

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**PHB despolimerasas de *Streptomyces exfoliatus* y *Streptomyces ascomycinicus*.
Caracterización de enzimas con potencial aplicación biotecnológica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier García Hidalgo

Directores

Isabel de la Mata Riesco
Miguel Arroyo Sánchez

Madrid, 2014



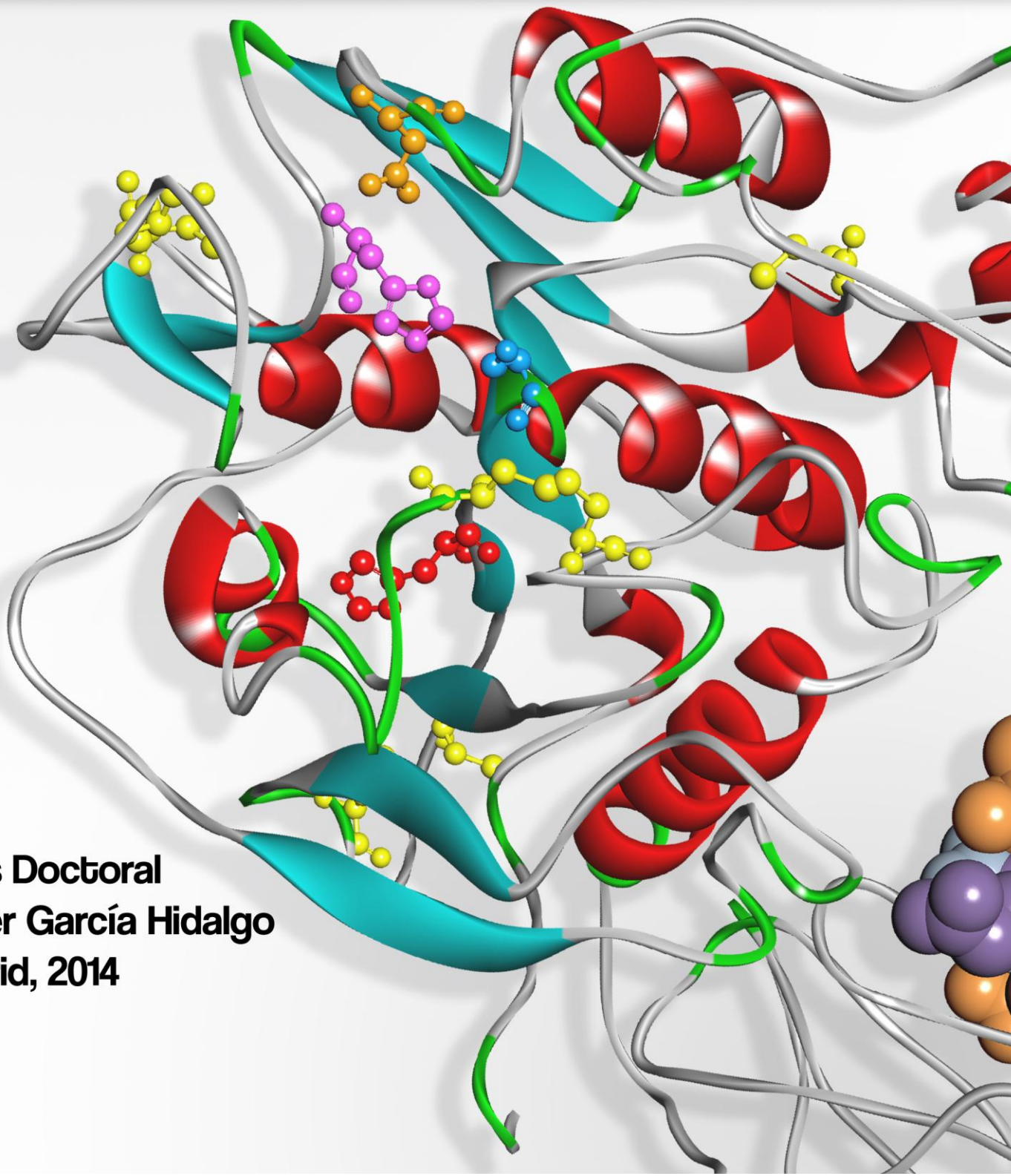
Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Facultad de Ciencias Biológicas

PHB despolimerasas de *Streptomyces exfoliatus* y *Streptomyces ascomycinicus*.

**Caracterización de enzimas con potencial
aplicación biotecnológica.**



**Tesis Doctoral
Javier García Hidalgo
Madrid, 2014**

Diseño de la portada y de la contraportada por Alberto Gutiérrez López y Javier Alonso Olaya, de Norden Estudio (www.nordenestudio.com).

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Facultad de Ciencias Biológicas



PHB despolimerasas de *Streptomyces exfoliatus* y
Streptomyces ascomycinicus. Caracterización de
enzimas con potencial aplicación biotecnológica

TESIS DOCTORAL

Javier García Hidalgo

Tesis dirigida por los Doctores Isabel de la Mata Riesco y Miguel Arroyo Sánchez

*Memoria presentada por D. Javier García Hidalgo para optar al título de Doctor en
Biología con Mención Europea, por la Universidad Complutense de Madrid*

Madrid, 2014

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Biotecnología Enzimática del departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, en la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado dentro del marco del proyecto integrado “Sustainable Microbial and Biocatalytic Production of Advanced Functional Materials” (BIOPRODUCTION/NMP-2-CT-2007-026515), financiado por la Comisión Europea.

El doctorando Javier García Hidalgo fue receptor de una beca predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid, desde Enero de 2010 hasta Enero de 2014.

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

Department of Biochemistry and Molecular Biology I

Faculty of Biological Sciences



PHB depolymerases from *Streptomyces exfoliatus*
and *Streptomyces ascomycinicus*. Characterization of
enzymes with potential biotechnological application

DOCTORAL THESIS

Javier García Hidalgo

Thesis supervised by Dr. Isabel de la Mata Riesco and Dr. Miguel Arroyo Sánchez

*Report presented by Mr. Javier García Hidalgo to apply for the degree of Doctor of Biology
with European Doctorate Mention, by the Complutense University of Madrid*

Madrid, 2014

This doctoral thesis has been carried out in the laboratory of Enzymatic Biotechnology of the department of Biochemistry and Molecular Biology I, in the faculty of Biological Sciences of the Complutense University of Madrid (Spain).

This work was carried out in the framework of the integrated project “Sustainable Microbial and Biocatalytic Production of Advanced Functional Materials” (BIOPRODUCTION/NMP-2-CT-2007-026515) funded by the European Commission.

The PhD student Javier García Hidalgo was the recipient of a predoctoral fellowship of the Complutense University of Madrid, from January 2010 to January 2014

LISTADO DE ABREVIATURAS	11
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	23
1. Biopolímeros	25
1.1 Bioplásticos.....	29
2. Polihidroxialcanoatos	32
2.1 Estructura y características de los gránulos de PHA	34
2.2 Biogénesis de los PHA	37
2.3 Propiedades fisicoquímicas de los PHAs	39
2.4 Aplicaciones de los PHAs	42
2.5 Degradación enzimática de PHA	47
2.5.1 Degradación intracelular de PHA:.....	48
2.5.2 Degradación extracelular de PHA:	49
2.5.3 Antecedentes y situación actual del estudio de las PHA despolimerasas.....	56
3. Características e importancia del género <i>Streptomyces</i>	58
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Reactivos	67
2. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	68
3. Plásmidos, manipulación y secuenciación de DNA	71
3.1 Construcción de cepas recombinantes	72
4. Preparación de suspensiones y emulsiones de PHA	75
5. Producción heteróloga de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	75
6. Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	76
6.1 Purificación de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} mediante cromatografía de intercambio aniónico	76
6.2 Purificación de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.....	77
7. Técnicas de análisis de proteínas	78
7.1 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	78
7.2 Inmunodetección de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	79
7.2.1 Producción, preadsorción y titulación de anticuerpos contra PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	79
7.2.2 Western blot	80

7.3 Determinación de la concentración de proteína	80
8. Secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	81
9. Espectrometría de masas MALDI-TOF de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	81
10. Cromatografía de filtración en gel de PhaZ_{Sex}	82
11. Ultracentrifugación analítica	82
12. Estudios de dicroísmo circular	83
13. Ensayos enzimáticos de actividad	83
13.1 Ensayo de actividad en placa	83
13.2 Ensayo turbidimétrico de actividad	83
13.3 Ensayo cromogénico de actividad con ésteres de <i>p</i> NP	84
13.4 Ensayo indirecto de actividad mediante β-hidroxibutirato deshidrogenasa	85
14. Identificación de los productos de reacción de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	86
15. Evaluación de los efectos de pH, temperatura y fuerza iónica sobre la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	87
16. Evaluación de la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} en presencia de sales, disolventes, detergentes y otros compuestos	88
17. Experimentos de liofilización de PhaZ_{Sex} en presencia de aditivos	88
18. Estudio de los parámetros cinéticos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	89
19. Experimentos de degradación enzimática de películas de PHB, PHBV y PHB-almidón mediante PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	89
20. Modificación química de aminoácidos	90
21. Mutagénesis dirigida de PhaZ_{Sa}	91
22. Inmovilización de PhaZ_{Sex}	91
22.1 Preparación de CLEAs de PhaZ _{Sex}	91
22.2 Microscopía confocal de CLEAs	92
22.3 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad de los CLEAs de PhaZ _{Sex} ...	93
23. Inmovilización de PhaZ_{Sa} en partículas magnéticas	93
23.1 Funcionalización de las partículas magnéticas	93
24. Experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos empleando PhaZ_{Sex} como catalizador ..	94
RESULTADOS	97

1. Búsqueda y detección de PHB despolimerasas extracelulares en cepas de <i>Streptomyces</i>	99
1.1 Búsqueda <i>in silico</i> de secuencias de PHB despolimerasas procedentes del género <i>Streptomyces</i>	99
1.2 Análisis y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	99
1.3 Evaluación de las actividades PHB y PHO despolimerasa extracelulares de cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i>	103
2. Clonación, expresión y purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	105
2.1 Clonación y expresión de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	105
2.2 Clonación y expresión de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} en <i>Rhodococcus</i> sp. T104	106
2.3 Secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	110
2.4 Análisis de un posible codón alternativo de inicio de la traducción de PhaZ _{Sa}	110
2.5 Purificación de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} mediante cromatografía de intercambio aniónico	111
2.5.1 DEAE-Sepharose	111
2.5.2 Amonio cuaternario-metacrilato	111
2.6 Purificación de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} mediante cromatografía de interacción hidrofóbica	112
2.7 Inmunodetección de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	115
3. Caracterización funcional y estructural de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	116
3.1 Espectros de absorbancia ultravioleta-visible de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	116
3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	116
3.3 Cromatografía de filtración en gel de PhaZ _{Sex}	117
3.4 Ultracentrifugación analítica de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	118
3.5 Estudios de dicroísmo circular	120
3.6 Predicción de la estructura secundaria de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	121
3.7 Evaluación de los efectos del pH sobre la actividad y estabilidad de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	122
3.8 Evaluación de los efectos de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	123
3.9 Evaluación de los efectos de la fuerza iónica sobre la actividad de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	125
3.10 Análisis de la actividad de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} en presencia de sales, disolventes, detergentes y otros compuestos.....	126
3.11 Experimentos de liofilización de PhaZ _{Sex} en presencia de aditivos	131
3.12 Estudios de especificidad de sustrato de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	131
3.13 Estudio de los parámetros cinéticos de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa} empleando PHB como sustrato	132
3.14 Identificación de los productos de reacción de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	133
3.15 Experimentos de degradación enzimática de películas de PHB, PHBV y PHB-almidón mediante PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	134
3.16 Modificación química de aminoácidos	139
3.17 Modelado de la estructura terciaria de PhaZ _{Sex} y PhaZ _{Sa}	140
3.18 Mutagénesis dirigida de PhaZ _{Sa}	144
4. Aplicaciones biotecnológicas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}	145
4.1 Inmovilización de PhaZ _{Sex} en agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)	145
4.1.1 Preparación de CLEAs	145
4.1.2 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de los PhaZ _{Sex} -CLEAs	146
4.1.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de los PhaZ _{Sex}	148
4.1.4 Termoinactivación de PhaZ _{Sex} -CLEAs.....	148

4.1.5 Actividad de PhaZ _{Sex} -CLEAs en presencia de distintos disolventes orgánicos	149
4.1.6 Reciclado de PhaZ _{Sex} -CLEAs	150
4.1.7 Microscopía confocal de PhaZ _{Sex} -CLEAs	150
4.2 Inmovilización de PhaZ _{So} en partículas magnéticas	151
4.2.1 Inmovilización covalente de PhaZ _{So} empleando glutaraldehído como agente de conjugación	151
4.2.2 Inmovilización covalente de PhaZ _{So} empleando EDC como agente de conjugación	153
4.2.3 Inmovilización no covalente de PhaZ _{So} mediante adsorción física	154
4.3 Experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos empleando PhaZ _{Sex} como catalizador	156
4.3.1 Experimentos de polimerización de lactonas por apertura de anillo (ROP)	156
4.3.2 Experimentos de polimerización contra acilación	157
4.3.3 Experimentos de polimerización de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-butirato de etilo	158
4.3.4 Experimentos de transesterificación entre PHB y alcoholes	158
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	159
1. Identificación y análisis de PHB despolimerasas extracelulares de <i>Streptomyces</i>	163
2. Detección de nuevas actividades PHB despolimerasa en cepas de <i>Streptomyces</i>	166
3. Clonación y expresión heteróloga de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}	166
4. Purificación de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}	169
5. Caracterización bioquímica y funcional de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}	170
6. Caracterización estructural de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}	178
7. Aplicaciones biotecnológicas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}	181
7.1 Inmovilización de PhaZ _{Sex} en CLEAs	181
7.2 Inmovilización de PhaZ _{So} en partículas magnéticas silanizadas	184
7.3 Reacciones de síntesis orgánica catalizadas por PhaZ _{Sex}	187
CONCLUSIONES	189
CONCLUSIONS	195
ANEXOS	201
Anexo 1: Secuencia de aminoácidos de PhaZ _{Sex} y secuencia de nucleótidos del gen <i>phaZ_{Sex}</i>	203
Anexo 2: Secuencia de aminoácidos de PhaZ _{So} y secuencia de nucleótidos del gen <i>fbkU</i>	209
BIBLIOGRAFÍA	211

Listado de abreviaturas y acrónimos usados en esta tesis

°C	Grados Celsius
3HAME	Éster metílico de (R)-3-hidroxicanoatos de cadena media
3HBME	Éster metílico de (R)-3-hidroxiacetato
Ap^R	Resistencia a ampicilina
APTMS	(3-aminopropil)trimetoxisilano
Asp	Ácido aspártico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BLOSUM	Matriz de sustitución de bloques de aminoácidos (<i>BLOcks of Amino Acid SUbstitution Matrix</i>)
BPB	Bromuro de bromofenacilo
BSA	Albúmina de suero bovino
c(s)	Distribución del coeficiente de sedimentación
CAI	Índice de adaptación de codones (<i>Codon Adaptation Index</i>)
CECT	Colección española de cultivos tipo
CLEAs	Agregados entrecruzados de enzima (<i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i>)
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
ColE1ori	Origen de replicación del plásmido ColE1
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Đ	Dispersidad de un polímero
Da	Dalton
DC	Dicroísmo Circular
DEAE	2-(Dietilamino)etanol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dPHA	PHA desnaturalizado
DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEO	Electroendoosmosis
e-PHA despolimerasas	PHA despolimerasas extracelulares
et al.	Y otros (<i>et alii</i>)

Listado de abreviaturas

g	Aceleración gravitatoria terrestre
g	Gramo
G+C	Guaninas y citosinas en una secuencia de DNA o RNA
GPC	Cromatografía de filtración en gel (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
i-PHA despolimerasas	PHA despolimerasas intracelulares
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KACC	Colección coreana de cultivos agrícolas (Korean Agricultural Culture Collection)
kDa	KiloDalton
kJ	KiloJulio
K_M	Constante de Michaelis-Menten
Km^R	Resistencia a kanamicina
kV	KiloVoltio
L	Litro
lacI	Gen del represor LacI del operón <i>lac</i> de <i>Escherichia coli</i>
lacZ	Gen de la β -galactosidasa en el operón <i>lac</i> de <i>Escherichia coli</i>
M	Molar (moles por litro)
m/z	Masa/Carga eléctrica
MALDI	Ionización con desorción por láser asistida por matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
mcl-PHA	PHA de cadena radical media
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfónico
μg	Microgramo
mg	Miligramo
μF	Microfaradio (unidad de capacidad eléctrica)
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μM	Micromolar (micromoles por litro)
mM	Milimolar (milimoles por litro)
M_n	Masa molecular promedio en número de un polímero
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
M_w	Masa molecular promedio en masa de un polímero
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
nm	Nanómetro
nPHA	PHA en estado nativo
NRRL	Colección de cultivos del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) de EEUU (<i>Northern Regional Research Laboratory</i>)
ORF	Marco abierto de lectura
P(HB-co-HH)	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi butirato-co-(<i>R</i>)-3-hidroxi hexanoato]
P(HB-co-HV)	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi butirato-co-(<i>R</i>)-3-hidroxi valerato]
P(HO-co-HH)	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi octanoato-co-(<i>R</i>)-3-hidroxi hexanoato]
p/v	Porcentaje en masa/volumen (gramos de soluto en 100 mililitros de disolvente)
P4HB	Poli(4-hidroxi butirato)
pAL500ori	Origen de replicación del plásmido pAL5000

pb	Pares de bases (unidad de longitud de secuencias de nucleótidos)
PBAT	Polibutilén adipato- <i>co</i> -tereftalato
PBS	Polibutilén succinato
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Poli(butilén succinato)- <i>co</i> -(butilén tereftalato)
PBT	Polibutilén tereftalato
PCL	Policaprolactona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Polietileno
PEG	Polietilenglicol
permE*	Promotor del gen de resistencia a la eritromicina de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> modificado
PES	Polietilén succinato
PET	Polietilén tereftalato
PGA	Ácido poli(γ -glutámico)
pH	Potencial de hidrógeno. Medida de la acidez o basicidad de una solución
PHA	Poli(hidroxi)alcanoato
PHB	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi]butirato]
PHBV	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi]butirato- <i>co</i> -(<i>R</i>)-3-hidroxi]valerato]
pHMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato
PHO	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi]octanoato]
PHV	Poli[(<i>R</i>)-3-hidroxi]valerato]
pI	Punto isoeléctrico
PL	ϵ -polilisina
PLA	Ácido poliláctico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNP	Paranitrofenol/4-nitrofenol
PP	Polipropileno
pUCori	Origen de replicación del plásmido pUC
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
pWHM4ori	Origen de replicación del plásmido pWHM4
R3HB	(<i>R</i>)-3-hidroxi]butirato
RBS	Sitio de unión del ribosoma en un fragmento de DNA o mRNA
RHAs	(<i>R</i>)-hidroxiácidos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
s	Coefficiente de sedimentación
S	Svedberg (unidad del coeficiente de sedimentación de una partícula o macromolécula)
SBD	Dominio de unión a sustrato (<i>Substrate Binding Domain</i>)
scl-PHA	PHA de cadena radical corta
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida
Ser	Serina
sp.	Especie
sp. nov.	Especie recientemente descrita

Listado de abreviaturas

subsp.	Subespecie
THF	Tetrahidrofurano
™	Marca comercial (<i>trade mark</i>)
T_m	Temperatura media de desnaturalización o fusión
TOF	Tiempo de vuelo, en espectrometría de masas (<i>Time Of Flight</i>)
tRNA	RNA de transferencia
Tsr^R	Resistencia a tioestreptona
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática (μmoles de producto liberados o de sustrato consumidos por minuto)
v/v	Porcentaje en volumen/volumen (mililitros de un disolvente en 100 mililitros de disolución)
var.	Variedad
V_{max}	Velocidad máxima de una enzima
Ω	Ohmio (unidad de resistencia eléctrica)

Summary

PHB depolymerases from *Streptomyces exfoliatus* and *Streptomyces ascomycinicus*.**Characterization of enzymes with potential biotechnological application.**

Summary of the PhD thesis by Javier García Hidalgo, supervised by Dr. Miguel Arroyo and Dr. Isabel de la Mata. Complutense University of Madrid. June 2014.

INTRODUCTION

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) constitute a class of hydrophobic linear biopolymers, chemically classified as aliphatic polyoxoesters. They are produced by a wide variety of eubacteria, as well as archaea, as an endogenous reservoir of carbon and energy, when the growth conditions are unbalanced and there is an excess of carbon sources. PHAs have properties similar to those of thermoplastics; additionally they are biodegradable and produced from renewable raw materials. Besides, they are the only bioplastics entirely produced by microorganisms. The most abundant and best known of the natural PHAs is the polyhydroxybutyrate (PHB), which presents a short side chain of only one carbon atom. PHB is the main representative of the short chain length-PHAs (scl-PHAs), in contrast to medium chain length-PHAs (mcl-PHAs), which side chains have six or more carbon atoms.

PHAs are produced intracellularly as cytoplasmic granules with a surface layer of different proteins (PHA synthases, structural phasins, and PHA depolymerases) and lipids. In these granules, known as carbonosomes, the PHA is in an amorphous state, but when the surface layer is somehow damaged, or the PHA is exposed to the extracellular medium, the polymer chains adopt a partially crystalline structure, known as denatured PHA or dPHA.

Enzymatic degradation of PHAs can involve two different processes, carried out by different enzymes: Intracellular degradation of PHAs is the process by which the PHA accumulating cell mobilizes its reserves of carbon and energy in order to grow when the environmental conditions are favorable after a period of unbalance. This is carried out by intracellular PHA depolymerases, hydrolytic enzymes bound to the surface of the PHA granule. On the other hand, extracellular PHA degradation is a different process, by which a microorganism (not necessarily PHA producer) releases soluble PHA depolymerases to the extracellular medium in order to hydrolyze denatured PHA, present in the environment as a result of the death and lysis of PHA producer bacteria, using the resulting monomers and oligomers as an alternative source of energy and carbon in absence of more suitable substrates.

Degradation of PHAs is an interesting process, not only with the purpose of relieving the excessive accumulation of plastic waste in the environment, but also because the possibility of using the monomers and oligomers, by-products of PHA hydrolysis, as chiral compounds with

high added value. These reaction products can be employed for the synthesis of polymers with tailor-made physicochemical properties, and also as starting materials for the synthesis of a wide range of enantiopure chiral pharmaceuticals.

The current knowledge about PHB depolymerases from Gram positive bacteria, especially actinomycetes, is scarce in comparison to that of PHB depolymerases from Gram negative bacteria or fungi. Actinomycetes, and particularly the genus *Streptomyces*, are renowned by their great versatility and ability to degrade all kind of macromolecules in the environment; therefore these soil microorganisms represent an important source of degrading enzymes with possible industrial applications.

The strains chosen for cloning and characterization of its extracellular PHB depolymerases were *Streptomyces exfoliatus* and *Streptomyces ascomycinicus* (formerly classified as *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*). *S. exfoliatus* had been previously described as an mcl-PHA and scl-PHA degrading strain, and its PHB depolymerase (PhaZ_{Sex}) was cloned and briefly characterized. On the other hand, the existence of a PHB depolymerase from *S. ascomycinicus* (PhaZ_{So}) was only inferred from homology of the gene *fkbU*, described as a member of a biosynthetic gene cluster responsible for the synthesis of the macrolide ascomycin (FK520).

OBJECTIVES AND RESULTS

The objectives outlined for this PhD thesis can be summarized as follows:

1. Identification and detection of new PHA depolymerase activities in *Streptomyces* strains.
2. Confirmation of *Streptomyces ascomycinicus* as an extracellular PHB depolymerase producer strain.
3. Cloning and heterologous expression of the genes *phaZ_{Sex}*, coding the PHB depolymerase from *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}), and *fkbU*, coding a putative extracellular PHB depolymerase in *Streptomyces ascomycinicus* (PhaZ_{So}).
4. Purification of both PHB depolymerases and complete functional and structural characterization of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}.
5. Development of biotechnological applications of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}, mainly preparation of reusable immobilized derivatives with the PHB depolymerases for degradation of PHB.

After a small-scale screening of extracellular PHA depolymerase activity in several *Streptomyces* strains, the candidates selected for further study were *Streptomyces exfoliatus* and *Streptomyces ascomycinicus*. The genes *phaZ_{Sex}* and *fkbU*, coding the PHB depolymerases PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}, respectively, were cloned and expressed in the heterologous hosts *E. coli*

and *Rhodococcus* sp. T104. Expression in *E. coli* led to the formation of inactive inclusion bodies, whereas *Rhodococcus* sp. T104 was able to recognize the secretory signal peptides of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}, producing active and extracellular forms of both depolymerases. These enzymes were purified by two hydrophobic interaction chromatography steps, and the presence and identity of secretory signal peptides was determined by sequencing the N-terminal aminoacid sequences of the mature PHB depolymerases.

Once purified, both PHB depolymerases were subjected to a thorough functional characterization, involving mass spectrometry of the enzymes, gel filtration chromatography, sedimentation velocity experiments, substrate specificity analysis, lyophilization in the presence of additives, identification of the reaction products by HPLC-MS, analysis of the effects of pH, temperature and ionic strength on enzyme activity and stability, analysis of the effects of different salts, organic solvents, detergents, reducing agents and other reagents on activity, and also a kinetic study of the degradation of PHB by PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}. Both depolymerases were also employed to perform solvent-cast film degradation experiments, using pure PHB, P(3HB-co-3HV) copolymers with different content of 3-hydroxyvalerate, as well as PHB-starch blends with 7:3 weight proportion.

Additionally, secondary and tertiary structures of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} were analyzed by experimental methods like circular dichroism spectrum deconvolution, chemical modification of aminoacids and site-directed mutagenesis; as well as by multiple sequence alignment and the use of predictive servers, leading to the proposal of several three-dimensional models of the spatial folding of these enzymes and their different domains.

Finally, PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} were employed for the development of reusable immobilized biocatalysts by different methods. Lyophilized PhaZ_{Sex} was also used as catalyst in several organic synthesis experiments in non-aqueous media, such as ring-opening polymerization (ROP) and other ester-forming reactions.

CONCLUSIONS

1. *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov. DSMZ 40822 and *Streptomyces albus* J1074 have been confirmed, for the first time, as extracellular PHB depolymerase producer strains.
2. PHB depolymerases from *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}) and *Streptomyces ascomycinicus* (PhaZ_{So}) have been cloned and successfully overexpressed in the heterologous host *Rhodococcus* sp. T104 in an active, soluble and extracellular form. It has been experimentally demonstrated that both enzymes present a secretory signal peptide at the N-terminal region, with a length of 26 aminoacids in PhaZ_{Sex} and 58 in the case of PhaZ_{So}. Molecular masses of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} are 47.9 and 48.0 kDa, respectively, and its active

form is a monomer. Both depolymerases are comprised by a catalytic domain (type 2 in PhaZ_{Sex} and type 1 in PhaZ_{So}), a fibronectin type III linker domain and a substrate binding domain (SBD) type 1 in both cases.

3. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} have been purified to electrophoretic homogeneity, by two consecutive hydrophobic interaction chromatography steps. Purified PhaZ_{Sex} shows maximum activity at 40°C, and pH values between 8 and 9, remaining stable after its incubation at pH values from 6 to 11, and temperatures up to 50°C, and presents two apparent melting temperatures, at 55.8 and 70.0°C. On the other hand, PhaZ_{So} reaches its maximum activity at 45°C and pH values between 5.5 and 6.5, remaining stable after its incubation at pH values from 4.5 to 9, and temperatures up to 50°C. It shows a single melting temperature at 58.4°C. This is the first report of a PHB depolymerase from a Gram positive bacterium with an acidic optimum pH.
4. Concentrations of magnesium and calcium cations, around 2 mM, produce a 30% increase of PhaZ_{Sex} activity. On the other hand, all divalent cations assayed (magnesium, calcium and manganese) up to 5 mM, triple PhaZ_{So} activity, owing to a non-essential activation phenomenon. However, increasing ionic strength of the medium causes a gradual decrease of the PHB depolymerase activity of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}, leading to a complete inactivation at concentrations around 3 M of NaCl.
5. Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) increases about 50% the activity of both depolymerases, at concentrations up to 10 mM. Polyethylene glycol 3350 also produces a rise of the activity at concentrations up to 5 mM, though it is more moderate. Additionally, MβCD 1.5 mM and glycerol 10% (v/v) exert a protective effect against lyophilization of PhaZ_{Sex}, preserving its activity to a larger extent than in the absence of additives. On the other hand, reducing agent DTT, as well as anionic or nonionic detergents, strongly inhibit the activity of both depolymerases.
6. The apparent kinetic parameters for PHB degradation of PhaZ_{Sex} are K_M of 125 μg/mL and V_{max} of 2,780 U/mg of enzyme, measured by the turbidimetric activity assay. By contrast, PhaZ_{So} shows a K_M of 269 μg/mL and V_{max} of 9,797 U/mg of enzyme. The efficiency of PhaZ_{So} is 1.7 fold higher than that of PhaZ_{Sex}. The most abundant end-point reaction products of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} are monomers and dimers of (*R*)-3-hydroxybutyrate, unveiling an exo-hydrolase activity, although the existence of a supplementary endo-hydrolase activity cannot be discarded. Additionally, PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} present esterase activity using *p*NP-alkanoates as substrate. The esterase activity of both enzymes is inversely proportional to the length of the aliphatic chain of these substrates.

7. Both PHB depolymerases are able to degrade PHB and PHBV (5% 3-hydroxyvalerate) films, prepared with chloroform by solvent-cast techniques. Specifically, a solution containing 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PhaZ_{St} can completely solubilize films made of 100 mg of PHB, PHBV 5% or PHB-starch (7:3 weight ratio), at 37°C and pH 6, in less than 30 hours.
8. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{St} present a mixed α/β secondary structure, and a three-dimensional folding type α/β hydrolase in their catalytic domains. The folding of the SBDs has not been experimentally determined, but their *ab initio* modeling predicts a predominantly β -sheet content in their secondary structure. PhaZ_{Sex} presents at least 4 intracatenary disulfide bonds in its structure (Cys⁵⁴-Cys⁶⁶, Cys¹⁵⁴-Cys¹⁶⁵, Cys²²⁴-Cys²³⁰ and Cys²³⁹-Cys²⁸²). PhaZ_{St} has at least three of these bonds, although their precise identities have not been as well established as those of PhaZ_{Sex}.
9. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{St} carry out the hydrolysis of PHB by means of a catalytic triad, which identity in PhaZ_{Sex} is Ser²⁴-Asp¹¹¹-His¹⁴³, as inferred from homology. The catalytic triad of PhaZ_{St} is Ser¹³¹-Asp²⁰⁹-His²⁶⁹, as demonstrated by site-directed mutagenesis of aminoacids.
10. PhaZ_{Sex} has been successfully immobilized as cross-linked enzyme aggregates (PhaZ_{Sex}-CLEAs), with a BSA:PhaZ_{Sex} ratio of 100:1. The maximum PHB activity of this biocatalyst, measured by turbidimetric activity assay, is 255 U/g of derivative, with an activity recovery of 18.4%. Maximum activity of this derivative is achieved at pH 7 and temperatures between 55 and 60°C. Additionally, it shows a clear stabilization effect against high temperatures when compared to the soluble enzyme, and a better tolerance to certain organic solvents such as methanol or acetonitrile. This biocatalyst can be used for at least 20 cycles without significant loss of activity.
11. Preliminary exploration of PhaZ_{St} immobilization onto the surface of silanized magnetic nanoparticles has been carried out by covalent binding as well as by physical adsorption. Higher activity is reached with non-covalent adsorption, outreaching 10 IU/g of derivative. Highest activity recovery of about 11% is also obtained with non-covalent physical adsorption.
12. The ability of lyophilized PhaZ_{Sex} to catalyze organic synthesis reactions in non-aqueous media has been assessed. PhaZ_{Sex} is able to polymerize β -butyrolactone by ring opening polymerization (ROP), with a conversion degree of 59%, generating PHB with a molecular size of 3.8 kDa; it also polymerizes 3-hydroxybutyrate by linear condensation, with a conversion degree of 22%, producing oligomers of 600 Da. Additionally, PhaZ_{Sex} is able to polymerize β -butyrolactone and simultaneously catalyze the acylation of glycerol and trimethylolpropane (TMP).

Introducción

1. Biopolímeros

Los biopolímeros se definen como las macromoléculas producidas de forma natural por organismos vivos de cualquier tipo. También se suelen englobar bajo este término otros polímeros que, aunque son fabricados mediante procesos de síntesis química, están compuestos a partir de materiales renovables de origen biológico, como es el caso del ácido poliláctico (PLA). Bajo esta amplia definición se halla una heterogénea variedad de materiales, que atendiendo a su naturaleza química se pueden clasificar en ocho grupos:

- I. **Polinucleótidos:** Los *ácidos ribonucleicos* (RNAs) y *desoxirribonucleicos* (DNAs) son los polímeros de nucleótidos responsables del almacenamiento, expresión y transmisión de la información genética en todos los seres vivos. Sintetizados generalmente usando como molde otra molécula de DNA o RNA.

