTCC 1615 (silvestre)	---			
NRRL B14690	Ácido láctico	1.188	0.089	Khanna & Srivastava, 2005
	Sacarosa	2.179	0.042	
	Melaza	1.960	0.039	
	Glicerol	2.879	0.034	
	Glucosa	2.332	0.031	
	Ácido acético	0.151	0.023	

---: Sin adición de una fuente de carbono.

La cepa NRRL B14690 fue cultivada en un medio de sales minerales adicionado con sulfato de amonio y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno (2 g/L) y la fuente de carbono indicada (20 g/L), a 30 °C, 150 rpm, durante 60 h. La cepa PTCC 1615 y PTCC 1615/*phbC* fueron cultivadas en medio LB a 30 °C, 150 rpm, durante 48 h.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. *Azotobacter vinelandii*

#### 2.1.1. Generalidades

*Azotobacter vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, Gram negativa, aerobia, pero puede crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Habita en muchos entornos, como el suelo, el agua y las superficies de raíces. Se mueve por flagelos peritricos (flagelos distribuidos en la superficie de la bacteria). Su morfología microscópica presenta un estado pleomórfico, variando desde bacilos hasta células en forma de cocos; se le observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable; las células presentan un diámetro de 2 a 5  $\mu\text{m}$  (5 a 10 veces el diámetro de las de *Escherichia coli*), se ha asociado este tamaño con la poliploidía, es decir, posee varias copias de su cromosoma (se calcula que pueden tener hasta 80 copias). El número de copias varía dependiendo del medio y las condiciones de cultivo, así como de la fase de crecimiento (Espín, 2002; Mazinani & Asgharzadeh, 2014). Puede utilizar una gran variedad de sustratos de carbono para crecer,

incluidos alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares, aunque muestra preferencia por ciertos compuestos sobre otros en forma de crecimiento diaúxico (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

El tamaño del genoma de la cepa DJ (UW136) de *A. vinelandii* es de 5,365,318 pb y se calcula que codifica para 5,051 genes. Por otra parte, la secuencia completa del genoma de la cepa A1501 de *Pseudomonas stutzeri* es de 4,567,418 pb y codifica para 4,128 genes (Setubal *et al.*, 2009). Se ha relacionado a *A. vinelandii* con las especies de *Pseudomonas*, hasta el punto de que se ha propuesto que pertenece a este género, debido a que el 50% de los genes presentes en esta bacteria codifican proteínas que muestran una similitud del 67% o superior con homólogos de *Pseudomonas* (González-Casanova *et al.*, 2014). Además, numerosos estudios muestran que comparten muchas vías metabólicas bioquímicas (como la fijación de nitrógeno, la producción de alginato, los mecanismos respiratorios) y habitan en entornos similares (Özen & Ussery, 2012). A pesar de la estrecha relación, *A. vinelandii* muestra importantes características fenotípicas que no se observan en la mayoría de las especies de *Pseudomonas*, incluida la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas, una alta tasa de respiración, la producción y asimilación de hidrógeno, y experimentar un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación (Castañeda *et al.*, 2016; Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

Ha servido durante mucho tiempo como modelo para estudios bioquímicos y genéticos sobre la fijación biológica de nitrógeno, la conversión de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) mediante una enzima nitrogenasa. Posee tres versiones de nitrogenasa con diferentes metales en sus cofactores centrales (molibdeno, hierro y vanadio), estas enzimas pueden sustituirse una por otra para permitir el crecimiento cuando uno u otro metal esencial está ausente. El crecimiento diazotrófico en condiciones aeróbicas es posible porque *A. vinelandii* puede ajustar las tasas de consumo de oxígeno para ayudar a mantener niveles bajos de oxígeno citoplasmático, lo que de otro modo es perjudicial no solo para la nitrogenasa sino también para otras enzimas sensibles al oxígeno. Este fenómeno se llama protección respiratoria (Espín, 2002; Setubal *et al.*, 2009; Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

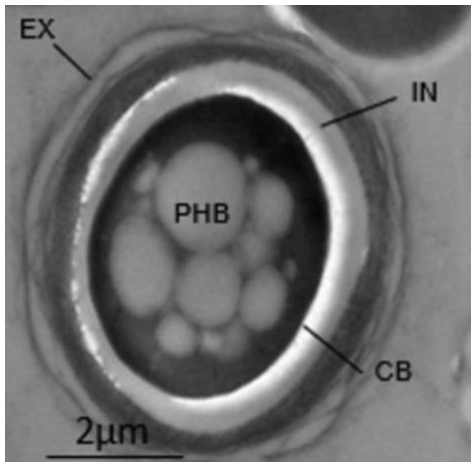
Produce metabolitos secundarios de interés biotecnológico: el exopolisacárido alginato, el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), y los lípidos fenólicos alquilresorcinoles (AR) y alquilpironas (AP); estos compuestos están relacionados con la diferenciación morfológica que sufre esta bacteria para formar quistes, células metabólicamente inactivas resistentes a la desecación y a las radiaciones UV en condiciones desfavorables de crecimiento (Espín, 2002; Castañeda *et al.*, 2016).

### 2.1.2. Ciclo de vida

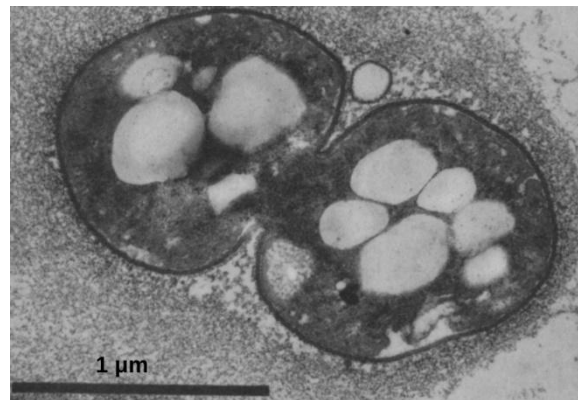
*A. vinelandii* presenta dos fases en su ciclo de vida (**Fig. 7**): una fase vegetativa y una fase de vida latente o quística.

Al inicio del proceso de diferenciación, las células vegetativas adquieren forma de “cacahuete”, pierden sus flagelos y sufren una última división celular (**Fig. 6**) para dar origen a dos células esféricas, cada una se convierte en un quiste. Después, desde la superficie de las células empieza la secreción de estructuras parecidas a membranas las cuales dan origen dos capas constituidas por alginato: una externa delgada (exina) y otra interna más gruesa (intina). Al finalizar la formación estas capas, se obtiene el quiste maduro (**Fig. 5**) que consta de un núcleo protoplásmico central o cuerpo central (que contiene en su interior gránulos de PHB), una membrana citoplasmática, una delgada pared celular de ácido murámico y una cápsula formada por las capas intina y exina (Sadoff, 1975).

En condiciones favorables de crecimiento, los quistes inician un proceso de germinación para convertirse en células vegetativas. Inicialmente el cuerpo central se hincha y ocupa el volumen de la intina. Posteriormente, el hinchamiento del quiste provoca la ruptura de la exina emergiendo dos células que adquieren nuevamente movilidad (Espín, 2002).



**Fig. 5.** Micrografía electrónica de un quiste de *A. vinelandii* después de un período de diferenciación de 5 días. Se indica el cuerpo central (CB) y los gránulos de PHB, al igual que la cápsula del quiste, que está compuesta por dos capas laminadas de alginato, la intina (IN) y la exina (EX) compuesta también de ARs y APs. Tomado de Martínez-Ortiz *et al.*, 2020.



**Fig. 6.** Micrografía electrónica de una célula vegetativa de *A. vinelandii* en división antes del enquistamiento. Está rodeada por una cápsula de alginato y contiene gránulos de PHB en su interior. Tomado de Hitchins & Sadoff, 1970.

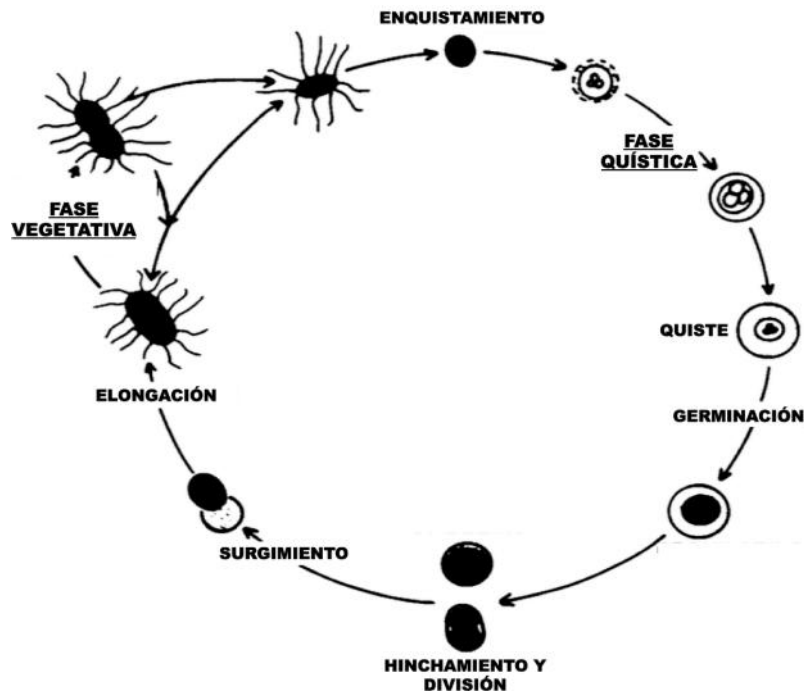


Fig. 7. Esquema del Ciclo de Vida de *A. vinelandii*. Tomado de Sadoff, 1975.

Durante el crecimiento vegetativo, *A. vinelandii* es móvil debido a los flagelos peritricos y tiene un metabolismo de tipo estrictamente aeróbico, pero estas características cambian durante el enquistamiento: las bacterias pierden los flagelos, se inhibe la fijación de nitrógeno y la respiración aeróbica, los fosfolípidos de membrana son reemplazados por los lípidos AR y AP (formando parte de la exina), y el metabolismo de los carbohidratos cambia a metabolismo lipídico (Segura *et al.*, 2003; Martínez-Ortiz *et al.*, 2020).

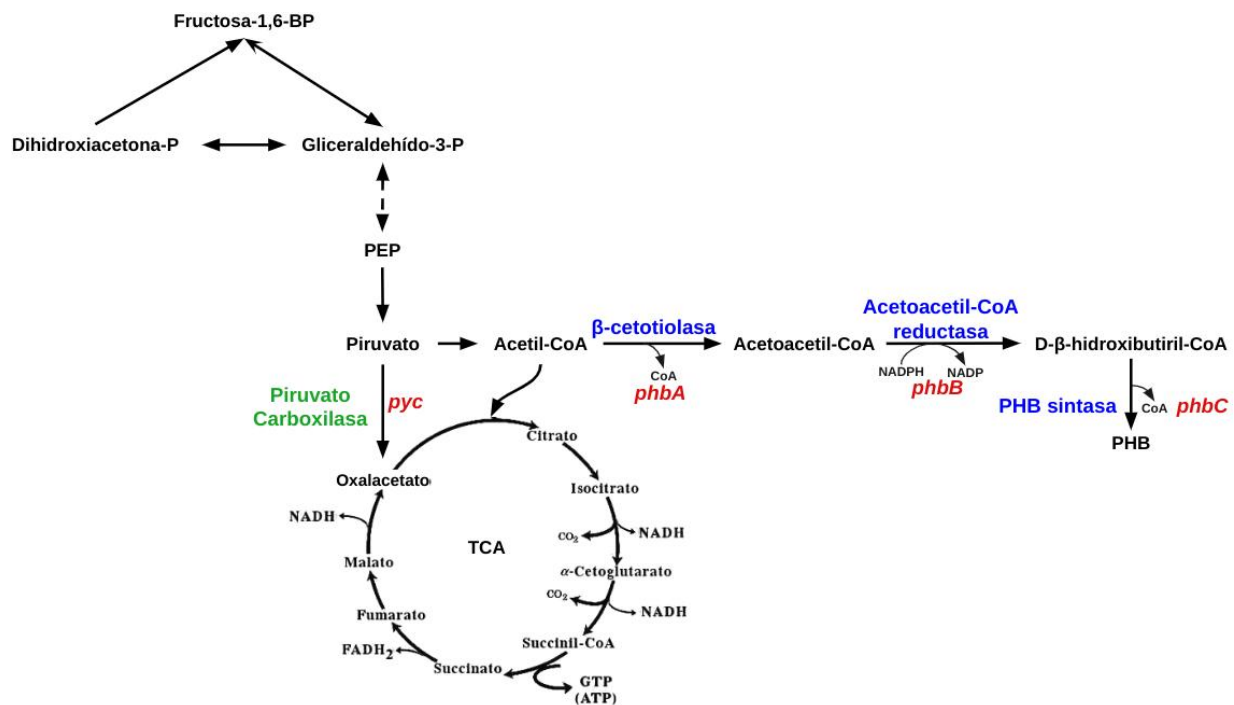
En *A. vinelandii*, el PHB puede acumularse hasta en el 70% del peso seco de las células. En condiciones de laboratorio, la fuente de carbono (y su concentración) adicionada al cultivo es importante en la producción del polímero: el acetato y el etanol permiten una producción pequeña o nula de PHB, comparada con la producción adicionando azúcares o butanol. Además, la producción de PHB y alginato puede competir por el mismo sustrato de carbono, por lo que, en algunas condiciones, eliminar la capacidad de *A. vinelandii* para producir PHB o alginato aumenta varias veces el rendimiento del otro (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

## 2.2. Ruta biosintética de PHB en *A. vinelandii*

La metabolización de una fuente de carbono a través de la vía Entner-Doudoroff (en el caso de glucosa) o Embden-Meyerhof (en el caso de fructosa) da origen a dos moléculas de

tres átomos de carbono, la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P), tras una serie de reacciones enzimáticas el G3P da lugar al fosfoenolpiruvato (PEP) que tras su desfosforilación produce piruvato (PYR). El PYR es transformado en acetil-Coenzima A (acetil-CoA) por la enzima piruvato deshidrogenasa; posteriormente el acetil-CoA es desviado a dos destinos principalmente: la generación de energía al incorporarse al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y a la producción de PHB (**Fig. 8**) (Castillo, 2013).

En *A. vinelandii* están presentes tres actividades enzimáticas que llevan a cabo la biosíntesis de PHB a partir del acetil-CoA. Una  $\beta$ -cetotiolasa cataliza la primera reacción, es decir, la condensación de dos moléculas del acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, que es reducido por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH para producir  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA. La PHB sintasa cataliza la reacción final: la polimerización de  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA (Galindo *et al.*, 2007).



**Fig. 8.** Ruta biosintética de PHB y sus relaciones metabólicas en *Azotobacter vinelandii*. Las flechas discontinuas indican vías multienzimáticas; los nombres de las enzimas se indican en azul y verde, y los genes correspondientes en rojo. Adaptado de Galindo *et al.*, 2007.

## 2.3. Regulación metabólica de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*

### 2.3.1. La enzima $\beta$ -cetotiolasa

La síntesis de PHB en esta bacteria se ha relacionado con el funcionamiento del ciclo TCA. Un punto de control importante es la actividad de la enzima acetil-CoA acetiltransferasa ( $\beta$ -cetotiolasa). En condiciones de crecimiento equilibrado, el acetil-CoA se incorpora al ciclo TCA y, el CoA resultante inhibe la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa. Sin embargo, en ciertas condiciones de desequilibrio, como la baja concentración de oxígeno en presencia de un exceso de fuente de carbono en el medio, conducen a un aumento en la concentración de NAD(P)H que, a su vez, inhibe la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa. Esta inhibición reduce el flujo del acetil-CoA hacia el ciclo TCA, elevando el nivel de este metabolito y disminuyendo la concentración de CoA. Por lo tanto, se estimula la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa, lo que permite que continúe la síntesis de PHB (Espín, 2002; Segura & Espín, 2004).