- II. **Poliamidas:** Se distinguen dos subgrupos dentro de esta clase: Por un lado, las *proteínas*, producidas en los ribosomas por la polimerización de aminoacil-tRNAs, dependiente de la secuencia codificada en RNAs mensajeros. Incluyen algunos de los biopolímeros más empleados a lo largo de la historia del ser humano, como la lana y la seda. Por otra parte, se encuentran los *poliaminoácidos*, en los que a diferencia de las proteínas, los enlaces entre aminoácidos no se establecen entre el carboxilo α y el grupo amino α . Dos de los escasos ejemplos de estos poliaminoácidos son el *ácido poli(γ -glutámico)* o PGA, producido extracelularmente por algunas bacterias Gram positivas, principalmente del género *Bacillus*, y que posee diversas aplicaciones en la industria alimentaria, siendo usado como espesante y humectante natural. También es un ingrediente fundamental del alimento tradicional japonés *natto*, obtenido mediante fermentación de semillas de soja por bacterias del género *Bacillus* (Figura 1). Además se han desarrollado aplicaciones del poli(γ -glutámico) en medicina, como transportador de fármacos para su liberación controlada (Kunioka y Furusawa 1997, Moraes *et al.* 2013). El otro ejemplo de poliaminoácido no proteico es la *ϵ -polilisina* o PL, de menor tamaño molecular y producido por especies del género *Streptomyces*, también empleado industrialmente en las áreas de alimentación, como conservante y emulgente, en medicina como hidrogel de alta absorción acuosa o potenciador de agentes anticancerígenos, en agricultura e incluso en electrónica, como material de recubrimiento de biochips (Shih *et al.* 2006). Ambos poliaminoácidos son producidos por fermentación bacteriana, y son comestibles, hidrosolubles, biodegradables y no tóxicos.



Figura 1: Comida tradicional japonesa conocida como natto, producida mediante fermentación de semillas de soja con bacterias del género *Bacillus*. Estas bacterias liberan durante la fermentación gran cantidad de ácido poli(γ -glutámico), que le da una característica consistencia mucilaginosa.

III. Polisacáridos: Son cadenas más o menos largas y complejas de azúcares unidos por enlaces glucosídicos, pueden presentar ramificaciones. Se trata de un grupo de polímeros muy heterogéneo, existe una enorme variedad de estructuras y unidades básicas que conforman los polisacáridos, y sus funciones biológicas y aplicaciones son igualmente diversas. El más abundante en la naturaleza es, sin ninguna duda, la *celulosa*, polímero lineal de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4), con una función primordialmente estructural, es el principal constituyente de la pared celular de las plantas. Otro polisacárido vegetal de gran importancia es el *almidón*. Al igual que la celulosa es un homopolímero de D-glucosa pero su estructura presenta numerosas ramificaciones. También es producido por plantas pero con una función de reserva energética. Adicionalmente existe un elevado número de polisacáridos con importantes aplicaciones industriales como los *xantanos*, el *alginato*, el *levano*, el *ácido hialurónico* o los *dextranos*. Los xantanos son producidos por bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas*; un ejemplo es la goma xantana, muy utilizada como espesante, emulgente y estabilizante, principalmente en la industria alimentaria y en cosmética (Becker y Vorhölter 2008). El alginato se aísla de algas pardas marinas y se ha extendido su uso como espesante y para encapsulación de fármacos (Remminghorst y Rehm 2008). El levano es un homopolisacárido de fructofuranosa que se emplea como aditivo alimentario con propiedades prebióticas e hipocolesterolémicas, así como en cosmética por su gran poder hidratante y sus efectos beneficiosos, favoreciendo la proliferación celular y reduciendo la irritación cutánea (Kang *et al.* 2008). El ácido hialurónico está compuesto por moléculas de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico, es un componente fundamental de la matriz extracelular de los tejidos eucariotas, aunque también es excretado por microorganismos, como las bacterias del género *Streptococcus*. El ácido hialurónico presenta

una extraordinaria capacidad para retener agua, por lo que es muypreciado en cosmética (Liu *et al.* 2011). Finalmente, los dextranos son un grupo complejo de polímeros ramificados de glucosa, producidos por bacterias acidolácticas de géneros como *Leuconostoc* o *Lactobacillus* por fermentación de la sacarosa. Los dextranos poseen muchas aplicaciones en medicina, como anticoagulante, antitrombótico y solubilizante de distintas sustancias en soluciones inyectables, también como aditivo alimentario gracias a sus propiedades antioxidantes y estabilizantes así como a su ausencia de sabor o aroma, incluso se usan ampliamente en investigación en diversas técnicas relacionadas con biosensores, cultivo celular o cromatografía de penetrabilidad, bajo nombres comerciales como SephadexTM (Bhavani y Nisha 2010).

- IV. Polioxoésteres:** Polímeros orgánicos cuyos monómeros están unidos por enlaces éster, cuya relativa facilidad para ser hidrolizado favorece la biodegradabilidad de estos compuestos. Ejemplos de estos biopolímeros son: el *ácido polimálico*, el único poliéster natural hidrosoluble, producido exclusivamente por ciertos hongos; la *cutina* y la *suberina*, componentes estructurales de la cutícula que recubre las partes aéreas de las plantas, de composición y estructura enormemente complejas y variadas (Kolattukudy 2002b, Kolattukudy 2002a, Lee *et al.* 2002); y los *polihidroxicanoatos* o PHAs, cuyas propiedades serán detalladas en profundidad más adelante.
- V. Politioésteres:** Polímeros de *ácidos 3-mercaptoalcanoicos* unidos entre sí por enlaces tioéster, siendo los únicos biopolímeros que contienen este tipo de enlace, y de los pocos polímeros orgánicos que contienen azufre, junto con las proteínas y ciertos polisacáridos complejos. Son producidos intracelularmente por bacterias acumuladoras de polihidroxicanoatos, mediante PHA sintetas, las mismas enzimas responsables de la síntesis de los PHAs, de hecho suelen encontrarse en forma de copolímeros junto con 3-hidroxicanoatos, aunque se ha descrito la existencia de homopolímeros. Los politioésteres son producidos por la adición de sustratos específicos, los 3-mercaptoalcanoatos, al medio de fermentación. Por el momento no se han descrito aplicaciones comerciales, debido, probablemente, a los complejos métodos de preparación necesarios (Lütke-Eversloh y Steinbüchel 2004).
- VI. Polifosfato:** Poliéster inorgánico conformado por residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhidro. Es considerado como el único biopolímero inorgánico. El polifosfato es sintetizado por organismos de todos los reinos conocidos, y se le atribuye una extensa variedad de posibles funciones biológicas: forma parte de la estructura de dientes y huesos,

actúa como reservorio de energía y fosfato, es un potente quelante de metales como el calcio o el magnesio, tampona las subidas de pH, es componente de la cápsula de ciertas bacterias patógenas como *Neisseria*, factor relevante en ajustes fisiológicos a procesos de crecimiento y desarrollo y también parece tener un papel fundamental en la toma de DNA exógeno por bacterias (competencia bacteriana), formando complejos junto con polihidroxitirato e iones de calcio. El polifosfato posee una serie de aplicaciones en la alimentación, preservando las carnes procesadas de la oxidación o el ataque bacteriano, y reteniendo el color original. Se puede usar para generar fibras que funcionan como un eficaz aislante térmico de características similares al amianto, y también se ha empleado como sistema asequible de regeneración del ATP en procesos a escala industrial, reduciendo enormemente los costes (Kornberg 1995).

VII. Poliisoprenoides: Como el *caucho* o la *gutapercha*, ambos son gomas naturales extraídas principalmente de árboles tropicales de los géneros *Hevea* y *Palaquium*, respectivamente (Figura 2). El caucho, en términos generales, es un polímero elástico de isopreno producido a partir del látex, una emulsión lechosa presente en la savia de cerca de 2.500 especies de plantas, que producen látex de diferentes masas moleculares. Junto con la celulosa, la lignina y el almidón, es uno de los biopolímeros más ampliamente usados en numerosas y diversas aplicaciones, y uno de los más fácilmente obtenibles de la naturaleza. A pesar de su abundancia natural, su degradación por la acción de microorganismos no es fácil, por lo que el caucho es muy empleado en aplicaciones en las que se desea evitar el biodeterioro a largo plazo. Los poliisoprenoides también son muy utilizados por ser muy elásticos, inertes y buenos aislantes eléctricos (Koyama y Steinbüchel 2002).



Figura 2: Extracción tradicional de látex mediante el método de "sangrado" de un árbol de la especie *Hevea brasiliensis*. A partir de esta savia o látex se producirá el caucho, poliisoprenoide de amplísima aplicación comercial.

VIII. Polifenoles: Ejemplos de esta clase de biopolímeros son la *lignina* y los *ácidos húmicos* (Figura 3). Los polifenoles son polímeros de enorme complejidad estructural producidos por las plantas, y son considerados las macromoléculas más resistentes a la biodegradación en la naturaleza. Presentan complejas estructuras aromáticas enlazadas covalentemente de forma más o menos aleatoria y con enlaces en su mayoría no hidrolizables. Debido a su ciclo biogeoquímico de conversión, los polifenoles como la lignina o la melanina son transformados en productos como los ácidos húmicos y el carbón. En conjunto representan una gigantesca reserva de carbono orgánico. Por ejemplo, los ácidos húmicos en tierras y aguas del planeta constituyen la mayor cantidad de carbono orgánico en la biosfera, siendo una cantidad tres veces superior a la del dióxido de carbono atmosférico. Su importancia ecológica y económica es extraordinaria (Monties y Fukushima 2002, Senesi y Loffredo 2002).

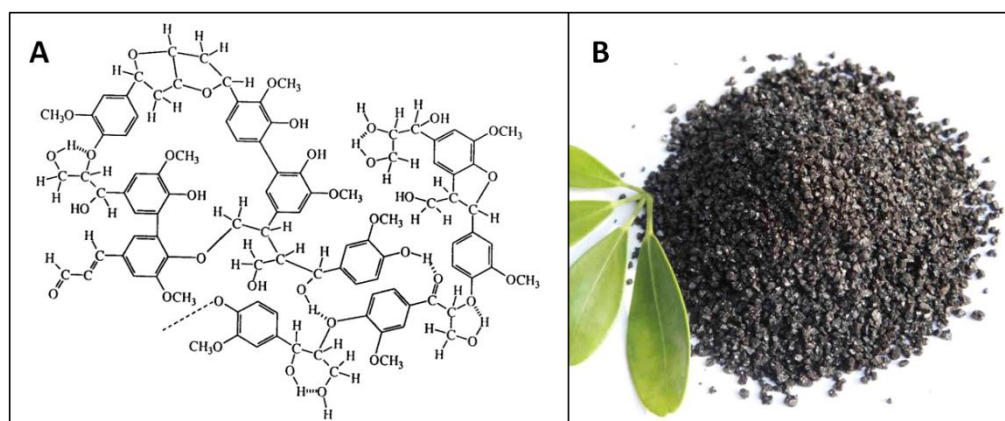


Figura 3: A. Estructura molecular de la lignina. B. Aspecto de una preparación comercial de ácidos húmicos para mejorar la calidad de la tierra para cultivo.

1.1 Bioplásticos

Antes de desglosar los distintos tipos y características de los bioplásticos, conviene señalar las características que presentan aquellos materiales considerados como plásticos. En general, un plástico es cualquier sólido orgánico, generalmente un polímero de elevada masa molecular, que se puede moldear. De hecho, la palabra plástico proviene del griego *plastikos* (πλαστικός), que significa moldeable. Un material plástico es capaz de cambiar su forma al ser sometido a una fuerza y conservar esta nueva forma al cesar dicha fuerza.

Los primeros plásticos sintéticos, como la *baquelita*, se descubrieron a principios del siglo XX, y desde aquellos inicios no se han dejado de encontrar nuevas variedades, así como nuevas técnicas para su síntesis y procesamiento, conforme se incrementaban los usos y aplicaciones para estos materiales. En la actualidad, los plásticos han conseguido ocupar un importante

lugar en todos los aspectos de la vida cotidiana, así como en la industria (Tokiwa *et al.* 2009), y se estima que el consumo de plásticos aumenta cerca de un 4% cada año (Arandes *et al.* 2004). Sin embargo, un factor clave en esta industria es el petróleo, materia prima a partir de la cual se obtiene la inmensa mayoría de los plásticos comercializados.

Como ya se sabe, el petróleo es un recurso natural fósil no renovable, cuyo precio y disponibilidad están sujetos a múltiples factores socioeconómicos. De hecho, su coste se ha incrementado casi continuamente durante las décadas posteriores a los años 70 (Steinbüchel 2005). Además de este serio inconveniente, existe un problema adicional asociado a la mayoría de los plásticos derivados de la industria petroquímica, que radica en su resistencia a la degradación por microorganismos presentes en el medio ambiente (Vroman y Tighzert 2009). Esta gran durabilidad, considerada una propiedad muy ventajosa para algunas aplicaciones como la construcción o la automoción, ha llevado a la acumulación de residuos plásticos indeseables, no solo en vertederos y demás instalaciones de gestión de residuos, sino en todo tipo de ambientes imaginables. Entre los residuos sólidos urbanos, los plásticos predominantes son derivados del petróleo, de los cuales sólo polipropileno y polietileno ya representan el 60%, seguidos de poliestireno, cloruro de polivinilo y otros (Arandes *et al.* 2004).

Estos inconvenientes de los plásticos tradicionales han llevado a realizar considerables esfuerzos en busca de materiales alternativos que puedan ser sintetizados a partir de fuentes renovables, puedan ser degradados fácilmente en el medio ambiente o, en el mejor de los casos, cumplan estas dos condiciones (Tokiwa *et al.* 2009).

En este sentido, los bioplásticos presentan una serie de características identificativas: Pueden ser producidos por seres vivos (esencialmente microorganismos), o bien a partir de materias primas renovables. Por otro lado, pueden considerarse bioplásticos todos los polímeros biodegradables, a pesar de que provengan de materias primas derivadas del petróleo. En cualquier caso, un bioplástico debe reunir algunas de las propiedades fisicoquímicas de los plásticos tradicionales derivados de la industria petroquímica, en cuanto a transparencia, flexibilidad, permeabilidad, elasticidad, resistencia eléctrica y química, solubilidad, inflamabilidad, estabilidad térmica o temperatura de combustión.

En el esquema de la *figura 4* se representa la clasificación de los bioplásticos y se ilustran algunos de sus ejemplos más relevantes. Atendiendo a esta clasificación podemos encontrar bioplásticos derivados del petróleo pero biodegradables como la *policaprolactona* (PCL), sintetizada mediante la polimerización de ϵ -caprolactona, el *polibutilén succinato* (PBS) o el *polietilén succinato* (PES). Por otra parte existen bioplásticos producidos por microorganismos, o derivados de sustancias renovables, que sin embargo no son biodegradables, como el *nylon*

11, sintetizado a partir de aceite de ricino, o el *polietileno* (PE), que suele proceder de hidrocarburos no renovables, pero puede ser generado también a partir de etanol. Otros biopolímeros pueden ser biodegradables o no serlo, como la *acetil celulosa*, que solamente es biodegradable si presenta un bajo nivel de acetilación, y pierde esta cualidad si dicho nivel es elevado. Finalmente encontramos bioplásticos que reúnen las dos condiciones, siendo renovables y biodegradables, como el *almidón*, el *ácido poliláctico* (PLA) y los *polihidroxialcanoatos* (PHAs). Dentro de este último grupo cabe destacar que, aunque el PLA procede del ácido láctico, el cual se puede obtener por fermentación bacteriana, su polimerización es un proceso químico (Doran-Peterson *et al.* 2008). Por su parte, el almidón es un polisacárido, por lo tanto, los PHAs son los únicos poliésteres renovables totalmente producidos por microorganismos y perfectamente biodegradables.

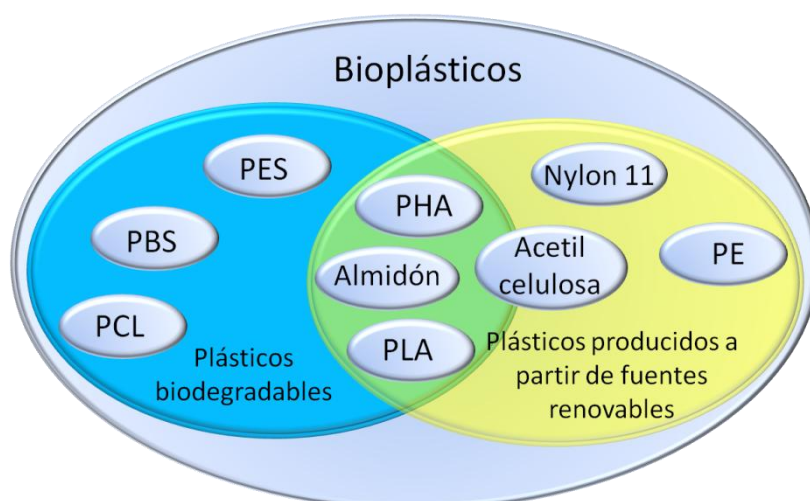


Figura 4: Clasificación de los bioplásticos según su biodegradabilidad y procedencia de fuentes renovables o no renovables. Abreviaturas: Polietilén succinato (PES), Polibutilén succinato (PBS), Policaprolactona (PCL), Polihidroxialcanoatos (PHA), Ácido Poliláctico (PLA), Polietileno (PE). Adaptado de Tokiwa *et al.* 2009.

La mayoría de plásticos biodegradables pertenecen al grupo de los poliésteres, a excepción de los derivados del almidón. Esto es debido a la especial susceptibilidad del enlace éster de ser hidrolizado por enzimas microbianas. Dentro del grupo de los poliésteres biodegradables encontramos poliésteres alifáticos y aromáticos. Los primeros, como la PCL y el PBS, son más fáciles de degradar por muchas clases de microorganismos y algunos de sus componentes son renovables, como el ácido succínico. Sin embargo, sus propiedades mecánicas no están a la altura de los aromáticos y esto dificulta su consolidación como plásticos cotidianos. En cambio, los poliésteres aromáticos, como el *polietilén tereftalato* (PET), o el *polibutilén tereftalato* (PBT), de origen sintético y procedentes de fuentes no renovables, poseen unas cualidades excelentes para su uso industrial en envasado, mostrando una gran resistencia a diversos

factores fisicoquímicos. No obstante, su contenido de componentes aromáticos dificulta su biodegradación, ralentizándola de forma considerable. Muchos de estos poliésteres se pueden mezclar en distintas proporciones con otra clase de polímeros, o bien con otros poliésteres, con el fin de reducir el coste del producto final, producir plásticos con propiedades modificadas o incrementar su biodegradabilidad. Una de las mezclas más frecuentes y eficaces se realiza con distintas formas de almidón, como el almidón gelatinizado, en gránulos o termoplástico, dado que es un polímero barato, renovable y disponible durante todo el año (Tokiwa *et al.* 2009). La mezcla de poliésteres con polímeros derivados del almidón es muy útil a la hora de fabricar plásticos de baja vida útil con un coste global reducido, incrementando su biodegradabilidad (Godbole *et al.* 2003). No obstante, el carácter hidrófilo del almidón puede afectar negativamente a su resistencia a la humedad.

También es habitual en la industria de los plásticos controlar la composición monomérica de estos poliésteres, buscando determinadas características en el producto final. De esta forma, en la composición del PET se pueden incorporar otros monómeros mediante enlaces éter o amida para facilitar su degradación. También en muchos casos se pueden combinar monómeros alifáticos y aromáticos para lograr aunar las ventajas de cada tipo de poliéster, y así obtener plásticos que exhiban interesantes propiedades mecánicas y una buena biodegradabilidad (Shah *et al.* 2013). Hay múltiples ejemplos de estos poliésteres combinados alifático-aromáticos como el *poli(butilén succinato)-co-(butilén tereftalato)* (PBST) o el *polibutilén adipato-co-tereftalato* (PBAT), comercializado por la compañía alemana BASF bajo la marca Ecoflex™.

2. Polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos o ácidos polihidroxialcanoicos (PHAs) son una clase de polímeros, hidrofóbicos clasificados desde el punto de vista químico como polioxoésteres alifáticos, producidos y acumulados por una enorme variedad de bacterias, así como ciertas arqueas, principalmente de la familia *Halobacteriaceae* (Fernández-Castillo *et al.* 1986, Steinbüchel y Fächtenbusch 1998). Se estima que más del 30% de las bacterias del suelo son capaces de sintetizar algún tipo de PHA. Por otro lado, esta capacidad está extendida por muy diversos ecosistemas aeróbicos y anaeróbicos, como lodos, lagos, mares e incluso ambientes extremos. Los PHAs son los únicos bioplásticos completamente sintetizados por microorganismos (Chen 2010). Estos poliésteres son producidos y almacenados intracelularmente en condiciones de crecimiento desequilibrado, fundamentalmente en presencia de un exceso de fuentes de

carbono y deficiencia de algún otro nutriente esencial, como nitrógeno, azufre, fósforo u oxígeno.

Los PHAs fueron descritos por primera vez en 1925 por el investigador francés Maurice Lemoigne, director del servicio de fermentación del Instituto Pasteur, en Lille (Francia) (Lemoigne 1925, Lemoigne 1926). En primera instancia, Lemoigne describió los gránulos de PHA en *Bacillus megaterium* como acumulaciones lipídicas intracelulares insolubles en éter. Lemoigne era microbiólogo, pero su formación como químico analítico le llevó a postular, en los años siguientes a sus primeras observaciones, que estos gránulos contenían un polímero ópticamente activo de ácido 3-hidroxibutírico. Llegó a demostrar que este polímero se podía cuantificar, extraer y usar para la formación de un film transparente, incluso lo propuso como material de reserva para las bacterias productoras, sin llegar a profundizar en su función biológica. Sin embargo, los primeros hallazgos de Lemoigne fueron publicados en revistas en francés, y por tanto de escasa difusión internacional. Este hecho, unido a la reticencia de muchos químicos orgánicos europeos de la época a creer en la existencia de moléculas de alto peso molecular o polímeros, hizo que los importantes descubrimientos de Lemoigne pasaran desapercibidos para la comunidad científica hasta la década de los 50, cuando varios laboratorios del Reino Unido y los Estados Unidos confirmaron la naturaleza de este polímero, y se interesaron por la función biológica, biosíntesis y degradación del *polihidroxibutirato* (PHB) (Weibull 1953, Williamson y Wilkinson 1958, Doudoroff y Stanier 1959).

Generalmente se considera que la función biológica de los PHAs es servir de reserva de carbono y energía para la célula productora. De hecho, se ha observado experimentalmente que el almacenamiento de PHA permite a las bacterias acumuladoras realizar hasta dos ciclos de división celular adicionales respecto a cultivos de la misma especie sin reservas de PHA, cuando son cultivadas en un medio sin fuentes de carbono (Handrick *et al.* 2000). En condiciones similares, también se ha observado una disminución y retraso en la lisis celular en el caso de bacterias con PHA acumulado frente a cultivos control sin PHA (Macrae y Wilkinson 1958). Adicionalmente, se ha comprobado que el almacenamiento de nutrientes en el citoplasma en forma de gránulos insolubles evitaría alteraciones en el equilibrio osmótico de la célula, así como la pérdida de estos valiosos nutrientes hacia el medio extracelular (Madison y Huisman 1999). Sin embargo, recientes investigaciones en el metabolismo de *Pseudomonas putida*, una bacteria modelo acumuladora de PHAs, otorgan a estos biopolímeros un papel mucho más complejo que la simple reserva de carbono y energía (Escapa *et al.* 2012). Las rutas de síntesis y degradación de PHA estarían íntimamente relacionadas con el metabolismo central del carbono en las bacterias productoras. Ambas rutas, tanto producción como degradación de PHA se producen simultáneamente, realizando un ciclo (Doi *et al.* 1990). A

pesar de parecer un derroche innecesario de energía y carbono, esta ruta cíclica tiene un papel amortiguador. Dicho ciclo canalizaría el flujo de carbono, energía y poder reductor hacia diversos procesos fisiológicos como el acopio de reservas, producción de biomasa, división celular o disipación de un exceso de energía, en función de las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes. Esta compleja sincronización de ciclos metabólicos facilitaría a los organismos productores de PHA una rápida y eficaz adaptación a nichos con condiciones cambiantes, pobres en nutrientes o con una elevada competitividad, como el suelo o la rizosfera y filosfera de plantas. En definitiva, la acumulación de PHA permite a las bacterias el mantenimiento de las capacidades metabólicas óptimas en condiciones subóptimas, y les confiere resistencia durante largos periodos a una gran variedad de situaciones de estrés físico y químico (Kadouri *et al.* 2005, Castro-Sowinski *et al.* 2010).

2.1 Estructura y características de los gránulos de PHA

Los PHAs se sintetizan y acumulan en el interior de la célula productora, en forma de inclusiones citoplásmicas conocidas como gránulos de PHA o, más generalmente, carbonosomas (Jendrossek 2009). Estas estructuras, de entre 100 y 500 nm, son visibles al microscopio de contraste de fases como glóbulos brillantes, y pueden llegar a representar el 90% del peso seco de la célula productora (Jendrossek y Handrick 2002) (Figura 5).

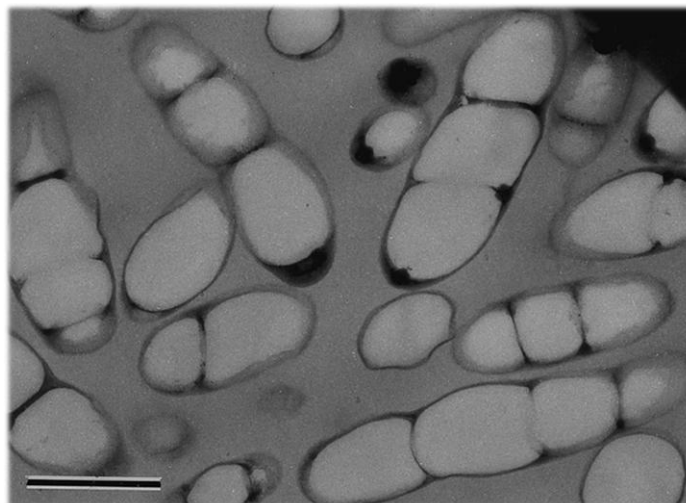


Figura 5: Imagen de microscopía electrónica de transmisión, se muestran bacterias de la especie *Ralstonia eutropha* acumulando polihidroxibutirato (PHB). Se aprecian grandes gránulos citoplásmicos de PHB. Tomado de Sudesh *et al.* 2000.

Los gránulos nativos de PHA presentan una envoltura superficial que los estabiliza y mantiene el estado amorfo y fluido del PHA en el citoplasma. Esta capa está compuesta mayoritariamente por proteínas, que recubren casi totalmente la superficie del gránulo de PHA. Estas proteínas se encuentran asociadas al polímero principalmente por interacciones hidrofóbicas, y también se ha detectado una pequeña fracción fosfolipídica (Griebel *et al.* 1968) (Figura 6). Mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión se ha calculado que el grosor de la capa externa es de aproximadamente 4 nm (Boatman 1964, Mayer y Hoppert 1997), lo que descarta la presencia de una bicapa lipídica (típicamente presentan un grosor en torno a 8 nm) y concuerda precisamente con la existencia de una monocapa, que expondría los grupos polares de los fosfolípidos hacia el citoplasma y las cadenas apolares hacia el núcleo hidrofóbico de PHA. No obstante, la existencia de esta capa lipídica no ha sido corroborada desde las primeras observaciones realizadas en los años 60, debido a la dificultad de determinar la composición exacta de los gránulos nativos de PHA sin romper la membrana de la célula productora. Cualquier método de análisis que implique la lisis celular del organismo productor puede generar artefactos, debido a la diseminación de los fosfolípidos de la membrana tras la rotura, y a la elevada probabilidad de que dichos lípidos se adhieran a la superficie hidrofóbica de los gránulos nativos de PHA durante el proceso de aislamiento (Jendrossek y Pfeiffer 2014).

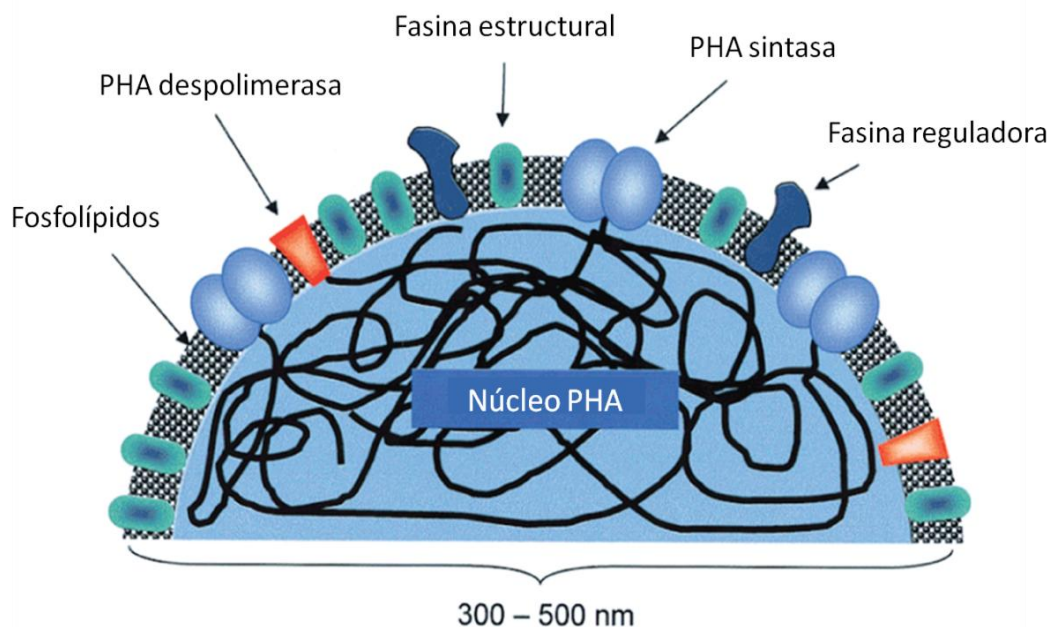


Figura 6: Representación esquemática de un gránulo de PHA mostrando su envoltura superficial y alguna de las proteínas asociadas al gránulo. Adaptado de Rehm 2003.

La presencia de proteínas en la cubierta de los gránulos nativos de PHA, en cambio, ha sido demostrada en numerosas ocasiones, mediante una amplia variedad de métodos *in vitro* así como *in vivo*. Entre las proteínas asociadas a la cubierta del gránulo de PHA se encuentran:

- **PHA sintasas**, responsables de la síntesis de las cadenas poliméricas. Usan como sustrato una gran variedad de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA y otras moléculas relacionadas como el 4-hidroxiбутирато, que obtienen de diversas rutas metabólicas, principalmente la β -oxidación de los ácidos grasos, aunque dependiendo de la especie bacteriana y la disponibilidad de sustratos, otras rutas pueden desembocar en la acumulación de PHA (Chen 2010). Se han descrito cuatro clases de PHA sintasas, dos de las cuales (clases I y II) tienen un único tipo de subunidad, con una masa molecular entre 61 y 73 kDa y se diferencian por el tipo de sustratos que son capaces de polimerizar. Las sintasas de clase I, como la producida por *Ralstonia eutropha*, polimerizan sustratos hidroxiacil-CoA de cadena corta (3 a 5 carbonos), mientras que las de clase II, como las expresadas por *Pseudomonas aeruginosa*, usan sustratos de cadena más larga (6 o más carbonos). Las otras dos clases (III y IV) son enzimas heterodiméricas que polimerizan sustratos de cadena corta, en la clase III se encuentra la PHA sintasa de *Allochromatium vinosum*, con dos subunidades distintas (PhaC y PhaE) de 40 kDa. Las sintasas de arqueas descritas hasta la fecha parecen presentar homología con las pertenecientes a la clase III. La clase IV está constituida por PHA sintasas del género *Bacillus*, presentan una subunidad de 40 kDa (PhaC) y otra de 20 kDa (PhaR). Todas las PHA sintasas presentan un equilibrio entre la forma monomérica y la dimérica, siendo el dímero la forma activa. En este dímero una de las unidades está unida covalentemente a la cadena de PHA mientras que la otra se une a los sustratos solubles para incorporarlos a la cadena (Grage *et al.* 2009).
- **PHA despolimerasas intracelulares**, encargadas de la movilización de estas reservas en caso de necesidad de un aporte adicional de carbono o energía. Liberan el correspondiente (*R*)-3-hidroxiácido u oligómeros de (*R*)-3-hidroxiácidos, que podrán ser entonces incorporados al metabolismo para cumplir diversas funciones celulares.
- **Fasinas**, una amplia variedad de polipéptidos estructurales de tamaño relativamente pequeño y con carácter anfipático. Deben su nombre (*phasins*, en inglés) a su analogía con las oleosinas, las proteínas que recubren la superficie de los cuerpos oleosos, gotas lipídicas especialmente abundantes en células vegetales de semillas o del polen. Las fasinas generan una interfase entre el PHA hidrofóbico y el medio acuoso del citoplasma.

Las funciones propuestas para estas fasinas son la estabilización del gránulo de PHA evitando su coalescencia o adherencia a otras estructuras celulares hidrofóbicas como por ejemplo las membranas; el control del número y tamaño de los gránulos; regulación de la expresión de otras proteínas asociadas al gránulo de PHA; evitar el plegamiento defectuoso de otras proteínas del gránulo o incluso servir como reserva de nitrógeno (de Eugenio 2009).