### **2.3.2. La enzima Piruvato Carboxilasa**

La piruvato carboxilasa (PYC) sintetiza oxaloacetato a partir de piruvato y cumple funciones gluconeogénicas, glicerogénicas y anapleróticas, que a menudo son vitales para la supervivencia de una célula (Lai *et al.*, 2006). El término anaplerótico tiene su origen en el griego y significa rellenar o reponer, ya que la función de la PYC es catalizar la carboxilación dependiente de ATP del piruvato para generar oxalacetato, y es responsable de reponer el oxaloacetato que se utiliza para la biosíntesis de intermediarios del ciclo TCA, permitiendo así su funcionamiento continuo (Segura & Espín, 2004; Hanson & Owen, 2013).

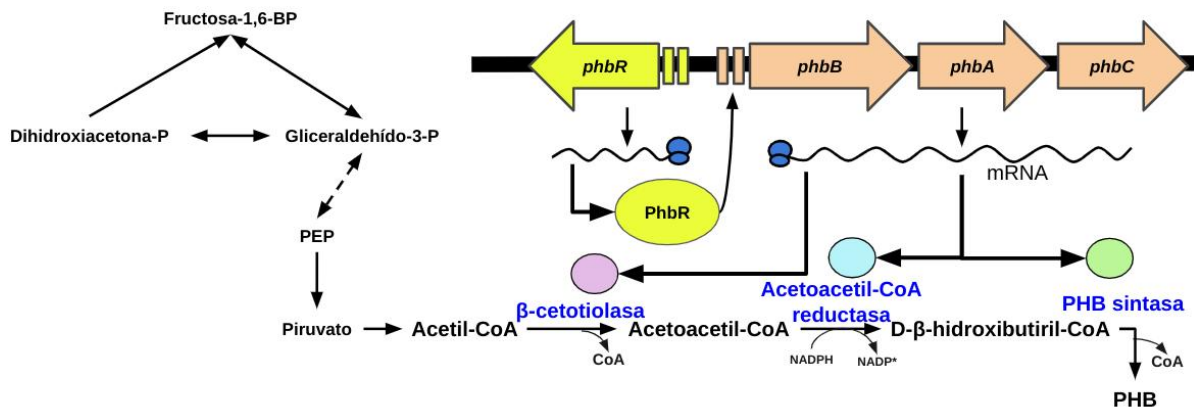
En una amplia gama de bacterias Gram negativas entre los filos Proteobacteria y Aquificae, la enzima PYC está codificada por dos genes separados: con el dominio BC (biotina carboxilasa) residiendo en una subunidad  $\alpha$  (de una masa molecular aproximadamente de 52 kDa); y los dominios CT (carboxiltransferasa) y BCCP (proteína transportadora de carboxilo de la biotina) en una subunidad  $\beta$  de aproximadamente 67 kDa (Choi *et al.*, 2016). En *A. vinelandii* los genes *pycA* y *pycB* codifican las dos subunidades de la piruvato carboxilasa PycA y PycB respectivamente (Segura & Espín, 2004).

Se ha reportado que la PYC de dos subunidades, en *P. fluorescens* es importante para la expresión de pequeños RNAs que median el metabolismo secundario y la biosíntesis de compuestos antibióticos (Choi *et al.*, 2016). En *A. vinelandii* es necesaria para el crecimiento en medio mínimo Burk con glucosa o sacarosa como única fuente de carbono; además en ausencia de actividad de PYC, el consumo durante la biosíntesis de material celular agota el acervo de oxaloacetato, causando una desaceleración en la actividad del ciclo TCA debido a una baja concentración de oxaloacetato, lo que resulta en una mayor disponibilidad del acetil-CoA para la síntesis de PHB (Segura & Espín, 2004).

## 2.4. Regulación genética de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*

### 2.4.1. La transcripción del operón biosintético *phbBAC*

En *A. vinelandii* se ha identificado un grupo de genes, que forman el operón biosintético *phbBAC*, que codifica las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de PHB: incluyendo la D(-)- $\beta$ -cetotiolasa (codificada por *phbA*), la acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y la PHB sintasa (*phbC*) (Peralta-Gil *et al.*, 2002).



**Fig. 9.** Regulación genética de la ruta biosintética de PHB en *A. vinelandii*. El gen *phbR* (indicado en color amarillo) codifica el activador transcripcional PhbR que activa la transcripción de los genes del operón *phbBAC* (en color melón), la posterior traducción del *phbBAC* mRNA da origen a las enzimas (en color azul rey) que participan en la biosíntesis de PHB a partir del acetyl-CoA. Tomado y modificado de Galindo *et al.*, 2007 y Peña *et al.*, 2014.

### 2.4.2. Los reguladores PhbR y RpoS

Como ya se mencionó, el principal mecanismo regulador que conduce a la acumulación de PHB en *A. vinelandii* implica al operón *phbBAC*, ya que codifica enzimas clave de la vía de biosíntesis de PHB. Río arriba del gen *phbB* y transcrito en la dirección opuesta se encuentra *phbR* (Fig. 9), que codifica un activador transcripcional de la familia AraC, se ha propuesto que este gen es un factor regulador positivo para transcripción de *phbBAC*. En particular, la transcripción del gen *phbB* está impulsada por dos promotores superpuestos, pB1 y pB2; se han identificado seis sitios conservados de 18 pb, denominados R1 a R6, dentro de la región intergénica *phbR-phbB*, donde R1 y R2 se superponen a la región -35 y -70 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de pB1. PhbR se une específicamente a R1 (TGTCACCAA-N4-CACTA) y R2 (TGTCACCAA-N4-CAGTA) presentes en la región promotora de *phbB* (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Hernández-Eligio *et al.*, 2011).

En *A. vinelandii*, la transcripción de pB2 depende del factor sigma RpoS y aumenta durante la fase estacionaria de crecimiento. La transcripción de R2 también se induce durante la fase estacionaria y depende de RpoS, aunque probablemente de manera indirecta. Así, se propuso el siguiente modelo de regulación: en las células en crecimiento exponencial, las condiciones de crecimiento equilibrado inhiben la actividad  $\beta$ -cetotilasa que está presente, y también hay una baja transcripción de *phbBAC* causada tanto por la falta de RpoS, que afecta a la transcripción de pB2, como por la baja concentración de PhbR, cuya transcripción también depende parcialmente de este factor sigma. Al entrar en la fase estacionaria, el incremento en la transcripción de *rpoS* y consecuentemente de *phbR*, estimula la transcripción del operón *phbBAC*. Además, la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico puede ralentizarse durante la fase estacionaria, lo que permite un aumento de la relación acetyl-CoA/CoA, restaurando la actividad de la  $\beta$ -cetotilasa (Galindo *et al.*, 2007).

Además, en *A. vinelandii*, RpoS está implicado en la respuesta al estrés oxidativo y en condiciones limitantes de nutrientes (carbono y nitrógeno) (Sandercock & Page, 2008) y es necesario para la síntesis de alquilresorcinoles y la formación de quistes (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011).

### **1.4.3. El sistema de regulación postranscripcional Rsm**

Se ha identificado, tanto en bacterias Gram negativas como positivas, un sistema regulador global postranscripcional, en el que intervienen dos componentes: una proteína de unión a RNA (RPB) y los pequeños RNA reguladores no codificantes (sRNAs). Este sistema se ha denominado Csr (carbon storage regulator) en especies como *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella enterica*; o sistema Rsm (regulator of secondary metabolism o repressor of stationary-phase metabolites, por sus siglas en inglés) en *Erwinia carotovora* y las especies de *Pseudomonas* (Song *et al.*, 2023). El sistema Csr/Rsm puede impactar tanto positiva como negativamente en la abundancia de más del 20% de todo el mRNA y controla una gran variedad de procesos fisiológicos (p. ej., el metabolismo del carbono, virulencia, motilidad, detección de quórum, producción de sideróforos, respuesta al estrés como la formación de biopelículas, activando procesos que favorezcan el crecimiento exponencial o reprimiendo la fase estacionaria) (Heroven *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2016; Potts *et al.*, 2017).

La mayoría de las bacterias donde se ha estudiado la funcionalidad de CsrA portan una única copia del gen; sin embargo, las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* destacan

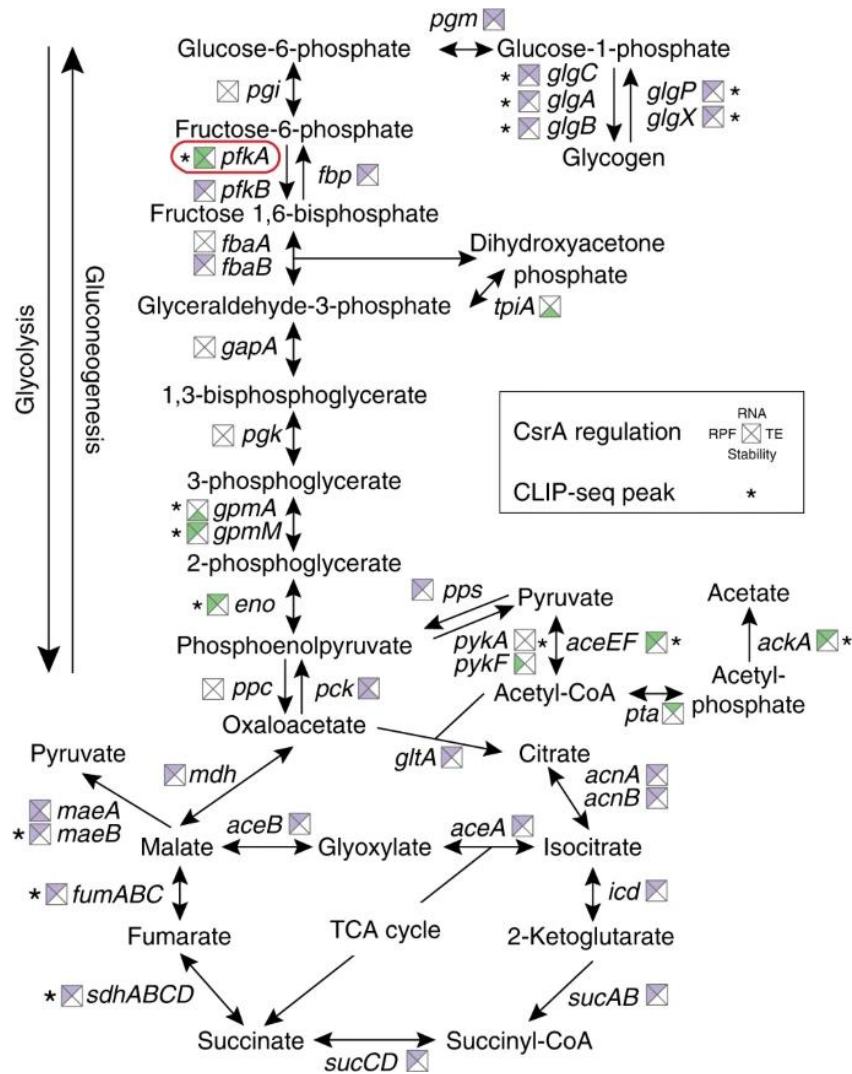
por codificar múltiples proteínas de unión a RNA que se han agrupado en nueve familias: RsmA, RsmE, RsmI, RsmN, RsmC, RsmD, RsmH, RsmL y RsmM (Ferreiro & Gallegos, 2021).

En el caso del patógeno oportunista *P. aeruginosa*, la generación de algunos factores de virulencia está organizada por un mecanismo de monitoreo de densidad celular llamado quorum sensing (QS) (Lin *et al.*, 2018). La RPB RsmA controla indirectamente la transcripción de numerosos genes a través de la regulación de la red QS. Burrowes *et al.* (2006) realizaron un perfil transcriptómico (mediante un análisis de microarreglos y RT-PCR semicuantitativa) para conocer los genes de *P. aeruginosa* cuya expresión está influenciada por RsmA; los genes que mostraron una mayor expresión en ausencia de RsmA en comparación con la cepa silvestre PAO1 participan en la captación de hierro (a través de los genes que dirigen la síntesis de pioverdina (*pvdN*, *pvdE*, *pvdF*, *pvdL*, *pvdG*) y el operón *pchABCDE* que dirigen la síntesis de pioquelina) y la resistencia a los antibióticos. Los genes con expresión disminuida en el mutante *rsmA* están involucrados en la síntesis de la molécula señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS); la regulación de la motilidad por medio de la formación de pili de tipo IV (*pilMNOPQ* y *pilU*), la formación de fimbrias (*pilC* y *cupA2*), la quimiotaxis (*motA* y *motB*); la producción de piocianina (*vfr*); y el almacenamiento de hierro a través de la proteína bacterioferritina (*bfrB*).

Por otra parte, en la bacteria rizosférica *P. fluorescens*, las proteínas RsmA y RsmE tienen objetivos de regulación compartidos. Para comprender el papel de RsmA y RsmE en esta bacteria, Zhang *et al.* (2020) realizaron un análisis RNA-seq en una mutante doble *rsmArsmE* sobre el fondo genético de la cepa silvestre 2P24. Los resultados indican que RsmA y RsmE reprimen la traducción del mRNA del operón *phiACBD*, activador de la biosíntesis del metabolito secundario 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), el cual se ha estudiado por su actividad antifúngica contra el patógeno vegetal *Gaeumannomyces graminis*; también reprimen la actividad del sistema de secreción tipo seis (T6SS), mecanismo importante en interacciones y patogénesis contra células bacterianas y eucariotas; además activan la motilidad celular (a través de los genes *flaG*, *fliT*, *fliS*, *motA*, *motC*, *flgE*), la formación de biopelículas, y el metabolismo del carbono (*glpD*, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; *zwf*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *glpK*, glicerol cinasa; *gap*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; *oadA*, oxalacetato decarboxilasa subunidad  $\alpha$ ; *pyk*, piruvato cinasa; *mgo*, malato deshidrogenasa (quinona)).

En *E. coli*, la RPB CsrA actúa principalmente como represor regulando la expresión de una gran cantidad de genes estructurales y reguladores involucrados en diversos mecanismos como: la biogénesis/degradación de la pared celular; el metabolismo del hierro, del carbono y de la biotina; resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos; la biosíntesis de aminoácidos

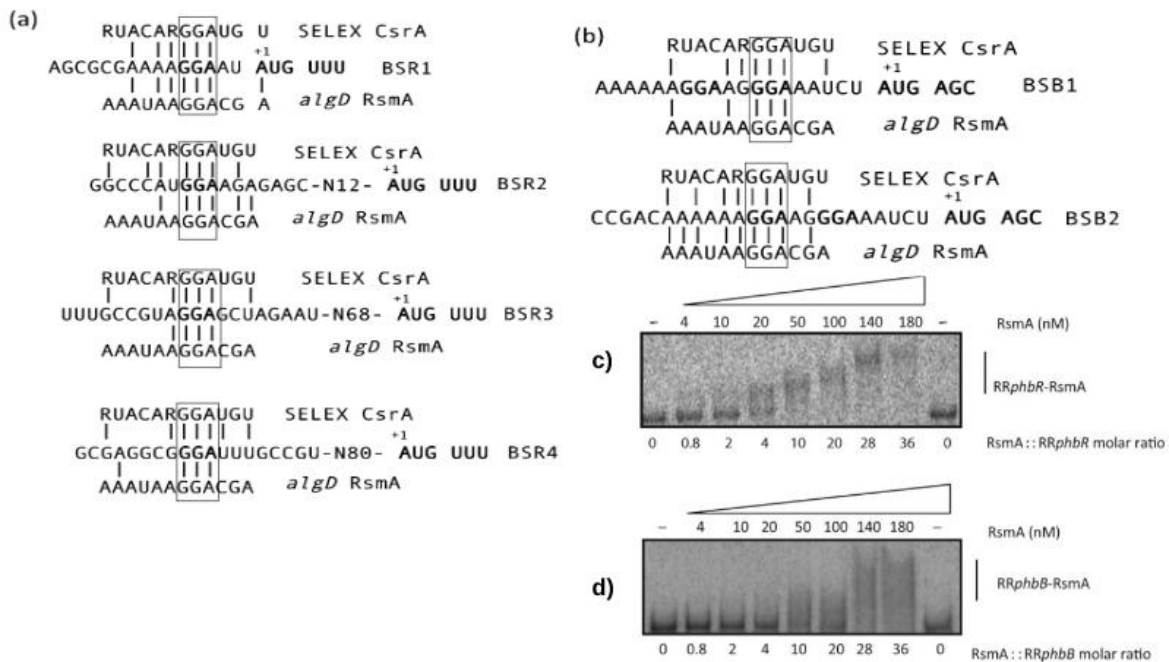
aromáticos, folato, arginina y enterobactina; degradación de ácidos grasos; quimiotaxis bacteriana; y ensamblaje flagelar. Además, en esta bacteria el metabolismo y transporte del carbono es regulado por CsrA, activando la glucólisis, y reprimiendo la gluconeogénesis y el ciclo TCA; en un estudio sobre la expresión de los genes que participan en estas vías metabólicas, se identificaron los genes que son regulados negativa y positivamente por CsrA (**Fig. 10**), además se destacó que la unión de CsrA al mRNA de *pfkA*, que codifica para la fosfofructocinasa, podría activar la glucólisis (Potts *et al.*, 2017).