2.2 Biogénesis de los PHA

Existen tres modelos que describen el mecanismo de biogénesis de los gránulos de PHA: el modelo de la micela o membrana, el del brote o gránulo incipiente (*budding model*) y el del andamio (*scaffold model*) (Figura 7). El modelo de la micela asume que las enzimas encargadas de la síntesis del polímero (PHA sintasas) se encuentran libres en el citoplasma, y tras oligomerizar y encontrar sustratos adecuados para la polimerización (hidroxiacil-CoA), empezarían a generar cadenas de PHA, que por interacción hidrofóbica tenderían a asociarse, dando lugar a un gránulo incipiente al que progresivamente se unirían los demás elementos constituyentes, como fasinas, despolimerasas, etc. El segundo modelo, del brote o gránulo incipiente, propone la generación del gránulo a partir de la membrana citoplásmica interna; las PHA sintasas estarían asociadas a esta membrana en regiones localizadas hacia los polos celulares, a partir de la cual se generarían vesículas membranosas englobando el acúmulo de PHA, que terminarían escindiéndose en fases posteriores para formar el gránulo maduro. Sin embargo el modelo del andamio es el que cuenta con más evidencias experimentales a su favor, gracias a los recientes trabajos publicados por los laboratorios de los doctores Sinskey y Stubbe (Cho *et al.* 2012) y Jendrossek (Pfeiffer *et al.* 2011, Wahl *et al.* 2012, Pfeiffer y Jendrossek 2013, Pfeiffer y Jendrossek 2014), con el organismo modelo para la producción de PHB *Ralstonia eutropha*. Según este modelo, las PHA sintasas se anclarían a una estructura citoplásmica sobre la que desarrollarían su actividad, dando origen a nuevos gránulos de PHB. Según los trabajos citados, dicha estructura de anclaje parece ser el nucleoide, la región irregular del citoplasma bacteriano que alberga el material genético. Este anclaje entre PHA sintasas y el nucleoide se produciría a través de un elemento mediador proteico. En el caso de *R. eutropha*, este mediador sería la proteína PhaM, y en la bacteria acumuladora de mcl-PHA (ver epígrafe siguiente) *Pseudomonas putida* KT2442, otra proteína asociada a gránulos de PHA, nombrada PhaF, parece desempeñar esta misma función (Galán *et al.* 2011). Dichos mediadores proteicos tienen capacidad de oligomerizar y asociarse específicamente con las correspondientes PHA sintasas mientras están anclados al nucleoide, generando un complejo

de elevada masa molecular que presenta actividad PHA polimerasa (Pfeiffer y Jendrossek 2014). Adicionalmente, los mediadores como PhaM también aseguran un reparto igualitario de los gránulos de PHA entre células hijas tras la división celular, gracias a su capacidad de anclarse al nucleóide bacteriano (Galán *et al.* 2011, Pfeiffer *et al.* 2011).

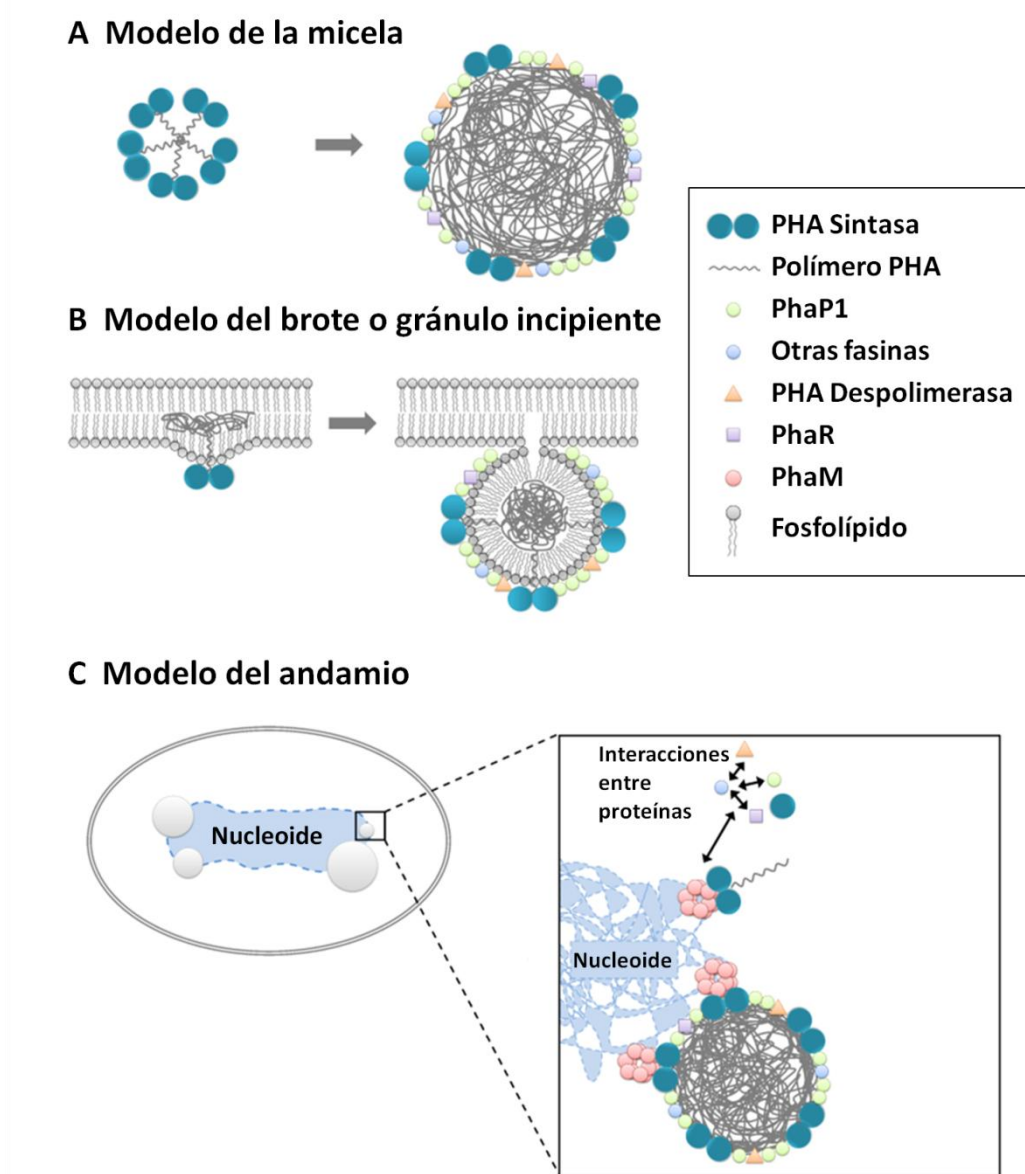


Figura 7: Modelos más relevantes del mecanismo de formación de nuevos gránulos nativos de PHA. Las proteínas específicas representadas pertenecen al metabolismo de síntesis de PHB de *Ralstonia eutropha* H16: PhaP1, fasina estructural. PhaR, represor de la expresión de otras fasinas. PhaM, proteína mediadora que interactúa con el DNA del nucleóide y con la PHA sintasa, anclando el gránulo a dicho nucleóide. La oligomerización de las proteínas asociadas al gránulo, excepto PhaM y la PHA sintasa, ha sido omitida para evitar excesiva complejidad en el esquema. Adaptado de Jendrossek y Pfeiffer 2014.

Los PHAs en el gránulo nativo intracelular se encuentran en un estado completamente amorfo y fluido, conformando el gránulo nativo o nPHA. Al romperse la célula productora de PHA,

estos gránulos nativos son liberados al medio extracelular y sometidos en consecuencia a un estrés fisicoquímico; la cubierta de fosfolípidos y proteínas se daña o pierde, y el polímero tiende a adoptar una estructura semicristalina, con distinto grado de cristalinidad dependiendo del tipo concreto de PHA del que se trate. En este gránulo desnudo y semicristalino el PHA se conoce como dPHA, o PHA desnaturalizado. Las técnicas estándar de purificación de PHAs mediante extracción orgánica y centrifugación producen dPHA, aunque los gránulos nativos también pueden ser recuperados mediante diversos protocolos de centrifugación en gradiente de densidad de glicerol (Merrick y Doudoroff 1964, Wieczorek *et al.* 1995).

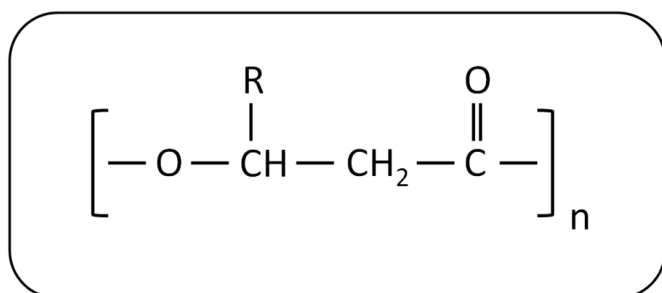
Una llamativa excepción al sistema de producción intracelular de PHA ha sido descrita para una cepa mutante de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Sabirova *et al.* 2006). En esta cepa, la mutación de un único gen que codifica una tioesterasa específica para la degradación intracelular de hidroxiacil-CoA, provoca una hiperproducción de PHA que se deposita extracelularmente, cuando se cultiva esta bacteria en un medio suplementado con alcanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual este PHA es expulsado desde el citoplasma hasta el medio extracelular no se conoce.

A partir del dPHA se pueden preparar gránulos con una estructura y propiedades físico-químicas similares a las del gránulo nativo, conocidos como gránulos artificiales de PHA o aPHA. Para ello es necesario disolver el dPHA en un disolvente orgánico como acetona o triclorometano, para a continuación añadir este PHA a una solución acuosa de un surfactante o detergente como SDS, oleato o colato sódico, y emulsionar el polímero mediante agitación y un tratamiento de ultrasonidos. Tras la evaporación del disolvente se obtiene un látex estable de gránulos de aPHA, indicado para el ensayo *in vitro* de actividad de PHA despolimerasas intracelulares así como algunas extracelulares (Horowitz y Sanders 1994, Ramsay *et al.* 1994, Horowitz y Sanders 1995, Marchessault *et al.* 1995, Bachmann y Seebach 1999).

2.3 Propiedades fisicoquímicas de los PHAs

Los PHAs son polímeros lineales, sin ramificaciones, su masa molecular varía desde diez mil hasta varios millones de Dalton, y su estructura general se ajusta, con escasas excepciones, a la fórmula representada en la *figura 8*. Los PHAs son termoplásticos ya que pueden ser moldeados mediante un aumento de la temperatura, y algunos presentan características elastoméricas. También poseen propiedades piezoeléctricas. En función de la longitud de la cadena lateral se suelen clasificar en dos familias: scl-PHAs (*short chain length*) o PHAs de cadena corta, compuestos por ácidos 3-hidroxialcanoicos de 4 ó 5 átomos de carbono; y mcl-

PHAs (*medium chain length*) o PHAs de cadena media, constituidos por ácidos 3-hidroxicarboxílicos de 6 ó más carbonos. Aparte de cadenas alifáticas saturadas y lineales, podemos encontrar muchos otros tipos de radicales en la estructura de los PHAs, aunque su ocurrencia de forma natural es mucho menos frecuente. De esta forma se han descrito PHAs con radicales insaturados, aromáticos, halogenados, ramificados, hidroxilados, etc. Llegando a contabilizarse cerca de 150 monómeros diferentes en los diversos PHAs caracterizados durante las últimas décadas (Steinbüchel *et al.* 1992, Steinbüchel y Valentin 1995). Esta gran variedad de monómeros evidencia la baja especificidad de sustrato exhibida por las PHA sintetasas, las enzimas encargadas de incorporar nuevos hidroxiaácidos a las cadenas de PHA. El tipo y la proporción de monómeros presentes en estos polímeros determinan las propiedades físicas, químicas y mecánicas del mismo. Este hecho confiere a los PHAs una diversidad prácticamente ilimitada, ofreciendo un amplísimo rango de propiedades finales, que convierten a los PHAs en materiales ideales para aplicaciones en las que se requieren características muy específicas, como se describirá más adelante.



Tipos de cadena radical que pueden formar parte de los PHAs

Saturada	Fenil
Insaturada	Metil éster
Halogenada	Ciano
Ramificada	Cianofenoxi
Hidroxilada	Nitrofenoxi
Epoxidada	Fenoxi

Figura 8: Fórmula química general de los polihidroxicarboxilatos. La cadena radical (R) puede tener una longitud de 1 ó 2 carbonos en los scl-PHAs, y 3 ó más en los mcl-PHAs. Los grupos indicados a la derecha pueden estar presentes en esta cadena lateral de forma menos frecuente.

En términos generales, y debido a la estructura de sus monómeros, los scl-PHAs son polímeros duros y quebradizos (*Figura 9*), con un elevado grado de cristalinidad, que en el caso del homopolímero de PHB puede llegar al 60%, acompañado por una elevada temperatura de fusión (T_m), hasta 180°C, ambos valores similares a los del *polipropileno* (PP). Sin embargo, el PHB presenta una elongación hasta rotura de sólo un 5%, frente al 400% del PP sintético (Sudesh *et al.* 2000, Chodak 2008). Este porcentaje de elongación es un parámetro físico muy empleado para caracterizar polímeros, indica la deformación mediante tensión que una pieza de determinado material soporta antes de romperse, proporcionando una medida de la ductilidad de un material. El contenido de 3-hidroxicarboxilato en los copolímeros de poli(3-hidroxicarboxilato-co-3-hidroxicarboxilato) (PHBV) otorga mayor elasticidad al polímero, reduciendo

progresivamente su T_m y cristalinidad, e incrementando paralelamente su elongación hasta rotura.

Por el contrario, los mcl-PHAs son polímeros de apariencia gomosa, muy elásticos y pegajosos al tacto. Su cristalinidad es muy baja en comparación con los scl-PHAs; por ejemplo, en el copolímero de 3-hidroxi octanoato y 3-hidroxi hexanoato [P(HO-co-HH)], uno de los mcl-PHAs naturales más abundantes y mejor caracterizados, la cristalinidad está en torno al 30%, con una T_m de 58,5°C, presentando una elongación hasta rotura del 300% (Preusting *et al.* 1990).



Figura 9: Aspecto macroscópico de dos tipos de PHAs. **A.** PHB, un scl-PHA quebradizo y poco elástico. **B.** P(HO-co-HH), un mcl-PHA elástico y de textura gomosa. **C.** Película elástica de P(HO-co-HH).

Otra importante característica de los PHAs de origen biológico es su composición enantioméricamente pura; los ácidos 3-hidroxi alcanoicos que constituyen los monómeros de los PHAs, contienen en su estructura un carbono quiral, y debido a la estricta estereoespecificidad de las PHA sintetasas que generan estos polímeros (Sudesh *et al.* 2000), todos los monómeros presentan una configuración *R*, siendo desde el punto de vista estereoquímico, polímeros isotácticos. Esta característica permite que los PHAs naturales adopten una estructura cristalina, ya que los PHAs atácticos (conformados por una mezcla de monómeros *R* y *S*, distribuidos aleatoriamente a lo largo del polímero), sintetizados artificialmente, son totalmente amorfos (Handrick *et al.* 2001). También se ha descrito la existencia, aunque de forma minoritaria, de PHAs conformados por monómeros no quirales, ácidos ω -hidroxi alcanoicos, en los que el grupo hidroxilo se encuentra en el último carbono de la cadena alifática, como por ejemplo 3-hidroxi propionato, 4-hidroxi butirato o 5-hidroxi valerato. El organismo productor incorpora estos ω -hidroxi alcanoatos al polímero en determinadas condiciones de cultivo y cuando los precursores adecuados son añadidos al medio (Braunegg *et al.* 1998). Esta peculiar clase de PHAs no quirales puede ser degradada inespecíficamente por lipasas y esterases (Mukai *et al.* 1993a, Jaeger *et al.* 1995).

Los PHAs sintetizados por microorganismos pueden producirse en forma de homopolímeros, es decir, incorporando un único tipo de monómero en su estructura. Varios homopolímeros de

PHA se han aislado e investigado a lo largo de las últimas décadas, principalmente el poli[(*R*)-3-hidroxi butirato] (PHB), pero también otros como el poli[(*R*)-3-hidroxi valerato] (PHV) (Steinbüchel y Schmack 1995), poli(4-hidroxi butirato) (P4HB) (Steinbüchel *et al.* 1994), y otros homopolímeros de cadena alifática más larga, hasta el poli[(*R*)-3-hidroxi decanoato] (Chen 2010).

En cambio, en muchas ocasiones, las bacterias productoras acumulan copolímeros de distintos hidroxiácidos, en función de la especie concreta que se estudie y de las fuentes de carbono que se hallen presentes en el medio de cultivo. De esta forma es muy frecuente encontrar bacterias productoras de scl-PHAs mixtos como el poli[(*R*)-3-hidroxi butirato-co-(*R*)-3-hidroxi valerato] (PHBV) (Alderete *et al.* 1993) o mcl-PHAs como el poli[(*R*)-3-hidroxi octanoato-co-(*R*)-3-hidroxi hexanoato] [P(HO-co-HH)], incluso combinaciones en distinta proporción de tres, cuatro o más monómeros diferentes (Lageveen *et al.* 1988).

Los copoliésteres que incluyen monómeros de cadena corta tales como el (*R*)-3-hidroxi butirato o el (*R*)-3-hidroxi valerato junto con otros de cadena media como el (*R*)-3-hidroxi hexanoato también se han conseguido sintetizar en cultivos bacterianos, de hecho, estos copoliésteres han demostrado presentar una combinación de propiedades mecánicas modulables y muy interesantes (Noda *et al.* 2010), lo que ha llevado a su producción a escala industrial por grandes empresas como la estadounidense Procter & Gamble, que bajo la marca Nodax™ comercializa utensilios compuestos por poli[(*R*)-3-hidroxi butirato-co-(*R*)-3-hidroxi hexanoato].

Normalmente los copolímeros de PHA sintetizados por bacterias son copolímeros al azar, incorporan los distintos monómeros aleatoriamente sin un orden establecido. No obstante, se ha descrito la posibilidad de sintetizar copolímeros en bloque, en los que segmentos de mayor o menor longitud formados por un solo tipo de monómero se alternan con segmentos de otro monómero. Este fenómeno se consigue realizando cambios periódicos de sustrato en el medio de fermentación, de forma que en función de la fuente de carbono empleada en cada fase (por ejemplo fructosa y ácido pentanoico), el microorganismo polimeriza uno u otro monómero (Pederson *et al.* 2006). Los copolímeros en bloque se reconocen por sus características físicas mediante diversas técnicas calorimétricas y reológicas, entre otras, y presentan unas propiedades fácilmente modulables, que además son más duraderas en el tiempo (McChalicher y Srienc 2007).

2.4 Aplicaciones de los PHAs

Las potenciales aplicaciones de los PHAs dependen en gran medida de su composición monomérica. Algunos scl-PHAs como el PHB son duros y rígidos, pudiendo carecer de las

propiedades necesarias para su uso como films o para aplicaciones biomédicas, sin embargo, los mcl-PHAs, a pesar de ser elastoméricos presentan muy baja resistencia mecánica (Hazer y Steinbüchel 2007). Por lo tanto las distintas aplicaciones requieren distintos tipos de bioplásticos, con diferentes características, que en el caso de los PHAs pueden obtenerse mediante la adecuada combinación de monómeros en su estructura.

Según ha ido avanzando el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los PHAs, así como el desarrollo de nuevas técnicas y materias primas para la producción de estos poliésteres, sus aplicaciones se han multiplicado en diversos sectores de la industria. Dichas aplicaciones se pueden resumir en los siguientes grupos:

- I. **PHAs para el envasado y embalaje:** Los PHAs se empezaron a producir industrialmente y comercializar en 1982 por la compañía química británica Imperial Chemical Industries (ICI), bajo el nombre comercial Biopol™, actualmente comercializado por la empresa estadounidense Metabolix. Se trata de un copolímero de 3-hidroxi butirato y 3-hidroxi valerato, producido por fermentación bacteriana y usado para la fabricación industrial de artículos cotidianos, tales como botellas de champú y otros envases, por compañías como la cosmética alemana Wella (Matavulj y Molitoris 1992). Otros PHAs, especialmente mcl-PHAs, se han empleado en la fabricación de films para embalaje, bolsas aptas para compostaje, revestimiento de vasos de papel, cuchillas desechables, capas impermeables de pañales y artículos de higiene femenina, tapicerías, alfombras y todo tipo de envases (Chen 2010) (*Figura 10*). Es especialmente interesante la posibilidad de usar PHAs en el recubrimiento de envases alimentarios de cartón, sustituyendo al aluminio y obteniendo un envase totalmente

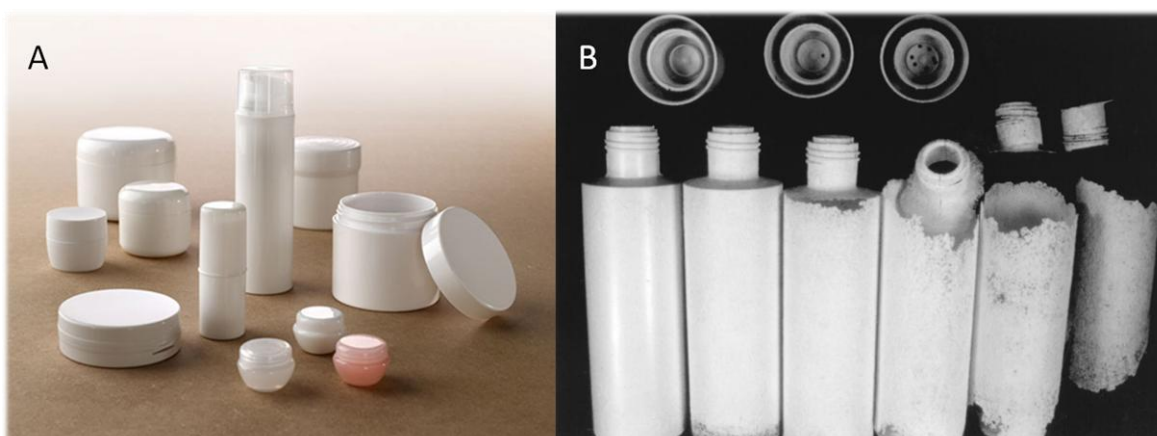


Figura 10: Aplicaciones de los PHAs en envasado. **A.** Distintos envases fabricados con copolímeros de PHB. **B.** Degradación bacteriana de una botella de PHBV tras su incubación en fangos de aguas residuales durante 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas, respectivamente de izquierda a derecha. Panel B tomado de Madison y Huisman 1999.

biodegradable. También es relevante la barrera que proporciona el PHBV frente a la difusión de gases, cualidad muy útil para el envasado de alimentos así como de bebidas, pudiendo llegar a sustituir parcialmente el uso masivo de PET en botellas (Philip *et al.* 2007).

II. PHAs en agricultura: Los PHAs se han empleado con éxito en agricultura y horticultura. El uso más extendido consiste en la fabricación de *film* agrícola para acolchado de cultivos (Figura 11). Mediante este acolchado se evita el crecimiento de malas hierbas en cultivos, se mantiene una temperatura más alta y estable en el suelo y se concentra la acción de pesticidas sobre el cultivo, a la vez que se protege el suelo frente a agentes meteorológicos que producen su erosión y lavado. También se emplean PHAs para las mallas de césped, macetas para trasplante, empaquetado de balas y otros elementos en agricultura, siempre con la gran ventaja de la biodegradabilidad de estos materiales, que no necesitan ser retirados del propio campo de cultivo (www.mirel.com). Existe una serie de aplicaciones agrícolas especializadas, principalmente la liberación controlada de pesticidas mediante su inclusión en gránulos de PHA, que liberarán el producto químico conforme se vayan degradando. Técnicas similares se usan para la liberación de nutrientes directamente en la raíz del cultivo. Los PHAs también se degradan en ambientes anaerobios, por lo que estas técnicas también se pueden emplear en cultivos como los arrozales (Philip *et al.* 2007).



Figura 11: Aplicaciones de los PHAs en agricultura. **A.** Cultivo acolchado mediante film agrícola biodegradable. **B.** Macetas fabricadas con copolímeros de PHA que pueden ser trasplantadas directamente a la tierra debido a su fácil biodegradabilidad.

III. PHAs en biomedicina: Los PHAs han encontrado numerosas aplicaciones en el campo de la biomedicina, debido principalmente a su combinación de biocompatibilidad, hidrofobicidad y biodegradabilidad (Chodak 2008). Estas aplicaciones han visto limitada su expansión por la

disponibilidad de estos poliésteres en cantidades suficientes. Por el momento, sólo algunos PHAs como PHB, P(HB-co-HV), P(3HB-co-4HB), P4HB, PHO y P(HB-co-HH) son producidos a gran escala y destinados a esta clase de aplicaciones. Adicionalmente, los polímeros empleados en tejidos vivos deben reunir una serie de requisitos especiales en cuanto al contenido de endotoxinas, lo cual encarece los procesos de producción y purificación, ya que actualmente todos los PHAs se producen por fermentación de bacterias Gram negativas, cuya membrana externa contiene gran cantidad de endotoxinas conocidas como lipopolisacáridos (Philip *et al.* 2007).

La aplicación médica más directa de estos bioplásticos es la fabricación de toda clase de elementos e implantes quirúrgicos, tales como hilo de sutura, grapas, tornillos o placas, y especialmente en el área cardiovascular, con cánulas, injertos, válvulas cardíacas, revestimiento interno de vasos sanguíneos y un largo etcétera (Philip *et al.* 2007, Chen 2010). El PHB también posee gran importancia en la fabricación de prótesis para la regeneración de tejidos óseos, sobre todo en combinación con partículas de hidroxiapatita, que le dan una resistencia mecánica similar a la del hueso humano, sin afectar a su capacidad de reabsorción gradual (Philip *et al.* 2007). El éxito de su implementación en la ingeniería de tejidos vivos se debe a que no producen reacción vascular aguda *in vivo* durante periodos superiores a un año. También se ha demostrado la ausencia de toxicidad y de efectos inmunoestimulantes de sus productos de degradación *in vivo*. De hecho, se ha observado que los productos oligoméricos de los PHAs estimulan la activación de canales de calcio y promueven la regeneración de tejidos dañados (Chen 2009).

Los PHAs también se han empleado con éxito desde principios de la década de los 90 como vehículos para la liberación controlada de fármacos como antibióticos o antitumorales. Por ejemplo el P(HB-co-HV) se puede emplear en administración oral de sustancias (Gould *et al.* 1987). Por el momento sólo PHB y P(HB-co-HV) han sido empleados para estos fines, pero se espera la incorporación de otros PHAs con distintas propiedades que mejoren el control sobre la tasa de liberación de los fármacos (Chen 2010).

IV. PHAs para la producción de biocombustibles: En el sector energético también se ha empezado a esbozar una prometedora aplicación de los PHAs. Recientemente, se ha llevado a cabo por primera vez la esterificación de scl y mcl-PHAs mediante hidrólisis ácida en presencia de metanol, obteniendo como producto los ésteres metílicos de los (*R*)-3-hidroxiácidos correspondientes, 3HBME para el PHB y 3HAME para el mcl-PHA. Se observó que estos ésteres metílicos presentaban unos calores de combustión de 20 y 30 kJ/g, respectivamente, valores comparables al del etanol, que es de 27 kJ/g. Asimismo, se ha demostrado que añadiendo un

10% de estos ésteres metílicos al etanol se incrementa su calor de combustión hasta 30 y 35 kJ/g, respectivamente. En cambio, el calor de combustión descendió ligeramente cuando esta adición se realizó sobre *n*-butanol, *n*-propanol, gasolina o gasóleo, manteniéndose los valores en un nivel razonable para un combustible (Zhang *et al.* 2009). Estos resultados abren la puerta a una nueva fuente de combustibles alternativos que podrían ser obtenidos a partir de productos de desecho de diversas industrias, ayudando así a paliar el agotamiento de los combustibles fósiles.

V. Aplicaciones de los monómeros de PHAs: Las aplicaciones de los PHAs no se limitan a su uso como bioplásticos. Como ya se ha discutido, los PHAs de origen bacteriano están constituidos por monómeros quirales enantioméricamente puros, con conformación *R*. Dichos monómeros son por lo tanto (*R*)-hidroxiácidos (RHAs), y constituyen moléculas muy interesantes desde el punto de vista químico, ya que contienen, aparte de un centro quiral, un grupo hidroxilo y otro carboxilo, ambos grupos muy fáciles de modificar. Esto otorga a los RHAs un gran valor como reactivos de partida en una enorme variedad de procesos de síntesis química, ya que la síntesis convencional de moléculas enantioméricamente puras suele requerir caros y complejos procesos de catálisis con metales (Ren *et al.* 2010). Mediante síntesis a partir de RHAs se podrían obtener compuestos como antibióticos (por ejemplo macrólidos o carbapenémicos), vitaminas, aromas o feromonas (Chiba y Nakai 1985). Sin embargo, muchos de estos procesos no están siendo llevados a cabo actualmente a escala industrial debido a que están sujetos a la disponibilidad de los distintos RHAs, de los que sólo unos pocos pueden ser obtenidos en estado puro y en cantidades suficientes.

Los RHAs procedentes de la degradación *in vivo* o *in vitro* de los PHAs naturales también pueden ser empleados en la síntesis de nuevos polímeros sintéticos, cuya composición monomérica sea definida con precisión. De esta forma, se pueden conseguir homopolímeros y copolímeros aleatorios o en bloque, que no se puedan obtener fácilmente por fermentación con bacterias, así como nuevos poliésteres quirales polimerizando RHAs con monómeros de otra naturaleza, o incluso dendrímeros (Chen 2010).

Ciertos RHAs tienen, por sí mismos, diversas propiedades o actividades interesantes. El más estudiado, por su alta disponibilidad, es el (*R*)-3-hidroxiбутирато. Se han descrito actividades antimicrobianas, antivíricas e insecticidas de este hidroxiácido (Tokiwa y Ugwu 2007), así como varias aplicaciones en medicina. Por ejemplo, se usa para tratar lesiones traumáticas en las que sea beneficioso un alto nivel de cuerpos cetónicos en sangre, como el shock hemorrágico, quemaduras extensivas e hipoxia o isquemia cerebral. También reduce la tasa de muerte neuronal en modelos *in vitro* de enfermedades como Alzheimer o Parkinson y presenta efectos

positivos en el crecimiento de osteoblastos *in vitro* y en el tratamiento de la osteoporosis *in vivo* (Chen 2010). Además, el (*R*)-3-hidroxi butirato posee propiedades muy ventajosas para su uso como fármaco, como su gran tolerancia en humanos y su corta vida media, que han permitido su uso directo por vía oral.

Con alrededor de 150 hidroxiacidos diferentes que pueden integrar los PHAs, sus potenciales aplicaciones en muchos sectores de la industria están aún por explorar. Los avances en los sistemas de producción y purificación de RHAs podrán abrir la puerta a su estudio y al desarrollo de nuevas aplicaciones.

2.5 Degradación enzimática de PHA

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster entre los monómeros de los PHAs son denominadas polihidroxi alcanoato despolimerasas o PHA despolimerasas. Estas enzimas se clasifican como carboxilesterasas y serina hidrolasas, ya que catalizan la hidrólisis de un éster carboxílico mediante una serina catalítica, uno de los tres aminoácidos que conforman una triada catalítica típica de serina hidrolasas, junto con una histidina y un residuo ácido de un glutámico o un aspártico.

Las PHA despolimerasas presentan una marcada especificidad de sustrato, a diferencia de las PHA sintasas, capaces de polimerizar una gran variedad de monómeros. En función del polímero que sean capaces de hidrolizar se establecen dos tipos de PHA despolimerasas perfectamente definidos:

scl-PHA despolimerasas: hidrolizan PHAs de cadena corta, con cadenas radicales de uno o dos átomos de carbono (radicales metilo o etilo). Esto incluye el poli[(*R*)-3-hidroxi butirato], poli[(*R*)-3-hidroxi valerato] y sus copolímeros. Estas enzimas se clasifican con el código EC 3.1.1.75 de acuerdo a la reacción que catalizan, y genéricamente se conocen como poli(3-hidroxi butirato) despolimerasas.

mcl-PHA despolimerasas: hidrolizan PHAs de cadena media, con cadenas radicales de 3 o más carbonos (radicales propilo o más largos), como el poli[(*R*)-3-hidroxi octanoato] o el poli[(*R*)-3-hidroxi decanoato]; la mayor variedad de sus posibles componentes hace que esta clase de PHAs sea más heterogénea que la de los scl-PHAs, existiendo copolímeros con composición monomérica muy compleja. Por la reacción que catalizan estas enzimas se clasifican como EC 3.1.1.76, y su nombre genérico es poli(3-hidroxi octanoato) despolimerasas.

Por lo que se ha publicado hasta la fecha, las PHA despolimerasas son completamente específicas para la hidrólisis de scl o mcl-PHAs. Incluso en organismos capaces de degradar ambos tipos de polímero se expresan enzimas distintas, específicas para cada tipo de PHA. De hecho, en los copolímeros en los que se mezclan (R)-3-hidroxiácidos de cadena corta y media, las PHA despolimerasas sólo son capaces de hidrolizar los enlaces éster entre monómeros del mismo tipo, para el que son específicas (Jendrossek y Handrick 2002).

Aparte de esta importante división de las PHA despolimerasas respecto a la especificidad de sustrato, cuando hablamos de degradación enzimática de los PHAs es importante distinguir entre dos procesos claramente diferenciados: la degradación intracelular y la degradación extracelular.

2.5.1 Degradación intracelular de PHA: Este proceso es llevado a cabo en la superficie del gránulo de PHA, dentro del citoplasma de una bacteria productora de esta clase de biopolímeros, y consiste en la movilización de la reserva de carbono y energía que representan los gránulos de PHA nativos. La acumulación de PHA, como ya se ha indicado anteriormente, se produce mayoritariamente durante un periodo de crecimiento desequilibrado, en el que ha existido un exceso de fuente de carbono y/o un defecto de algún otro nutriente esencial. Al cesar este desequilibrio, la bacteria acumuladora puede utilizar este almacén energético y nutricional para desarrollar sus funciones vitales de crecimiento y división. Para ello, las PHA despolimerasas intracelulares degradan las cadenas de polímero liberando al citoplasma monómeros u oligómeros solubles. En el caso de liberar oligómeros como producto de reacción, la bacteria productora de PHA suele disponer de oligómero hidrolasas intracelulares (Delafield *et al.* 1965, Tanaka *et al.* 1981). Estas oligómero hidrolasas degradan los oligómeros a monómeros más sencillos, que a través de varias rutas metabólicas, principalmente la β -oxidación y la síntesis *de novo* de ácidos grasos, serán incorporados al metabolismo (Sugiyama *et al.* 2004).