**Fig. 10.** CsrA activa la glucólisis y reprime la gluconeogénesis y el ciclo del ácido tricarboxílico en *E. coli*. Los cuadrados cerca de los nombres de los genes muestran el efecto de CsrA: el color morado indica la represión y el verde indica la activación. Se realizaron ensayos CLIP-seq (para identificar RNA que interactúa directamente con CsrA *in vivo*), RNA-seq (para identificar la abundancia de ARN) y qRT-PCR (para identificar cambios en la traducción de un gen). Tomado de Potts *et al.*, 2017.

En las bacterias de la familia Pseudomonadaceae los sRNAs se agrupan en tres familias: RsmX, RmsY y RsmZ. *A. vinelandii* es la bacteria con el mayor número de Rsm-sRNAs reportados hasta la fecha, con siete sRNAs pertenecientes a la familia RsmZ (RsmZ1 - RsmZ7) y uno de la familia RsmY (López- Pliego *et al.*, 2018).

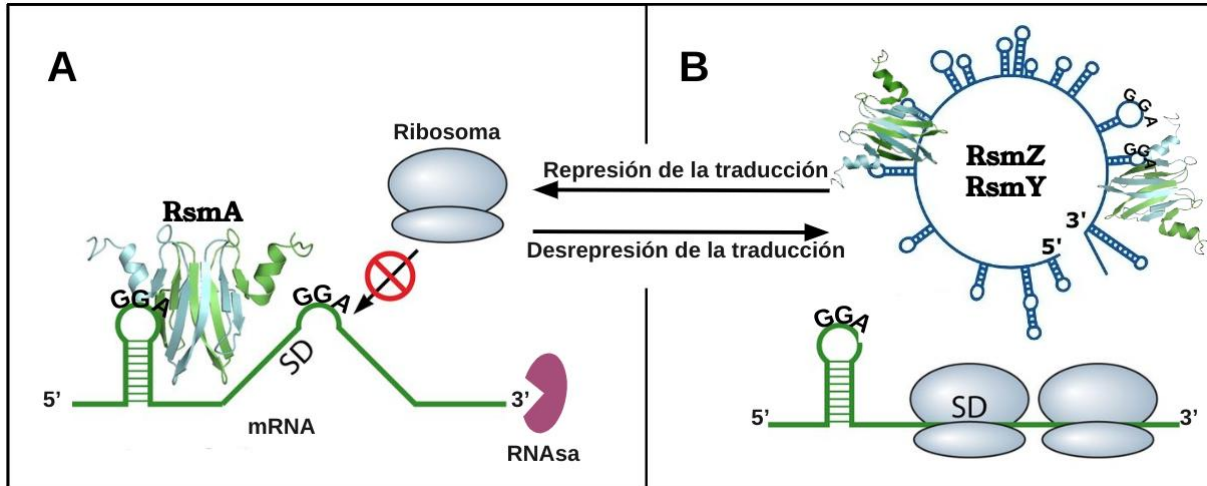
En *A. vinelandii*, la RPB del sistema Rsm se ha denominado RsmA. Se ha establecido de manera *in vitro* mediante un ensayo denominado SELEX que existe interacción entre RsmA y la región 5' de los genes *phbB* y *phbR*. La predicción de sitios de unión a RsmA en la región reguladora (RR) de los transcritos de estos genes (RR*phbB* y RR*phbR*) se realizó buscando la presencia de sitios de unión a CsrA; encontrando cuatro sitios de unión putativos en *phbR* y dos sitios en *phbB* (**Fig. 11 a-b**). Además, en la **Fig. 11 c-d**, se presenta el análisis de movilidad en gel, en el que se estableció la unión RsmA-RR*phbB* y RsmA-RR*phbR*. Los datos anteriores junto con la presencia de sitios de unión putativos de RsmA en o cerca de la secuencia Shine-Dalgarno (SD) dentro de los mRNA de *phbR* y *phbB*, sugirió que estos mRNA son objetivos del control post-transcripcional ejercido por la proteína RsmA (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).



**Fig. 11.** Interacción de RsmA con la región reguladora de *phbB* y *phbR*. a) Se muestra la presencia de la secuencia consenso GGA en los sitios de unión a RsmA predichos en la región reguladora de *phbR* y b) de *phbB* mediante Selex (RUACARGGGAUGU, R = A o G). c) Análisis de movilidad en gel de ARN que muestra la unión de RsmA a la RR*phbR* y d) a la RR*phbB*. Tomado de Hernández-Eligio *et al.*, 2012.

Existen estudios que sugieren que RsmA actúa como represor post-transcripcional. Los RNA mensajeros (codificados por los genes *phbR* y *phbB*) se estructuran en forma de tallo y asa, la proteína RsmA se une a sitios blanco de alta afinidad (motivos GGA que se encuentran en el asa del mRNA), que se encuentran cerca y/o en el sitio de unión al ribosoma (secuencia SD), obstaculizando así la unión de la maquinaria ribosomal, impidiendo su traducción y causando su degradación por la acción de las RNAsas (**Fig. 12-A**), o alternativamente causando primero la terminación prematura de la transcripción y al hacerlo reduciendo su tasa de traducción; impidiendo finalmente la expresión del operón *phbBAC* (Mercante *et. al.* 2009; Henández-Eligio *et. al.* 2012; Romeo *et al.*, 2013).

La liberación de la represión ejercida sobre el mRNA de *phbR* y *phbB* se da cuando los sRNAs del sistema Rsm se encuentran en el medio, estos sRNAs forman moléculas altamente estructuradas compuestas por múltiples estructuras de tallo y asa. La unión de los sRNAs con RsmA se realiza a través de motivos GGA, que se encuentran en las asas de las estructuras secundarias de tallo y asa, los cuales son similares a los sitios de unión del mRNA. Como resultado, la región SD del mRNA queda libre permitiendo el reconocimiento y traducción por el ribosoma (**Fig. 12-B**).



**Fig. 12.** Mecanismo general del sistema de regulación postranscripcional Rsm. Tomado y modificado de Vakulskas *et al.*, 2015.

Se ha reportado que en *A. vinelandii*, la proteína RsmA también reprime en la traducción de los mRNA de *algD* y *arpR*, genes clave en la síntesis de alginato y alquilresorcinoles respectivamente. Por lo tanto, como en el caso del PHB, los sRNAs del sistema Rsm también son necesarios para antagonizar la actividad represora de RsmA (Castañeda *et al.*, 2016).

### 3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

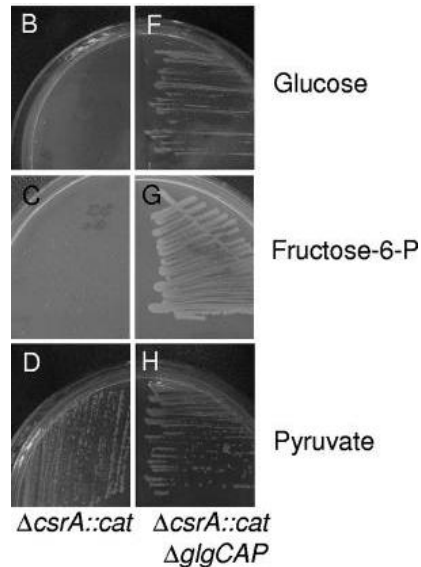
#### 3.1. Generación de la mutante $E\Delta algD::Km\Delta rsmA::Sm$

En un trabajo previo en el laboratorio, se generó una mutante sobre el fondo genético de la cepa silvestre E (AEIV), a partir de la remoción de la región estructural y la región reguladora putativa del gen *rsmA* insertando en su lugar un interposón de estreptomicina ( $\Omega$  Sm) proveniente del pBSL130 (Alexeyev *et al.*, 1995). Sin embargo, solo se obtuvieron mutantes merodiploides y no se pudo segregar la mutación a todos los cromosomas de la cepa, conservando tanto el alelo silvestre como el mutado (Cocotl-Yañez, 2007).

En muchas especies bacterianas, es muy difícil generar mutantes de *rsmA/csrA*, ya que presentan fuertes agregaciones de célula-célula y/o un crecimiento muy lento. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* la agregación restringe el crecimiento de una mutante *rsmA* y da como resultado un fenotipo de colonias pequeñas; en *L. pneumophila*, solo se pudo obtener una mutante *csrA* en una cepa que portaba una copia funcional adicional de este gen en trans; en *E. coli* las mutantes en *csrA* son letales cuando se crecen en presencia de hexosas como fuente de carbono (Lapouge *et al.*, 2008; Timmermans & Van Melder, 2009).

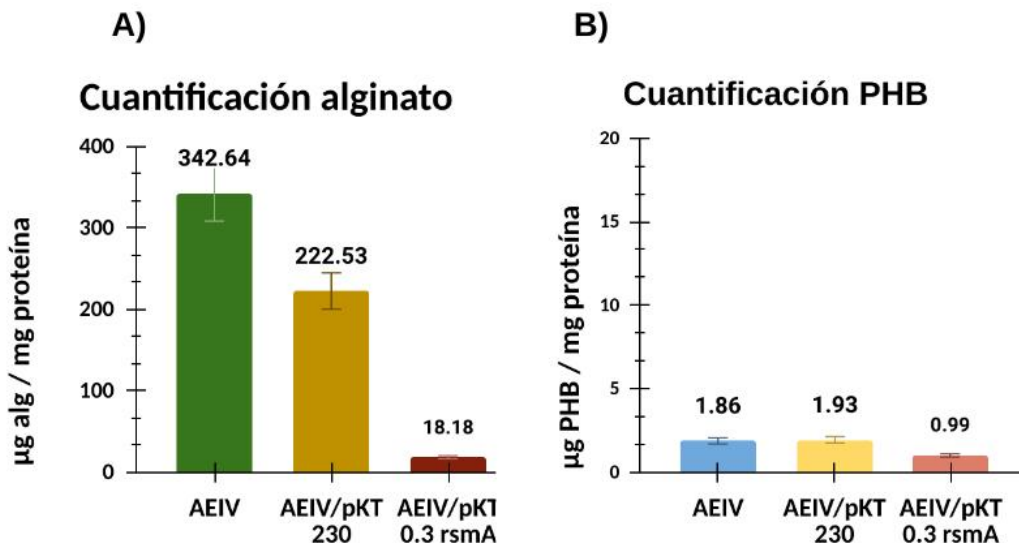
En un estudio se consiguió recuperar mutantes nulas *csrA* en *E. coli*, para ello las células se seleccionaron en fuentes de carbono que entran directamente al ciclo de Krebs. En esta bacteria CsrA controla el flujo de carbono intracelular regulando positivamente la vía de la glucólisis, pero al mismo tiempo regula negativamente la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno. Por lo tanto, en ausencia de CsrA la síntesis de glucógeno se ve fuertemente favorecida, lo cual genera un estrés metabólico en la bacteria perjudicando la viabilidad. Tal como se muestra en la **Fig. 13**, la mutante *csrA* no presentó crecimiento en medio mínimo con glucosa o fructuosa-6-fosfato como única fuente de carbono. Sin embargo, creció cuando la fuente de carbono era piruvato (fuente de carbono en la unión entre la glucólisis y el ciclo de Krebs). Esto indica que, al crecer a la bacteria en fuentes de carbono glucolíticas, el flujo de carbono se direcciona hacia la síntesis de glucógeno, disminuyendo de esta manera la glucólisis y el ciclo de Krebs. Para superar esta condicionalidad, se generó una mutante incapaz de sintetizar glucógeno (deletando el operón *glgCAP*) las cuales fueron capaces de

soportar sin mayor problema la mutación nula en *csrA* en cualquier fuente de carbono (Timmermans & Van Melderren, 2009).



**Fig. 13.** La acumulación excesiva de glucógeno en la mutante  $\Delta csrA::cat$  perjudica la viabilidad en fuentes de carbono glucolíticas. Las mutantes  $\Delta csrA::cat$  (panel izquierdo) y  $\Delta csrA::cat\Delta glgCAP$  (panel derecho), se sembraron en medio mínimo con con glucosa (B y F), fructosa-6-fosfato (C y G) o piruvato (D y H) como única fuente de carbono. Tomado de Timmermans & Van Melderren, 2009.

En otro estudio se determinó la cantidad de alginato y PHB producido en tres cepas de *A. vinelandii*: la cepa E, la mutante AEIV / pKT 230 (sin el gen *rsmA*) y la mutante AEIV / pKT 0.3 *rsmA* (que sobre expresa a *rsmA*). Como se muestra en la **Fig. 14**, en la sobre expresión la producción de alginato disminuyo en un 95% y la de PHB en un 50% con respecto a la cepa silvestre, evidenciando la regulación negativa ejercida por RsmA en la producción de ambos polímeros. Por otra parte, se aprecia que en la mutante AEIV / pKT 230 la producción de alginato es alrededor de 115 veces más respecto a la cantidad de PHB (Cocotl-Yañez, 2007), estos datos mostraron que *A. vinelandii* pudiera exhibir una actividad similar a la de la mutante en *csrA* de *E. coli*, donde en ausencia de *rsmA* el flujo de carbono se direcciona hacia la síntesis de alginato presentándose una disminución del flujo para la producción de PHB y el ciclo de Krebs.



**Fig. 14.** Cuantificación de alginato A) y PHB B) en la cepa silvestre (AEIV), la cepa que contiene el plásmido pKT 230 (AEIV / pKT 230), y la cepa AEIV / pKT 0.3 *rsmA* (derivada de la AEIV que porta un plásmido con la región estructural del gen *rsmA*). Las cepas se cultivaron en medio mínimo (Burk) líquido adicionado con sacarosa. Tomado de Cocotl-Yañez, 2007.

Ante lo anteriormente discutido, en *A. vinelandii* se podría estar presentando un fenómeno similar, en el que la síntesis de alginato tomaría el papel de la síntesis de glucógeno en *E. coli*; por lo que se generó una mutante por remoción total de *rsmA* en un fondo genético no productor de alginato. Para construir la mutante  $E\Delta rsmA::Sm$ , se transformó el plásmido pUC19 $\Delta rsmA::\Omega Sm$ <sup>1</sup> en la cepa no mucoide  $E\Delta algD$ <sup>2</sup>. Sin embargo, solo se obtuvieron mutantes merodiploides (Morales-Sandoval, 2014).