PHA despolimerasas intracelulares: Reciben el nombre de i-PHA despolimerasas, son las enzimas que catalizan la despolimerización de las cadenas de PHA en el gránulo nativo dentro del citoplasma bacteriano, liberando como productos monómeros y oligómeros de ácidos (R)-3-hidroxiálcanoicos. Este tipo de despolimerasas solamente se encuentra en bacterias productoras de PHA. Como ya se ha comentado, los gránulos de PHA en su estado nativo mantienen el polímero en un estado amorfo y fluido, gracias a su envuelta proteolipídica. Es en esta envuelta donde se encuentran embebidas las enzimas encargadas tanto de la síntesis como de la degradación del PHA. Estas i-PHA despolimerasas están en contacto directo con el

polímero hidrofóbico, y son específicas para la degradación del PHA en estado nativo, por lo que también se las conoce como nPHA despolimerasas. Debido al complejo entorno parcialmente hidrofóbico en el que se localizan de forma natural, estas enzimas no suelen ser muy estables en forma soluble en un medio extracelular (Handrick y Jendrossek 1998), lo que dificulta, tanto su expresión heteróloga, ya que por su carácter hidrofóbico tienden a crear cuerpos de inclusión (de Eugenio *et al.* 2007), como su aplicación biotecnológica como biocatalizador inmovilizado (Chen 2009, Arroyo *et al.* 2011).

2.5.2 Degradación extracelular de PHA: Se trata del proceso mediante el cual, un microorganismo no necesariamente productor de PHA, hidroliza, mediante enzimas extracelulares secretadas al medio externo, los gránulos desnaturalizados de PHA, vertidos a este medio por la muerte y lisis celular de bacterias acumuladoras.

La degradación extracelular de PHA es, por tanto, la solubilización de estos sustratos poliméricos desnaturalizados (dPHA), con el fin de liberar monómeros y oligómeros de ácidos 3-hidroxicanoicos solubles. Si los productos mayoritarios de esta hidrólisis extracelular son oligómeros, la bacteria degradadora deberá contar con oligómero hidrolasas extracelulares (Shirakura *et al.* 1983, Zhang *et al.* 1997). En caso de disponer únicamente de oligómero hidrolasas intracelulares, también deberán de contar con un sistema de transporte a través de la pared y las membranas celulares, adecuado para asimilar los oligómeros producidos y usarlos como fuente de carbono y energía.

PHA despolimerasas extracelulares: Conocidas como e-PHA despolimerasas, estas enzimas son secretadas al medio por una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias y hongos, con el fin de solubilizar los gránulos de dPHA del medio. Sin embargo, los PHA extracelulares son una fuente secundaria de carbono, por lo que la expresión de las e-PHA despolimerasas está sujeta a represión catabólica. Es decir, en presencia de otras fuentes de carbono más adecuadas, como glucosa o ácidos orgánicos, se reprime la expresión de estas enzimas hidrolíticas (Jendrossek *et al.* 1993). En algunas especies bacterianas la expresión de las e-PHA despolimerasas se produce incluso en ausencia de PHA, por lo que se piensa que no es necesaria una inducción de su expresión mediante el propio polímero (Jendrossek y Handrick 2002), sino solamente la falta de fuentes de carbono más adecuadas.

Como ya se ha explicado anteriormente, los gránulos de PHA vertidos al medio, conocidos como gránulos desnaturalizados pierden su envoltura, y el PHA que contienen adopta una estructura más o menos cristalina, dependiendo del tipo de PHA que se trate. Las e-PHA despolimerasas presentan una gran actividad sobre el PHA desnaturalizado, por lo que

también se hace referencia a ellas como dPHA despolimerasas. Para llevar a cabo la degradación de los gránulos se adsorben a ellos con gran afinidad, y los degradan erosionando su superficie para liberar los productos solubles.

Respecto al mecanismo de acción de estas enzimas, se ha descrito que la hidrólisis afecta principalmente al segundo y tercer enlace éster desde el extremo hidroxilo de una cadena de PHA (Nakayama *et al.* 1985), lo que apunta a un mecanismo exo-hidrolasa, aunque también se ha demostrado que algunas PHA despolimerasas presentan actividad endo-hidrolasa, pudiendo hidrolizar oligómeros cíclicos de 3-hidroxiacanoatos (Brandl *et al.* 1995, Bachmann y Seebach 1999, Scherer *et al.* 2000). Se asume que la mayoría, si no todas las dPHA despolimerasas catalizan una actividad tanto endo como exohidrolasa.

Las dPHA despolimerasas comparten una serie de características típicas de enzimas hidrolíticas extracelulares:

- Presentan una gran estabilidad en amplios intervalos de temperatura, pH y fuerza iónica, muchas son bastante resistentes incluso en presencia de disolventes orgánicos.
- Tamaño molecular relativamente pequeño, siempre por debajo de 65 kDa. Además son enzimas monoméricas, sólo presentan una única cadena polipeptídica, con la única excepción publicada de la mcl-PHA despolimerasa extracelular de *Pseudomonas* sp. RY-1, descrita como homotetramérica (Kim *et al.* 2000b).
- Su pH óptimo suele ser alcalino, entre pH 7,5 y 10.
- La mayoría de dPHA despolimerasas sufren una inhibición severa por agentes reductores, así como por inhibidores específicos de serina hidrolasas, por ejemplo el diisopropil fluorofosfato (DFP) o el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
- No se unen a intercambiadores aniónicos como la dietilaminoetil-sefarosa (DEAE-sefarosa) a pH neutro, sin embargo presentan gran afinidad por los soportes hidrofóbicos.

scl-dPHA despolimerasas

También conocidas como dPHB despolimerasas, estas son las PHA despolimerasas más abundantes en la naturaleza y mejor conocidas. Como ya se ha comentado, son enzimas extracelulares, con gran afinidad por dPHA de cadena corta (scl) como el PHB y copolímeros de PHBV, sólo algunas de estas enzimas presentan afinidad por el homopolímero de PHV. Son producidas mayoritariamente por un amplio espectro de bacterias y hongos. Su estructura

está compuesta por varios dominios claramente diferenciados y con distintas funciones, tal como se esquematiza en la *figura 11*:

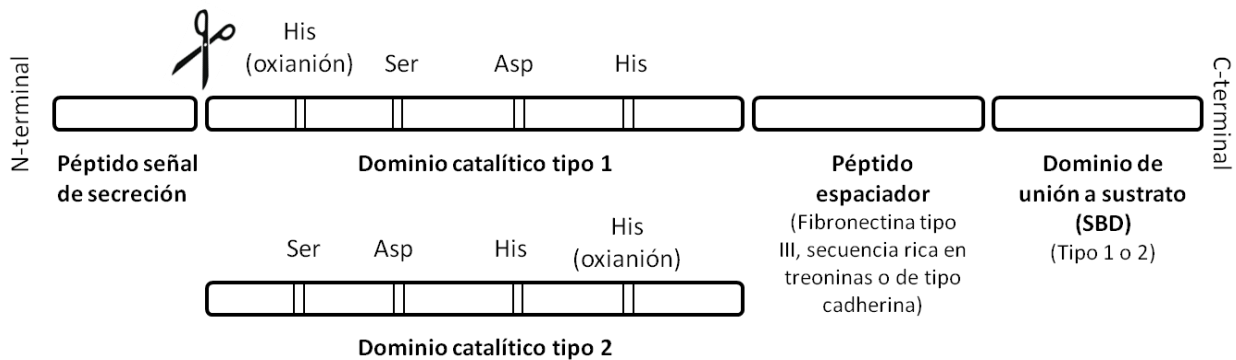


Figura 11: Esquema de la organización de los distintos módulos de las PHB despolimerasas extracelulares. Los módulos están representados en el orden que ocupan a lo largo de la estructura primaria de la enzima. Se indica la posición relativa de los aminoácidos catalíticos (Ser, Asp e His) y de la posible histidina de la cavidad del oxianión (His oxianión) en los dos tipos de dominio catalítico descritos. La tijera representa el sitio de corte del péptido señal de secreción de la preproteína mediante peptidasas señal, generando la despolimerasa madura.

- I. **Péptido señal de secreción:** Estas PHA despolimerasas son sintetizadas en el interior de la célula como preproteínas marcadas con un péptido señal N-terminal de entre 20 y 60 aminoácidos de longitud, que las destina a ser secretadas hacia el exterior de la célula. Esta secreción desde el citoplasma se produce a través de la vía Sec, un sistema general de secreción de proteínas desde el citoplasma dependiente de la presencia de un péptido señal de secreción. A continuación, en el caso de las bacterias Gram negativas, el transporte desde el periplasma hacia el exterior parece proceder mediante la ruta tipo II de secreción (Sugimoto *et al.* 2008), empleando complejos multiméricos de secretina y otras proteínas involucradas en este sistema. En el proceso de translocación, ciertas peptidasas cortan este péptido señal para liberar la proteína madura en el medio extracelular.
- II. **Dominio catalítico:** Situado en la región N-terminal de la proteína madura tras escindir el péptido señal. Es un dominio grande, supone más de la mitad del tamaño de la despolimerasa madura. Presenta homología con muchas serina hidrolasas, y contiene una triada catalítica, compuesta por una serina, una histidina y un ácido aspártico. La serina catalítica está situada dentro de un pentapéptido conocido como "caja lipasa", cuya secuencia consenso de aminoácidos es (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly), pudiendo ser X₁ y X₂ diferentes aminoácidos. Esta caja lipasa está presente en casi todas las serina hidrolasas conocidas, tales como lipasas, esterases o serina proteasas (Brenner 1988). El dominio catalítico también cuenta con otra región

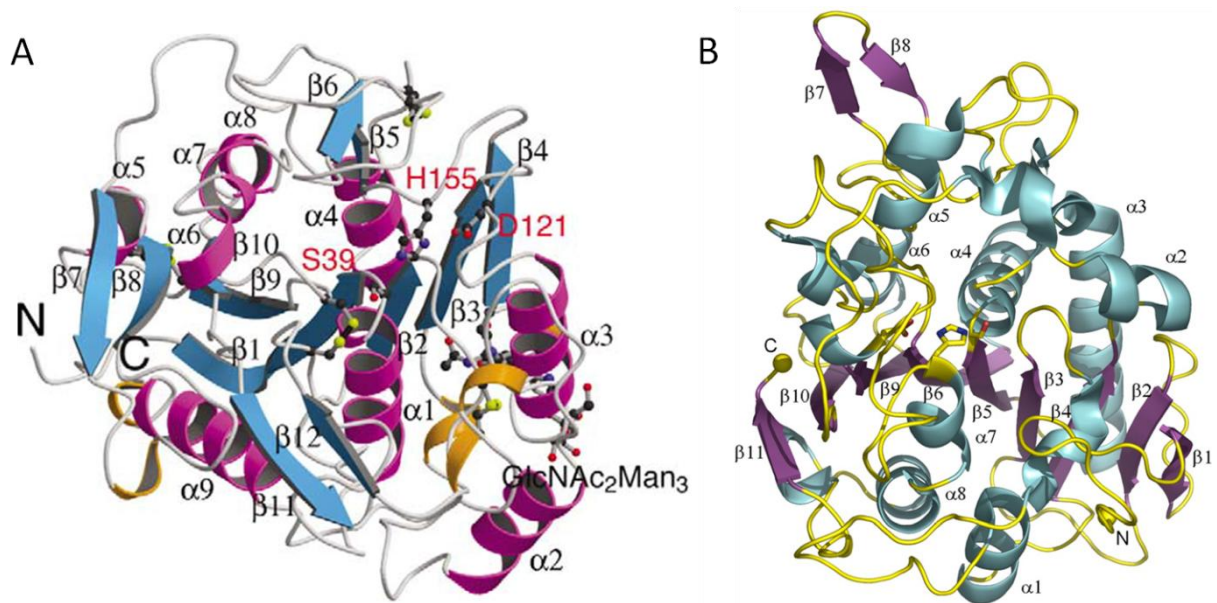


Figura 12: Estructuras tridimensionales conocidas de PHB despolimerasas extracelulares. Las α -hélices y láminas β están numeradas desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal. **A.** Modelo tridimensional de la PHB despolimerasa del hongo *Penicillium funiculosum*, de solo 33 kDa, mostrando los aminoácidos catalíticos, las cisteínas y un oligosacárido ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$) formado por dos moléculas de N-acetil glucosamina y tres manosas, unido covalentemente a una asparagina. Tomado de Hisano et al. 2006. **B.** Modelo tridimensional de la PHB despolimerasa PhaZ7 de *Paucimonas lemoignei*, de 36.2 kDa, mostrando sus aminoácidos catalíticos. Tomado de Papageorgiou et al. 2008.

importante para el mecanismo catalítico, se trata de la cavidad del oxianión. En esta región se encuentra una histidina (distinta de la histidina catalítica) totalmente conservada, cuya posible función es estabilizar el intermediario tetraédrico de la reacción, cargado negativamente (oxianión), mediante un puente de hidrógeno. En función de la posición relativa que ocupe esta histidina del oxianión en la secuencia primaria, respecto a los aminoácidos de la triada catalítica, se pueden distinguir dos tipos de dominio catalítico en las dPHB despolimerasas: en el tipo 1 la histidina del oxianión se encuentra más cerca del extremo N-terminal que los aminoácidos de la triada catalítica, como en las PHB despolimerasas de *Pseudomonas lemoignei* (Briese et al. 1994, Jendrossek et al. 1995b), *Alcaligenes faecalis* (Kita et al. 1997) o *Ralstonia pickettii* (Wang et al. 2002); en cambio, en el tipo 2 está más cerca del extremo C-terminal que todos los aminoácidos catalíticos, como ocurre en las PHB despolimerasas de bacterias Gram negativas de géneros como *Comamonas* (Jendrossek et al. 1995a, Shinomiya et al. 1997), *Leptothrix* (Takeda et al. 2000), y *Acidovorax* (Kobayashi et al. 1999), y también algunas Gram positivas como *Streptomyces exfoliatus* (Klingbeil et al. 1996). Sin embargo, la función de estas histidinas altamente conservadas como estabilizadoras del oxianión es especulativa. Es necesario contar con un modelo fiable de alta resolución para determinar qué aminoácidos se encuentran mejor posicionados para desempeñar esta función. Por ejemplo, el

análisis de la arquitectura del centro activo de PHA despolimerasas cuya estructura tridimensional se ha resuelto mediante cristalografía asistida por difracción de rayos X (Figura 12), ha revelado otros aminoácidos que probablemente estén involucrados en mayor medida en la formación de la cavidad del oxianión, especialmente los enlaces peptídicos entre ciertos aminoácidos circundantes al centro activo (Hisano *et al.* 2006, Papageorgiou *et al.* 2008). El establecimiento de la estructura tridimensional de la PHB despolimerasa de *Penicillium funiculosum*, con resolución a nivel atómico, permitió detallar el mecanismo catalítico mediante el cual esta enzima realiza la hidrólisis del PHB, que se muestra en la figura 13. Este mecanismo puede servir como modelo para dilucidar el mecanismo catalítico de otras PHB despolimerasas homólogas, así como los aminoácidos involucrados en la hidrólisis.

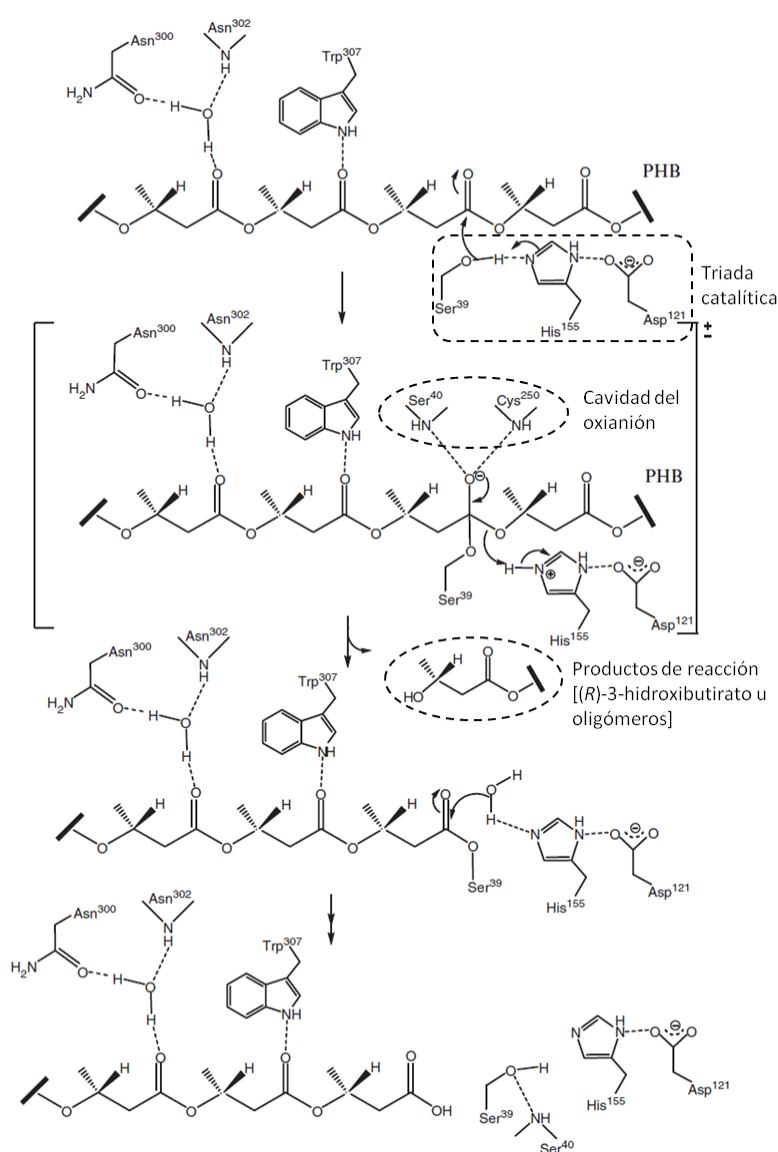


Figura 13: Esquema del mecanismo catalítico de la PHB despolimerasa extracelular de *Penicillium funiculosum*. Se indican los aminoácidos del centro activo involucrados en la catálisis, la unión al sustrato y la estabilización del intermediario de reacción. Adaptado de Hisano *et al.* (2006).

III. Dominio separador: Entre el dominio catalítico y el dominio C-terminal se encuentra una región de unión, de longitud variable, cuya función no se ha demostrado completamente y que puede ser de diferente naturaleza. En cinco de las siete PHB despolimerasas extracelulares descritas en *Paucimonas lemoignei*, este dominio consiste en una región de unos 40 aminoácidos rica en treoninas, con bloques repetitivos de dos a seis residuos de treonina. En cambio, en muchas otras despolimerasas encontramos una secuencia que presenta homología con el dominio fibronectina tipo III; este dominio de aproximadamente 100 aminoácidos, evolutivamente conservado en animales, bacterias y levaduras, adopta un plegamiento tipo beta sándwich y está presente en multitud de proteínas extracelulares, así como en enzimas procarióticas que hidrolizan polímeros, como por ejemplo quitinasas, celulasas y glucoamilasas. Adicionalmente se ha descrito otra clase de dominio espaciador en la dPHB despolimerasa de *Pseudomonas stutzeri* (Ohura *et al.* 1999), también en torno a 100 aminoácidos de longitud, y con una secuencia tipo cadherina. Esta clase de secuencias tipo cadherina también se encuentran en proteínas eucariotas, aunque están más generalizadas en procariotas. Frecuentemente se encuentran fusionadas con otros dominios, como el dominio fibronectina tipo III, también adoptan plegamientos tipo beta sándwich, y se cree que pueden estar involucradas en funciones de unión a carbohidratos (ver información del dominio en Interpro, [<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>] con el código de acceso IPR025883).

Al parecer, la naturaleza de este dominio no es tan relevante como su presencia, ya que ciertos experimentos de mutación en los que se sustituyó uno de estos dominios (fibronectina tipo III) por otro de distinto tipo (región rica en treoninas), permitieron obtener despolimerasas igualmente funcionales. En cambio, si se deleta totalmente esta región, la despolimerasa no es capaz de llevar a cabo su reacción (Nojiri y Saito 1997). A la vista de estos resultados se desarrolló la hipótesis de que la función de esta clase de dominio consiste en proporcionar una distancia adecuada entre el dominio catalítico y el dominio de unión a sustrato, localizado en el extremo C-terminal, de forma que el primero disponga de la movilidad suficiente para realizar la catálisis mientras la enzima está adsorbida al polímero. Sin embargo, el alto grado de conservación encontrado en muchos aminoácidos de este dominio reduce la probabilidad de que se trate únicamente de un péptido de unión (Jendrossek *et al.* 1995b), cabiendo la posibilidad de que desempeñe otro cometido desconocido hasta el momento.

IV. Dominio de unión a sustrato (*Substrate Binding Domain* o *SBD*): Se trata de un dominio de entre 40 y 60 aminoácidos localizados en el extremo C-terminal de las dPHB despolimerasas. Se ha demostrado que esta región es capaz por sí sola de adherirse al dPHB con cierta especificidad, ya que no tienen afinidad por otros polímeros como quitina o celulosa. Las

despolimerasas a las que se les deleciona este dominio son incapaces de unirse al PHB, aunque retienen la actividad esterasa sobre ésteres solubles de *p*-nitrofenol (Behrends *et al.* 1996, Nojiri y Saito 1997, Briese y Jendrossek 1998). Existen varios tipos de dominios de unión a dPHB, con un tamaño parecido pero secuencias claramente diferenciadas, no obstante, ambos presentan una serie de aminoácidos muy conservados, entre ellos algunos aminoácidos polares con carga como histidina y arginina, otros polares sin carga como serina, asparagina o glutamina y algunos más hidrofóbicos como tirosina o alanina. Los SBD de tipo 1, bastante extendidos entre las dPHB despolimerasas conocidas, cuentan con dos cisteínas conservadas en su secuencia, lo que hace pensar en la presencia de un puente disulfuro en este dominio, mientras que los de tipo 2, únicamente descrito en unas pocas dPHB despolimerasas como PhaZ1_{ple} y PhaZ4_{ple} de *Paucimonas lemoignei*, sólo presentan una cisteína (Jendrossek y Handrick 2002). Aún no se sabe si estos aminoácidos conservados en la secuencia de los SBD son necesarios para adoptar una conformación tridimensional adecuada o bien están implicados directamente en el establecimiento de interacciones con el polímero de tipo hidrofílico, hidrofóbico o electrostático. Por otra parte, en la dPHB despolimerasa de *Bacillus* sp. NRRL B-14911 se han descrito otros dos nuevos dominios de unión a sustrato, sin homología con los anteriormente citados. Ambos dominios son suficientes por sí solos de unirse al PHB con gran afinidad, y en esta despolimerasa se disponen adyacentes en su estructura primaria. Esta enzima de *Bacillus* constituye una nueva clase de dPHB despolimerasas, porque a pesar de tener un dominio catalítico de tipo 1, su probable péptido de unión también posee características propias y no presenta homología con ninguno de los detallados en el epígrafe anterior (Ma *et al.* 2011).

Los avances más importantes en la caracterización del dominio y mecanismo de unión a sustrato de una PHB despolimerasa se han desarrollado recientemente con la PHB despolimerasa PhaZ7_{ple} de *Paucimonas lemoignei*, esta despolimerasa es muy peculiar en muchos sentidos, ya que a pesar de ser una enzima extracelular sólo presenta afinidad por los gránulos nativos de PHB, siendo la primera e-nPHB despolimerasa descrita (Handrick *et al.* 2001). PhaZ7_{ple} no presenta homología de secuencia con ninguna otra PHB despolimerasa, y parece carecer de un dominio de unión a sustrato definido, en cambio, mediante experimentos de mutagénesis dirigida y gracias a la cristalización de esta despolimerasa, se han podido identificar, en distintas regiones de la secuencia, hasta cinco aminoácidos hidrofóbicos (tirosinas y triptófanos) directamente implicados en la unión al nPHB (Hermawan y Jendrossek 2010, Jendrossek *et al.* 2013).

2.5.3 Antecedentes y situación actual del estudio de las PHA despolimerasas

La actividad scl-PHA despolimerasa extracelular en los ecosistemas naturales parece estar bastante más extendida en comparación con la mcl-PHA despolimerasa (de Eugenio *et al.* 2007), esto ha propiciado el desarrollo de un mayor conocimiento de las PHB despolimerasas, tanto intracelulares como extracelulares. A partir de los años 90 se han realizado grandes avances en el metabolismo de las bacterias acumuladoras de PHB y PHBV, especialmente de *Ralstonia eutropha* H16 (Doi *et al.* 1990, Saito *et al.* 1995, Handrick *et al.* 2000, Saegusa *et al.* 2001), (anteriormente clasificada como *Hydrogenomonas eutropha* H16 y *Alcaligenes eutrophus*). El metabolismo de producción y degradación de PHAs en *R. eutropha* se ha venido estudiando desde los años 70 (Oeding y Schlegel 1973), y se ha llegado a convertir en el microorganismo modelo para el estudio de la producción de PHB.

Respecto a las scl-PHA despolimerasas extracelulares, también experimentaron un notable auge en su estudio, gracias en gran medida a las investigaciones con *Paucimonas lemoignei* (Nakayama *et al.* 1985, Briese *et al.* 1994, Jendrossek *et al.* 1995b, Handrick *et al.* 2001), nombrada así en honor a Maurice Lemoigne, que describió por primera vez la naturaleza de los PHAs. En esta bacteria se han descubierto hasta 7 despolimerasas extracelulares de PHB. Aún no se ha determinado con claridad la ventaja adaptativa de disponer de una batería de 7 PHB despolimerasas, aunque la presencia de varias isoenzimas extracelulares en la misma especie bacteriana, con diferente afinidad para cadenas de polímero de distinta longitud podría ejercer un efecto sinérgico para la degradación del PHB. Este fenómeno sinérgico se ha observado frecuentemente en la degradación de otros polímeros naturales como la celulosa o la quitina (Jendrossek y Handrick 2002). En este campo de las scl-PHA despolimerasas extracelulares, la mayor parte del conocimiento acumulado a nivel bioquímico se concentra en PHB despolimerasas procedentes de bacterias Gram negativas, como la ya nombrada *Paucimonas lemoignei*, y otras especies como *Alcaligenes faecalis* (Saito *et al.* 1989), *Pseudomonas stutzeri* (Ohura *et al.* 1999), *Marinobacter* sp. (Kasuya *et al.* 2003), *Schlegelella* sp. (Romen *et al.* 2004), *Thermus thermophilus* (Papaneophytou *et al.* 2009) o *Comamonas acidovorans* (Kasuya *et al.* 1997). Por el contrario, las enzimas procedentes de Gram positivas comparativamente han recibido mucha menor atención, a pesar de que bacterias Gram positivas dentro del género *Bacillus* o *Streptomyces*, así como actinomicetos en general, han sido reconocidos como algunos de los microorganismos degradadores de PHB más numerosos y relevantes en suelos de diversa composición (Mergaert *et al.* 1993, Savenkova *et al.* 2000), así como en compost y en ambientes acuáticos naturales (Mergaert *et al.* 1994, Mergaert *et al.* 1995). Entre los escasos representantes de dPHB despolimerasas extracelulares de Gram positivas purificadas y caracterizadas se encuentran las de *Bacillus megaterium* N-18-25-9 (Takaku *et al.* 2006),

Bacillus sp. NRRL B-14911 (Ma *et al.* 2011) y la de *Streptomyces exfoliatus* K10 (Klingbeil *et al.* 1996).

En cambio, la investigación de las mcl-PHA despolimerasas se ha desarrollado más lentamente, en el año 2000 sólo se contaba con unas pocas mcl-PHA despolimerasas caracterizadas, todas de gamma-proteobacterias como *Pseudomonas fluorescens* GK13 (Schirmer y Jendrossek 1994), *Pseudomonas* sp. RY-1 (Kim *et al.* 2000b) o *Xanthomonas* sp. JS02 (Kim *et al.* 2000a). Ha sido en la década pasada cuando se ha empezado a disponer de un número considerable de mcl-PHA despolimerasas, tanto intra como extracelulares, y caracterizadas en mayor o menor medida. Estas enzimas son procedentes de bacterias de la familia *Pseudomonadaceae*, como por ejemplo *Pseudomonas alcaligenes* LB19 (Kim *et al.* 2002, Kim *et al.* 2005), *P. putida* KT2442 (de Eugenio *et al.* 2007, de Eugenio *et al.* 2008), y también de otros grupos, como la bacteria depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 (Martinez *et al.* 2012), y actinomicetos como *Streptomyces* sp. KJ-72 (Kim *et al.* 2003), *Streptomyces roseolus* SL3 (Gangoiti *et al.* 2012) o *Streptomyces venezuelae* SO1 (Santos *et al.* 2013). Paralelamente, también ha crecido el interés por la aplicación de estas enzimas y sus bacterias productoras en diversos procesos de interés industrial (Ruth *et al.* 2007, Gangoiti *et al.* 2010, Arroyo *et al.* 2011).

Con los recientes avances en las técnicas de secuenciación masiva de DNA (Glenn 2011, Dini-Andreote *et al.* 2012), el número de genomas bacterianos completamente secuenciados y disponibles para su libre consulta se ha incrementado notablemente, por lo que existen numerosas secuencias génicas codificantes que podrían corresponder a PHA despolimerasas. Muchas de las secuencias disponibles hasta 2009 están recogidas en la base de datos PHA Depolymerase Engineering Database (DED) desarrollada por el grupo del profesor Pleiss de la Universidad de Stuttgart (Knoll *et al.* 2009). Esta base de datos reúne 587 secuencias de PHA despolimerasas (tanto caracterizadas como putativas) y las agrupa sistemáticamente en superfamilias y familias de homología, suponiendo una ayuda práctica para predecir la presencia de estas despolimerasas en multitud de microorganismos, así como su localización celular y características bioquímicas. No obstante se requiere de metodología experimental para certificar las predicciones bioinformáticas realizadas por esta base de datos (Sznajder y Jendrossek 2011). En dicha base de datos existen 364 secuencias atribuidas a dPHB despolimerasas extracelulares, organizadas en 24 familias de homología. Entre estas secuencias está la de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891, subespecie posteriormente reclasificada como *Streptomyces ascomycinicus* (Kumar y Goodfellow 2010). Esta secuencia codificante (*fkbU*) se describió dentro de la región génica FK520 (Wu *et al.* 2000), que codifica un conjunto de enzimas responsables de la ruta sintética del macrólido ascomicina o FK520, compuesto con actividad antifúngica, neurotrófica e

inmunosupresora. Sin embargo, por homología se le asignó la función de PHB despolimerasa, proponiendo los autores que esta enzima podría ser responsable de suministrar y mantener un elevado nivel de 3-hidroxiácidos como precursores para la síntesis de ascomicina. Cabe destacar que esta posible PHB despolimerasa presenta homología con despolimerasas extracelulares como PhaZ3 de *Paucimonas lemoignei*, por lo que el suministro de 3-hidroxiácidos dependería de la presencia de PHB extracelular, no de un acúmulo intracelular del propio *Streptomyces ascomycinicus*, como sugirieron los autores.

3. Características e importancia del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es uno de los aproximadamente 120 géneros que forman parte del orden *Actinomycetales*, dentro de la clase *Actinobacteria*. Consta de más de 500 especies conocidas, más que cualquier otro género del dominio *Bacteria* (Hain *et al.* 1997). Se trata de bacterias filamentosas, Gram positivas y aerobias, con un contenido de Guanina y Citosina (G+C) en sus genomas de entre el 69 y el 78%, mucho más elevado que otros géneros de Gram positivas no actinomicetos, como *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* o *Streptococcus*, que pueden presentar contenidos de G+C inferiores al 50%. El contenido elevado de G+C es característico de todos los actinomicetos, y sirve para diferenciar esta importante rama dentro de las bacterias Gram positivas (Hopwood 2006). Los *Streptomyces* son bacterias miceliales, con una morfología aparentemente más cercana a los hongos que a las demás bacterias. Esto hizo que, hasta finales de los años 50, los actinomicetos fuesen considerados como un filo intermedio entre hongos y bacterias, aunque evidentemente carecen de núcleo, mitocondrias o cloroplastos (Kieser *et al.* 2000). Las colonias de *Streptomyces* constan de “tejidos” diferenciados, rasgo muy poco usual en las demás bacterias y conocido como pleomorfismo. Esto se debe a su complejo ciclo de vida, por el cual, a partir de una espora esférica y quiescente, cuando se dan las condiciones adecuadas, se generan uno o más tubos germinales o hifas, que se elongan mediante crecimiento apical, creando septos celulares transversales a intervalos, e iniciando ramificaciones laterales con nuevos ápices en crecimiento, lo que les permite incrementar su biomasa casi exponencialmente. Esta es la fase de crecimiento vegetativo, que debido al crecimiento apical con ramificaciones, resulta en un complejo entramado de hifas. Cuando los nutrientes del medio empiezan a agotarse, este micelio sustrato o vegetativo comienza a emitir hifas reproductivas (esporóforos) que se extienden hacia los espacios aéreos del medio, y después de cierta elongación, los extremos distales de estas hifas empiezan a compartimentalizarse para dar lugar a cadenas de esporas terminales o conidios (Anderson y Wellington 2001, Hopwood 2006). Este proceso de esporulación se

produce a costa de la biomasa del micelio sustrato, que sufre una lisis extensiva para alimentar el crecimiento de las hifas reproductivas (Miguélez *et al.* 1999). Las esporas, una vez maduras, serán liberadas al medio, y al encontrarse en condiciones adecuadas germinarán desarrollando nuevo micelio sustrato (Figura 14).



Figura 14: Esquema general del ciclo de vida de las bacterias del género *Streptomyces*, mostrando el pleomorfismo de sus distintas fases. Modificado de Brooks *et al.* (2012).