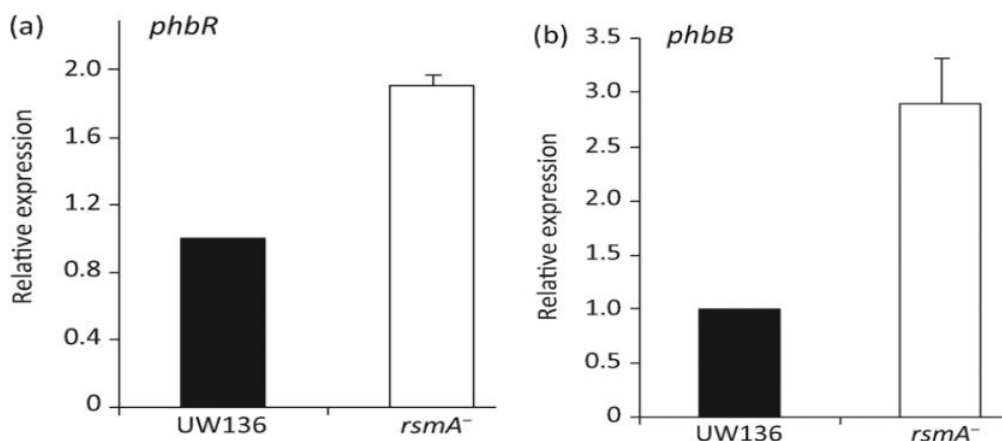
Por otra parte, hay evidencia de que una mutante que porta una mutación en *rsmA* derivada de la cepa no mucoide UW136<sup>3</sup> de *A. vinelandii*, aumentó la producción de PHB en un 25% en comparación su cepa madre. Adicionalmente, se monitoreó la proporción de la expresión de los transcritos correspondientes a los genes *phbB* y *phbR* en ambas cepas mediante una qRT-PCR; como se muestra en la **Fig. 15**, en la mutante en *rsmA* los niveles de

<sup>1</sup> Derivado del pUC19 que contiene un fragmento de 2 Kb en el que se removió por completo el gen *rsmA* y se insertó en su lugar el interosón  $\Omega Sm$  (Cocotl-Yañez, 2007).

<sup>2</sup> Derivada de la cepa silvestre E. La pérdida del fenotipo mucoide es resultado de una mutación en la que se removió gran parte de la región catalítica y parte del sitio de pegado a sustrato del gen *algD*, para abatir por completo la actividad de la enzima GDP-6-manosa deshidrogenasa (GMD), y en su lugar se insertó un casete que confiere resistencia a kanamicina (Km) (Morales-Sandoval, 2014). La enzima GMD es fundamental en la vía biosintética del alginato.

<sup>3</sup> La pérdida del fenotipo mucoide es resultado de una mutación del gen que codifica para el factor sigma AlgU implicado en la transcripción de genes necesarios para la producción de alginato (Martínez-Salazar *et al.*, 1996).

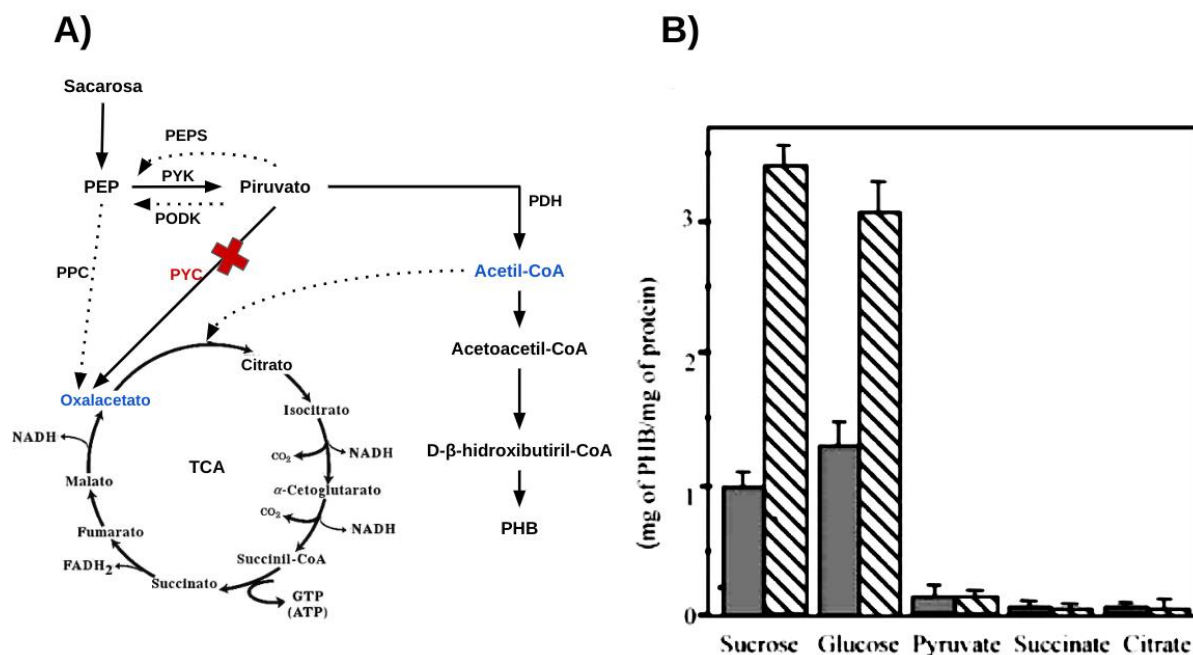
los mRNA de ambos genes aumentaron en comparación con su expresión en la cepa silvestre (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).



**Fig. 15.** Análisis de qRT-PCR de las transcripciones de *phbR* (a) y *phbB* (b) utilizando ARN aislado de cultivos de las cepas UW136 y *AhrsmA*. Las cepas de *A. vinelandii* se cultivaron en medio PY hasta la fase estacionaria. Los valores son la media de tres experimentos independientes. Tomado de Hernández-Eligio *et al.*, 2012.

### 3.2. Generación de la mutante *EΔalgD::Sp-pycA::Km*

A nivel metabólico se demostró que una mutante en la piruvato carboxilasa (*pycA*) sobre el fondo genético UW136 tiene un efecto positivo en la producción de PHB (**Fig. 16-B**). La producción de poliéster por la mutante en presencia de fuentes glucolíticas (sacarosa y glucosa) aumentó 3.5 y 2 veces respectivamente con relación a su cepa madre. En cambio, en presencia de intermediarios del ciclo de Krebs, hubo un efecto inhibitorio en la producción de PHB en la cepa silvestre y no se observó un efecto de sobreproducción del polímero en la mutante. Se propuso que la mayor acumulación de PHB en la mutante en *pycA* es el resultado del siguiente proceso (**Fig. 16-A**): la eliminación de *pycA* da como resultado una reserva de oxalacetato más baja y, como el flujo del acetil-CoA en el ciclo TCA depende de que este se condense con oxaloacetato para producir citrato, el resultado es que el acetil-CoA permanece disponible para la síntesis de PHB (Segura & Espín, 2004).



**Fig. 16. A)** Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en *pycA*. **B)** Acumulación de PHB por las cepas de *Azotobacter vinelandii* UW136 (barras rellenas) y la mutante con una inserción mini-Tn5 en *pycA* (barras con líneas) cultivadas en medio PY sólido suplementado con 2% de la fuente de carbono indicada. PYC piruvato carboxilasa, PYK, piruvato quinasa, PPC fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPS fosfoenolpiruvato sintasa, PODK piruvato fosfato diquinasa, PDH piruvato deshidrogenasa. Tomado de Segura & Espín, 2004.

Teniendo presente el estudio anterior, en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana BUAP (GMM) se construyó la mutante por inserción *EpycA*: interrumpiendo el gen *pycA* con un casete de resistencia a kanamicina (Km) proveniente del pBSL97 (Alexeyev *et al.*, 1995). Este sería transformado sobre el fondo genético no productor de alginato *EΔalgD::Sp*<sup>4</sup> (Zárate-Morales, 2020).

### 3.3. Generación de la mutante *EΔalgD::Sp-pycA::KmΔrsmA::Gm*

Considerando la importancia de la disponibilidad del acetil-CoA para promover la síntesis de PHB, el papel de la proteína RsmA como represora de la transcripción del operón *phbBAC* y tomando en cuenta las mutantes reportadas, se construyó la mutante *EpycAΔrsmA* con la finalidad de dirigir y aumentar la producción de PHB. Para lo cual, el plásmido

<sup>4</sup> Derivada de la cepa *EΔalgD*, en la que se removió el casete de Km y en su lugar se insertó un casete de espectinomicina (Sp) (Zárate-Morales, 2020).

pUC19*rsmA*::Gm<sup>5</sup> se transformó en la cepa *EpycA*. La generación de las mutantes triples fue exitosa sin presencia de copias del gen silvestre *rsmA* (Zárate-Morales, 2020).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente una de las principales causas del deterioro ambiental es la expansión del uso de materiales petroquímicos (fabricados a partir de combustibles fósiles) para la manufactura de productos plásticos. Para su eliminación se ha recurrido a métodos como el enterramiento o la quema, sin embargo, al tratarse de plásticos no biodegradables, estas prácticas propician la generación de microplásticos que pueden transferirse a través de cadenas tróficas; además, en la quema de plásticos se liberan dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero que, a su vez, atrapan el calor en la atmósfera terrestre, convirtiéndolos en los principales responsables del calentamiento global y del cambio climático.

Los PHA son termoplásticos naturales con propiedades físicas semejantes a las de plásticos petroquímicos como el polietileno (PE) y el polipropileno (PP), además al ser materiales biodegradables deberían ser aceptados por un mercado que enfatice la sostenibilidad. Sin embargo, solo unos pocos PHA se producen a gran escala con éxito de mercado limitados: estos son el poli-3-hidroxi-butirato (PHB), el poli-4-hidroxi-butirato (P4HB), su copolímero P(3HB-co-4HB), los copolímeros de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-valerato P(3HB-co-3HV), y los copolímeros de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-hexanoato P(3HB-co-3HHX) (Zheng *et al.*, 2020). El éxito limitado de los PHA se debe a sus altos costos de producción, unas diez veces mayores que el de los plásticos petroquímicos. El costo de producción de los biopolímeros es de aproximadamente 6-15 USD/kg, lo cual es bastante alto en comparación con los polímeros sintéticos como el PE y el PP, que cuestan 0.23-0.48 USD/kg (Sirohi *et al.*, 2020).

En la producción convencional de PHB se emplean azúcares puros como fuente de carbono (Zytner *et al.*, 2023). El costo de la materia prima constituye más de la mitad del costo total de producción de biopolímeros, y aproximadamente el 70–80% del costo de la materia prima es la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de los microorganismos (Sirohi *et al.*, 2020). Esto se ve reflejado en el costo de venta, por ejemplo, el PHB ronda en los 30 USD/kg como lo vende Goodfellow®, una reconocida empresa con sede en el Reino Unido, este precio de mercado del PHB de origen microbiano es entre un 20 y un 80% más alto que el de los polímeros derivados del petróleo que cuestan 1.25-2.53 USD/kg (Manikandan *et al.*, 2021;

---

<sup>5</sup> pUC19Δ*rsmA*::ΩSm en el que se removió el interposón de ΩSm y en su lugar se insertó un casete de gentamicina (Gm) (Zárate-Morales, 2020).

Alvarez-Chavez *et al.*, 2022). Para reducir el costo de los PHA se ha propuesto el uso de azúcares no estandarizadas, además de la vinculación genética de las enzimas de la vía PHA con los genes esenciales en la producción de estos, así mediante la ingeniería genética se puede dirigir el flujo de carbono haciendo específica la producción de los PHA (Park *et al*, 2024).

## 5. JUSTIFICACIÓN

En *A. vinelandii*, la regulación genética de la biosíntesis de PHB involucra al sistema de regulación postranscripcional Rsm, en el que la proteína RsmA reprime la transcripción del operón biosintético *phbBAC* y de su activador transcripcional *phbR*. Además, a nivel metabólico la enzima piruvato carboxilasa (PYC) cataliza la formación de oxalacetato a partir de piruvato, posteriormente el acetil-CoA se condensa con oxalacetato para generar citrato, producto que permite continuar el ciclo TCA, con lo cual se restringe el flujo del acetil-CoA hacia la síntesis de PHB. Por ello, la realización del siguiente trabajo permitirá comprender el efecto sobre la producción de PHB en *A. vinelandii* ejercido tanto por las mutaciones individuales en *pycA* y *rsmA* como por la mutante en ambos reguladores sobre el fondo genético de una la cepa no productora de alginato  $E\Delta algD$ . Así como determinar si la producción del polímero a través de las mutaciones en los sistemas reguladores mencionados está influenciada por la fuente de carbono utilizada durante el crecimiento bacteriano.

## 6. HIPÓTESIS

Las cepas mutantes en los genes que codifican para los reguladores *pycA* y *rsmA* tienen una producción mayor de PHB en comparación con su cepa madre no productora de alginato ( $E\Delta algD$ ).

## 7. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar las mutantes  $E\Delta algD$ ,  $E\Delta algD\Delta rsmA$ ,  $E\Delta algD::pycA$  y  $E\Delta algD::pycA\Delta rsmA$  relacionadas con la producción de PHB.

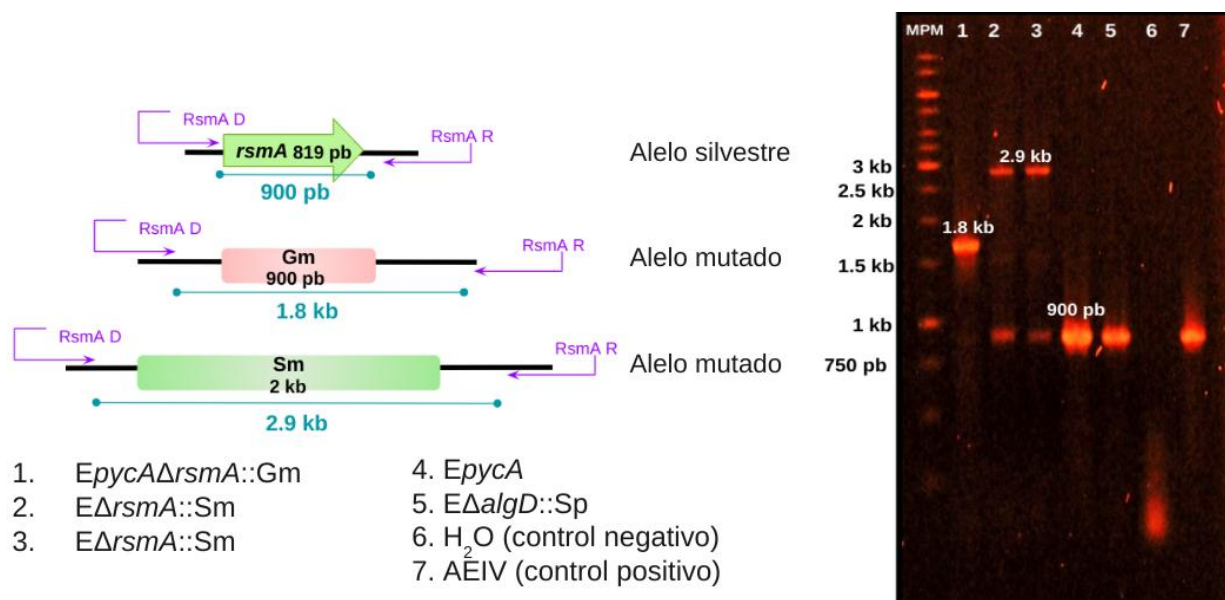
### Objetivos particulares

1. Comprobar la mutación en *rsmA* generada en las cepas *EΔalgDΔrsmA* y *EΔalgD::pycAΔrsmA*.
2. Determinar el efecto de las fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas en las mutantes sobre la producción de PHB.
3. Medir la producción de PHB en diferentes fuentes de carbono en medio líquido: en la mutante simple *EΔalgD*, mutantes dobles *EΔalgDΔrsmA*, *EΔalgD::pycA* y mutante triple *EΔalgDΔrsmA::pycA*.
4. Medir la producción de PHB en medio sólido (bajo condiciones de disminución de la transferencia de oxígeno): en la mutante simple *EΔalgD*, mutantes dobles *EΔalgDΔrsmA*, *EΔalgD::pycA* y mutante triple *EΔalgDΔrsmA::pycA*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Comprobación de las mutantes en *rsmA*

Para lograr el primer objetivo, se extrajo el DNA genómico de las cepas previamente generadas en el laboratorio, sobre el fondo genético no productor de alginato *EΔalgD*. Posteriormente se comprobó la mutación en *rsmA* que portaban las mutantes *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* mediante una reacción de PCR usando el par de oligonucleótidos RsmAD y RsmAR (con una  $T_m$  de 58 °C y un tiempo de extensión de dos minutos). En las cepas *EpycA*, *EΔalgD::Sp* y la silvestre AEIV, usadas como controles positivos, se amplificó un fragmento de 0.9 Kb correspondiente al alelo silvestre *rsmA*, ya que en estas cepas no está mutado el gen *rsmA*. En la cepa *EpycAΔrsmA* se amplificó el gen mutado con un casete de gentamicina (1.8 kb). Finalmente, en la mutante *EΔrsmA::Sm* se observó que tiene coexistiendo copias del gen silvestre de *rsmA* (900 pb) y el mutado con un casete de estreptomicina (2.9 kb) (**Fig. 17**).