Las bacterias del género *Streptomyces* están entre los más abundantes y representativos habitantes de los suelos de todo el planeta, aunque se las puede encontrar en multitud de ecosistemas. La mayoría de las especies son saprófitas, obteniendo sus nutrientes de la materia orgánica en descomposición. Debido a este modo de vida, son capaces de producir una cantidad excepcionalmente elevada de enzimas hidrolíticas extracelulares, como celulasas, quitinasas, xilanasas o lignocelulasas, que les permiten degradar y asimilar todo tipo de polímeros naturales, entre ellos algunas de las sustancias naturales más resistentes a la biodegradación como la quitina o la lignocelulosa. Por esta extensa batería de actividades hidrolíticas, los *Streptomyces* desempeñan un papel primordial en el inicio de la composición de la materia orgánica en los hábitats terrestres. Sus excepcionales capacidades hidrolíticas permiten que algunas especies establezcan una aparente relación de simbiosis en el intestino de ciertas termitas xilófagas. Por otra parte, existen especies de *Streptomyces* que son patógenas de raíces o tubérculos vegetales, como *Streptomyces scabies*, que produce la sarna de la patata (Chater *et al.* 2010).

Una de las características más notables del género *Streptomyces* es su prodigiosa capacidad para producir metabolitos secundarios, principalmente antibióticos. Se llaman metabolitos secundarios a aquellas moléculas pequeñas (generalmente menos de 3.000 Da) de naturaleza extremadamente diversa y función natural muchas veces no muy bien establecida, sintetizados por plantas y microorganismos, pero que no son esenciales para su metabolismo (Berdy 2005, Chaudhary *et al.* 2013). De los miles de metabolitos secundarios bioactivos documentados, más de un tercio son producidos por alguna especie de *Streptomyces*. Entre ellos podemos encontrar actividades antibióticas, antitumorales, inmunosupresoras, antihelmínticas, citostáticas, efectoras del crecimiento de plantas, herbicidas e insecticidas. Este vasto reservorio de productos hace de *Streptomyces* el género de microorganismos más importante desde el punto de vista industrial.

Objetivos

Como ya se ha comentado, la degradación enzimática de los polihidroxicanoatos es un proceso biotecnológico interesante, no sólo con el propósito de paliar la acumulación excesiva de residuos plásticos en el medio ambiente, sino también por la posibilidad de aprovechar los monómeros u oligómeros producto de la hidrólisis de los PHAs como compuestos quirales de alto valor añadido. Estos productos de reacción pueden ser empleados para la síntesis de polímeros con propiedades fisicoquímicas a medida, y también como materiales de partida en la síntesis de multitud de fármacos quirales enantioméricamente puros.

Adicionalmente, el conocimiento relativo a las PHB despolimerasas de bacterias Gram positivas, particularmente de actinomicetos, es escaso en comparación con el existente sobre las pertenecientes a Gram negativas o a hongos. Los actinomicetos son reconocidos por su gran versatilidad y capacidad de degradar todo tipo de macromoléculas en la naturaleza, por lo que representan una importante fuente de enzimas degradadoras de posible aplicación industrial.

Por lo tanto, los objetivos concretos establecidos para esta tesis se pueden resumir en los siguientes epígrafes:

1. Identificación y detección de nuevas actividades PHA despolimerasa extracelulares en cepas bacterianas del género *Streptomyces*.
2. Confirmación de *Streptomyces ascomycinicus* como productor de PHB despolimerasa extracelular.
3. Clonación y expresión heteróloga de los genes *phaZ_{Sex}*, que codifica la PHB despolimerasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}), y *fkbU*, que codifica una putativa PHB despolimerasa en *Streptomyces ascomycinicus* (PhaZ_{Sa}).
4. Purificación de ambas PHB despolimerasas y caracterización funcional y estructural de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}.
5. Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}, principalmente preparación de biocatalizadores inmovilizados reutilizables de las PHB despolimerasas para la degradación de PHB.

Materiales y métodos

1. Reactivos

Los siguientes ingredientes de medios de cultivo fueron suministrados por Difco, Becton-Dickinson (Estados Unidos): extracto de levadura, bactotripton, extracto de malta, agar bacteriano. La harina de soja fue adquirida a El Granero Integral (España). El manitol procedió de Fluka (Suiza). La glucosa y sacarosa fueron de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Los antibióticos ampicilina y kanamicina, así como el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Los siguientes disolventes fueron adquiridos a Scharlab (España): etanol absoluto, etanol 96%, ácido acético glacial, metanol, acetona, acetonitrilo, cloroformo, 2-propanol, 2-mercaptoetanol, dimetilformamida, tolueno, tetrahidrofurano, etilenglicol, dietilenglicol y trietilenglicol. El glicerol, ácido clorhídrico y dimetilsulfóxido fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y el fenol a Amresco (Estados Unidos).

Las siguientes sales fueron suministradas por Sigma-Aldrich: NaCl, KCl, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, CuSO₄, FeSO₄ y ZnSO₄. El MgSO₄ fue de Probus (España). Los tampones fosfato potásico (monobásico y dibásico), ácido bórico, citrato potásico, Tris (Trizma base), MES, así como el hidróxido sódico, fueron de Sigma-Aldrich.

La DNA polimerasa *Pfu* fue de Promega (Estados Unidos). La DNA ligasa T4 fue de Roche (Alemania), la RNasa A, lisozima, β -hidroxibutirato deshidrogenasa de *Pseudomonas lemoignei* y el β -NAD fueron de Sigma-Aldrich. Las enzimas de restricción y los dNTPs fueron adquiridos a Roche y New England Biolabs (Estados Unidos). Los oligonucleótidos para PCR fueron sintetizados por Sigma Aldrich.

La agarosa (D1 Media EEO) fue de Pronadisa (España). El marcador de pesos moleculares λ DNA-BstEII fue de MBI Fermentas (Alemania). Los marcadores de peso molecular de amplio intervalo sin teñir y preteñidos (Precision Plus All Blue), fueron adquiridos a Bio-Rad (Estados Unidos). La tinción para DNA GelRed fue suministrada por Biotium (Estados Unidos). El reactivo de Bradford fue adquirido a Bio-Rad, la albúmina de suero bovino (BSA) y γ -globulina bovina fueron de Pierce Biotechnology (Estados Unidos). El anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 fue suministrado por Molecular Probes (Estados Unidos), el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano fue de Nordic Immunology (Holanda).

El (*R*)-3-hidroxibutirato sódico, y los polímeros PHB, PHBV 5%, PHBV 12% y almidón de maíz fueron provistos por Sigma-Aldrich. El poli[(*R*)-3-hidroxi octanoato-*co*-(*R*)-3-hidroxi hexanoato] [P(HO-*co*-HH)] fue suministrado por Biopolis S. L. (España). Los sustratos cromogénicos *pNP*-

acetato, *p*NP-butirato, *p*NP-valerato, *p*NP-hexanoato, *p*NP-octanoato y *p*NP-decanoato, así como el *p*NP fueron provistos por Sigma-Aldrich.

Los siguientes reactivos de modificación química de aminoácidos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), dietilpirocarbonato (DEPC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), glicinamida, *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB) y ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB o reactivo de Ellman). La cisteína fue de Merck.

Los siguientes reactivos también fueron suministrados por Sigma-Aldrich: Glicina, acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), azul de bromofenol, azul brillante de Coomassie G-250, rojo Ponceau, negro amido, tioglicolato sódico, peróxido de hidrógeno, diaminobencidina, dodecilsulfato sódico (SDS), Tween-20, Triton X-100, ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol, PEG 35.000, PEG 3.350, partículas magnéticas (óxido de hierro (II, III)/magnetita), glutaraldehído y aceite mineral. La metil- β -ciclodextrina fue proporcionada por CTD Inc. (Estados Unidos), el persulfato amónico y las membranas de nitrocelulosa por Bio-Rad. Las membranas de PVDF fueron de Merck-Millipore (Alemania). La leche desnatada en polvo fue de Central Lechera Asturiana (España). Las membranas de diálisis de tamaño de poro 12-14 kDa fueron de Medicell International Ltd. (Reino Unido).

Los siguientes reactivos de síntesis fueron suministrados por Sigma-Aldrich: β -butirolactona, γ -butirolactona, ϵ -caprolactona, 3-fenil-propanol, trimetilolpropano y 3-hidroxi-butirato de etilo.

2. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Todas las cepas bacterianas empleadas durante el desarrollo de esta tesis están recogidas en la *tabla 1*.

Como fuente de DNA cromosómico para la clonación de los genes de las PHB despolimerasas extracelulares se emplearon las cepas *Streptomyces exfoliatus* DSMZ 41693 y *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov. DSMZ 40822 (Kumar y Goodfellow 2010), (conocido anteriormente como *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* y *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891), ambas especies descritas previamente como productores de PHB despolimerasas extracelulares (Klingbeil *et al.* 1996, Wu *et al.* 2000).

Para la evaluación de las actividades PHB y PHO despolimerasa extracelulares en cepas de *Streptomyces* se emplearon las siguientes cepas: *S. coelicolor* CECT 3243, *S. lividans* NRRL B-16148, *S. albus* J1074, *S. lavendulae* ATCC 13664, *S. ascomycinicus* DSMZ 40822 y *S. exfoliatus* DSMZ 41693 como control positivo para ambas actividades.

Tabla 1: Cepas bacterianas, plásmidos y construcciones usados en esta tesis

Cepa bacteriana o plásmido	Genotipo relevante o descripción	Referencia
Cepas bacterianas		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 λ ⁻	(Hanahan 1983)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Invitrogen
<i>Streptomyces ascomycinicus</i> DSMZ 40822	Productor de PHB despolimerasa extracelular	(Wu <i>et al.</i> 2000, Kumar y Goodfellow 2010)
<i>Streptomyces exfoliatus</i> DSMZ 41693	Productor de PHB y PHO despolimerasas extracelulares	(Klingbeil <i>et al.</i> 1996)
<i>Streptomyces coelicolor</i> CECT 3243	Cepa empleada para la evaluación de actividad PHB y PHO despolimerasa extracelular	
<i>Streptomyces lividans</i> NRRL B-16148	Cepa empleada para la evaluación de actividad PHB y PHO despolimerasa extracelular	
<i>Streptomyces albus</i> J1074	Cepa empleada para la evaluación de actividad PHB y PHO despolimerasa extracelular	
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 13664	Cepa empleada para la evaluación de actividad PHB y PHO despolimerasa extracelular	
<i>Rhodococcus</i> sp. T104 KACC 21099	Cepa silvestre, apta para clonación y expresión de proteínas con el vector pNV19	(Hernández <i>et al.</i> 1997)
Plásmidos		
pET28	Vector de clonación y expresión para cepas de <i>Escherichia coli</i> . 5,4 kb	Novagen
pEPET1	Construcción derivada de pET28 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> con péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pEPET2	Construcción derivada de pET28 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> sin péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pHPET	Construcción derivada de pET28 conteniendo el gen <i>fkfU</i>	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2013)
pEM4	Vector bifuncional para <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> . Ap ^R Tsr ^R <i>permE*</i> pUCori pWHM4ori 7,9 kb	(Quirós <i>et al.</i> 1998)
pEPEM1	Construcción derivada de pEM4 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> con péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pEPEM2	Construcción derivada de pEM4 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> sin péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pHPEM	Construcción derivada de pEM4 conteniendo el gen <i>fkfU</i>	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2013)
pNV19	Vector bifuncional para <i>E. coli</i> y <i>Rhodococcus</i> . Km ^R pAL5000ori <i>lacZ</i> ColE1ori. 4,4 kb	(Chiba <i>et al.</i> 2007)
pEPNV1	Construcción derivada de pNV19 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> con péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pEPNV2	Construcción derivada de pNV19 conteniendo el gen <i>phaZ_{sex}</i> sin péptido señal de secreción	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2012)
pHPNV	Construcción derivada de pNV19 conteniendo el gen <i>fkfU</i>	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2013)
pHPNV S131A/S131C/D209N/H269E/H269Q	Construcciones derivadas de pHPNV con mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos catalíticos de PhaZ _{sex}	Este trabajo (García-Hidalgo <i>et al.</i> 2013)
pHPNV*GTG	Construcción a partir de pHPNV con un péptido señal acortado y un codón de inicio alternativo (GTG)	Este trabajo

Escherichia coli DH5 α se usó como hospedador para experimentos de subclonación. *E. coli* BL21(DE3) se empleó como hospedador para la sobreproducción de PHB despolimerasas clonadas bajo el control del promotor T7.

La cepa silvestre *Rhodococcus* sp. T104 KACC 21099 (Hernández *et al.* 1997) se empleó como hospedador para la expresión extracelular de las PHB despolimerasas clonadas de *Streptomyces*. Esta cepa fue amablemente proporcionada por el laboratorio del Dr. Gerben Zylstra de la Universidad estatal de Rutgers (New Jersey, Estados Unidos).

Todos los medios de cultivo sólidos se prepararon con bactoagar 1,5% (p/v). Cuando fue necesario se añadieron los siguientes antibióticos en las concentraciones señaladas: ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli* y 100 o 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Rhodococcus* sp. T104.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio rico Luria-Bertani (LB) (10 g/L bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L cloruro sódico, pH 7,5) (Sambrook y Russell 2001) a 37°C durante 16 a 24 horas, suplementado con el inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM cuando fue necesario para la expresión de genes clonados.

Las cepas de *Rhodococcus* sp. T104 se cultivaron en medio rico 2xYT (16 g/L bacto triptona, 10 g/L extracto de levadura y 5 g/L cloruro sódico, pH 7) (Sambrook y Russell 2001) suplementado con 25 mL de una solución de glucosa 1 M esterilizada por filtración por cada litro de medio (medio 2xYTG), a 30°C durante 72 horas.

Las células de *Streptomyces* se esporularon en medio sólido SFM (20 g/L harina de soja y 20 g/L manitol) (Kieser *et al.* 2000), tras 5 días de incubación a 30°C en condiciones de elevada humedad, las esporas fueron recogidas mediante raspado con asa de siembra y lavadas con una solución estéril de cloruro sódico 0,9% (p/v). Para la purificación de DNA genómico, estas esporas se cultivaron aeróbicamente durante 72 horas en medio líquido YEME (3 g/L extracto de levadura, 5 g/L bacto peptona, 3 g/L extracto de malta, 10 g/L glucosa, 340 g/L sacarosa, 5 mM MgCl_2) (Kieser *et al.* 2000), suplementado con glicina 0,5% (p/v), para permitir un crecimiento dispersado.

Para la detección de actividad PHA despolimerasa extracelular en cepas de *Streptomyces* las esporas lavadas se sembraron en placas de medio mínimo salino (2,64 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,38 g/L KH_2PO_4 , 5,65 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 6,4 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,1 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 7,9 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7) (Pridham y Gottlieb 1948), suplementadas mediante una capa fina superficial de medio sólido estéril con 1 mg/mL de PHB en suspensión acuosa o emulsión de P(HO-co-HH) en agua como única fuente de carbono. Las placas se incubaron durante 120 horas a 30°C en condiciones de elevada humedad y aireación.

3. Plásmidos, manipulación y secuenciación de DNA

Los plásmidos empleados en el desarrollo de este trabajo están detallados en la *tabla 1*.

El plásmido pET28a(+) (Km^R , promotor T7, *lacI*) (Novagen) se usó para la expresión de genes clonados en *E. coli* BL21(DE3). Los plásmidos bifuncionales pEM4 (Ap^R , Tsr^R , *permE**) (Quirós *et al.* 1998) y pNV19 (Km^R , *lacZ*) (Chiba *et al.* 2007) se emplearon para obtener los vectores recombinantes para expresión heteróloga de genes en *Rhodococcus* sp. T104. El plásmido pEM4 fue facilitado por el Dr. José Antonio Salas, de la Universidad de Oviedo (Asturias, España). El plásmido pNV19 fue suministrado por el laboratorio del Dr. Gerben Zylstra de la Universidad estatal de Rutgers (New Jersey, Estados Unidos).

El DNA cromosómico de *Streptomyces exfoliatus* DSMZ 41693 y *S. ascomycinicus* DSMZ 40822 se purificó mediante lisis celular con lizozima, precipitación proteica con fenol-cloroformo, digestión con RNasa y precipitación del DNA con 2-propanol, como se ha descrito anteriormente (Kieser *et al.* 2000).

Las preparaciones de DNA plasmídico, digestiones con endonucleasas de restricción, ligaciones, transformaciones y otras manipulaciones del DNA se llevaron a cabo siguiendo protocolos estándar para *E. coli* (Sambrook y Russell 2001) y *Streptomyces* (Kieser *et al.* 2000). Las secuencias de DNA se obtuvieron mediante el método de terminación de cadena didesoxi (Sanger *et al.* 1977), con un secuenciador automático DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems), en el servicio de secuenciación de DNA (Secugen) del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Las células electrocompetentes de *Rhodococcus* sp. T104 se obtuvieron mediante el siguiente protocolo: 100 mL de medio 2xYTG en un matraz de 500 mL se inocularon hasta densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,1 con un cultivo líquido de *Rhodococcus* sp. T104 crecido durante 24 horas. Se incubó este cultivo a 30°C con agitación orbital a 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. A continuación se recuperaron las células mediante centrifugación a 3.500×g durante 10 minutos y se resuspendieron en 2 mL de glicerol al 10% (v/v), después de 3 lavados con 50 mL de glicerol 10%. Para la transformación se añadió una cantidad aproximada de 0,5 µg de DNA a una alícuota de 200 µL de suspensión de células electrocompetentes en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de paso. La electroporación se llevó a cabo a 12,5 kV cm^{-1} , 600 Ω, y 25 µF usando un electroporador MicroPulser (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadió 1 mL de medio 2xYTG y finalmente las células se incubaron a 30°C durante 4 horas sin agitación y se sembraron distintas alícuotas en medio sólido 2xYTG con 200 µg/mL de kanamicina. Las colonias transformantes aparecieron tras 72-

120 horas, los plásmidos recombinantes que portaban se extrajeron y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

3.1 Construcción de cepas recombinantes

Para la expresión de la PHB despolimerasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{sex}), la secuencia codificante de su gen (*phaZ_{sex}*, 1.467 pb, número de acceso GenBank U58990.1) (Klingbeil *et al.* 1996) fue amplificada por PCR en dos fragmentos diferentes, uno de ellos incluía la posible secuencia codificante del péptido señal y el otro fragmento no. Para esta amplificación se usó DNA cromosómico de *Streptomyces exfoliatus* DSMZ 41693 como molde. La secuencia de los oligonucleótidos para PCR fue diseñada de acuerdo a las secuencias de los extremos de *phaZ_{sex}*. Las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados en esta tesis están recogidas en la *tabla 2*. Se incluyeron dianas de restricción para las endonucleasas *NcoI*, *XbaI* y *EcoRI* en los oligonucleótidos para facilitar la subclonación de los fragmentos de PCR. La secuencia consenso del sitio de unión del ribosoma (RBS) de *Streptomyces* (GGAGG) se incluyó en los oligonucleótidos EPET1 y EPEM2. La secuencia codificante del péptido señal de secreción se incluyó en los oligonucleótidos EPET1 y EPEM1.

Tabla 2: Oligonucleótidos de PCR usados en esta tesis para la clonación de los genes *phaZ_{sex}* y *fbkU*, y para la mutagénesis dirigida de aminoácidos catalíticos de PhaZ_{sa}

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Longitud (bp)	T _m (°C)	Diana de restricción
EPET1	ctagccatggcaatgaagatcagacaactcctcgtcgcgccctg	45	89,3	<i>NcoI</i>
EPET2	ctagccatggccgttccggcgccgacccccggctcgtccagcag	45	97,8	<i>NcoI</i>
EPEM1	gctctagaggaggcaccatgaagatcagacaactcctcgtcgc	45	86,7	<i>XbaI</i>
EPEM2	gctctagaggaggcaccatggccgttccggcgccgacccccggc	45	96,9	<i>XbaI</i>
E3	ggaattctcagcaggtgaccagtagccggggcggtctcc	41	89,5	<i>EcoRI</i>
HPET	catgccatggcaatgcagccgccggttccggggaatcctcacc	45	96,7	<i>NcoI</i>
HPEM	gctctagaggaggaacaccatgcagccgccggttccgggg	43	93,5	<i>XbaI</i>
H3	ggaattctcagggacaggtgtcgttcgcgacggtgaagtagccg	45	89,6	<i>EcoRI</i>
S131A	caccgggctggccgccggcg	21	79,7	-
S131A antisense	ccgccggcggccagccccggtg	21	79,7	-
S131C	acatcaccgggctgtgcccggcg	24	80,0	-
S131C antisense	cgccggcgccagccccggtgatgt	24	80,0	-

D209N	gcacggcgacaagaacaccaccgtcgc	27	80,1	-
D209N antisense	gcgacgggtggtgttcttctgcccgtgc	27	80,1	-
H269Q	cgggcatcgggcagggcaccccc	22	79,8	-
H269Q antisense	ggggtgccctgccccgatgccccg	22	79,8	-
H269E	cgggcatcggggagggcacccccggt	25	79,3	-
H269E antisense	accggggtgccctccccgatgccccg	25	79,3	-
PhaZ _{Sa} GTG	gctctagaggacggcggggggtgctcaccctctctggtggccg	42	94,2	<i>Xba</i> I

*Las dianas de restricción introducidas están marcadas en negrita. Los codones de inicio de traducción están señalados en cursiva. Los tripletes mutados en los oligonucleótidos de mutagénesis dirigida están subrayados.

Para la expresión de PhaZ_{Sa} la secuencia de DNA del gen codificante de la posible PHB despolimerasa extracelular de *Streptomyces ascomycinicus* (*fbu*, 1.560 pb, número de acceso GenBank AF235504.1) fue amplificada usando DNA cromosómico de *S. ascomycinicus* DSMZ 40822 como molde. Los oligonucleótidos para PCR fueron diseñados de acuerdo a la secuencia de los extremos de *fbu* (Wu *et al.* 2000). Se incluyeron dianas para las enzimas de restricción *Nco*I, *Xba*I y *Eco*RI en los oligonucleótidos para facilitar la subclonación de los correspondientes fragmentos de PCR. La secuencia consenso del sitio de unión del ribosoma (RBS) de *Streptomyces* (GGAGG) se incluyó en el oligonucleótido HPEM.

Todas las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), usando el programa TDPfu (Tabla 3), ajustado para el elevado contenido en G+C de los genomas de actinomicetos, y empleando la DNA polimerasa *Pfu* (Promega). Los productos de PCR fueron purificados con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche), y digeridos con las endonucleasas *Nco*I o *Xba*I para cortar los extremos 5' de las secuencias codificantes y *Eco*RI para los extremos 3'.

Los fragmentos resultantes con cada uno de los genes se ligaron en el sitio *Nco*I-*Eco*RI del vector pET28 resultando en los plásmidos recombinantes pEPET1, pEPET2, portando el gen *phaZ_{Sex}* de *S. exfoliatus* con y sin la secuencia del péptido señal, respectivamente, y pHPET, que porta el gen *fbu* de *S. ascomycinicus*; o bien en el sitio *Xba*I-*Eco*RI del vector pEM4, obteniendo los plásmidos recombinantes pPEM1, pPEM2 que portan el gen *phaZ_{Sex}* con y sin péptido señal, respectivamente, y pHPEM, con el gen *fbu*. Los plásmidos pEPET1, pEPET2 y pHPET se usaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) mediante el método de choque térmico. Los plásmidos recombinantes pPEM1, pPEM2 y pHPEM fueron subsiguientemente digeridos con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI con el fin de obtener los fragmentos conteniendo el marco abierto de lectura (ORF) de *phaZ_{Sex}* o *fbu* junto con el

promotor fuerte y constitutivo *ermE**, presente en el vector pEM4 y procedente del gen de resistencia a la eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb *et al.* 1985, Bibb *et al.* 1994). Dichos fragmentos se transfirieron al sitio *HindIII-EcoRI* del vector pNV19 obteniendo los plásmidos pEPNV1, pEPNV2, portando el gen *phaZ_{sex}* con y sin péptido señal, respectivamente, y pHPNV, con el gen *fbu*, que se usaron para transformar células electrocompetentes de *Rhodococcus* sp. T104. Las construcciones generadas a partir de los plásmidos pET28, pEM4 y pNV19 están representadas en la *figura 21*.

Tabla 3: Programa TDPfu de amplificación por PCR

Número	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	96	2
2	Desnaturalización	96	1
3	Hibridación	70	2
4	Extensión	72	8
5	Los pasos 2 a 4 se repitieron 5 ciclos		
6	Desnaturalización	96	1
7	Hibridación	68	2
8	Extensión	72	8
9	Los pasos 6 a 8 se repitieron 5 ciclos		
10	Desnaturalización	96	1
11	Hibridación	63	2
12	Extensión	72	8
13	Los pasos 10 a 12 se repitieron 5 ciclos		
14	Desnaturalización	96	1
15	Hibridación	60	2
16	Extensión	72	8
17	Los pasos 14 a 16 se repitieron 20 ciclos		
18	Extensión final	72	20

El plásmido pHPNV fue usado como molde de PCR con los oligonucleótidos PhaZSaGTG y H3, para amplificar el ORF del gen *fbu* sin los 84 primeros nucleótidos del extremo 5'. El fragmento amplificado, de 1.492 bp se purificó previamente a la digestión. El oligonucleótido PhaZSaGTG incorpora una diana *XbaI*, por lo que tanto el fragmento amplificado como el plásmido original pHPNV fueron digeridos con *XbaI* y *EcoRI*. Tras la digestión, los fragmentos se cargaron y corrieron en un gel de agarosa. A continuación se extrajeron y purificaron las bandas pertenecientes al plásmido pHPNV linearizado y sin inserto, y al fragmento amplificado por PCR, ambos digeridos con *XbaI* y *EcoRI*. Ambos fragmentos fueron ligados dando lugar al plásmido pHPNV*GTG, que fue transferido a células electrocompetentes de *Rhodococcus* sp. T104.

Todos los plásmidos recombinantes fueron purificados con el kit High pure Plasmid Isolation (Roche) y secuenciados para confirmar la ausencia de mutaciones y la correcta orientación de los insertos.

4. Preparación de suspensiones y emulsiones de PHA

Suspensiones de distintas cantidades de PHB o P(HB-co-HV) (5% 3-hidroxivalerato) en 100 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 ó MES 50 mM pH 6 se sometieron a ultrasonidos durante un minuto al 40% de amplitud mediante un sonicador de sonda Branson 250 para disgregar los sólidos y obtener suspensiones estables, con las que se realizaron ensayos de actividad en placa o turbidimétricos. Para preparar placas estériles de medio mínimo o rico suplementado con PHB se autoclavaron estas suspensiones con 15 g/L de agar y se usaron para formar una capa fina superficial y translúcida sobre las placas de medio mínimo en las que se detectó la actividad PHB despolimerasa mediante la formación de halos de hidrólisis.

Los mcl-PHA no se pueden preparar en suspensión acuosa, por lo que para preparar placas de medio mínimo suplementadas con P(HO-co-HH) se disolvieron 50 mg de este polímero en 25 mL de acetona, seguidamente se añadió esta solución gradualmente con una pipeta Pasteur en 7,25 mL de agua fría en baño de hielo y mezclando vigorosamente. Finalmente se evaporó la acetona por vacío en evaporador rotatorio a 40°C obteniendo una emulsión estable de P(HO-co-HH) (Schirmer y Jendrosseck 1994). Esta emulsión se mezcló con un volumen igual de agar 30 g/L en medio mínimo salino y se autoclavó durante 20 minutos a 121°C. Finalmente se extendieron capas finas de esta mezcla sobre placas precalentadas de medio mínimo salino.

5. Producción heteróloga de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Para la expresión de las PHB despolimerasas de *Streptomyces* clonadas en *E. coli* BL21(DE3), los clones portando los plásmidos pEPET1, pEPET2 o pHPET, así como el control negativo pET28, fueron cultivados durante 20 horas aeróbicamente a 37°C con agitación orbital a 250 rpm en 10 mL de medio LB con kanamicina 50 µg/mL. Con estos precultivos se inocularon 100 mL de LB con kanamicina 50 µg/mL en matraces de 250 mL hasta una DO₆₀₀ inicial de 0,1. Estos cultivos se incubaron en las mismas condiciones hasta alcanzar DO₆₀₀ de 0,5, entonces se indujo la hiperexpresión de los genes clonados bajo el control del promotor fuerte e inducible T7 mediante la adición de IPTG hasta 0,5 mM. Los cultivos inducidos se incubaron en las mismas condiciones durante 4 horas más y después se recogieron las células mediante

centrifugación a 5.000×g durante 5 minutos. Estos sedimentos celulares se resuspendieron en 1 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 y se rompieron por ultrasonidos usando un sonicador digital de sonda (Branson 250) en ciclos sucesivos de amplitud creciente hasta el 40%, con pulsos de 0,5 segundos e intervalos de 1 segundo durante 3 minutos, en baño de hielo. Finalmente se centrifugaron a 10.000×g durante 30 minutos y se analizaron alícuotas del extracto soluble, el desecho celular y células intactas mediante SDS-PAGE. También se evaluó la actividad PHB despolimerasa de las distintas preparaciones mediante ensayo de actividad en placa.

Para la expresión de las PHB despolimerasas de *Streptomyces* clonadas en *Rhodococcus* sp. T104, los clones portando los plásmidos pENV1, pEPNV2 o pHPNV, así como el correspondiente control negativo pNV19, fueron cultivados aeróbicamente en 10 mL de medio líquido 2xYTG con kanamicina 100 µg/mL a 30°C con agitación orbital a 250 rpm durante 72 horas. Este preinóculo se utilizó para inocular 1 litro de medio 2xYTG con kanamicina 100 µg/mL hasta DO₆₀₀ 0,1, y a continuación se incubó este cultivo en las mismas condiciones durante otras 72 horas. Finalmente se separó el caldo de fermentación de las células por centrifugación a 8.000×g durante 15 minutos. Tanto el caldo como las células se analizaron por SDS-PAGE, y se evaluó la actividad PHB despolimerasa mediante ensayo de actividad en placa.

6. Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

6.1 Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St} mediante cromatografía de intercambio aniónico

Para separar las PHB despolimerasas producidas extracelularmente en *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1/pHPNV del resto de proteínas presentes en el caldo de cultivo se abordó la purificación por intercambio aniónico, para ello una muestra de cada caldo de fermentación se dializó durante 20 horas a 4°C frente a tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 usando una membrana de diálisis de celulosa con 25 kDa de tamaño de poro (Medicell International Ltd.), a continuación usando la misma membrana se concentró en lecho seco de polietilenglicol 35.000 hasta alcanzar entre un octavo y un décimo de su volumen original. Finalmente se cargaron estos caldos procesados en dos intercambiadores aniónicos distintos:

DEAE-Sepharose: Se realizaron pruebas de purificación en discontinuo. Se tomaron 2,5 mL de caldo dializado y concentrado y se aplicaron directamente sobre 500 µL de resina DEAE-Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en tampón Tris 50 mM pH 8. Se mezcló la muestra con la resina durante una hora para que la interacción alcanzase el equilibrio, y a continuación se centrifugó 3 minutos a 2.500×g para separar la resina del sobrenadante. Se retiró el

sobrenadante y se realizaron 5 lavados con 1 mL de tampón de equilibrado. Finalmente se llevó a cabo la elución escalonadamente mediante concentraciones crecientes de NaCl, a 0,25, 0,5, 0,75 y 1 M, cada concentración con 2 lavados de 0,5 mL de tampón de equilibrado centrifugando y separando el sobrenadante entre cada paso. La pureza y actividad PHB despolimerasa se ensayaron mediante SDS-PAGE y ensayo de actividad en placa.

Amonio cuaternario-Metacrilato: Estas pruebas se llevaron a cabo en continuo, usando un cartucho preempacutado Econo-pac High Q (Bio-Rad) de 5 mL de lecho, esta matriz de metacrilato macroporoso está altamente activada con grupos amonio cuaternario. Se cargaron 5 mL de caldo de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV dializado y concentrado en el cartucho equilibrado con tampón Tris 50 mM pH 8. Tras una hora de interacción de la muestra con el soporte lavó el soporte con 35 mL de tampón de equilibrado, y finalmente se procedió a la elución en gradiente ascendente de concentración de 0 a 0,25 M de NaCl. La pureza y actividad PHB despolimerasa se ensayaron mediante SDS-PAGE y ensayo de actividad en placa.

6.2 Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante cromatografía de interacción hidrofóbica

Las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fueron aisladas mediante dos pasos consecutivos de cromatografía de interacción hidrofóbica. Para ello se preparó 1 litro de caldo de fermentación de 72 horas de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 o pHPNV. A cada litro de caldo de fermentación se le añadieron 167 mL de (NH₄)₂SO₄ 3,5 M hasta una concentración final de 0,5 M, en baño de hielo, con agitación y por goteo mediante una bomba peristáltica, para evitar fuertes subidas locales de concentración. A continuación se centrifugó este caldo a 10.000×g durante 10 minutos para sedimentar los posibles precipitados proteicos formados por el aumento de concentración salina. El sobrenadante se cargó en una columna de 100 mL de volumen total de octil FF (Fast Flow) Sepharose (GE healthcare) equilibrada con tampón fosfato potásico 20 mM pH 7 con 0,5 M de (NH₄)₂SO₄ (tampón A), usando un sistema cromatográfico con bomba peristáltica BioLogic LP (Bio-Rad). La columna se lavó con 300 mL de tampón A, y a continuación se eluyeron las proteínas adsorbidas mediante un gradiente decreciente de concentración de (NH₄)₂SO₄ desde 0,5 a 0 M, en tampón fosfato 20 mM pH 7. Las fracciones recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE, y su actividad se ensayó cualitativamente mediante ensayo de actividad en placa. Las fracciones con actividad PHB despolimerasa se juntaron, y la concentración de (NH₄)₂SO₄ en esta nueva muestra fue ajustada nuevamente a 0,5 M de acuerdo con la conductividad eléctrica que presentaba la muestra respecto a la del tampón de equilibrado.

A partir de este paso las purificaciones de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} siguen protocolos análogos pero con ciertas diferencias:

Para la purificación de PhaZ_{sex} se centrifugó la muestra a 10.000×g durante 10 minutos tras añadir la cantidad necesaria de sulfato amónico, a continuación se dividió en tres volúmenes iguales para no saturar de muestra el siguiente soporte. Cada volumen se cargó en un cartucho preempacutado HiTrap butil High Performance (HP) Sepharose (GE Healthcare), de 5 mL de volumen de lecho, equilibrado con tampón A y acoplado al sistema cromatográfico BioLogic LP. La columna se lavó con 20 mL de tampón A, y finalmente las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente decreciente de 0,5 a 0 M de (NH₄)₂SO₄.