**Fig. 17.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los amplificados del alelo silvestre *rsmA* (en las mutantes *EpycA*, *E*Δ*algD*::Sp y *E*Δ*rsmA*::Sm) y los alelos mutados (en *EpycA*Δ*rsmA* y *E*Δ*rsmA*::Sm), usando los oligonucleótidos RsmAR y RsmAD.

## 8.2. Efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de PHB

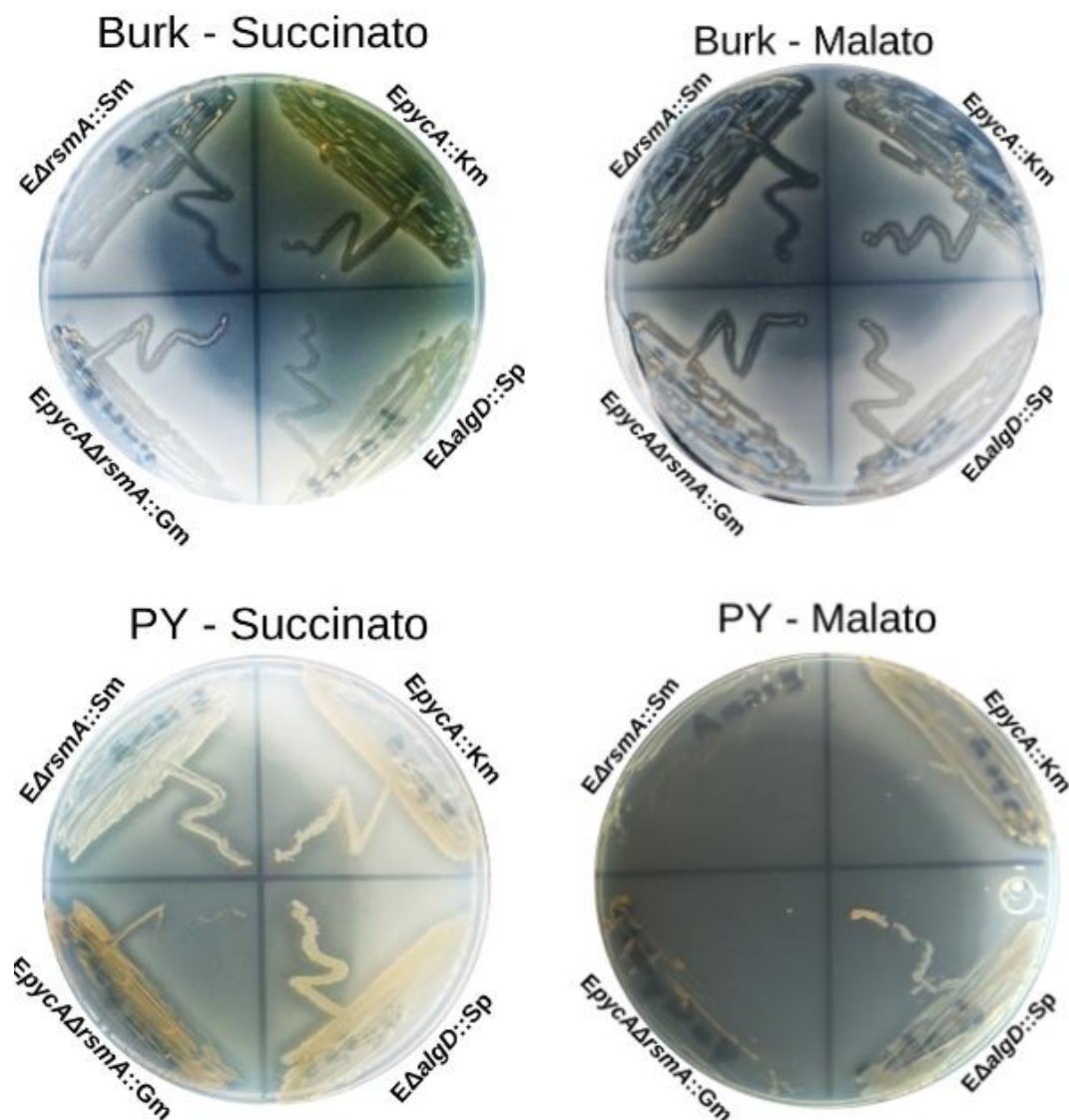
En *A. vinelandii*, se han utilizado fuentes de carbono glucolíticas (sacarosa y glucosa) e intermediarios del ciclo TCA (piruvato, succinato y citrato) en medio rico PY, para medir su efecto sobre la producción de PHB en una mutante en el gen *pycA* derivada de la cepa no productora de alginato UW136 (Segura & Espín, 2004). Además, se ha medido el efecto sobre la producción de alginato usando fuentes de carbono glucolíticas (fructosa y glucosa) y succinato como fuente gluconeogénica en medio mínimo de Burk en mutantes individuales por remoción de los *rsmZ*-sRNAs sobre el fondo genético AIEV, registrando el mejor efecto sobre la disminución de alginato en presencia de fructosa en comparación con las otras fuentes de carbono (López- Pliego *et al.*, 2018), por lo que tal condición podría estar favoreciendo la producción de PHB en estas mutantes.

Tomando como referencia los estudios anteriores, se quiso explorar el efecto de diferentes tipos de fuentes de carbono glucolíticas (sacarosa, glucosa y fructosa) y gluconeogénicas (succinato y malato) en los medios sólidos de Burk y PY para visualizar su efecto en la producción de PHB. La acumulación de PHB es fácilmente visualizada correlacionando la producción del polímero con el fenotipo blanquecino y la opacidad del crecimiento celular.

### 8.2.1. Efecto de las fuentes gluconeogénicas sobre la producción de PHB

Como resultado del ensayo fenotípico en medio mínimo Burk con fuentes gluconeogénicas, las mutantes presentan un tapete celular de apariencia traslucida sobre la superficie del agar, sugiriendo que son incapaces de producir PHB.

En cuanto al medio PY, se observa un tapete celular más saturado en presencia de succinato en comparación con malato. En ambas fuentes de carbono la mutante sencilla (*EΔalgD::Sp*), la doble *EpycA* y triple (*EpycAΔrsmA*) presentan colonias de color naranja claro. Además, en succinato las cuatro mutantes y en malato tanto la mutante sencilla como las dobles, tienen una ligera pigmentación blanquecina opaca indicando la producción de PHB (**Fig. 18**).

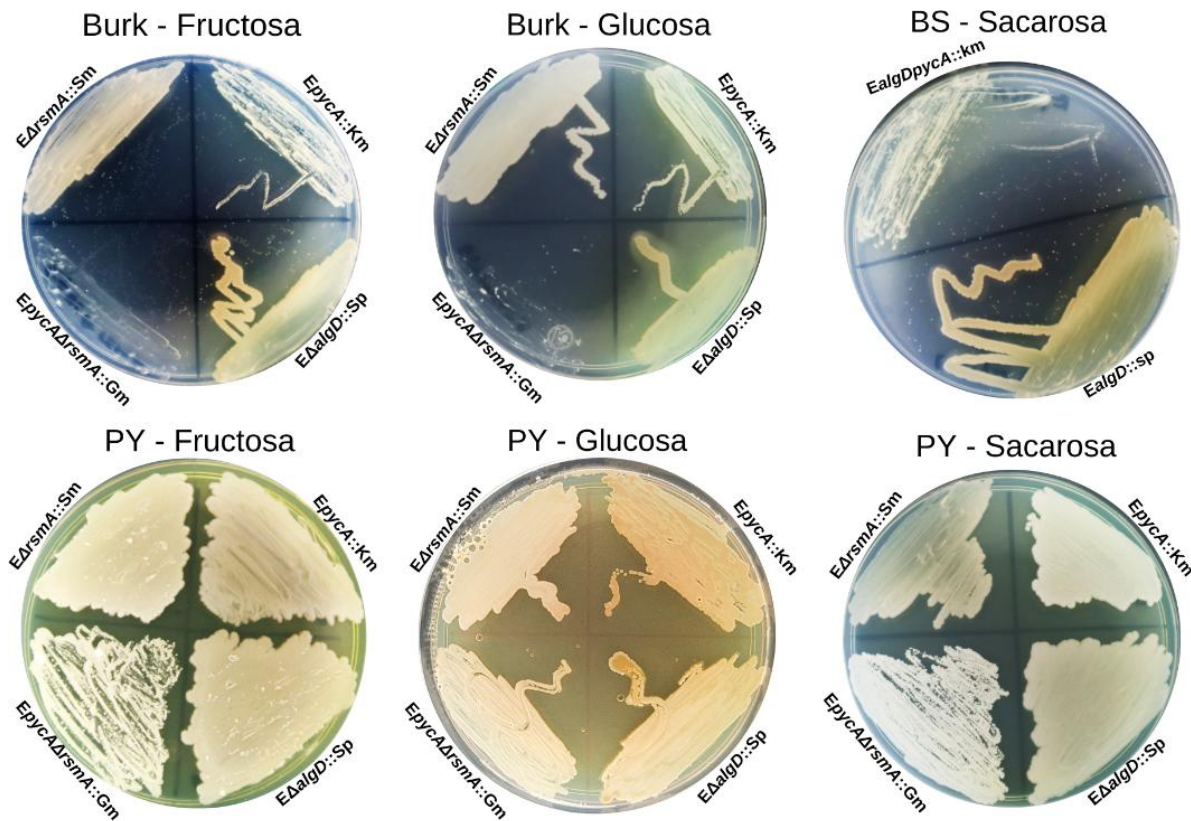


**Fig. 18.** Efecto de las mutantes sobre la producción de PHB, en medio sólido Burk (paneles superiores) y PY (paneles inferiores) adicionados con 2% de las fuentes de carbono gluconeogénicas. Las mutantes se incubaron a 30°C durante 5 días para registrar su fenotipo.

### 8.2.2. Efecto de las fuentes glucolíticas sobre la producción de PHB

Con respecto al medio Burk adicionado con fuentes glucolíticas, tanto la mutante simple como la doble  $E\Delta rsmA::Sm$  muestran una mayor saturación del tapete celular comparada con la mutante doble  $EpycA$ . Además, la opacidad en las mutantes dobles es mayor a la de las colonias que solo tienen la mutación en el gen  $algD$ . En este medio, la mutante triple muestra un crecimiento casi nulo presentándose como colonias pequeñas puntiformes de color blanco traslucido.

En medio PY adicionado con cada fuente glucolítica, todas las cepas exhiben colonias robustas con una pigmentación blanquecina. Además, la opacidad en las colonias de las mutantes  $EpycA$  y  $EpycA\Delta rsmA$  es más pronunciada que en las mutantes sencilla y  $E\Delta rsmA::Sm$  (Fig. 19), lo cual puede sugerir un aumento de la acumulación de PHB en estas cepas.



**Fig. 19.** Efecto de las mutantes sobre la producción de PHB, en medio sólido Burk (paneles superiores) y PY (paneles inferiores) adicionados con 2% de las fuentes de carbono glucolíticas. Las mutantes se incubaron a 30°C durante 5 días para registrar su fenotipo.

### 8.3. Efecto de las mutaciones en los genes *algD*, *pycA* y *rsmA* sobre la producción de PHB

Una vez realizados los ensayos fenotípicos para corroborar cualitativamente la producción de PHB en las diferentes condiciones propuestas, se planteó realizar la cuantificación del biopolímero en medio PY adicionado con 2% de sacarosa, glucosa, fructosa y succinato en medio líquido (en matraces de 125 ml tapados con tapón de algodón) y sólido (en placas Petri de (60 X 15 mm); de acuerdo con la metodología descrita por Lowry (1951) para proteína, y por Law y Slepecky (1961) para PHB.

Es importante mencionar que, aun presentando merodiploidia, cuando la mutante *EΔrsmA::Sm* se estrió en medio PY en presencia de las todas las fuentes glucolíticas se observaron colonias blancas, robustas y opacas, fenotipo que confirma la producción de PHB, por lo que se decidió cuantificar la producción del poliéster en esta cepa.

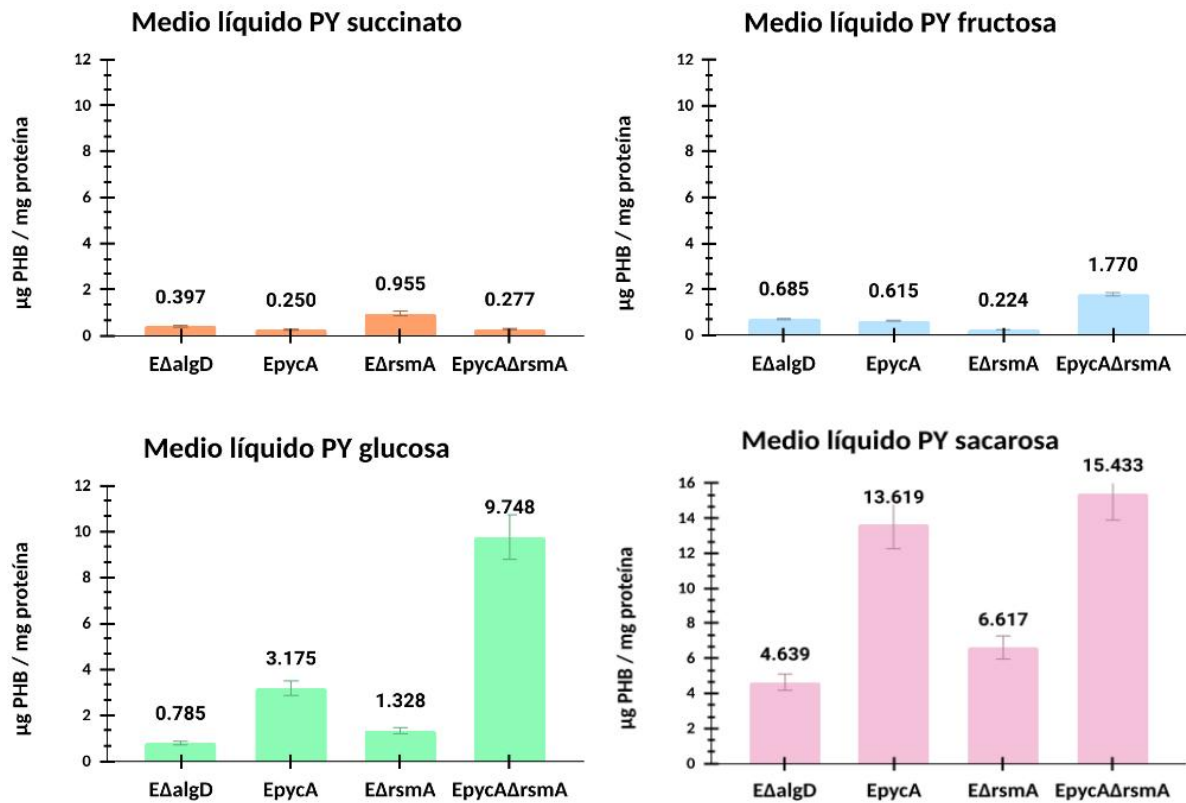
#### 8.3.1 Cuantificación de PHB en medio líquido

En succinato, tanto la cepa *EpycA* como la cepa *EpycAΔrsmA* muestran una disminución en la síntesis del polímero, alrededor de un 37% ( $0.250 \pm 0.001$ ) y un 30% ( $0.277 \pm 0.002$ ) respectivamente, en relación con la cepa *EΔalgD::Sp* ( $0.397 \pm 0.002$ ). En cambio, en la mutante *EΔrsmA::Sm* ( $0.955 \pm 0.045$ ) se presenta un efecto positivo aumentando casi 2.5 veces la producción de PHB en comparación con la mutante sencilla.

En fructosa, la cepa *EΔrsmA::Sm* muestra una disminución en la producción de PHB, aproximadamente 3 veces menos ( $0.224 \pm 0.029$ ) comparada tanto con la cepa *EΔalgD::Sp* ( $0.685 \pm 0.068$ ) como con la cepa *EpycA* ( $0.615 \pm 0.032$ ). En la mutante *EpycAΔrsmA* se observa un efecto positivo aumentando la producción en poco más del doble ( $1.770 \pm 0.014$ ) en comparación con la mutante sencilla.

Con glucosa, la acumulación de PHB aumenta casi el doble en la mutante *EΔrsmA::Sm* ( $1.328 \pm 0.011$ ) con respecto a la mutante *EΔalgD::Sp* ( $0.785 \pm 0.039$ ), también hay un aumento del polímero de 4 veces en la cepa *EpycA* ( $3.175 \pm 0.048$ ) y de poco más de 12 veces en cepa *EpycAΔrsmA* ( $9.748 \pm 0.591$ ) con respecto a la mutante sencilla.

Finalmente, en sacarosa tanto las mutantes dobles como la triple muestran un efecto positivo en la síntesis del biopolímero en relación con la mutante *EΔalgD::Sp* ( $4.639 \pm 0.142$ ), aumentando 1.4 veces en la cepa *EΔrsmA::Sm* ( $6.617 \pm 0.214$ ), el triple en la mutante *EpycA* ( $13.619 \pm 0.325$ ) y casi 4 veces más en *EpycAΔrsmA* ( $15.433 \pm 0.725$ ). Por lo que, entre las fuentes de carbono probadas, demostró ser la más apropiada para favorecer la acumulación de PHB en medio PY líquido.



Fuente de carbono	Cepa	µg PHB/mg proteína
Fructosa	EΔalgD::Sp	0.685 ± 0.068
	EpycA	0.615 ± 0.032
	EΔrsmA::Sm	0.224 ± 0.029
	EpycAΔrsmA	1.770 ± 0.014
Sacarosa	EΔalgD::Sp	4.639 ± 0.142
	EpycA	13.619 ± 0.325
	EΔrsmA::Sm	6.617 ± 0.214
	EpycAΔrsmA	15.433 ± 0.725
Glucosa	EΔalgD::Sp	0.785 ± 0.039
	EpycA	3.175 ± 0.048
	EΔrsmA::Sm	1.328 ± 0.011
	EpycAΔrsmA	9.748 ± 0.591
Succinato	EΔalgD::Sp	0.397 ± 0.002
	EpycA	0.250 ± 0.001
	EΔrsmA::Sm	0.955 ± 0.045
	EpycAΔrsmA	0.277 ± 0.002

**Fig. 20.** Cuantificación de la producción de PHB en presencia de fructosa, sacarosa, glucosa o succinato (2%) como fuente de carbono en medio líquido PY en las mutantes EΔalgD::Sp, EpycA, EΔrsmA::Sm y EpycAΔrsmA de *A. vinelandii*.

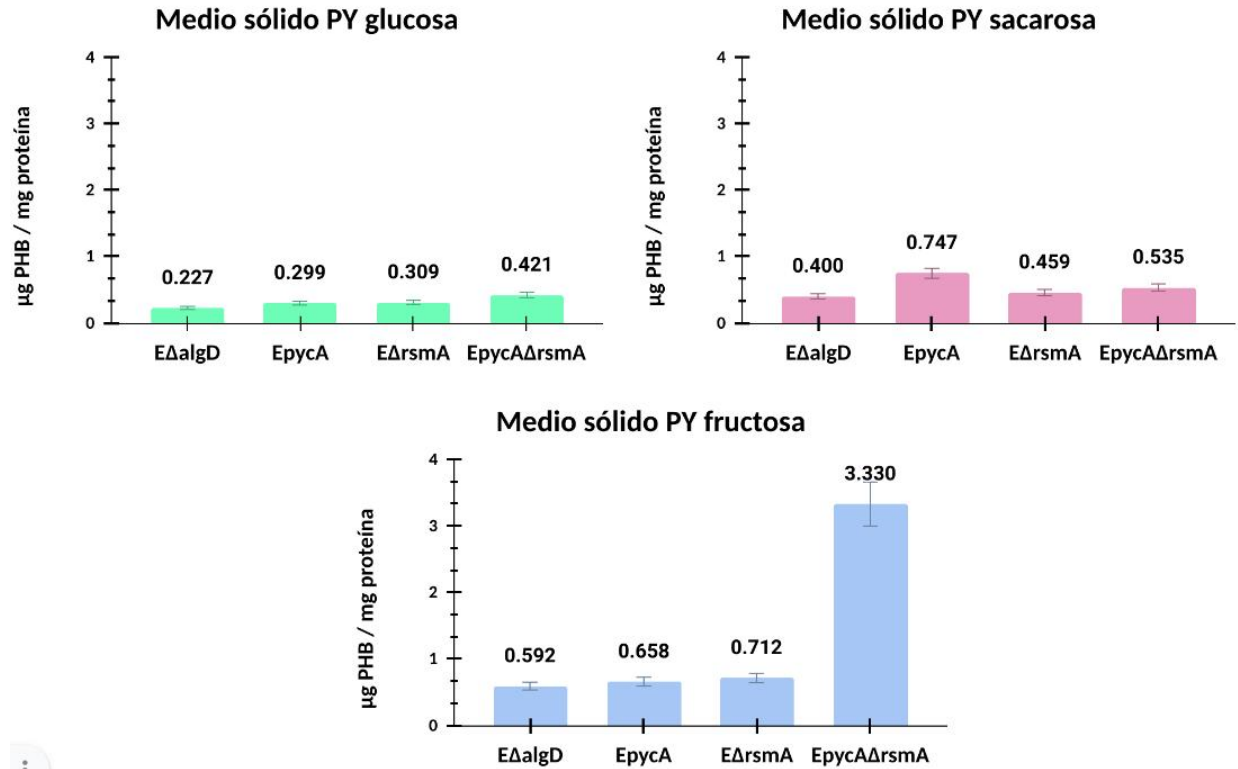
### 8.3.2 Cuantificación de PHB en medio sólido

Al comenzar la caracterización fenotípica encontramos que las mutantes fueron capaces de crecer en medio PY sólido adicionado con succinato. Sin embargo, presentan un crecimiento lento en medio líquido; como parte de los ensayos de cuantificación, tras 24 horas de incubación en medio líquido PY adicionado con succinato se observa crecimiento casi nulo y floculado, por lo que, al inocular las mutantes (provenientes de medio líquido) en medio PY sólido con succinato, no fueron capaces de crecer ni de producir PHB (imágenes no mostradas).

En medio suplementado con glucosa se aprecia un incremento gradual en la producción del polímero, en la cepa *EpycA* aumentando alrededor de un 24% ( $0.299 \pm 0.0012$ ), en *EΔrsmA::Sm* aproximadamente un 26% ( $0.309 \pm 0.0058$ ) y en *EpycAΔrsmA* un 46% ( $0.421 \pm 0.0013$ ) sobre la mutante *EΔalgD::Sp* ( $0.227 \pm 0.0033$ ).

En sacarosa, las cepas *EΔrsmA::Sm* ( $0.459 \pm 0.0032$ ) y *EpycAΔrsmA* ( $0.535 \pm 0.0045$ ) muestran un efecto parcial en la producción de PHB en relación con la cepa *EΔalgD::Sp* ( $0.400 \pm 0.0029$ ), mientras que *EpycA* tiene un efecto positivo aumentando casi el doble ( $0.747 \pm 0.0057$ ) la producción del polímero con respecto a la mutante sencilla.

En presencia de fructosa, se observa un efecto positivo acentuado en la mutante *EpycAΔrsmA* con un aumento de poco más de 5 veces ( $3.330 \pm 0.0370$ ) comparada con la cepa *EΔalgD::Sp* ( $0.592 \pm 0.0024$ ), mientras que las mutantes dobles *EpycA* ( $0.658 \pm 0.0006$ ) y *EΔrsmA::Sm* ( $0.712 \pm 0.0048$ ) presentan un efecto parcial en la producción del polímero aumentando un 10% y 16% respectivamente con relación a la mutante sencilla. Por lo que, entre las fuentes de carbono probadas, demostró ser la más apropiada para favorecer la acumulación de PHB en medio PY sólido.



Fuente de carbono	Cepa	µg PHB/mg proteína
Fructosa	<i>EΔalgD::Sp</i>	0.592 ± 0.0024
	<i>EpycA</i>	0.658 ± 0.0006
	<i>EΔrsmA::Sm</i>	0.712 ± 0.0048
	<i>EpycAΔrsmA</i>	3.330 ± 0.0370
Sacarosa	<i>EΔalgD::Sp</i>	0.400 ± 0.0029
	<i>EpycA</i>	0.747 ± 0.0057
	<i>EΔrsmA::Sm</i>	0.459 ± 0.0032
	<i>EpycAΔrsmA</i>	0.535 ± 0.0045
Glucosa	<i>EΔalgD::Sp</i>	0.227 ± 0.0033
	<i>EpycA</i>	0.299 ± 0.0012
	<i>EΔrsmA::Sm</i>	0.309 ± 0.0058
	<i>EpycAΔrsmA</i>	0.421 ± 0.0013

**Fig. 21.** Cuantificación de la producción de PHB en presencia de fructosa, sacarosa o glucosa (2%) como fuente de carbono en medio sólido PY en las mutantes *EΔalgD::Sp*, *EpycA*, *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* de *A. vinelandii*.

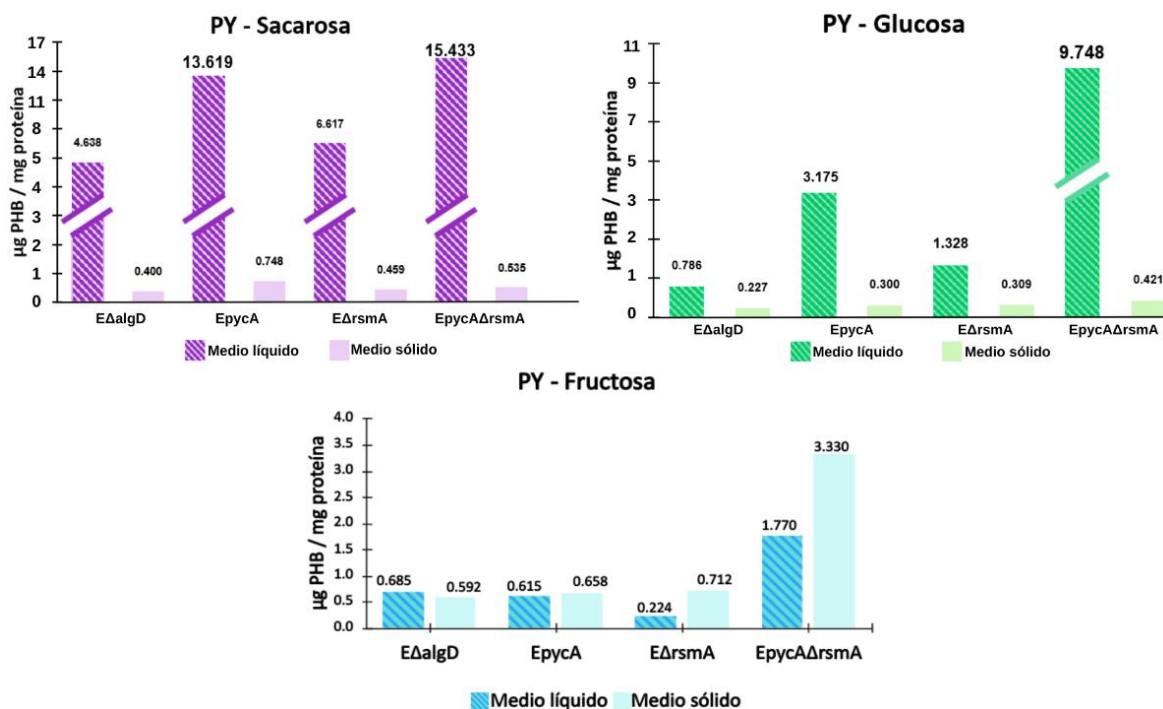
### 8.3.3. Influencia de la transferencia de oxígeno en el medio para la producción de PHB

La cuantificación de PHB se efectuó bajo dos condiciones con respecto a la aireación del cultivo: en matraces con tapón de algodón, que promueve una mayor transferencia de oxígeno, y en placas de Petri donde el nivel de oxigenación es menor.

En medio líquido adicionado con sacarosa, las mutantes *EΔalgD::Sp*, *EpycA*, *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* producen 11, 18, 14 y 28 veces más PHB respectivamente que en medio sólido.

En medio líquido con glucosa, las mutantes *EΔalgD::Sp*, *EpycA*, *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* acumulan 3, 10, 4 y 23 veces más PHB con respecto al acumulado en medio sólido.

Finalmente, en presencia de fructosa, en medio sólido las mutantes *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* acumulan 3 y 1 vez más PHB respectivamente que en medio líquido. En la cepa *EΔalgD::Sp* aunque se aprecia un ligero aumento en medio líquido con respecto al sólido, no hay diferencia significativa ( $\pm$ SD) en la producción del poliéster entre ambas condiciones de cultivo, se obtuvo un resultado similar en la mutante *EpycA* con un ligero aumento en la producción en medio sólido con respecto al líquido.



**Fig. 22.** Comparación de la producción de PHB en medio PY sólido y líquido (adicionado con 2% de fructosa, sacarosa o glucosa) en las mutantes *EΔalgD::Sp*, *EpycA*, *EΔrsmA::Sm* y *EpycAΔrsmA* de *A. vinelandii*.

## 9. DISCUSIÓN

Respecto a la producción de PHB en la mutante simple en *pycA* descrita por Segura *et al.* 2004, esta mostraba un aumento de la producción en presencia de sacarosa y glucosa por un posible aumento del acetil-CoA utilizada por la vía de síntesis de PHB. Así mismo, se describió un efecto catabólico de la fuente de carbono, en presencia de glucosa y sacarosa la mutante en *pycA* no es capaz de crecer en medio mínimo Burk, mientras que, en presencia de una fuente de carbono como succinato o piruvato, es capaz de crecer, lo que indica que la actividad de PYC es proveer de oxalacetato al ciclo de Krebs.