El segundo paso de la purificación de PhaZ_{sa} se llevó a cabo mediante un cartucho HiTrap fenil HP Sepharose (GE Healthcare) de 1 mL de volumen de lecho, equilibrado en tampón A. La muestra procedente del primer paso se fraccionó en alícuotas de 50 mL que se aplicaron por separado. La columna se lavó con 10 mL de tampón A y se procedió a la elución de las proteínas retenidas mediante el mismo procedimiento empleado para la elución de PhaZ_{sex}.

La pureza de las fracciones eluidas se evaluó por SDS-PAGE, y la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

7. Técnicas de análisis de proteínas

7.1 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El tamaño molecular aparente, la cantidad relativa y pureza de las muestras de proteínas se analizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Se empleó el sistema Mini-protean Tetra Cell (Bio-Rad) para desarrollar la separación electroforética. Se prepararon geles de 1 mm de grosor y 10 pocillos, conteniendo en el segmento separador un 0,1% de SDS, 12,5% de acrilamida y un 0,33% de bis-acrilamida (proporción 37,5:1). La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente con una intensidad constante de 25 mA por gel.

Las muestras de proteínas se prepararon para su separación electroforética en tampón de muestras de Laemmli [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v) y 2-mercaptoetanol 5% (v/v)]. Las muestras con tampón se calentaron durante 10 minutos en termobloque a 95°C, después se centrifugaron durante 10 segundos en una microcentrífuga Labnet Spectrafuge 24D a 13.000 rpm y finalmente se aplicaron en el gel de poliacrilamida.

Los geles se tiñeron mediante un protocolo que incluye un paso previo de fijación de las proteínas, que se logra incubando el gel en una solución de ácido acético 10% y 2-propanol 25% (v/v) durante 15 minutos con agitación suave.

Tras la fijación los geles fueron lavados con agua desionizada, y a continuación se sumergieron en una solución de tinción que contenía un 0,012% (p/v) de azul brillante de Coomassie G-250 en ácido acético al 10% (v/v), y se incubaron durante 1 hora con agitación. Tras la tinción se eliminó el exceso de colorante con agua desionizada y se destiñó el gel en una solución de ácido acético 10% con agitación hasta observar bandas de proteína claramente distinguibles. Para la precipitación de las proteínas de muestras para análisis por SDS-PAGE se añadieron cuatro volúmenes de acetona a -20°C a un volumen de muestra, en un tubo Eppendorf, mezclando vigorosamente, estas muestras se incubaron a -20°C durante 1 hora y a continuación se centrifugaron a $15.000\times g$ durante 30 minutos. Se decantaron los sobrenadantes y se dejó evaporar totalmente la acetona en termobloque a 95°C . Finalmente los sedimentos fueron resuspendidos vigorosamente en $30\ \mu\text{L}$ de tampón de muestras de Laemmli y preparados para cargar en un gel.

7.2 Inmunodetección de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

7.2.1 Producción, preadsorción y titulación de anticuerpos contra PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

Los anticuerpos de conejo anti-PhaZ_{Sex} y anti-PhaZ_{St} fueron producidos como se ha descrito anteriormente (Sánchez-Puelles *et al.* 1992), inmunizando conejos de 2,7 y 2,9 kg, respectivamente, frente a PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St} recombinantes puras durante 53 días, con tres inoculaciones de $100\ \mu\text{g}$ de enzima cada una, empleando el adyuvante completo de Freund y permitiendo tres semanas de reposo entre inyecciones. Al final de este periodo se sacrificaron los animales y se extrajo su sangre, ésta se dejó coagular a 37°C durante 30 minutos y después se contrajo el coágulo por incubación a 4°C durante 16 horas. Se sedimentó el coágulo centrifugando durante 5 minutos a $5.000\times g$ a 4°C y se tomó el plasma sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur. A continuación se inactivó el sistema del complemento calentando el plasma a 56°C durante 30 minutos, finalmente se atemperó el plasma procesado y se procedió a su preadsorción.

Con el fin de eliminar la respuesta inespecífica de los anticuerpos con las proteínas extracelulares de las cepas productoras, se preadsorbieron los antisueros con un volumen de caldo de fermentación 2xYTG cultivado durante 72 horas, de la cepa control *Rhodococcus* sp. T104 pNV19, no productora de PHB despolimerasas extracelulares, concentrado 4 veces en lecho seco de PEG 35.000. Se incubaron las mezclas durante 16 horas a 4°C con agitación en vaivén y finalmente se centrifugaron a $10.000\times g$ durante 15 minutos para sedimentar los

complejos inespecíficos. Se recuperaron los sobrenadantes, se alicuotaron y se almacenaron a -20°C .

Para la titulación de los anticuerpos preadsorbidos se realizaron experimentos de Western blot con caldos de cultivo de 72 horas de *Rhodococcus* sp. T104 conteniendo los plásmidos pEPNV1, pHPNV o pNV19 (productores o control negativo) y distintas diluciones finales del correspondiente anticuerpo preadsorbido: 1/500, 1/1.000, 1/5.000 y 1/10.000. De esta forma se trató de elegir una dilución que permitiese una buena relación de señal específica frente a ruido de fondo inespecífico.

7.2.2 Western blot

Para la inmunodetección de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se electrotransfirieron geles de SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 16 horas a temperatura ambiente y 10 V. Después se verificó la transferencia mediante una tinción reversible de 5 minutos con rojo Ponceau 0,1% (p/v) en ácido acético 5% (v/v), para después desteñir con agua desionizada hasta distinguir las bandas. Seguidamente se lavó la membrana hasta la eliminación del colorante. La membrana con proteínas se bloqueó a continuación mediante una incubación de 90 minutos en agitación a 37°C con tampón fosfato salino/PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH_2PO_4 y 1,41 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4) con un 4% (p/v) de leche desnatada en polvo, y después se incubó con 10 mL de la dilución adecuada del anticuerpo primario preadsorbido producido en conejo, en PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v) y leche desnatada en polvo al 1,3% (p/v), durante 16 horas a 4°C con agitación en vaivén. A continuación se lavó la membrana 3 veces en PBS con Tween-20 al 0,1%, y se aplicó el anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (Nordic Immunology), diluido en PBS con Tween-20 al 0,1% y leche desnatada en polvo al 1,3%, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar la membrana durante 10 minutos en PBS con Tween-20 al 0,1% y otros 10 minutos en PBS a temperatura ambiente, se reveló la actividad peroxidasa mediante la adición de 1 mL de diaminobencidina 5 mg/mL y 5 μL de peróxido de hidrógeno 20% a la membrana en PBS, que se agitó suavemente durante unos segundos hasta que aparecieron las bandas de proteína claramente visibles, inmediatamente se lavó con abundante agua desionizada para detener la reacción. La membrana se secó al aire y posteriormente fue escaneada.

7.3 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en soluciones biológicas fue determinada rutinariamente por el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976) usando una solución de azul brillante de

Coomassie G-250 en metanol y ácido fosfórico (Bio-Rad). Se empleó el protocolo para ensayos en placa multipocillo, con 40 μL de cada dilución de muestra y 80 μL de reactivo, en un volumen total de 400 μL . Los viales se agitaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de transferir el contenido a una placa de 96 pocillos y medir su absorbancia a 595 nm mediante un lector de placas Asys Hitech modelo Digiscan 340T. Las concentraciones de las muestras se interpolaron de una recta patrón realizada con diluciones de concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA).

8. Secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

La secuenciación de los extremos N-terminal de las PHB despolimerasas recombinantes se realizó mediante el protocolo de degradación secuencial de Edman (Edman y Begg 1967), en un secuenciador de proteínas Procise 494 (Applied Biosystems). Este análisis se llevó a cabo en el servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Para ello las proteínas fueron previamente separadas mediante SDS-PAGE, los geles de poliacrilamida se prepararon con una concentración de 0,2% SDS y se dejaron polimerizar durante 16 horas a temperatura ambiente. Los tampones para el desarrollo del gel fueron filtrados con papel Whatman para eliminar cualquier contaminante en suspensión, y se añadió tioglicolato sódico hasta una concentración 0,1 mM exclusivamente en la cubeta del electrodo superior. Tras el desarrollo de la electroforesis, las proteínas de los geles fueron electrotransferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) Immobilon-P^{SO} (Millipore), durante 16 horas a 10 V y 4°C (Speicher 1994). Las membranas se tiñeron en una solución de negro amido 0,1% (p/v) en ácido acético 10% (v/v) durante 1 minuto. A continuación se destiñeron las membranas mediante lavado con ácido acético 5% (v/v) durante 1 minuto y se lavaron con abundante agua desionizada antes de dejarlas secar al aire. Las bandas pertenecientes a las proteínas que se deseaba secuenciar se cortaron con un bisturí limpio y fueron transferidas a un tubo Eppendorf.

9. Espectrometría de masas MALDI-TOF de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Este análisis se realizó en la Unidad de Proteómica en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello, muestras de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} puras en tampón fosfato potásico 15 mM pH 7 se aplicaron sobre placas de muestras para MALDI-TOF en gotas de 1 μL que se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Una vez secas se añadieron 0,6

μL de solución matriz (ácido sinápico 10 mg/mL en acetonitrilo 30% (v/v) en agua con 0,3% (v/v) de ácido trifluoroacético), la cristalización se llevó a cabo a temperatura ambiente. Los espectros de masas MALDI-TOF se registraron con un espectrómetro de masas Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems) equipado con un láser pulsado de nitrógeno emitiendo a 337 nm. Las muestras se analizaron en modo positivo lineal en un rango de masas de 10 a 210 kDa, usando un retraso de extracción ajustado a 860 ns y un voltaje de aceleración operando en modo iónico positivo de 20 kV. Para mejorar la relación señal/ruido se promediaron 100 disparos individuales para cada espectro de masas. Se realizó una calibración externa de espectros de masas usando un kit de marcadores de masa molecular con BSA e inmunoglobulina G (Applied Biosystems).

10. Cromatografía de filtración en gel de PhaZ_{sex}

Para determinar la naturaleza de la forma activa de PhaZ_{sex} se sometió una muestra de enzima purificada a cromatografía analítica de filtración en gel en una columna Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 con NaCl 150 mM. El perfil de elución de PhaZ_{sex} se detectó mediante absorbancia a 280 nm y por actividad PHB despolimerasa de las fracciones eluidas mediante el ensayo turbidimétrico estándar. La fracción con mayor actividad PHB despolimerasa se sometió a espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF para hallar su masa molecular.

11. Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de ultracentrifugación se llevaron a cabo en el servicio de ultracentrifugación analítica y dispersión de luz del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Alícuotas puras de PhaZ_{sex} 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de PhaZ₅₀ con tres concentraciones diferentes (65, 129 y 259 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón fosfato potásico 25 mM pH 7 con NaCl 100 mM fueron sometidas a experimentos de velocidad de sedimentación en una ultracentrífuga analítica Beckman Coulter XL-I equipada con detector óptico de absorbancia UV-visible, a 48.000 $\times g$ y 20°C, usando un rotor An-60Ti y piezas centrales de doble sector estándar (paso óptico de 12 mm) de Epon-charcoal. La señal de línea basal se midió seguidamente a 200.000 $\times g$. La distribución del coeficiente de sedimentación $c(s)$ y el coeficiente de sedimentación s fueron calculados a partir de la velocidad de sedimentación mediante el programa SEDFIT versión 12.52 (Brown y Schuck 2006).

12. Estudios de dicroísmo circular

La estructura secundaria de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue analizada experimentalmente mediante deconvolución de sus espectros de dicroísmo circular en el intervalo ultravioleta lejano-medio. Los espectros se registraron empleando muestras puras de PhaZ_{Sex} a 160 µg/mL y PhaZ_{So} a 102 µg/mL en tampón fosfato potásico 5 mM pH 7 entre 175 y 290 nm en condiciones termostalizadas a 25°C, usando un espectropolarímetro JASCO J-715. Los espectros de dicroísmo circular fueron analizados mediante el programa Spectra Manager 1.53. Las lecturas de dicroísmo circular se expresaron como elipticidad molar media por residuo de aminoácido ($\text{grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), asumiendo una masa media por residuo de 104 Da, de acuerdo a la masa molecular media por aminoácido deducida de las secuencias de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} maduras. Los porcentajes estructurales de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se obtuvieron de la deconvolución de los espectros de dicroísmo circular realizada mediante el programa CDNN versión 2.1 (Böhm *et al.* 1992).

La desnaturalización térmica de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se analizó monitorizando la variación de la señal de dicroísmo circular a 218,8 y 209,0 nm, respectivamente, en el rango de temperaturas entre 25 y 85°C, con una velocidad de barrido de 20°C/hora.

13. Ensayos enzimáticos de actividad

13.1 Ensayo de actividad en placa

La actividad PHB despolimerasa de caldos de fermentación, células, extractos celulares o preparaciones de enzima se determinó cualitativamente mediante este ensayo. Se añadieron 100 mL de una suspensión estable de PHB 1 mg/mL en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 o MES 50 mM pH 6 a un matraz de 250 mL con 1,5 g de agar, que se fundió en microondas hasta la homogeneidad. Se prepararon placas Petri con 20 mL de la suspensión, y tras gelificar el agar se practicaron pocillos de 5 mm de diámetro con una pipeta Pasteur. En estos pocillos se cargaron hasta 40 µL de la preparación a ensayar, y las placas cerradas se incubaron sin invertir a 37°C durante 3 a 24 horas, hasta apreciarse halos de hidrólisis alrededor del pocillo.

13.2 Ensayo turbidimétrico de actividad

La actividad PHB despolimerasa de las preparaciones de enzimas recombinantes se midió rutinariamente midiendo el descenso de la turbidez de una suspensión homogénea de PHB. Un volumen de 500 µL de mezcla estándar de reacción conteniendo tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,

(para PhaZ_{Sex}) o tampón MES 50 mM pH 6 (para PhaZ_{So}) con MgCl₂ 4 mM y 200 µg/mL de PHB o P(HB-co-HV) (5% 3-hidroxivalerato) en suspensión homogénea en agua desionizada se atemperaron a 40°C durante 3 minutos. A continuación, se inició la reacción con la adición de 20 µL de solución enzimática. Tras 30 minutos de incubación a 40°C con agitación suave se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo, y se midió el descenso en densidad óptica a 600 nm. El descenso de turbidez fue lineal durante el tiempo ensayado. Se realizaron controles en paralelo sin enzima para determinar la posible hidrólisis no enzimática del sustrato. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y el error máximo se encontró por debajo del 5%. Una unidad de actividad despolimerasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza el descenso de 0,01 unidades de absorbancia a 600 nm por minuto en las condiciones descritas. En el caso de los derivados inmovilizados PhaZ_{Sex}-CLEAs, el ensayo turbidimétrico se llevó a cabo de forma análoga con ciertas diferencias: se realizó en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 con CaCl₂ 2 mM y 100 µg/mL de PHB. La reacción se inició añadiendo 10 mg de CLEAs a 1 mL de mezcla de reacción, y los ensayos se incubaron a 40°C durante 45 minutos. Tras parar la reacción en hielo se separaron las partículas de CLEAs por filtración en papel de filtro (0,115 mm de grosor, 50 g/m²) y se midió el descenso de turbidez a 600 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con un error máximo por debajo del 5%.

13.3 Ensayo cromogénico de actividad con ésteres de pNP

La actividad esterasa de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se ensayó usando como sustratos cromogénicos pNP-alcanoatos de distinta longitud de cadena alifática (pNP-acetato, pNP-butirato, pNP-valerato, pNP-hexanoato, pNP-octanoato o pNP-decanoato). La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en las siguientes condiciones estándar: Un volumen total de 500 µL de tampón MES 50 mM pH 6 con 2 mM MgCl₂, 2 ó 5 mM del correspondiente sustrato cromogénico y 5% (v/v) de metanol (para PhaZ_{Sex}) o acetonitrilo (para PhaZ_{So}) se preincubó durante 90 segundos a 40°C, y a continuación se inició la reacción añadiendo 15 µL de la dilución enzimática adecuada. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 40°C y después se paró la reacción añadiendo 125 µL de 2-propanol. Seguidamente se añadieron 30 µL de tampón fosfato potásico 1M pH 8 y se mezcló para revelar el color del pNP hidrolizado. Los viales se centrifugaron durante 90 segundos a 15.000×g y finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 414 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se sustrajo la absorbancia observada en los controles sin enzima, debida a hidrólisis espontánea de los pNP-alcanoatos.

Para evaluar la actividad esterasa de los derivados inmovilizados PhaZ_{sex}-CLEAs se empleó *p*NP-butirato como sustrato, la mezcla de reacción contenía 5 mM de *p*NP-butirato en tampón citrato potásico 50 mM pH 6 con CaCl₂ 2 mM. La reacción se inició con la adición de 5 mg de PhaZ_{sex}-CLEAs a 500 µL de mezcla de reacción, y se incubó por 30 minutos a 40°C con agitación orbital a 250 rpm. Transcurrida el tiempo de reacción, ésta se detuvo mediante la adición de 125 µL de 2-propanol, y se reveló mezclando 30 µL de tampón fosfato potásico 1 M pH 8. Finalmente se centrifugó 2 minutos la mezcla a 3.000×*g* e inmediatamente se midió la absorbancia del sobrenadante a 414 nm.

13.4 Ensayo indirecto de actividad mediante β-hidroxiacetato deshidrogenasa

La actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{sa} en experimentos de degradación de películas de PHB y PHBV, o bien en condiciones en las que no es posible utilizar el ensayo turbidimétrico, se cuantificó mediante un ensayo enzimático indirecto que valora específicamente la concentración de (*R*)-3-hidroxiacetato liberado por la PHB despolimerasa ensayada. La liberación de este producto de reacción se midió espectroscópicamente gracias a la actividad de la β-hidroxiacetato deshidrogenasa de *Pseudomonas lemoignei* (Shirakura *et al.* 1983, Jendrossek 2007). La producción de NADH a partir de NAD⁺ como resultado de la oxidación de (*R*)-3-hidroxiacetato se midió a 340 nm tras la incubación de 100 µL de la muestra a valorar durante 30 minutos a 37°C con 9,5 mUI de β-hidroxiacetato deshidrogenasa y 1 mM de NAD⁺, en tampón Tris-HCl 75 mM pH 8, en un volumen total de 500 µL. La reacción se detuvo colocando los viales en baño de hielo, y la absorbancia a 340 nm se midió inmediatamente después en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800. La absorbancia a 340 nm de los controles negativos se sustrajo a las de las muestras, y la concentración de (*R*)-3-hidroxiacetato en los 100 µL de muestra se calculó interpolando los valores de absorbancia a 340 nm en una recta patrón elaborada a tal efecto.

Para medir la actividad de los derivados enzimáticos de PhaZ_{sa} en partículas magnéticas silanizadas se llevó a cabo un ensayo de actividad previo con 10 mg de derivado inmovilizado y 500 µg de PHB en suspensión, en 1 mL de tampón MES 50 mM pH 6 con MgCl₂ 4 mM. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 40°C con agitación. Una vez terminado este ensayo previo se detiene la reacción en hielo y se centrifugan los viales a 12.000×*g* durante 3 minutos, para sedimentar los restos de PHB en suspensión. De estos sobrenadantes se tomaron las alícuotas de 100 µL para valorar la concentración liberada de (*R*)-3-hidroxiacetato mediante la β-hidroxiacetato deshidrogenasa.

14. Identificación de los productos de reacción de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Para identificar los productos liberados por la hidrólisis del PHB se llevó a cabo la catálisis mediante PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} de una suspensión de 100 µg/mL de PHB en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8 o MES 20 mM pH 6 respectivamente, con MgCl₂ 2 mM en un volumen total de 3 mL a 40°C con agitación orbital a 300 rpm durante 18 horas. La reacción se inició añadiendo 1 µg de despolimerasa recombinante pura. Después del ensayo las mezclas de reacción se calentaron a 95°C durante 10 minutos para detener la actividad enzimática y desnaturalizar la enzima en solución. A continuación, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 15.000×g y se recuperaron los sobrenadantes.

Para la detección de los productos de reacción mediante HPLC-MS se siguió un protocolo de derivatización de los monómeros y oligómeros de (*R*)-3-hidroxi butirato, basado en el empleado por Gebauer y Jendrosseck (2006), (Durst *et al.* 1975). Para ello, se tomaron 100 µL de los sobrenadantes de las reacciones o bien de los controles, tanto positivos con (*R*)-3-hidroxi butirato puro como negativos, procedentes de mezcla de reacción sin enzima. Estos 100 µL de cada muestra se alcalinizaron con la adición de 100 µL de trietilamina 0,1 M en acetona. Tras evaporar la acetona bajo atmósfera de nitrógeno se añadieron 150 µL de bromuro de bromofenacilo/BPB 10 mM en acetonitrilo, y 150 µL de éter corona (18-corona-6) 2 mM en acetonitrilo. Se incubó la mezcla en un vial sellado durante 90 minutos a 80°C, y finalmente se dejaron enfriar los viales a temperatura ambiente.

La detección de los productos de reacción se llevó a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación de espectrometría de masas de la Universidad Complutense de Madrid. Alícuotas de 10 µL de la correspondiente mezcla de derivatización se cargaron en una columna de fase reversa C18 Ascentis (5 µm, 150 mm×2,1 mm) (Supelco). Los analitos se eluyeron a un flujo de 2 mL/minuto, y los picos detectados por absorbancia a 254 nm se identificaron por espectrometría de masas, usando un espectrómetro de masas de trampa iónica modelo Esquire-LC (Bruker), con fuente de ionización electrospray. Se usó nitrógeno como gas de desolvatación, a 350°C y un flujo de 7 L/hora. Se empleó un potencial de 4 kV en el capilar en modo iónico positivo, en el electrodo final se ajustó a -0,5 kV. Los espectros de masas se adquirieron en un rango de *m/z* entre 50 y 1.000 Dalton.

15. Evaluación de los efectos de pH, temperatura y fuerza iónica sobre la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

El efecto del pH en la estabilidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue analizado incubando 2 µg de enzima pura a valores de pH entre 4 y 11 durante 45 minutos a 4°C en tampón fosfato/citrato/borato 20 mM de cada uno, a una fuerza iónica constante de 120 mM ajustada mediante la adición de distintas cantidades de NaCl en los casos necesarios. Tras la incubación, la alícuota de enzima se empleó para realizar un ensayo turbidimétrico estándar por triplicado al pH óptimo de cada enzima y 40°C.

El perfil de actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} a diferentes valores de pH fue evaluado realizando ensayos turbidimétricos estándar por triplicado en tampón fosfato/citrato/borato 20 mM de cada compuesto, ajustado a los diferentes valores de pH, a 40°C y a una fuerza iónica constante de 120 mM. Se añadió MgCl₂ 4 mM en los ensayos.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue evaluado incubando alícuotas de enzima pura en tampón fosfato potásico 20 mM pH 7 durante 45 minutos a distintas temperaturas entre 25 y 70°C en baño de agua con agitación suave, tras la incubación se depositaron las alícuotas en hielo durante 5 minutos para a continuación realizar ensayos turbidimétricos estándar de actividad en el tampón correspondiente al pH óptimo de cada despolimerasa y por triplicado, añadiendo MgCl₂ 1 mM para PhaZ_{Sex} o 4 mM en los ensayos de PhaZ_{So}.

El perfil de actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} a distintas temperaturas entre 25 y 75°C fue establecido mediante ensayo turbidimétrico estándar por triplicado en el tampón correspondiente al pH óptimo para cada enzima, con MgCl₂ 1 mM para PhaZ_{Sex} o 4 mM en los ensayos de PhaZ_{So}.

La inactivación térmica de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue monitorizada a distintas temperaturas (50 y 55°C para PhaZ_{So}, 40, 50, 60 y 70°C para PhaZ_{Sex}) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 o MES 50 mM pH 6 respectivamente. En el caso de PhaZ_{Sex} también se realizó en presencia de MβCD 5 mM. Las muestras de enzima pura se incubaron a la temperatura correspondiente en baño de agua con agitación suave, y a distintos intervalos de tiempo se extrajeron alícuotas que se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. A continuación se emplearon estas alícuotas para realizar ensayos turbidimétricos estándar de actividad por triplicado en el tampón correspondiente a cada enzima, para determinar la actividad remanente respecto a las muestras de despolimerasa control sin incubar.

El efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue analizado mediante ensayos turbidimétricos de actividad en presencia de distintos valores de concentración de NaCl desde 0 hasta 3 M

16. Evaluación de la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en presencia de sales, disolventes, detergentes y otros compuestos

La actividad PHB despolimerasa de muestras de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} dializadas frente a tampón fosfato potásico 20 mM pH 7 fue evaluada mediante ensayos turbidimétricos de actividad en presencia de distintas concentraciones entre 0 y 30 mM de cinco cloruros de cationes monovalentes (sodio y potasio) o divalentes (calcio, magnesio y zinc).

Para evaluar el efecto de distintos disolventes sobre la actividad de estas PHB despolimerasas se realizaron ensayos turbidimétricos estándar en presencia de un 10% (v/v) de los siguientes disolventes orgánicos miscibles en agua: acetona, acetonitrilo, dietilenglicol, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, etilenglicol, glicerol, metanol, 2-propanol, tetrahidrofurano (THF) y trietilenglicol, realizando controles de turbidez de la mezcla de reacción en presencia de cada uno de los solventes empleados.

También se analizó mediante ensayos turbidimétricos estándar el efecto sobre la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, de varias concentraciones de los siguientes compuestos: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), metil- β -ciclodextrina (M β CD), polietilenglicol 3.350 (PEG 3.350), ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol y los detergentes dodecilsulfato sódico (SDS), y Tween-20. Adicionalmente se midió la actividad de PhaZ_{So} en presencia de almidón de maíz o de detergente Triton X-100; y la actividad de PhaZ_{Sex} en presencia de sacarosa. Los correspondientes controles de mezcla de reacción sin enzima y en presencia de cada compuesto se llevaron a cabo en paralelo.

17. Experimentos de liofilización de PhaZ_{Sex} en presencia de aditivos

Alícuotas de PhaZ_{Sex} pura fueron suplementadas con varias concentraciones de distintos aditivos empleados como lioprotectores: M β CD, PEG 3.350, glicerol y KCl. Las mezclas de enzima y aditivo se prepararon por duplicado y realizando siempre la misma dilución de la enzima (con agua desionizada en el caso del control). Uno de los duplicados de cada aditivo se sometió a congelación rápida en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24 horas en un liofilizador Labconco Freezone 12 L, el otro duplicado se conservó intacto como control de la

actividad previa a la liofilización. Una vez liofilizadas las alícuotas, se reconstituyó su volumen original con agua desionizada, y se midió su actividad residual por triplicado, así como la de las alícuotas sin liofilizar, mediante el ensayo turbidimétrico estándar.

18. Estudio de los parámetros cinéticos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Los parámetros cinéticos aparentes K_M (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} (velocidad máxima) de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} para la hidrólisis de PHB fueron calculados mediante regresión hiperbólica no lineal, obteniendo los valores iniciales obtenidos por ajuste lineal de una representación de Hanes-Woolf y empleando estos valores para una regresión no lineal que ajusta los datos a la mejor hipérbola posible (Wilkinson 1961, Duggleby 1981), con el programa Hyper32 (disponible en <http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/hyper32.html>). La ecuación de Michaelis-Menten, que describe cómo varía la velocidad de reacción con la concentración de sustrato es la siguiente:

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Estos parámetros cinéticos fueron determinados mediante ensayos turbidimétricos de actividad con distintos valores de concentración de sustrato (PHB), y considerando una masa molecular promedio en masa (M_w) de 437 kDa, proporcionada por el fabricante.

19. Experimentos de degradación enzimática de películas de PHB, PHBV y PHB-almidón mediante PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Para estos experimentos se prepararon películas finas de PHB, P(HB-co-HV) con 5 o 12% de 3-hidroxivalerato y de una mezcla de PHB con almidón de maíz en proporción de masa 7:3. Para ello se pesaron 100 mg del correspondiente polímero o mezcla de polímeros y se disolvieron en 20 mL de cloroformo caliente con agitación vigorosa, a continuación se vertieron estas soluciones en placas Petri de vidrio, y se dejó evaporar totalmente el cloroformo en campana de extracción. Cuando las películas estuvieron secas se desprendieron de la placa de vidrio y se depositaron en una placa Petri de plástico.

Para los experimentos de degradación con PhaZ_{Sex} se usaron películas de PHB, P(HB-co-HV) con 5 y 12%. A cada película se le añadió 5 mL de una solución de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 suplementado con MgCl₂ 2 mM conteniendo 10 µg de PhaZ_{Sex}, y se incubaron con la placa

sellada a 37°C sin agitación durante 24 horas. Se tomaron imágenes a distintos tiempos para evaluar el proceso de degradación de las películas.

En el caso de los experimentos de degradación con PhaZ_{So} se usaron películas de PHB, P(HB-co-HV) con 5 y 12%, y adicionalmente se probaron películas de PHB-almidón en proporción 7:3. Las películas se sumergieron en 10 mL de tampón MES 150 mM pH 6 con MgCl₂ 5 mM y MβCD 4 mM, y se añadieron 30 μg de PhaZ_{So} o bien un volumen igual de tampón fosfato potásico 20 mM pH 7 para los controles sin enzima. Todas las películas se incubaron con la placa sellada a 37°C sin agitación durante 40 horas. Se tomaron imágenes a distintos tiempos para evaluar el proceso de degradación de las películas, y también se tomaron alícuotas de los sobrenadantes para cuantificar la concentración de (R)-3-hidroxi butirato mediante el ensayo de la β-hidroxi butirato deshidrogenasa.

20. Modificación química de aminoácidos

Se realizó la modificación química de determinados aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante los siguientes reactivos específicos de grupo: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para serinas, dietilpirocarbonato (DEPC) para histidinas, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para ácidos aspárticos y glutámicos, y *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB) para cisteínas, sólo en el caso de PhaZ_{Sex}.

Las modificaciones se llevaron a cabo sobre 5 μg de enzima en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 a excepción de la realizada con EDC, que fue llevada a cabo en tampón MES 50 mM pH 5. Las reacciones de modificación se incubaron durante 30 minutos con distintas concentraciones del reactivo correspondiente en 50 μL de volumen final. Las soluciones con PMSF se prepararon en DMSO, las de DEPC en etanol absoluto, el EDC se disolvió en tampón MES 30 mM pH 5 y el *p*HMB en tampón fosfato potásico 50 mM pH 8. Las reacciones con PMSF se realizaron a 25°C mientras que las de DEPC, *p*HMB y EDC se hicieron a 37°C con el volumen adecuado de solución de reactivo. En el caso de la reacción con EDC se añadió glicinamida a una concentración final de 1 M. La concentración final de DMSO o etanol en la mezcla de modificación enzimática nunca excedió el 1%, y se comprobó que no presentara ningún efecto detectable sobre la estabilidad o la actividad de las enzimas a esta concentración. Las reacciones con EDC y *p*HMB se detuvieron añadiendo un volumen de citrato potásico 1 M pH 5 a 4°C. El exceso de DEPC se bloqueó añadiendo imidazol hasta una concentración final de 10 mM. La actividad remanente en cada caso se determinó mediante el ensayo turbidimétrico estándar, y todos los ensayos se realizaron por triplicado, estando representados los valores

medios en las tablas. Los controles adecuados de actividad enzimática se llevaron a cabo en todos los experimentos.

Los grupos sulfhidrilo reducidos (-SH) de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se cuantificaron espectrofotométricamente empleando el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) mediante el método de Ellman (Ellman 1959). Para la titulación se construyó una recta patrón con distintas cantidades de cisteína entre 0 y 8 μ M. El ensayo consistió en tomar 100 μ L de muestra a titular o bien de soluciones de cisteína, siempre por triplicado, y llevarlo a 1 mL con tampón Tris-HCl 20 mM con EDTA 1 mM y 40 μ L de una solución stock de DTNB 5 mM, alcanzando una concentración de reactivo en el ensayo de 0,2 mM. Tras mezclar cada vial adecuadamente y esperar 10 minutos a temperatura ambiente se trasvasaron 400 μ L de cada vial a una placa multipocillo para medir su absorbancia a 414 nm. Los valores de absorbancia de las muestras de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} puras de concentración conocida se interpolaron en la recta patrón y de este modo se estimó la concentración de grupos sulfhidrilo libres en las muestras, que relacionada con la concentración de enzima indica el número de grupos sulfhidrilo libres por molécula de enzima.

21. Mutagénesis dirigida de PhaZ_{So}

Con el fin de verificar la identidad de los aminoácidos que constituyen la triada catalítica de PhaZ_{So}, los residuos candidatos elegidos de acuerdo a alineamientos múltiples de secuencia se mutaron por medio del kit Quikchange II XL site-directed mutagenesis (Stratagene). El plásmido pHPNV se usó como molde para las PCRs mutagénicas, usando los oligonucleótidos recogidos en la *tabla 2*. Los plásmidos mutantes construidos fueron secuenciados para confirmar las mutaciones introducidas y posteriormente transferidos a *Rhodococcus* sp. T104 para las pruebas de expresión de las despolimerasas mutantes. La serina 131 se intercambió por una alanina (mutante S131A) o una cisteína (S131C); el ácido aspártico se cambió por una asparagina (D209N) y la histidina 269 se intercambió por un ácido glutámico (H269E) o una glutamina (H269Q).