En este estudio al utilizar como fuente de carbono fructosa, podemos notar que no existe un efecto positivo sobre la producción de PHB, es destacable en este sentido que la fructosa es una fuente de carbono que no sigue la misma vía metabólica como lo hace la glucosa, puesto que el metabolismo de glucosa en *A. vinelandii* sigue la vía Entner Doudoroff por la ausencia de la enzima 6-fosfofructoquinasa y la consecuente formación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), el que será escindido por acción de la KDPG aldolasa (Eda) para formar piruvato y gliceraldehído 3-fosfato; el piruvato por su parte puede ser convertido a acetil-CoA a través de la piruvato deshidrogenasa, alimentando así la vía de síntesis de PHB (Conway, 1992; Castillo, 2013; Wilkes *et al.*, 2019). Sin embargo, la fructosa puede ser asimilada a través del sistema PTS<sup>Fru</sup> (Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate-phosphotransferase System por sus siglas en inglés) que bajo la conversión a fructosa 1-6 bisfosfato sigue la vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Pflüger-Grau & de Lorenzo, 2014).

Por su parte la utilización de succinato en la síntesis de PHB no tiene un gran efecto, porque como fuente de carbono entra directamente a el ciclo tricarboxílico, permitiendo la generación de cofactores reducidos y energía para la producción de biomasa, pero no promueve la formación del acetil-CoA como precursor para la producción de PHB, por lo que observamos valores muy bajos en la producción de PHB en todas las mutantes (valores por debajo de 1 µg de PHB/mg de proteína).

Así mismo, la proteína RsmA, es una proteína de unión a RNA mensajeros y su principal actividad es la represión de la expresión de los genes que se encuentran sobre su control. En *E. coli*, el sistema Csr, homologo al Rsm, la proteína CsrA promueve la glucólisis, inhibiendo la traducción de mRNA blanco relacionado con la producción de glucógeno (Timmermans & Van Melderen, 2009). En el caso de *A. vinelandii*, la proteína RsmA controla la producción de alginato de manera prioritaria, por ello se generó una mutación en el gen *algD*,

esencial en la producción de alginato para poder observar sus efectos sobre la producción de PHB. Estudios de transcriptoma muestran que el regulador global CsrA en *E. coli* regula de forma directa más de 400 genes de forma negativa (Potts *et al.*, 2017); sin embargo, uno de los efectos en la generación de una mutante CsrA genera una disminución en la estabilidad de los RNA mensajeros producidos por la célula, así como un defecto en el crecimiento bacteriano (Timmermans & Van Melderen, 2009), por lo que posiblemente el efecto observado en la disminución de la producción de PHB en *A. vinelandii* en todas las mutantes *rsmA* pueda deberse por un efecto del crecimiento que posiblemente es compensado cuando se genera la mutante *EpycAΔrsmA*, por lo que aumenta hasta cuatro veces más la producción de PHB comparada con la mutante *EalgD* en presencia de sacarosa. Además, en la mutante *EpycAΔrsmA*, se presenta un efecto aditivo en la producción del metabolito tomando en cuenta la producción de este en las mutantes dobles *EpycA* y *EΔrsmA::Sm*, por lo que el efecto observado podría atribuirse a la existencia de una actividad sinérgica al mutar ambos reguladores negativos.

Respecto a la regulación de la producción de PHB se conoce que existen reguladores que podrían estar afectando su producción como es *rpoS*, que es regulado por DksA en condiciones de limitación de nutrientes (falta de ácidos grasos, de fosfatos, de carbono, de hierro) generando una respuesta al estrés, denominada *stringent* o estricta (Potrykus & Cashel, 2008; Ortiz-Vasco *et al.*, 2024); así mismo la regulación ejercida por el sistema de fosfotransferasa relacionada con nitrógeno PTS<sup>NTR</sup>, es un sistema homólogo al sistema PTS de transporte de carbohidratos, se encuentra compuesto por las proteínas EI<sup>Ntr</sup>, Npr, EIIA<sup>Ntr</sup>; estas proteínas se encuentran participando en la cascada de fosforilación donde EIIA<sup>Ntr</sup> parece ser el aceptor final (Muriel-Millán *et al.*, 2017). La inactivación de los componentes del sistema reduce la síntesis de PHAs por un aumento en el nivel de EIIA<sup>Ntr</sup> no fosforilado. Aún se desconoce la cascada de eventos que se confluyen con la disminución de la producción de PHB (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

El PHB es almacenado en gránulos intracelulares rodeados por una capa de fosfolípidos asociados a proteínas. Entre estas proteínas se encuentran las sintasas de PHB, las despolimerasas y un grupo de proteínas conocidas como fasinas (PhbP en *Azotobacter vinelandii*). Las fasinas promueven el crecimiento bacteriano, la síntesis del gránulo y la distribución de los gránulos. Además de las funciones estructurales de las fasinas en el gránulo se han descrito diferentes funciones de las fasinas: activan la despolimerización de los gránulos de PHB, incrementan la expresión y actividad de las PHA sintasas, entre otras (Parlane *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, existen diversos niveles de regulación que pueden afectar la expresión de los genes relacionados con la síntesis de PHB, entre ellos *rpoS*, la activación del sistema PTS<sup>NTR</sup>, la regulación ejercida a nivel del activador transcripcional *phbR*; la regulación a nivel post-transcripcional ejercida por la proteína RsmA que se ha demostrado ejerce un efecto de control directo sobre *phbR*, pero que aún se desconoce qué otros elementos podría estar regulando de forma global. Así mismo la participación de otras vías de regulación de la producción del polímero a través de las fasinias, y las depolimerasas del gránulo, podrían ejerciendo un efecto sobre la producción del polímero en las mutantes *pycA-rsmA* expuestas en el presente escrito.

Finalmente, en este estudio la cuantificación de PHB se efectuó bajo dos condiciones de aireación, cultivos en matraces agitados en los que se promovió una mayor transferencia de oxígeno al usar tapones de algodón en comparación con los cultivos en medio sólido en placas de Petri donde el nivel de oxigenación es menor. Se ha reportado para algunas cepas de *A. vinelandii*, que la limitación de oxígeno conduce a un aumento de la producción de PHB, debido a una acumulación de poder reductor que provoca la inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la activación de la enzima  $\beta$ -cetotiolasa, y por lo tanto, la síntesis de PHB (Galindo *et al.*, 2007). Este comportamiento no se observó en nuestros experimentos, porque la producción de PHB ( $\mu\text{g}$  de PHB/mg de proteína) en las mutantes *pycA-rsmA* en condiciones de limitación de oxígeno fue similar a la cepa madre *EalgD*, y menor que la mostrada en cultivos en matraces con una mayor transferencia de oxígeno. Aunque no se puede dar una explicación definitiva para nuestros resultados, es posible que este comportamiento pueda deberse a diferencias entre las cepas utilizadas en estudios anteriores y las cepas probadas en el presente estudio, puesto que los mecanismos reguladores podrían tener un rango diferente de sensibilidad al oxígeno, o la actividad respiratoria podría ser distinta entre las diferentes cepas de *A. vinelandii*, por lo que será necesario realizar más estudios para explicar la razón de estas diferencias.

## 10. CONCLUSIONES

1. Hay un aumento en la producción de PHB dependiente de la fuente de carbono empleada.
2. Las mutantes dobles *EpycA* y *E $\Delta$ rsmA::Sm* presentan una mayor producción de PHB en comparación con la cepa *E $\Delta$ algD::Sp* en presencia de sacarosa y glucosa en medio PY líquido.

3. En medio PY líquido adicionado con sacarosa, al mutar los reguladores negativos RsmA y PYCA en una misma cepa (*EpycAΔrsmA*), se presenta un efecto aditivo en la producción de PHB tomando en cuenta la producción del metabolito en las mutantes dobles.
4. Se observa una mayor producción de PHB en medio PY líquido adicionado con sacarosa y glucosa en comparación con la obtenida bajo condiciones de disminución de la transferencia de oxígeno en medio PY sólido.

## 11. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar la producción de PHB usando fuentes de carbono alternativas, como los subproductos de la industria alimentaria (melazas, vinazas, suero de queso), así como determinar si su utilización mejora la producción de PHB en relación con el uso de fuentes de carbono estandarizadas con un alto grado de pureza como las empleadas en el presente estudio.
2. Investigar el efecto que produce la mutación en *rsmA* sobre la expresión de los genes regulatorios y biosintéticos de PHB, mediante la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales *phbB-gusA* y *phbR-gusA* en los fondos genéticos que se analizaron en este estudio.

## 12. MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1. Medios de cultivo:

#### → Agar Agua

Agua bidestilada	800ml
Agar bacteriológico	15 g

#### → Medio mínimo Burk

##### Soluciones para el medio

<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	3.66 g/200 ml	
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1.46 g/200 ml	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	32 g/200 ml	
<b>NaMnO<sub>4</sub></b>	0.04 g/200 ml	
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	1.0 g/200 ml	Preparar en frasco ámbar
<b>Buffer fosfatos</b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.2 g	Volumen final de 400 ml, ajustar pH a 7 con HCl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g	
Fuente de carbono 20%	80 g/400 ml	

Nota: Todas las soluciones para medio Burk se esterilizan a 10 psi durante 20 minutos.

Descripción	ml/L
Fuente de carbono 20%	100
Buffer fosfatos	100
CaCl <sub>2</sub>	10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
MgCl <sub>2</sub>	1
FeSO <sub>4</sub>	1
NaMnO <sub>4</sub>	1
Agar agua (para sólido)	800

→ **Medio Peptone - Yeast Extract (PY)**

Descripción	g/100 ml
Peptona de caseína	0.5
Extracto de levadura	0.3
Agar bacteriológico	1.5
H <sub>2</sub> O	90 ml
Fuente de carbono al 20% p/V	10 ml

→ **Antibióticos**

Las concentraciones de antibióticos utilizadas (en mg/ml) para *A. vinelandii* en medio sólido fueron las siguientes: kanamicina (Km) 4, gentamicina (Gm) 1.5, estreptomycinina (Sm) 2 y espectinomycinina (Sp) 2.

## 12.2. Material biológico

### Cepas utilizadas en este estudio

Cepas de <i>A. vinelandii</i>	Descripción	Referencia
E (AIEV)	Cepa silvestre mucoide (productora de alginato), NaI <sup>R</sup> .	Larsen & Haug, 1971
E $\Delta$ algD::Sp	Derivada de la cepa E $\Delta$ algD (generada a partir de la cepa E con una mutación por inserción/remoción $\Delta$ algD::Km) por un cambio de casete de kanamicina a espectinomycinina.	Zárate-Morales, 2020
E $\Delta$ rsmA::Sm (E $\Delta$ algD::Km $\Delta$ rsmA::Sm)	Derivada de la cepa E $\Delta$ algD, con el plásmido pUC19 $\Delta$ rsmA:: $\Omega$ Sm que carga la remoción total del gen <i>rsmA</i> .	Morales-Sandoval, 2014
EpycA (E $\Delta$ algD::Sp-pycA::Km)	Derivada de la cepa E $\Delta$ algD::Sp, a la que se le mutó el gen <i>pycA</i> por inserción de un casete de kanamicina.	Zárate-Morales, 2020
EpycA $\Delta$ rsmA (E $\Delta$ algD::Sp-pycA::Km $\Delta$ rsmA::Gm)	Derivada de la cepa EpycA a la que se le insertó el plásmido pUC19 $\Delta$ rsmA::Gm.	

## 12.3. Procedimientos de manejo de ácidos nucleicos

### 12.3.1. Extracción de DNA genómico de *A. vinelandii*

1. A partir de una placa fresca de PY inocular en medio PY líquido en agitación (25 ml) o sólido, con el marcador de selección, durante 48 h a 30 °C.

2. Cosechar las células por centrifugación. En el caso de cultivo sólido, coleccionar con un broche "BACO" la mitad de la superficie de una placa grande en estría masiva.
3. Lavar el paquete celular con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
4. Resuspender en 450 µl de buffer TE 50/20 (TRIS-HCl 1 M pH 7.5, 2.5 ml y EDTA 0.22M pH 8, 4.5 ml; mezclar y aforar a 50 ml).
5. Agregar 50 µl de lisozima (10 mg/ml), incubar 30 min a 37 °C.
6. Agregar 30 µl de proteasa (10 mg/ml), incubar 30 min a 37 °C.
7. Agregar 50 µl de SDS 10 %, incubar 15 min a 37 °C o hasta que se observe una solución turbia y viscosa.
8. Agregar 100 µl de NaCl 5M, mezclar e incubar 10 min a 65 °C.
9. Adicionar 80 µl de solución CTAB 10% NaCl 0.7 M (previamente incubada a 65 °C), incubar de 15 - 20 min a 65 °C.
10. Extraer una vez con un volumen de una solución cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, vortexear y centrifugar por 5 min.
11. Recuperar la fase superior y colocarla en un tubo Eppendorf nuevo.
12. Agregar 10 µl de sílica y dejar reposar por 5 min.
13. Centrifugar por 1 min, decantar sobrenadante.
14. Lavar 3 veces con 500 µl de solución de lavado "New Wash", retirar la mayor cantidad posible de sobrenadante en cada lavado.
15. Dejar secar pastilla a 50 °C.
16. Asegurándose que la sílica se encuentra completamente seca, agregar 30 µl de RNAsa diluida (2 µl/ml) e incubar a 37 °C por una hora.
17. Centrifugar por 2 min, recuperar el sobrenadante (sin tomar parte de la sílica) y depositarlo en un tubo Eppendorf nuevo.
18. Correr en gel de electroforesis.

### **Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Tm</b>	<b>Referencia</b>
RsmAD	CGACGGTGCGCATTATAGTGT	58 °C	Morales-Sandoval, 2014
RsmAR	CGGCGCACGCGAAGTCAT T	58 °C	

Se utilizó la enzima DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher Scientific) para las amplificaciones por PCR.

### **12.3.2. Condiciones de amplificación de PCR**

REACTIVO	VOLUMEN
DNA molde	1.0 $\mu$ l
Buffer	5.0 $\mu$ l
dNTP's 1.25 mM	8.0 $\mu$ l
Oligo Fw	1.0 $\mu$ l
Oligo Rv	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	33.0 $\mu$ l
Dream TaqPol	0.2 $\mu$ l

## 12.4. Métodos analíticos para la cuantificación de PHB:

### 12.4.1. Desarrollo del pre-inóculo

- Inocular por estría cruzada la cepa de *A. vinelandii* de interés, con su respectivo antibiótico de selección, en placas Petri pequeñas que contienen medio PY sólido enriquecido con la fuente de carbono de elección. Incubar durante 3 días a 30°C.
- Recoger colonias aisladas para preparar un pre-inóculo en 25 ml de medio PY líquido enriquecido con la fuente de carbono de elección<sup>6</sup>, incubar durante 24 h en agitación de 210 rpm a 30°C.

### 12.4.2. Desarrollo del inóculo para los cultivos en matraz

El cultivo para cuantificación en medio líquido (se realiza por triplicado):

- Tomar 1 ml del pre-inóculo para inocular 25 ml de medio PY líquido enriquecido con la fuente de carbono, incubar durante 5 días en agitación de 210 rpm y 30 °C.
- Tomar muestras de 1 ml de cultivo (una muestra para cuantificar proteína y otra para cuantificar PHB) y depositar cada una en un tubo Eppendorf, centrifugar por 2 minutos a 8000 rpm, lavar las células con MgSO<sub>4</sub> 10mM y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.
- Guardar en congelador.

### 12.4.3. Desarrollo del inóculo para los cultivos en cajas Petri

El cultivo para cuantificación en medio sólido (se realiza por triplicado):

- Tomar 200  $\mu$ l del pre-inóculo para inocular en placas Petri pequeñas que contienen el medio PY sólido con la fuente de carbono seleccionada. Agregar el pre-inóculo al centro de la placa, cuidando que crezca de forma uniforme como círculo, dejar secar por completo. Incubar durante 5 días a 30°C.

---

<sup>6</sup> Se utilizaron matraces de 125 ml (con tapón de algodón).

- Recoger con un broche Baco todo el tapete o crecimiento celular y depositar en un tubo Falcon de 15 ml para resuspender en 5 ml de MgSO<sub>4</sub>.
- Tomar muestras de 1 ml de cultivo (una muestra para cuantificar proteína y otra para cuantificar PHB) y depositar cada una en un tubo Eppendorf, centrifugar por 2 minutos a 8000 rpm, lavar las células con MgSO<sub>4</sub> 10mM y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.
- Guardar en congelador.

#### 12.4.2. Cuantificación de proteína por el método de Lowry:

La determinación de la cantidad de proteína total en la biomasa se llevó a cabo mediante el método de Lowry *et al.* (1951). La reacción de óxido-reducción se acompaña de la formación de un color azul cuya densidad óptica se determina a 625nm y es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

1. Resuspender las células en 1 ml de MgSO<sub>4</sub>
2. A partir de las células resuspendidas tomar 10 µl de células (depende del tamaño de muestra inicial) y agregar 190 µl de MgSO<sub>4</sub> para llevarlo a un volumen de 200 µl
3. Añadir 1 ml de la solución reactiva, mezclar con ayuda de un vortex y dejar reposar por 10 minutos
4. Agregar 100 µl de solución del Reactivo de Folin y dejar reposar por 30 minutos
5. Mezclar la solución con ayuda de un vortex y transferir inmediatamente la solución a una celda de cuarzo. Leer absorbancia a 625 nm.
6. Correr al mismo tiempo una curva de calibración usando albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/ml.

Reactivos:

- Solución reactiva: 1 ml solución C + 1 ml solución B + 98 ml solución A.  
Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1N  
Solución B: Tartrato de NaK 2%  
Solución C: CuSO<sub>4</sub> 1%
- Reactivo de Folin (solución en una relación 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu con H<sub>2</sub>O)
- Curva de calibración de albúmina:

STOCK Albúmina 2 mg/ml (µl)	MgSO <sub>4</sub> (µl)	Concentración de BSA (µg/mL)
0	200	0
2	198	4

4	196	8
8	192	16
16	184	32
32	168	64

Para realizar la cuantificación, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{proteína} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\left( \frac{\text{Lectura de absorbancia} - b}{m} \right) \cdot \text{Dilución}}{1000}$$

Donde b es la ordenada al origen y, m es la pendiente de la curva patrón.

#### 12.4.3. Extracción de PHB

1. Lavar las células una vez con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
2. Agregar 1 ml de NaHCl (hipoclorito de sodio comercial CLORALEX® o similar) al 30% y resuspender con un mezclador vortex
3. Depositar los tubos en un frasco e incubar por una hora y media a 37°C o por una hora a 30°C en agitación
4. Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
5. Lavar el paquete con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada
6. Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
7. Lavar el paquete con 1 ml de etanol al 100%
8. Centrifugar 2 min a 14000 rpm
9. Lavar el paquete con 1 ml de acetona
10. Centrifugar por 2 min a 14000 rpm
11. Dejar secar el paquete toda la noche a temperatura ambiente

#### 12.4.4. Cuantificación del contenido de PHB en la biomasa:

La cuantificación de PHB se realizó mediante la conversión a ácido crotónico por tratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (Law & Slepecky, 1961).

12. Agregar 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y resuspender con ayuda de un vortex
13. Transferir el contenido a un tubo de ensayo de cristal (tapar la boca del tubo con una canica de vidrio)
14. Incubar a 90°C por 10 minutos (se debe observar un cambio en el color del ácido)
15. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente
16. Mezclar la solución con ayuda de un vortex y transferir inmediatamente a una celda de cuarzo.

17. Leer absorbancia a 235 nm, usar como blanco H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

La concentración de PHB se calculó a partir de la ecuación de Lambert-Beer y la fórmula de molaridad; conociendo el coeficiente de extinción molar (15600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), la longitud de la celda (1 cm), las lecturas de absorbancia, el volumen correspondiente a cada muestra (0.001 L), la masa molar del ácido crotonico (86 g/mol) y la cantidad de proteína total en la biomasa (proteína mg/ml).

$$\frac{\mu g \text{ PHB}}{mg \text{ proteína}} = \frac{\left[ \left( \frac{\text{Lectura absorbancia}}{(15600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})(1 \text{ cm})} \right) \left( 86 \frac{g}{mol} \right) (0.001 \text{ L}) \right] [1000000]}{\text{proteína} \frac{mg}{ml}}$$

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Acharjee, S. A., Bharali, P., Gogoi, B., Sorhie, V., Walling, B., & Alemtoshi. (2023). PHA-Based Bioplastic: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 234(1), 21.
2. Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63-67.
3. Alvarez-Chavez, B., Raghavan, V., & Tartakovsky, B. (2022). A comparative analysis of biopolymer production by microbial and bioelectrochemical technologies. *RSC Advances*, 12(25), 16105-16118.
4. Azizi, N., Eslami, R., Goudarzi, S., Habibollah Younesi, & Hadis Zarrin. (2024). A Review of Current Achievements and Recent Challenges in Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates: Production and Potential Applications. *Biomacromolecules*, 25(5), 2679-2700.
5. Barati, F., Asgarani, E., Gharavi, S., & Soudi, M. R. (2021). Considerable increase in Poly(3-hydroxybutyrate) production via phbC gene overexpression in *Ralstonia eutropha* PTCC 1615. *BioImpacts: BI*, 11(1), 53–57.
6. Bhagowati, P., Pradhan, S., Dash, H. R., & Das, S. (2015). Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus spp.* *Bioscience, Biotechnol. and Biochem.*, 79(9), 1454-1463.
7. Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiol. (Reading, England)*, 152(Pt 2), 405–418.
8. Castañeda, M., Espín, G., & López-Pliego, L. (2016). *Azotobacter vinelandii* small RNAs: Their roles in the formation of cysts and other processes. In *Non-coding RNAs and Inter-kingdom Communication* (pp. 67-82). Springer.
9. Castillo, T. (2013). La acetilación de los alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* en función de la tensión de oxígeno disuelto y de la velocidad específica de crecimiento. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
10. *CJ Biomaterials*. (2024). Cjbiomaterials.com.
11. Cocotl-Yañez, M. (2007). Caracterización del gen rsmA involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
12. Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol.*, 157(6), 1685-1693.
13. Conway T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS microbiology reviews*, 9(1), 1–27.
14. Costa, A., Encarnação, T., Tavares, R., Todo Bom, T., & Mateus, A. (2023). Bioplastics: Innovation for Green Transition. *Polymers*, 15(3), 517.
15. Do Santos, R., Girioli, J., & Santos, P. (2009). WO/2009/133516. Biodegradable thermoplastic compositions. OMPI. Wipo.int.
16. Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. *Microbios en línea*. Ed. Martínez-Romero, E & Martínez-Romero, J. Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN 968-36-8879-9.

17. Ferreiro, M. D., & Gallegos, M. T. (2021). Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.*, 23(10), 5670-5689.
18. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, 7.
19. González, Y., Meza, J. C., González, O., & Córdova, J. A. (2013). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates: Plastic microbial | Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115.
20. González-Casanova, A., Aguirre-von-Wobeser, E., Espín, G., Servín-González, L., Kurt, N., Spanò, D., Blath, J., & Soberón-Chávez, G. (2014). Strong seed-bank effects in bacterial evolution. *J. of Theoretical Biology*, 356, 62-70.
21. Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). Gluconeogenesis. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. Ed. Lennarz, W. J., & Lane, M. D. (pp. 381-386). Elsevier.
22. Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiol.*, 157(11), 3014-3023.
23. Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol. (UK)*, 158(8), 1953-1963.
24. Heroven, A. K., Böhme, K., & Dersch, P. (2012). The Csr/Rsm system of yersinia and related pathogens: A post-transcriptional strategy for managing virulence. *RNA Biology*, 9(4), 379-391.
25. Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *J. of Bacteriol.*, 104(1), 492-498.
26. Jaso, M. A. (2020). El surgimiento de los bioplásticos: un estudio de nichos tecnológicos. *Acta Universitaria*, 30, 1-24.
27. Julinová, M., Šašínková, D., Minařík, A., Kaszonyiová, M., Kalendová, A., Kadlečková, M., Fayyazbakhsh, A., & Koutný, M. (2023). Comprehensive Biodegradation Analysis of Chemically Modified Poly(3-hydroxybutyrate) Materials with Different Crystal Structures. *Biomacromolecules*, 24(11), 4939-4957.
28. Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.*, 40(6), 2173-2182.
29. Kim, M.-N., Lee, A.-R., Yoon, J.-S., & Chin, I.-J. (2000). Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European Polymer J.*, 36(8), 1677-1685.
30. Lai, H., Kraszewski, J. L., Purwantini, E., & Mukhopadhyay, B. (2006). Identification of pyruvate carboxylase genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and development of a *P. aeruginosa*-based overexpression system for alpha4- and alpha4beta4-type pyruvate carboxylases. *Applied and Environ. Microbiol.*, 72(12), 7785-7792.
31. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.*, 67(2), 241-253.
32. Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J. of Bacteriol.*, 82(1), 33-36.

33. Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., & Shen, X. (2018). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiol.*, 8, 230.
34. López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Biotechnol.*, 60(9), 670-680.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The J. of Biological Chem.*, 193(1), 265-275.
36. Maestro, B. & Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnol.*, 10(6), 1323-1337.
37. Mahato, R. P., Kumar, S., & Singh, P. (2023). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable resources: a review on prospects, challenges and applications. *Arch. of Microbiol.*, 205(172). Springer.
38. Manikandan, N. A., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2021). Techno-economic assessment of a sustainable and cost-effective bioprocess for large scale production of polyhydroxybutyrate. *Chemosphere*, 284, 131371.
39. Martínez-Ortiz, I. C., Ahumada-Manuel, C. L., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Waters, C. M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G. & Núñez, C. (2020). Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*. *J. of Bacteriol.*, 202(24).
40. Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G., & Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor algU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. of Bacteriol.*, 178(7), 1800-1808.
41. Mazinani, Z., & Asgharzadeh, A. (2014). Genetic diversity of *Azotobacter* strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytol. and Genet.*, 48(5), 293-301.
42. McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*. 12(12), 2908.
43. Mercante, J., Edwards, A. N., Dubey, A. K., Babitzke, P., & Romeo, T. (2009). Molecular Geometry of CsrA (RsmA) Binding to RNA and Its Implications for Regulated Expression. *J. of Mol. Biology*, 392(2), 511-528.
44. Miller, C. L., Romero, M., Karna, S. L. R., Chen, T., Heeb, S., & Leung, K. P. (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol.*, 16(1), 155.
45. Morales-Sandoval, I. P. (2014). Generación y caracterización de mutantes de rsmA en *Azotobacter Vinelandii*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
46. Mukherjee, A., & Koller, M. (2023). Microbial PolyHydroxyAlkanoate (PHA) Biopolymers-Intrinsically Natural. *Bioengineering*, 10(7), 855-855.

47. Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017). Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molec. Microbiol.*, *104*(2), 197-211.
48. Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiol. (UK)*, *164*(4), 421-436.
49. Ortiz-Vasco, C. C., Moreno, S., Quintero-Navarro, L. A., Rojo-Rodríguez, J. B., & Espín, G. (2024). The stringent response regulates the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS one*, *19*(4).
50. Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?. *Microbial Ecology*, *63*(2), 239-248.
51. Park, H., He, H., Yan, X., Liu, X., Scrutton, N. S., & Chen, G. Q. (2024). PHA is not just a bioplastic!. *Biotechnol. Advances*, *71*, 108320.
52. Parlane, N. A., Gupta, S. K., Rubio-Reyes, P., Chen, S., Gonzalez-Miro, M., Wedlock, D. N., & Rehm, B. H. A. (2017). Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, *3*(12), 3043-3057.
53. Peña, C., López, S., Andrés García, Espín, G., Romo-Urbe, A., & Segura, D. (2013). Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiol.*, *64*(1), 39-47.
54. Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnol.*, *7*(4), 278-293.
55. Peoples, O. P., & Sinskey, A. J. (1989). Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *The J. of Biological Chem.*, *264*(26), 15298–15303.
56. Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. of Bacteriol.*, *184*(20), 5672-5677.
57. Pflüger-Grau, K., & de Lorenzo, V. (2014). From the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system to selfish metabolism: A story retraced in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Letters*, *356*(2), 144-153.
58. Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2006). Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules. In *Inclusions in Prokaryotes* (pp. 109-136). Springer-Verlag.
59. Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiol.*, *62*(1), 35-51.
60. Potts, A. H., Vakulskas, C. A., Pannuri, A., Yakhnin, H., Babitzke, P., & Romeo, T. (2017). Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. *Nature Communications*, *8*(1), 1596.
61. Quiroz-Rocha, E., Moreno, R., Hernández-Ortiz, A., Juan Carlos Fragosó-Jiménez, Luis Felipe Muriel-Millán, Guzmán, J., Espín, G., Rojo, F., & Núñez, C. (2017). Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Scientific Reports*, *7*(1), 858.
62. Romeo, T., Vakulskas, C. A., & Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: Form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.*, *15*(2), 313-324.
63. Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, *39*(4), 516-539.

64. Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. of Microbiol.*, 179(6), 437-443.
65. Segura, D., & Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, 65(4), 414-418.
66. Sehgal, R., & Gupta, R. (2020). Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech*, 10(12), 549.
67. Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernández, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., ... Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. of Bacteriol.*, 191(14), 4534-4545.
68. Sirohi, R., Prakash Pandey, J., Kumar Gaur, V., Gnansounou, E., & Sindhu, R. (2020). Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technol.*, 311, 123536.
69. Song, H., Li, Y., & Wang, Y. (2023). Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. *Engineering Microbiol.* Elsevier.
70. Timmermans, J., & Van Melder, L. (2009). Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *J. of Bacteriol.*, 191(5), 1722-1724.
71. Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of Bacterial Virulence by Csr (Rsm) Systems. *Microbiol. and Molec. Biology Reviews*, 79(2), 193-224.
72. Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., & Segura, D. (2020). The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnol.*, 8, 386.
73. Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The Role of Bacterial Polyhydroxyalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International J. of Environ. Research and Public Health*, 20(4), 2959.
74. Wilkes, R. A., Mendonca, C. M., & Aristilde, L. (2018). A Cyclic Metabolic Network in *Pseudomonas protegens* Pf-5 Prioritizes the Entner-Doudoroff Pathway and Exhibits Substrate Hierarchy during Carbohydrate Co-Utilization. *Applied and Environ. Microbiol.*, 85(1).
75. Zambrano, H., & Antonieta, M. (2021). Desafío de los polihidroxicanoatos como solución al problema de los plásticos de un solo uso. *Publicaciones En Ciencias y Tecnología. Vol, 15*, 15-26.
76. Zárate-Morales, B. (2020). Estudio del papel del sistema de control post transcripcional RSM en la producción de poli-beta hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
77. Zhang, Y., Zhang, B., Wu, H., Wu, X., Yan, Q., & Zhang, L. Q. (2020). Pleiotropic effects of RsmA and RsmE proteins in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *BMC microbiol.*, 20(1), 191.
78. Zheng, Y., Chen, J. C., Ma, Y. M., & Chen, G. Q. (2020). Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering*, 58, 82-93.

79. Zytner, P., Kumar, D., Elsayed, A., Mohanty, A., Ramarao, B. V., & Misra, M. (2023). A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustainability*. Royal Society of Chemistry.