22. Inmovilización de PhaZ_{Sex}

22.1 Preparación de CLEAs de PhaZ_{Sex}

Los agregados entrecruzados de PHB despolimerasa recombinante de *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}-CLEAs) se prepararon añadiendo gradualmente cuatro volúmenes de acetona a -20°C

en 400 μ L de solución de PhaZ_{sex} pura en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7, esta solución contenía 5 μ g de PHB despolimerasa y diferentes cantidades de BSA en proporciones de masa BSA:PhaZ_{sex} 100:1, 200:1, 500:1, 1.000:1, también se realizó el proceso sin BSA. Después de 40 minutos a 4°C con agitación orbital a 300 rpm, las proteínas agregadas fueron sometidas a entrecruzamiento químico usando diferentes concentraciones de glutaraldehído (5; 12,5; 25 y 50 mM). Las muestras se agitaron continuamente durante la adición del glutaraldehído. A continuación se incubaron estas mezclas a 4°C durante 2 horas con agitación constante a 300 rpm antes de centrifugarlas a 4.000 \times g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se desecharon por decantación y los CLEAs resultantes se lavaron 3 veces con 2 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7. Finalmente las preparaciones de CLEAs se conservaron a 4°C antes de usar. Los rendimientos de inmovilización en términos de recuperación de enzima se determinaron como la actividad relativa presentada por los CLEAs con respecto a la misma cantidad de enzima soluble que contenía cada derivado enzimático.

22.2 Microscopía confocal de CLEAs

10 mg de PhaZ_{sex}-CLEAs se incubaron con 5 mL de PBS conteniendo un 1% (p/v) de BSA durante 30 minutos. Después los derivados enzimáticos se lavaron tres veces con 5 mL de PBS con 0,1% (p/v) BSA y se incubaron durante 16 horas a 4°C con 5 mL de una solución de anticuerpo de conejo anti-PhaZ_{sex} preparada en PBS con 0,1% de BSA. Los CLEAs se lavaron de nuevo con 5 mL de PBS con 0,1% (p/v) BSA y se incubaron dos horas adicionales a 25°C con 5 mL de solución de un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 en tampón PBS con 0,1% (p/v) BSA. La concentración final de anticuerpo conjugado fue de 5 μ g/mL. Se realizaron controles negativos de BSA entrecruzada sin enzima, para comprobar la unión específica del anticuerpo secundario a los PhaZ_{sex}-CLEAs. Estas muestras se lavaron tres veces con 5 mL de PBS con 0,01% (p/v) BSA durante 10 minutos cada lavado, seguidos de otros tres lavados iguales con 5 mL de PBS y finalmente otros tres lavados con agua desionizada durante 5 minutos cada uno.

La adquisición de imágenes de microscopía se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Microscopía Electrónica asociado a la Universidad Complutense de Madrid. Los derivados marcados de esta forma se analizaron mediante un microscopio confocal Radiance 2000 (Bio-Rad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 (Carl Zeiss), realizando tres pases con un filtro promediador Kalman y una adquisición de imagen de 1.024 \times 1.024 pixels. Las imágenes se analizaron con el programa Leica Confocal Software Lite.

22.3 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad de los CLEAs de PhaZ_{Sex}

El efecto del pH en la estabilidad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se estudió incubando 10 mg de derivado en 1 mL de tampón fosfato-citrato-borato 50 mM de cada compuesto, durante 45 minutos a 4°C y a valores de pH entre 4 y 10. Los sobrenadantes se separaron por centrifugación y se valoró la actividad residual del derivado mediante ensayo cromogénico específico para CLEAs.

El perfil de actividad frente a pH de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se elaboró con alícuotas de 5 mg de derivado en tampón fosfato-citrato-borato 50 mM de cada compuesto con CaCl₂ 2 mM, a valores de pH entre 5 y 10 con una fuerza iónica constante de 0,4 M, midiendo la actividad a 40°C a cada valor de pH mediante ensayo turbidimétrico para CLEAs. No se empleó el ensayo cromogénico en este caso debido a la elevada tasa de hidrólisis espontánea del pNP-butirato a valores básicos de pH.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se determinó incubando 10 mg de derivado en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 a diferentes temperaturas entre 30 y 80°C durante 45 minutos. La actividad remanente en el derivado tras la incubación se midió tras sedimentar los CLEAs por centrifugación, mediante el ensayo cromogénico para CLEAs.

El perfil de actividad frente a temperatura de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se estudió entre 30 y 80°C con 5 mg de derivado en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 con CaCl₂ 2 mM, siguiendo el ensayo de actividad cromogénico específico para CLEAs a la temperatura correspondiente.

La inactivación térmica de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se estudió mediante la incubación de 5 mg de derivado en 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 suplementado con CaCl₂ 2mM a 40 y 60°C. Se incubaron a distintos tiempos desde 0 hasta 270 minutos, en cada punto se extrajo el correspondiente vial, se separó el derivado por centrifugación y se evaluó la actividad residual mediante el ensayo cromogénico de actividad específico para CLEAs.

23. Inmovilización de PhaZ_{St} en partículas magnéticas

Para la inmovilización de PhaZ_{St} se emplearon partículas de magnetita [óxido de hierro (II,III)] comerciales (Sigma-Aldrich) con un tamaño promedio de 50 nm, estimado mediante microscopía electrónica de transmisión.

23.1 Funcionalización de las partículas magnéticas

Para activar las partículas magnéticas con grupos amino se siguió el protocolo desarrollado por del Campo *et al.* (2005). Previamente se lavaron 150 mg de partículas magnéticas tres veces

con 10 mL de agua desionizada en un tubo de 15 mL, sedimentando las partículas por centrifugación entre lavados y disgregando los sedimentos durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos para obtener una suspensión homogénea. A continuación se resuspendieron las partículas lavadas en 15 mL de agua desionizada y se transfirieron a un matraz de 25 mL con 310 μ L de (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS), alcanzando una concentración final del 2% (v/v). Se evacuó el aire del matraz mediante un flujo de argón para evitar la oxidación de las partículas magnéticas y se cerró herméticamente. Este matraz se incubó en un baño de aceite mineral a 70°C con agitación mecánica vigorosa durante aproximadamente 18 horas. Tras la reacción se recuperaron las partículas y se volvieron a lavar 4 veces con 10 mL de agua desionizada para eliminar los restos del reactivo, finalmente se secaron las partículas completamente en un desecador a vacío hasta obtener un polvo fino.

24. Experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos empleando PhaZ_{Sex} como catalizador

Todos los experimentos de síntesis orgánica fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Química Técnica y Macromolecular (ITMC) de la Universidad RWTH en Aachen, Alemania.

La PHB despolimerasa PhaZ_{Sex} fue empleada para realizar distintos experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos, para ello se dializó la enzima frente a tampón fosfato potásico 5 mM pH 7 y a continuación se liofilizó esta preparación durante 48 horas. Esta enzima liofilizada fue empleada como catalizador en los experimentos. Los ensayos fueron llevados a cabo en atmósfera de nitrógeno, controlando la temperatura de los viales en baño de aceite mineral termostatzado y con agitación magnética.

El peso molecular promedio en número (M_n) de los polímeros u oligómeros, así como su dispersidad (\mathcal{D}) se calcularon mediante cromatografía de filtración en gel (GPC) con cloroformo como fase móvil. Se empleó una bomba HPLC Jasco PU-2080-Plus, un detector Jasco 2031 Plus RI y cuatro columnas MZ-Gel SD Plus de 50, 100, 10^3 y 10^4 Å en serie, a 30°C y un flujo de 1 mL/minuto. Los valores de M_n y \mathcal{D} fueron determinados mediante patrones de metil metacrilato de distribución estrecha. El peso molecular promedio en número (M_n) de un polímero representa la media aritmética del tamaño molecular de todas las cadenas poliméricas de una muestra. La dispersidad (\mathcal{D}) de los polímeros mide la heterogeneidad en el tamaño molecular de las cadenas de dicho polímero, cuanto menor es su valor, mayor es la uniformidad en el tamaño de las distintas cadenas sintetizadas.

Las estructuras químicas de los productos sintetizados fueron analizadas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros de ^1H y ^{13}C fueron adquiridos mediante un espectrómetro Bruker DPX-400 FT-NMR a 400 y 101 MHz, respectivamente, usando cloroformo deuterado como disolvente. Los desplazamientos químicos registrados se relacionaron con los obtenidos para el patrón tetrametilsilano. Los espectros de RMN se utilizaron para calcular los porcentajes de conversión de sustratos a productos en las distintas reacciones ensayadas.

Resultados

1. Búsqueda y detección de PHB despolimerasas extracelulares en cepas de *Streptomyces*

1.1 Búsqueda *in silico* de secuencias de PHB despolimerasas procedentes del género *Streptomyces*

La búsqueda de PHB despolimerasas extracelulares de cepas del género *Streptomyces* en la bibliografía y las bases de datos de secuencias, condujo a la selección de dos especies candidatas para su estudio. En primer lugar, *Streptomyces exfoliatus*, descrita como degradadora de PHB y PHO, cuya PHB despolimerasa había sido previamente clonada en *E. coli* y brevemente caracterizada (Klingbeil *et al.* 1996). En segundo lugar, *Streptomyces hygrosopicus* var. *ascomyceticus*, cepa en la cual se había localizado y secuenciado un gen (*fkbU*) dentro de una región génica encargada de la biosíntesis del antibiótico macrólido ascomicina. Mediante alineamiento de la secuencia de *fkbU* con la base de datos de secuencias, usando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), se clasificó su producto génico como una potencial PHB despolimerasa extracelular, dado que presenta una identidad de secuencia del 50% con la PHB despolimerasa extracelular PhaZ3 de *Paucimonas lemoignei* (código de acceso Genbank U68170). Posteriormente esta variedad bacteriana fue reclasificada como *Streptomyces ascomycinicus* (DSMZ 40822/NBRC 13981), tras un estudio genotípico y fenotípico detallado de cultivos de distinta procedencia, todos anteriormente agrupados bajo la denominación *Streptomyces hygrosopicus* (Kumar y Goodfellow 2010).

1.2 Análisis y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Las secuencias de aminoácidos de las PHB despolimerasas de *S. exfoliatus* (PhaZ_{Sex}) y de *S. ascomycinicus* (PhaZ_{So}), fueron analizadas mediante el uso de varias herramientas bioinformáticas y servidores.

El servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011), disponible en la página www.cbs.dtu.dk/services/SignalP, se empleó para predecir la existencia y longitud de péptidos señales de secreción en PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} basándose en su secuencia completa de aminoácidos. En ambos casos se detectaron péptidos señal con un elevado nivel de confianza, y atendiendo a los sitios de corte predichos, el péptido señal de PhaZ_{Sex} contaría con 26 aminoácidos, mientras que el de PhaZ_{So} estaría formado por 58 residuos (Figura 15).

La secuencia de aminoácidos de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} maduras (tras la escisión del péptido señal) se analizó mediante la herramienta informática ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005), que computa diversos parámetros físicos y químicos de proteínas en

Resultados

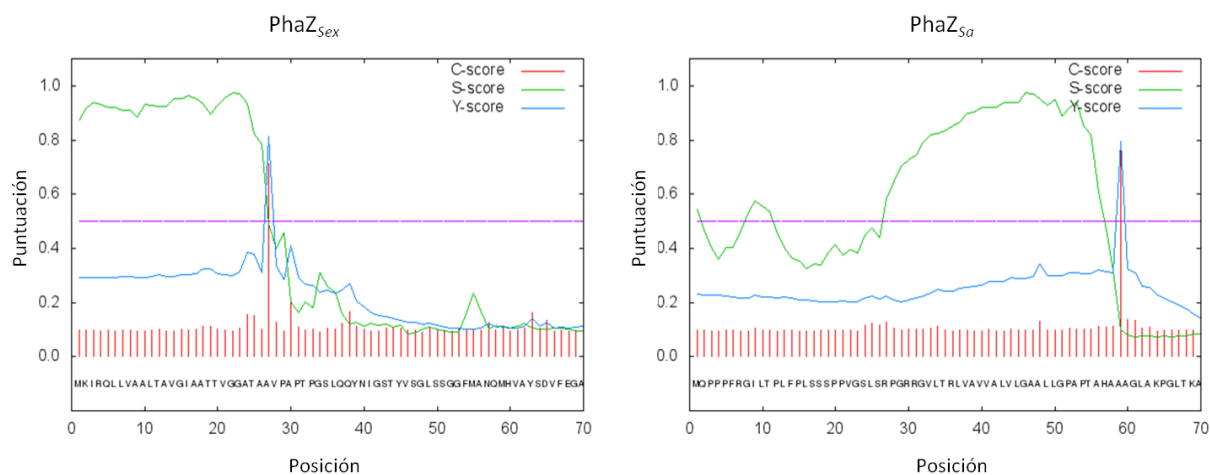


Figura 15: Predicción de péptidos señal y puntos de corte en las secuencias de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{Sa} (derecha) realizada por el servidor SignalP 4.1. La puntuación C, en rojo, indica la probabilidad de un lugar de corte de péptido señal. S, en verde, indica la probabilidad de presencia de un péptido señal en una ubicación determinada, el parámetro Y, en azul, combina ambas puntuaciones para realizar una predicción más exacta y fiable sobre el punto de corte del péptido señal.

función de su secuencia. Con esta herramienta se calculó que PhaZ_{Sex} madura es una proteína de 462 aminoácidos y una masa molecular de 47,9 kDa, con un punto isoelectrico (pI) teórico de 5,26. Destaca el elevado número de cisteínas, un total de 10, lo que apunta hacia la existencia de uno o varios puentes disulfuro intracatenarios. En el caso de PhaZ_{Sa} madura se encontró un número casi idéntico de aminoácidos, 461, sólo uno menos que PhaZ_{Sex}, con una masa molecular muy cercana, de 48,0 kDa y un pI teórico de 5,31. Asimismo cuenta con 8 cisteínas en su secuencia, posibilitando el establecimiento de enlaces disulfuro intracatenarios. Ambas secuencias completas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} con sus péptidos señal fueron comparadas para evaluar el grado de similitud entre ellas. Para ello se empleó la aplicación bioinformática MatGAT 2.02 (Campanella *et al.* 2003), que mediante la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM 62 halló una identidad del 25,9% y una similitud del 41,2%.

Dado que ambas PHB despolimerasas pertenecen a bacterias Gram positivas del grupo de los actinomicetos, sus genes poseen secuencias inusualmente ricas en guanina y citosina (G+C) (Wright y Bibb 1992). Se analizó el uso de codones en su secuencia génica mediante la herramienta de análisis de codones raros de Genscript (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis) para evaluar su posible clonación y expresión en un hospedador Gram negativo como *Escherichia coli*. Se confirmó el elevado contenido en G+C en ambos genes, *phaZ_{Sex}* cuenta con un 69% mientras que *fbkU* presenta un 72%. Adicionalmente se encontró en *phaZ_{Sex}* un 5% de codones considerados raros en *E. coli*, mientras que en el caso de *fbkU* el número de codones raros asciende al 7%. La presencia de estos codones poco frecuentes dificulta la obtención de un nivel elevado de expresión en un organismo hospedador como *E. coli*. Ambos genes coinciden en un bajo índice de adaptación de codones

(CAI) de 0,73. Este índice da una valoración aproximada de la probabilidad de éxito de expresión de un gen heterólogo en un hospedador determinado (Sharp y Li 1987), y se considera que un valor por debajo de 0,8 implica dificultades para una adecuada expresión.

Las secuencias de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fueron alineadas frente a las de otras PHB despolimerasas extracelulares con homología de secuencia (Figura 16). Las secuencias homólogas para el alineamiento fueron seleccionadas mediante la aplicación BLAST, eligiendo secuencias completas con nivel de identidad siempre inferior al 58% con PhaZ_{Sex} o PhaZ_{So}, para minimizar la redundancia en los alineamientos. Las PHB despolimerasas seleccionadas para este alineamiento con PhaZ_{Sex} pertenecen a especies bacterianas Gram positivas (*Nocardia seriolae* N-2927, *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728 y *Streptomyces purpureus*), Gram negativas (*Delftia acidovorans*, *Halomonas* sp. TD01, *Burkholderia pseudomallei*, *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100, *Microcystis aeruginosa* PCC 9809, *Ramlibacter tataouinensis* TTB310, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Caldimonas manganoxidans*) y al hongo ascomiceto *Penicillium funiculosum*. En el caso de PhaZ_{So}, las secuencias procedieron de bacterias Gram positivas (*Catenulispora acidiphila*, *Streptomyces flavogriseus*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Thermobifida fusca* y *Janibacter* sp.) y Gram negativas (*Haliangium ochraceum*, *Paucimonas lemoignei* y *Ralstonia pickettii*). Se generó una matriz de similitud/identidad para cada grupo de secuencias mediante el programa MatGAT 2.02, para verificar una identidad inferior al 58% entre cualquier par de secuencias de cada grupo. El alineamiento óptimo de ambos grupos de secuencias fue realizado mediante el servidor T-COFFEE (Notredame *et al.* 2000), (disponible en www.tcoffee.org), y los resultados fueron representados mediante el programa Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.* 2009).

En ambos alineamientos, esquematizados en la figura 16, podemos encontrar regiones altamente conservadas en todas las secuencias homólogas, principalmente destacan los aminoácidos que han sido propuestos como integrantes de la triada catalítica (Jendrossek y Handrick 2002), que para PhaZ_{Sex} serían Ser²⁴, Asp¹¹¹ e His¹⁴³, y en el caso de PhaZ_{Sex} Ser¹³¹, Asp²⁰⁹ e His²⁶⁹ (numeración referente a la secuencia de las proteínas maduras), y que están estrictamente conservados en todas las secuencias alineadas, así como parte de los aminoácidos dentro de su entorno inmediato, como en el caso de la caja lipasa en la que se enmarcan las serinas catalíticas. Otra región involucrada en la catálisis es la cavidad del oxianión, cuya ubicación propuesta está en torno a His²³⁷ de PhaZ_{Sex} e His⁴⁸ de PhaZ_{So}, también conservadas en todas las secuencias. Asimismo cabe destacar el alto grado de conservación de las cisteínas de ambas despolimerasas, al contrario que la mayoría de aminoácidos adyacentes, lo que sugiere la relevancia de estos residuos a la hora de proporcionar estabilidad estructural a las enzimas mediante enlaces disulfuro intracatenarios.

1.3 Evaluación de las actividades PHB y PHO despolimerasa extracelulares de cepas bacterianas del género *Streptomyces*

Para confirmar la actividad PHB despolimerasa extracelular atribuida a *Streptomyces ascomycinicus* y encontrar otras cepas de *Streptomyces* capaces de degradar PHAs, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento de esporas de distintas especies en placas de medio mínimo salino suplementadas con una suspensión de PHB o emulsión de P(HO-co-HH) en agua como única fuente de carbono. *Streptomyces exfoliatus* fue empleado como control positivo para la degradación extracelular de scl y mcl-PHAs. Para este ensayo de cultivaron durante 5 días las esporas de 6 especies de *Streptomyces* (*S. exfoliatus*, *S. ascomycinicus*, *S. coelicolor*, *S. albus*, *S. lividans* y *S. lavendulae*) a 30°C. Las especies capaces de usar el PHA extracelular mostraron un claro crecimiento miceliar, acompañado por la formación de halos transparentes de hidrólisis alrededor de las estrías, como se puede apreciar en las figuras 17 y 18.

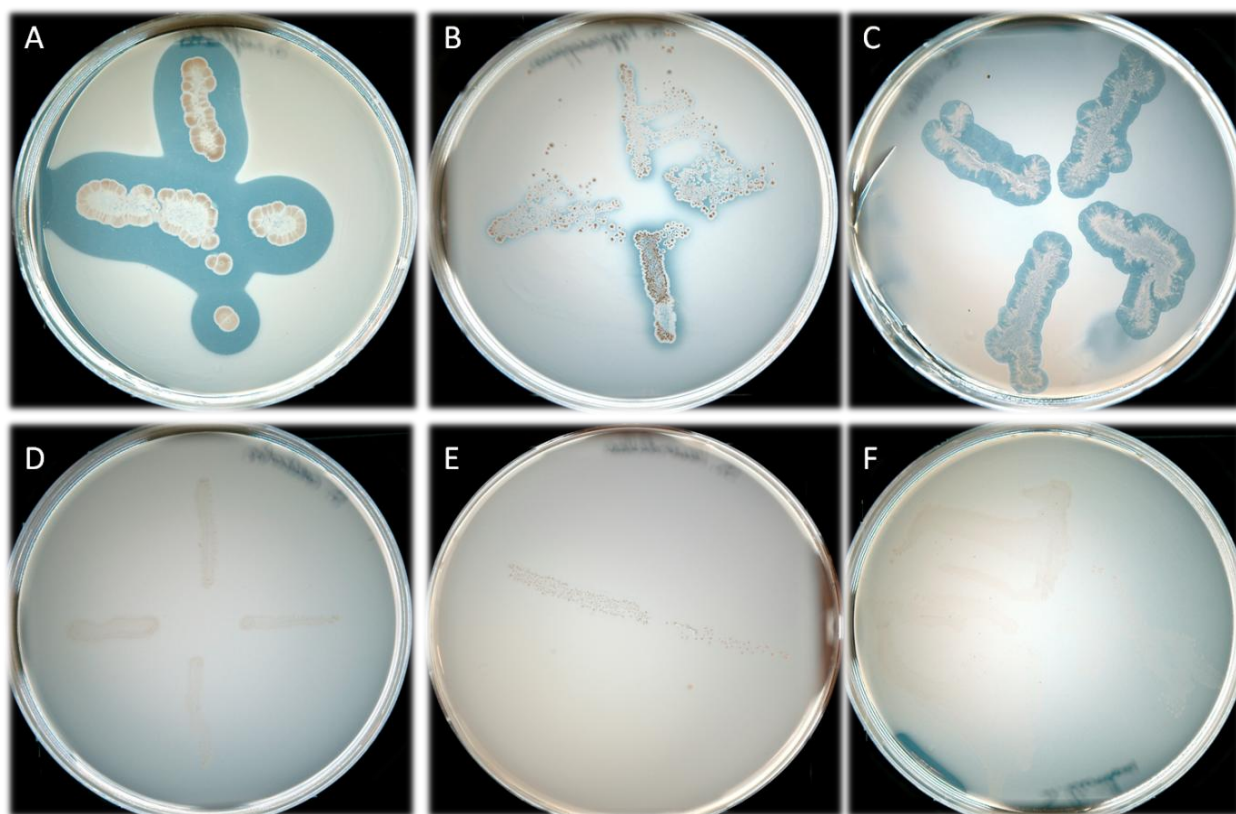


Figura 17: Detección de actividad PHB despolimerasa extracelular en cepas de *Streptomyces* sobre medio mínimo salino suplementado con suspensión de PHB como única fuente de carbono. Las especies empleadas son *S. exfoliatus* (A), *S. ascomycinicus* (B), *S. albus* (C), *S. coelicolor* (D), *S. lividans* (E) y *S. lavendulae* (F).

Resultados

Tal como se esperaba, *S. exfoliatus* mostró su capacidad para degradar ambos tipos de PHA. Por su parte, se confirma a *S. ascomycinicus* como productor de PHB despolimerasa extracelular, aunque el halo de hidrólisis formado no fue de tanta entidad como en el caso de *S. exfoliatus*, debido probablemente a un crecimiento más lento, como se puede ver en la *figura 17*, y por consiguiente un menor nivel de producción de enzimas extracelulares.

Adicionalmente, *S. albus* también demostró ser capaz de crecer rápidamente con PHB extracelular como fuente de carbono y energía, dando lugar a un halo de tamaño considerable, aunque no tan extenso como en el caso de *S. exfoliatus*.

Ninguna de las especies ensayadas aparte del control positivo *Streptomyces exfoliatus* fue capaz de degradar P(HO-co-HH) en las condiciones del experimento, como se observa en la *figura 18*.

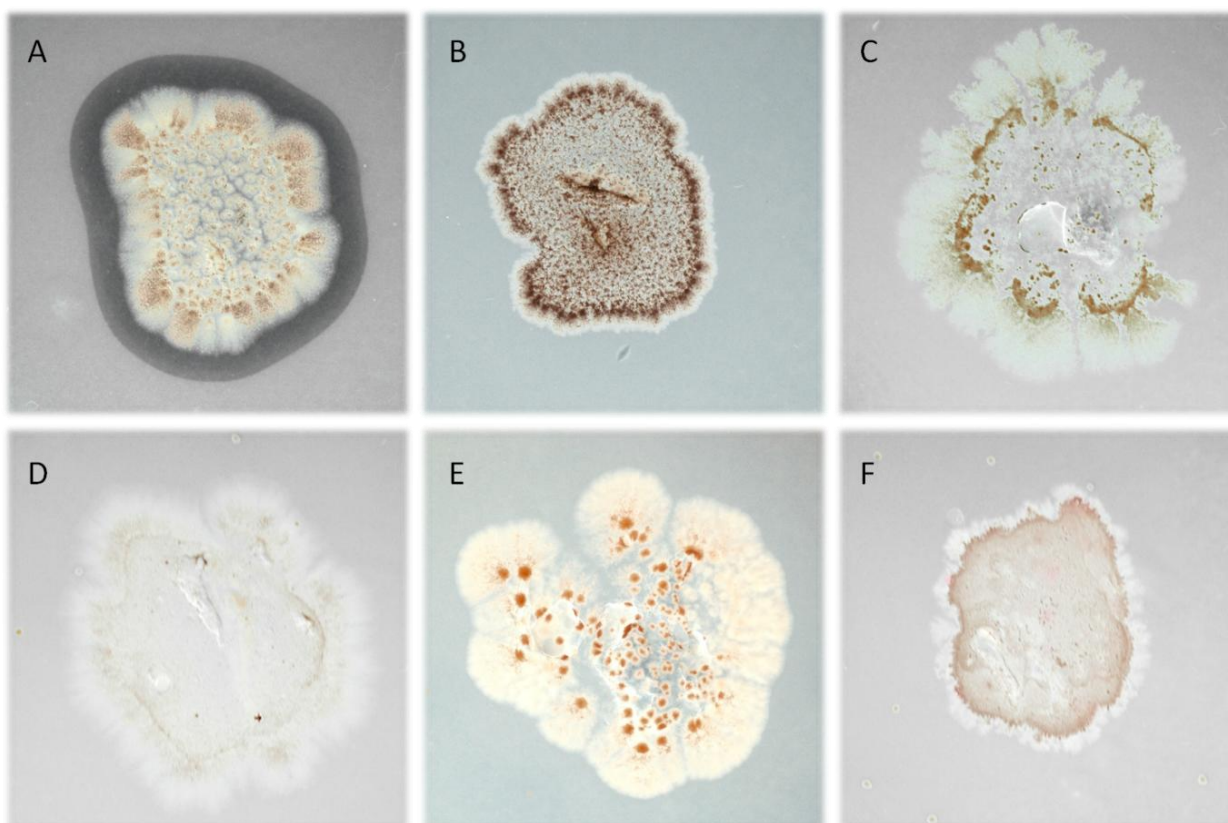


Figura 18: Detección de actividad PHO despolimerasa extracelular en cepas de *Streptomyces* sobre medio mínimo salino suplementado con emulsión de P(HO-co-HH) como única fuente de carbono. Las especies empleadas son *S. exfoliatus* (A), *S. ascomycinicus* (B), *S. albus* (C), *S. coelicolor* (D), *S. lividans* (E) y *S. lavendulae* (F).

2. Clonación, expresión y purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

2.1 Clonación y expresión de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en *Escherichia coli* BL21(DE3)

Las secuencias de DNA de ambas PHB despolimerasas fueron amplificadas por PCR empleando los oligonucleótidos cebadores recogidos en la *tabla 2*, y colocando en los extremos de los cebadores las dianas de restricción adecuadas, se pudieron digerir los fragmentos amplificados e insertarlos directamente en sus plásmidos de destino, en este caso pET28, bajo el control del promotor del fago T7, muy fuerte y específicamente reconocido por la RNA polimerasa de dicho fago T7. Este plásmido sirve como vector de clonación y expresión de proteínas en cepas de *E. coli* como BL21(DE3), que contienen un lisógeno del fago λ DE3 expresando la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor lacUV5, inducible mediante IPTG.

Una vez construidos a partir de pET28 los vectores de PhaZ_{Sex} con y sin péptido señal de secreción (pEPET1 y pEPET2, respectivamente) y de PhaZ_{So} (pHPET), dichas construcciones (*Figura 21*), así como el plásmido control pET28, se transfirieron a *E. coli* BL21(DE3) para su expresión. Los clones se crecieron hasta una densidad óptica de 0,5 y después se indujo la expresión de los genes clonados mediante la adición de IPTG 0,5 mM. Tras cuatro horas de expresión inducida se recogieron las células por centrifugación y se analizó la expresión de las distintas construcciones tanto en los caldos de cultivo como en los extractos celulares solubles e insolubles, mediante SDS-PAGE (*figura 19*).

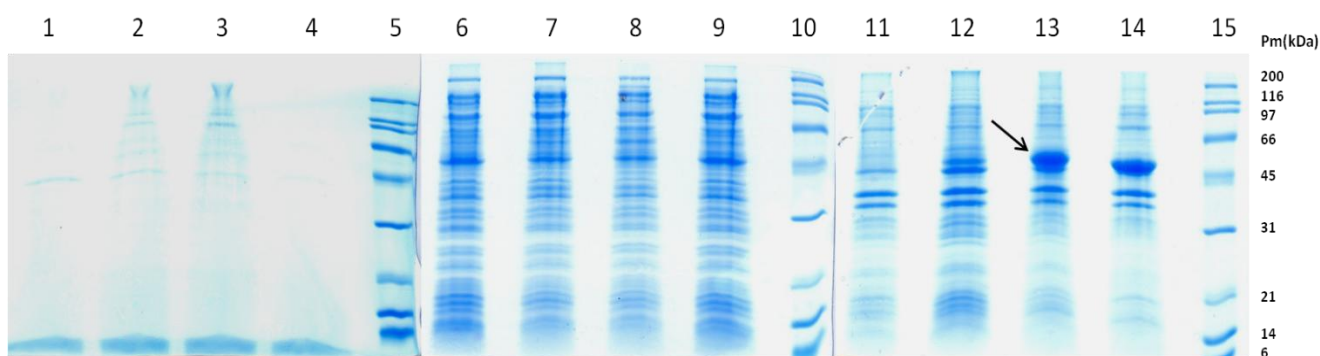


Figura 19: Análisis SDS-PAGE de la expresión de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en *E. coli* BL21(DE3). Carriles **1 a 4**: 100 μ L de sobrenadantes extracelulares precipitados con acetona fría. Carriles **6 a 9**: Extractos intracelulares solubles. Carriles **11 a 14**: Desechos celulares insolubles. Los carriles **1, 6 y 11** corresponden al control negativo pET28; los carriles **2, 7 y 12** pertenecen al clon de PhaZ_{So} (pHPET); **3, 8 y 13** corresponden al clon de PhaZ_{Sex} con péptido señal de secreción (pEPET1) y los carriles **4, 9 y 14** pertenecen al clon de PhaZ_{Sex} sin péptido señal de secreción (pEPET2). Los carriles **5, 10 y 15** contienen el patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad). La flecha indica la posición de los cuerpos de inclusión de las PHB despolimerasas hiperexpresadas.

También se ensayó la actividad de las distintas fracciones mediante ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa, como se muestra en la *figura 20*. No se detecta actividad PHB despolimerasa en los extractos celulares solubles ni insolubles, en cambio si se aprecia un bajo nivel de actividad en el caldo de cultivo de pHPET, sólo detectable tras la incubación de la placa de actividad durante aproximadamente 48 horas a 37°C.

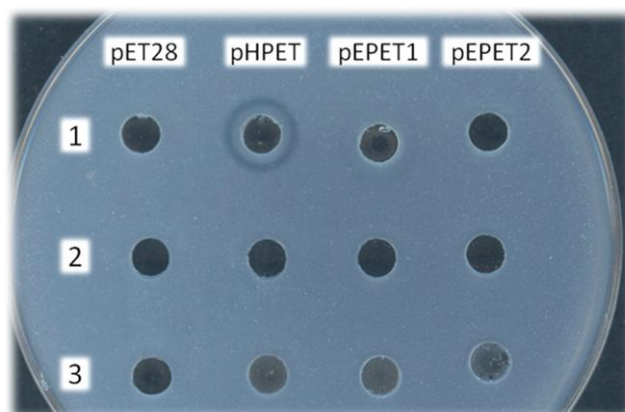


Figura 20: Ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa de las distintas fracciones de cultivos de *E. coli* BL21(DE3) pHPET (clon de PhaZ_{5a}), pEPET1 (clon de PhaZ_{5ex} con péptido señal), pEPET2 (clon de PhaZ_{5ex} sin péptido señal) y el control negativo pET28. **1.** Sobrenadantes extracelulares. **2.** Extractos intracelulares solubles. **3.** Desechos celulares insolubles. Los halos alrededor de los pocillos indican hidrólisis del PHB.

2.2 Clonación y expresión de PhaZ_{5ex} y PhaZ_{5a} en *Rhodococcus* sp. T104

De forma similar a la empleada para la expresión en *E. coli*, los genes codificantes para las PHB despolimerasas PhaZ_{5ex} y PhaZ_{5a} fueron amplificados por PCR e introducidos en el vector bifuncional de clonación y expresión pEM4, capaz de replicar tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*. Para la expresión en *Rhodococcus* sp. T104 se añadió la secuencia consenso del sitio de unión al ribosoma de *Streptomyces* (GGAGG) en los oligonucleótidos de PCR del extremo 5' de los genes a amplificar, en la posición -5 ó -7, antes del codón de iniciación. El plásmido pEM4 se empleó únicamente para incorporar la secuencia del promotor fuerte y constitutivo *ermE** al extremo 5' de las secuencias clonadas, obteniendo de esta manera las construcciones pEPEM1, pEPEM2 y pHPEM (*Figura 21*).

Estas tres construcciones se digirieron con las endonucleasas de restricción adecuadas para escindir los genes clonados junto con el promotor *ermE** y la secuencia de unión al ribosoma. Estos fragmentos se transfirieron al plásmido bifuncional pNV19, capaz de replicar en *E. coli* y también en bacterias Gram positivas como *Nocardia* o *Rhodococcus* (Chiba *et al.* 2007), dando lugar a las construcciones definitivas para expresión en *Rhodococcus*: pEPNV1, pEPNV2 y

pHPNV (Figura 21), que al igual que el plásmido control pNV19 se transfirieron por electroporación a células competentes de *Rhodococcus* sp. T104.

Los clones de *PhaZ_{sex}* y *PhaZ_{sa}* en *Rhodococcus* sp. T104 y el correspondiente control negativo portando pNV19 fueron cultivados en medio líquido 2xYTG durante 3 días, tras los cuales se separaron las células de los caldos de fermentación. Una vez lavadas para retirar los restos de caldo extracelular, las células se rompieron por tratamiento con ultrasonidos y se separó el extracto intracelular soluble del insoluble. Finalmente se ensayó en placa la actividad PHB despolimerasa de cada una de las fracciones obtenidas, y se analizaron también por SDS-PAGE. Como se puede comprobar en la figura 22, sólo se detectó halo de actividad en los caldos de

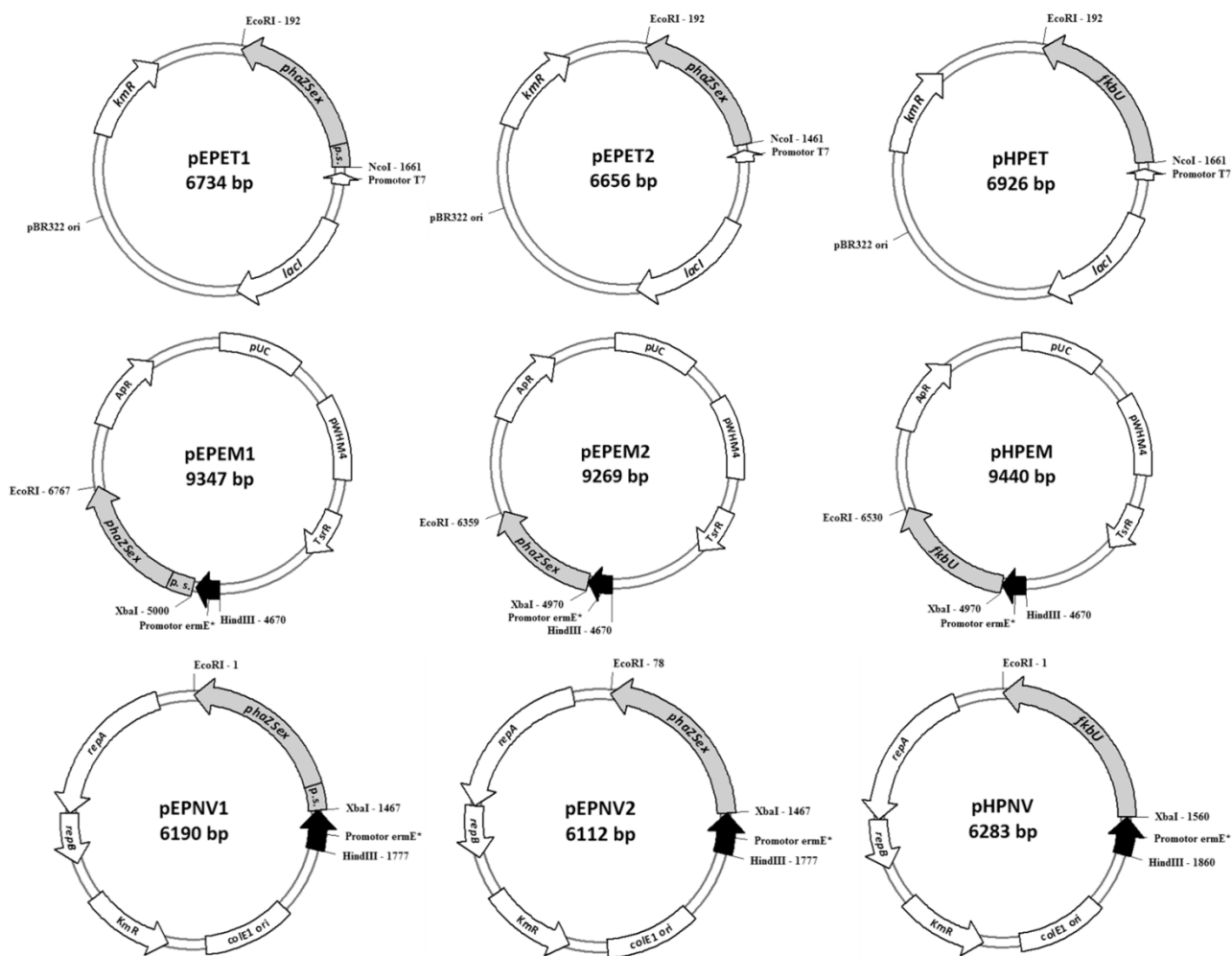


Figura 21: Esquema de las construcciones generadas para la expresión heteróloga de las PHB despolimerasas de *S. exfoliatus* con péptido señal (pPET1, pPEM1 y pEPNV1), sin péptido señal (pPET2, pPEM2 y pEPNV2) y de *S. ascomycinicus* (pHPET, pHPEM y pHPNV). Abreviaturas: *lacI*: gen del represor LacI, que reprime la expresión en ausencia de IPTG. *KmR*: gen de resistencia a kanamicina, *ApR*: gen de resistencia a ampicilina. *TsrR*: gen de resistencia a tioestreptona. *pUC*: fragmento procedente de un plásmido pUC, para replicación en *E. coli*. *pWHM4*: fragmento procedente del plásmido pWHM4, para replicación en *Streptomyces*. *repA* y *repB*: genes necesarios para la replicación en *Mycobacterium* y otras bacterias Gram positivas. *colE1 ori*: origen de replicación en *E. coli*. *p.s.*: secuencia codificante del péptido señal de secreción de la PHB despolimerasa de *S. exfoliatus*.

fermentación extracelulares de las construcciones pEPNV1 y pHPNV, no hallando un nivel detectable de actividad PHB despolimerasa en los extractos intracelulares solubles ni en los restos celulares insolubles. Tampoco se detectó actividad en ninguna de las fracciones del clon pEPNV2, que contiene el gen de la despolimerasa PhaZ_{sex} sin el péptido señal de secreción N-terminal.

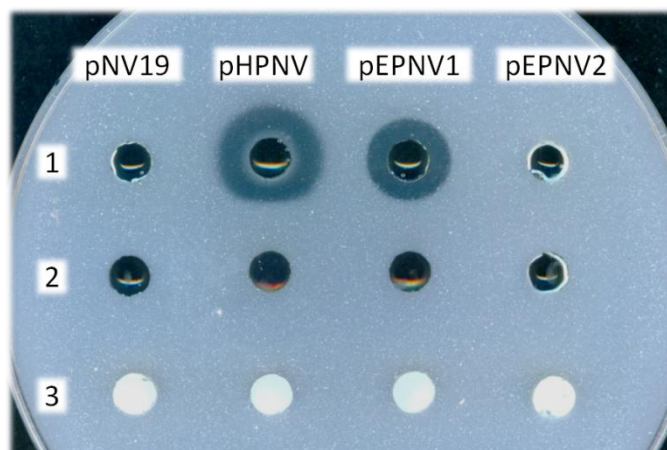


Figura 22: Ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa de las distintas fracciones de cultivos de 72 horas de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV (clon de PhaZ_{sex}), pEPNV1 (clon de PhaZ_{sex} con péptido señal), pEPNV2 (clon de PhaZ_{sex} sin péptido señal) y el control negativo pNV19. **1.** Caldos de fermentación. **2.** Extractos intracelulares solubles. **3.** Desechos celulares insolubles. Los halos alrededor de los pocillos indican hidrólisis del PHB.

El análisis de las distintas fracciones de los cultivos mediante SDS-PAGE concuerda con el análisis de su actividad (*Figura 23*). En los caldos de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV y pEPNV, que presentaban actividad PHB despolimerasa, se puede observar una banda de proteína de un tamaño molecular en torno a 50 kDa que no está presente en el caldo del control negativo portando el plásmido pNV19 ni tampoco en el de pEPNV2, lo que demuestra el éxito de este sistema de expresión heteróloga, obteniendo la producción de enzima activa y extracelular, incluso con el empleo de los péptidos señal de las enzimas nativas. Al cultivar los clones de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 y pEPNV2 en medio 2xYTG suplementado con PHB, se observa la necesidad de un péptido señal de secreción para la expresión extracelular de la PHB despolimerasa PhaZ_{sex}, como se muestra en la *figura 24*.

Respecto a los extractos celulares no se aprecian diferencias significativas entre los patrones proteicos de los distintos cultivos, a excepción de una banda de aproximadamente 30 kDa que parece estar ligeramente sobreexpresada en el extracto soluble de pHPNV, así como en su

fracción celular insoluble. Esta banda está presente con distinto nivel de expresión en todos los cultivos, incluido el control negativo pNV19, y su identidad no ha sido determinada.

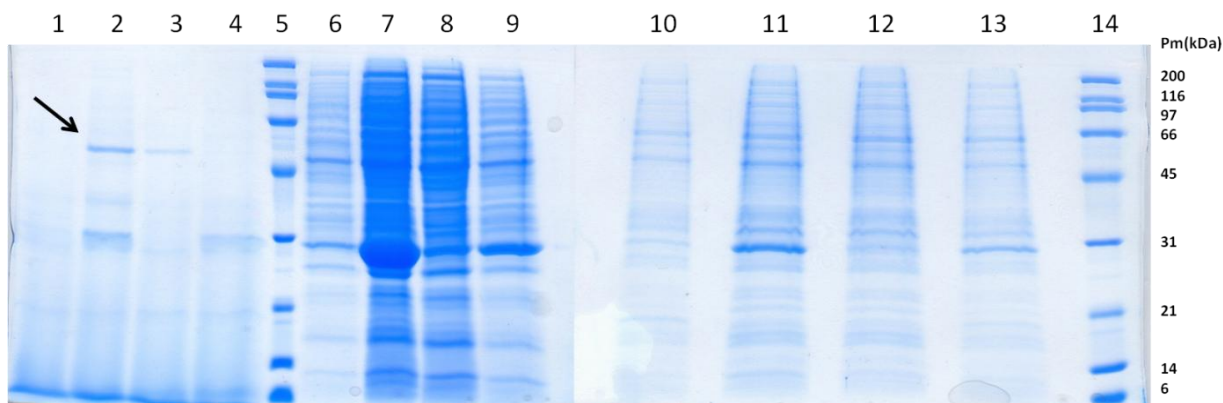


Figura 23: Análisis SDS-PAGE de la expresión de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} en *Rhodococcus* sp. T104. Carriles 1 a 4: Caldos de fermentación. Carriles 6 a 9: Extractos intracelulares solubles. Carriles 10 a 13: Desechos celulares insolubles. Los carriles 1, 6 y 10 corresponden al control negativo pNV19; los carriles 2, 7 y 11 pertenecen al clon de PhaZ_{Sa} (pHPNV); 3, 8 y 12 corresponden al clon de PhaZ_{Sex} con péptido señal de secreción (pEPNV1) y los carriles 4, 9 y 13 pertenecen al clon de PhaZ_{Sex} sin péptido señal de secreción (pEPNV2). Los carriles 5 y 14 contienen el patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad). La flecha indica la posición de las bandas correspondientes a las PHB despolimerasas en el caldo de fermentación.

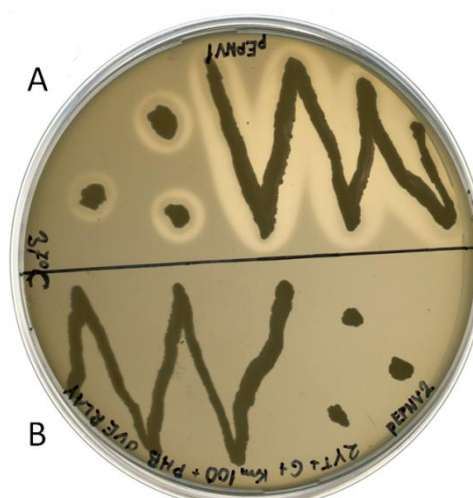


Figura 24: Ensayo de actividad PHB despolimerasa extracelular de las clones *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 y pEPNV2, que expresan el gen *phaZSex* con y sin la secuencia codificante de su péptido señal de secreción, respectivamente. Estas cepas se sembraron en el medio rico 2xYTG, con una capa superficial de suspensión de PHB. Como se puede observar por la aparición de halos translúcidos, el clon pEPNV1 (A) produce y secreta la PHB despolimerasa PhaZ_{Sex} de forma constitutiva (sin necesidad de inducción) y sin estar sujeta su expresión a ningún tipo de represión catabólica, a diferencia del clon pEPNV2 (B), que produce la enzima sin péptido señal.

De esta forma se confirma definitivamente que la enzima PhaZ_{Sa}, codificada por *fbkU* es una PHB despolimerasa extracelular, como apuntaban las búsquedas por homología de secuencia

en las bases de datos, dado que es capaz de degradar dPHB. Asimismo se confirma el éxito del sistema de expresión heteróloga de las PHB despolimerasas PhaZ_{So} y PhaZ_{Sex}, que por primera vez son expresadas en un hospedador Gram positivo, dando lugar a ambas enzimas exclusivamente en forma soluble y extracelular.

2.3 Secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

La secuenciación, mediante degradación secuencial de Edman, de los 17 aminoácidos situados en el extremo N-terminal de las proteínas recombinantes maduras PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, producidas en *Rhodococcus* sp. T104, dio como resultado las secuencias indicadas en la *tabla 4*. Ambas secuencias coinciden exactamente con lo predicho por el servidor SignalP 4.1. La presencia y longitud exacta del péptido señal de PhaZ_{Sex}, de 26 aminoácidos, se confirma respecto a anteriores trabajos, y se describe por primera vez el péptido señal de PhaZ_{So}, que resulta ser inusualmente largo, con 58 aminoácidos.

PHB despolimerasa	Secuencia N-terminal
PhaZ _{Sex}	A V P A P T P G S L Q Q Y N I G S
PhaZ _{So}	A A G L A K P G L T K A D L T E V

2.4 Análisis de un posible codón alternativo de inicio de la traducción de PhaZ_{So}

El extremo N-terminal de la proteína madura nos permite conocer el punto de corte en el cual se escinde el péptido señal al ser secretada la despolimerasa al medio extracelular, sin embargo, la considerable longitud del péptido señal de PhaZ_{So} deducida de la secuencia N-terminal sugiere que el punto de inicio de la traducción proteica pueda estar situado en una posición más avanzada de lo que en principio se asumió. Analizando la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de *fbkU* no se encuentra ningún codón de inicio estándar ATG, sin embargo si se puede localizar otro posible codón de inicio alternativo GTG, muy frecuente en genes de actinomicetos. Este posible codón de inicio alternativo se localiza en la posición 97-99 del posible marco abierto de lectura, además está precedido por una secuencia GGAGC, muy similar a la consenso de unión al ribosoma (GGAGG) y a una distancia de 7 bases, compatible con esta función de inicio de la traducción.

Para comprobar cuál de los posibles codones de inicio está funcionando en nuestro sistema de expresión se construyó mediante PCR una nueva versión del plásmido pHPNV llamada pHPNV*GTG, conteniendo el gen *fbkU* bajo el control del promotor *ermE**, pero con una

secuencia codificante del péptido señal más corta, y conservando el posible sitio de unión del ribosoma (GGAGC) localizado 7 bases antes del codón GTG. Con esta construcción se pretendió expresar PhaZ_{So} con un péptido señal de tan solo 26 aminoácidos, longitud exactamente coincidente con el descrito en PhaZ_{Sex}. Analizando esta nueva secuencia resultante mediante el servidor SignalP 4.1, encontramos que el péptido señal sigue siendo reconocido con el mismo punto de corte y un elevado valor de confianza.

Sin embargo, al intentar expresar esta construcción en *Rhodococcus* sp. T104 no se detectó ninguna actividad PHB despolimerasa en el caldo de fermentación ni en ninguno de los extractos celulares ensayados. Adicionalmente, se analizó mediante SDS-PAGE el caldo de 72 horas de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV*GTG sin hallar ninguna proteína del tamaño aproximado de PhaZ_{So}, indicando la ausencia de expresión con el codón alternativo propuesto.

2.5 Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante cromatografía de intercambio aniónico

En primer lugar se abordó la purificación de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} por intercambio aniónico, a partir del caldo de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 o pHPNV, cultivados durante 3 días y concentrados en lecho seco de polietilenglicol 35.000. Dos intercambiadores aniónicos diferentes se emplearon con este propósito:

2.5.1 DEAE-Sepharose: Este intercambiador aniónico débil está activado con grupos dietil aminoetil, cargados positivamente, por lo que se debe usar a un pH al que la proteína de interés presente una carga neta negativa; como las formas maduras de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} presentan valores teóricos de pI de 5,26 y 5,31, respectivamente, se desarrollaron estas purificaciones en tampón Tris-HCl a pH 8. Para estas pruebas preliminares, el soporte cromatográfico se empleó en discontinuo, tomando una alícuota de resina activada con DEAE donde se cargó la muestra, procediendo a los lavados y la elución, sin aplicar un flujo a través de dicha resina.

Ninguna de las PHB despolimerasas se une eficazmente al soporte con DEAE, casi la totalidad de estas enzimas se recupera con el eluido de carga y los sucesivos lavados. Sin embargo, una cantidad muy minoritaria de PhaZ_{So} parece adsorberse al soporte, ya que al aplicar un volumen de tampón con una concentración 0,25 M de NaCl se aprecia un tenue halo de hidrólisis debido a la elución de esta fracción de PhaZ_{So} unida débilmente al DEAE.

2.5.2 Amonio cuaternario-metacrilato: Para potenciar la adsorción electrostática de PhaZ_{So} a un intercambiador aniónico, se realizó esta prueba en continuo con un soporte activado con

grupos amonio cuaternario, considerado un intercambiador aniónico fuerte. Se llevó a cabo únicamente con el caldo dializado y concentrado de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV, productor de PhaZ_{So}. Se empleó un cartucho preempaquetado Econo-pac High Q (Bio-Rad) de 5 mL de lecho, en el que se cargaron 5 mL del caldo de fermentación, equilibrado a pH 8. Tras llevar a cabo los lavados y la elución en gradiente ascendente de concentración de 0 a 0,25 M de NaCl se analizaron las distintas fracciones mediante ensayo de actividad en placa y SDS-PAGE.

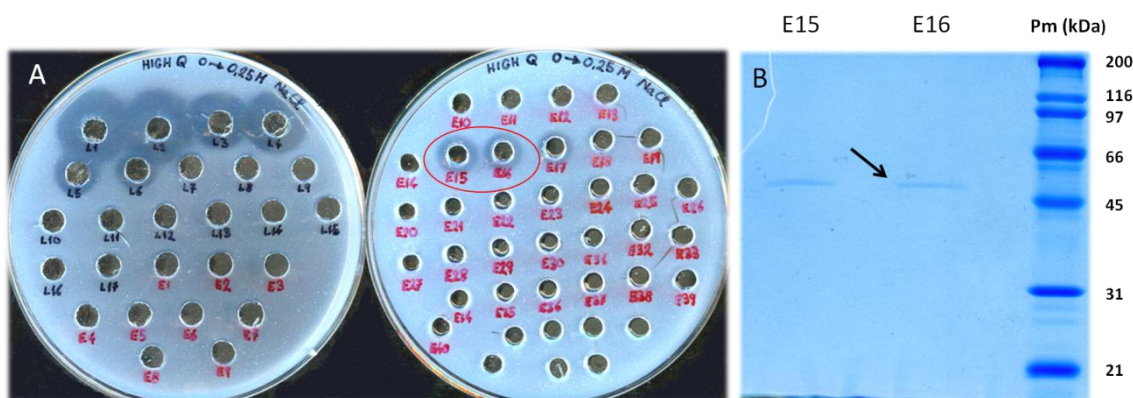


Figura 25: Purificación de PhaZ_{So} mediante intercambio aniónico en cartucho High Q (Bio-Rad) de amonio cuaternario-metacrilato. **A.** Ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa de los lavados (L1-17, rotulados en negro) y la elución en gradiente ascendente de concentración de NaCl (E1-40, rotulados en rojo). La elipse roja marca las fracciones de elución con actividad. **B.** Análisis SDS-PAGE de las fracciones de elución con actividad PHB despolimerasa E15 y E16. A la derecha se muestra el patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad). La flecha indica la banda correspondiente a PhaZ_{So}.

En la *figura 25* se constata que PhaZ_{So} no interacciona eficazmente con el soporte y la mayoría de enzima eluye durante los lavados. Sin embargo, se observa de nuevo una pequeña proporción de PHB despolimerasa que sí se mantiene adsorbida a la matriz, y eluye al principio del gradiente, cuando la concentración de NaCl alcanza aproximadamente 90 mM. Se analizaron las fracciones que presentaban actividad mediante SDS-PAGE (*Figura 25*). Para ello, se precipitaron las proteínas de 100 µL de cada muestra y del caldo de fermentación con acetona fría, y se cargó todo el sedimento en un gel. Se puede ver que PhaZ_{So} eluyó con una baja concentración, pero aparentemente muy pura, sin rastro visible de proteínas contaminantes.

2.6 Purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante cromatografía de interacción hidrofóbica

Ambas PHB despolimerasas fueron purificadas desde el caldo de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 (productor de PhaZ_{Sex}) o pHPNV (productor de PhaZ_{So}), mediante

cromatografía de interacción hidrofóbica. Con este fin se optó por una estrategia de purificación en dos etapas. En primer lugar, se realizó una etapa de captación de la enzima, mediante un soporte de tamaño medio de partícula de 90 μm (FF) en la que separamos las PHB despolimerasas del caldo de cultivo, desechando muchas proteínas contaminantes así como gran parte de los elementos no proteicos presentes en el caldo de fermentación (principalmente sacáridos, lípidos y ácidos nucleicos), obteniendo nuestra enzima de interés en solución tamponada que contenía una concentración de sulfato amónico por debajo de 0,5 M. En segundo lugar se llevó a cabo una fase de pulido, en la que se empleó un soporte con un tamaño medio de partícula de 34 μm (HP), que permite una elevada resolución, y proporciona un gran nivel de pureza y concentración.

Para el primer paso de las purificaciones de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St} se preparó una columna con 100 mL de lecho de octil FF Sepharose, en la que se aplicó un litro de caldo de fermentación de 72 horas de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1 o pHPNV con sulfato amónico 0,5 M. Tras lavar la columna con el tampón de equilibrado, se procedió a retirar gradualmente el sulfato amónico, permitiendo la desorción de las proteínas retenidas. Las fracciones que presentaron actividad PHB despolimerasa en placa fueron analizadas por SDS-PAGE (figuras 26 y 27), y aquellas que presentaban una cantidad detectable de PHB despolimerasa fueron acumuladas y preparadas para el segundo paso de la purificación mediante la adición de sulfato amónico hasta restablecer una concentración de 0,5 M.

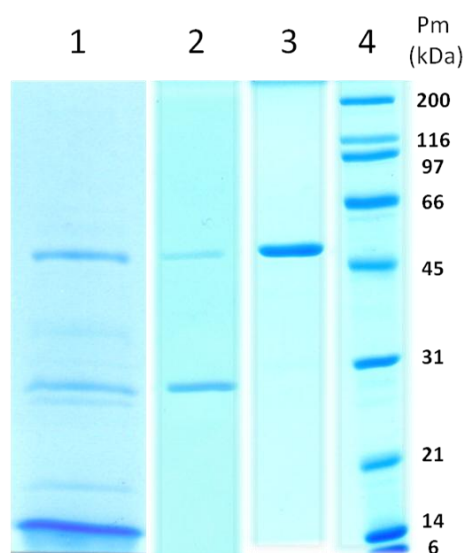


Figura 26: Análisis SDS-PAGE de fracciones de las distintas fases de la purificación de PhaZ_{Sex}. **1.** Caldo de cultivo de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1. **2.** Fracción eluída tras el primer paso de la purificación en octil Sepharose FF. **3.** PhaZ_{Sex} pura tras el segundo paso de la purificación en butil Sepharose HP. **4.** Patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad).

El segundo paso de la purificación de PhaZ_{Sex} consistió en cargar la muestra obtenida en el primer paso en un cartucho de 5 mL de butil HP Sepharose. Esta aplicación se dividió en tres tandas iguales de aproximadamente 110 mL, debido al gran volumen de muestra obtenido tras el primer paso de la purificación, con el fin de procesar toda la muestra sin saturar de proteína la columna empleada. Tras cargar cada una de las tres alícuotas de muestra se llevó a cabo el protocolo de elución en gradiente decreciente de concentración de sulfato amónico, analizando la actividad y pureza de las fracciones resultantes mediante ensayo de actividad en placa y SDS-PAGE (Figura 26). De esta forma conseguimos obtener fracciones de PhaZ_{Sex} que presentaban un alto grado de pureza.

El segundo paso de la purificación de PhaZ_{So} empleó un cartucho de fenil HP Sepharose, en este soporte se cargaron alícuotas de 50 mL de las fracciones seleccionadas, procedentes de los 390 mL obtenidos en la primera etapa. Tras llevar a cabo el lavado de la columna y el gradiente de concentración de sulfato amónico, PhaZ_{So} se eluyó del soporte con una homogeneidad electroforética total (Figura 27).

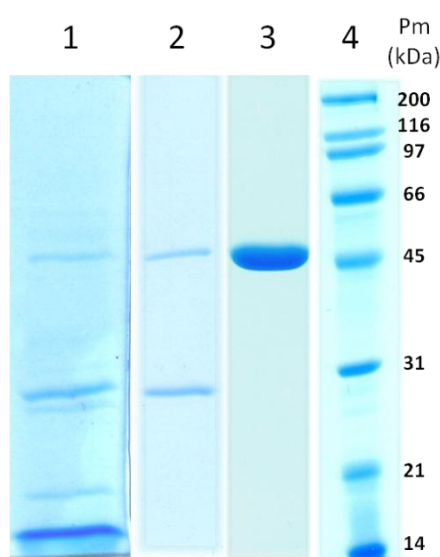


Figura 27: Análisis SDS-PAGE de fracciones de las distintas fases de la purificación de PhaZ_{So}. **1.** Caldo de cultivo de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV. **2.** Fracción eluída tras el primer paso de la purificación en octil Sepharose FF. **3.** PhaZ_{So} pura tras el segundo paso de la purificación en fenil Sepharose HP. **4.** Patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad).

Tabla 5: Tabla de purificación de PhaZ_{Sex}

Fracción	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Caldo de fermentación	1.093	35,89	12	13.456	375	1,0	100
Octil Sepharose	334	16,57	50	16.715	1.009	2,7	124
Butil HP Sepharose	130	6,25	86	11.122	1.779	4,7	83

Las tablas con los rendimientos resultantes de la purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se muestran a continuación (Tablas 5 y 6).

Tabla 6: Tabla de purificación de PhaZ_{So}

Fracción	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Caldo de fermentación	1.093	68,43	103	100.450	1.468	1,00	100
Octil Sepharose	390	12,13	176	68.510	5.649	3,85	68
Fenil HP Sepharose	220	6,10	172	37.876	6.212	4,23	38

2.7 Inmunodetección de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Para permitir la detección específica de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante Western blot en las aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas, se generaron anticuerpos policlonales en conejo. Una vez preadsorbidos los antisueros con caldo de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pNV19, se llevó a cabo su titulación con el fin de comprobar su efectividad y encontrar una dilución adecuada para su uso. Las proteínas presentes en alícuotas de las PHB despolimerasas purificadas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para proceder a su inmunodetección. Adicionalmente se llevó a cabo la inmunodetección de PhaZ_{Sex} en fracciones de los distintos pasos cromatográficos de su purificación (Figura 28).

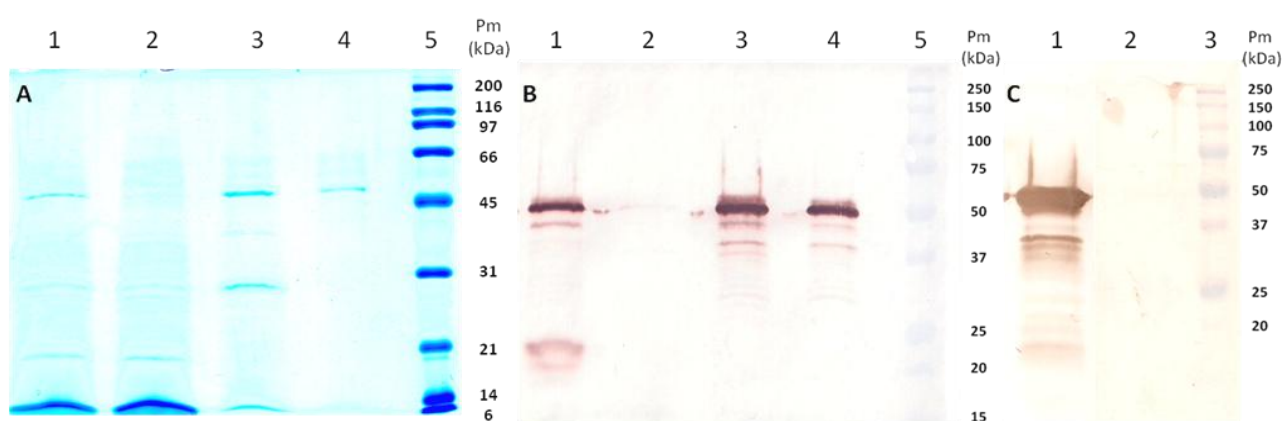


Figura 28: Inmunodetección de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante Western blot en membranas de nitrocelulosa. **A.** SDS-PAGE de las etapas de purificación de PhaZ_{Sex}. Carril 1: caldo de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pEPNV1, carril 2: caldo de *Rhodococcus* sp. T104 pNV19 (control negativo), carril 3: fracción de elución de octil Sepharose FF, carril 4: fracción de elución de butil Sepharose HP, carril 5: patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad). **B.** Western blot de las etapas de purificación de PhaZ_{Sex}, con antisuero diluido 1/50.000. Carriles 1 a 4 igual que en A, carril 5: patrón preteñido de pesos moleculares Precision Plus All Blue (Bio-Rad). **C.** Western blot de PhaZ_{So}, con antisuero diluido 1/10.000. Carril 1: fracción de elución de PhaZ_{So} en butil Sepharose HP, carril 2: caldo de fermentación de *Rhodococcus* sp. T104 pNV19 (control negativo), carril 3: patrón de pesos moleculares Precision Plus All Blue (Bio-Rad).

Como se observa en la figura, ambos antisueros producen una fuerte señal con la correspondiente PHB despolimerasa empleando diluciones 1/50.000 en la membrana de PhaZ_{Sex} y 1/10.000 en la de PhaZ_{St}. En cambio no producen ninguna señal ante el caldo control de *Rhodococcus* sp. T104 pNV19. Se pueden apreciar bandas de menor tamaño con una señal débil incluso en las muestras de proteína purificada, lo que puede deberse a la presencia de fragmentos de proteólisis de las despolimerasas, o impurezas no detectables mediante tinción con azul de Coomassie. El antisuero de PhaZ_{St} con dilución 1/10.000 produce una señal muy intensa y cierto ruido de fondo, por lo que se debería diluir al menos hasta 1/50.000 para lograr una detección más específica.

3. Caracterización funcional y estructural de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

3.1 Espectros de absorción ultravioleta-visible de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

Los espectros de absorción a longitudes de onda entre 200 y 600 nm de las PHB despolimerasas purificadas fueron analizados mediante un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800. Los espectros de ambas enzimas mostraron un único pico de absorción en este intervalo, con un máximo cerca de los 280 nm (*Figura 29*). En ambos espectros se puede distinguir el característico hombro de absorción a 290 nm debido a la presencia de 8 y 9 triptófanos en la estructura primaria de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St} respectivamente.

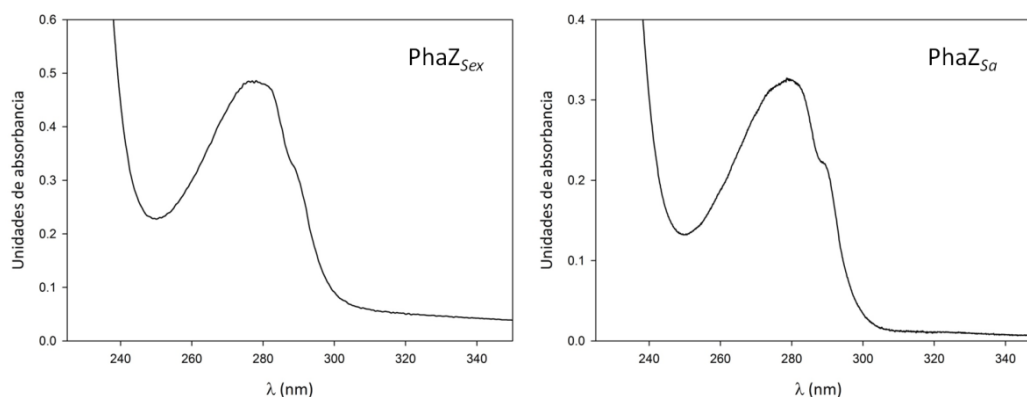


Figura 29: Espectros de absorción ultravioleta de alícuotas de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{St} (derecha) purificadas.

3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

Una vez purificadas las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St} maduras, estas fueron analizadas por MALDI-TOF para determinar de una manera más precisa su masa molecular, así como para evaluar el estado de oligomerización de la forma activa de estas enzimas. Como se puede apreciar en la (*Figura 30*), PhaZ_{Sex} presenta una masa molecular de 48.421 Da, mientras que

PhaZ_{So} exhibe una masa de 48.405 Da. Estas masas pertenecen a los picos mayoritarios de cada espectro, y concuerdan con las masas moleculares teóricas deducidas de la secuencia de aminoácidos de cada enzima con un error de +1,08% y +0,84%, respectivamente.

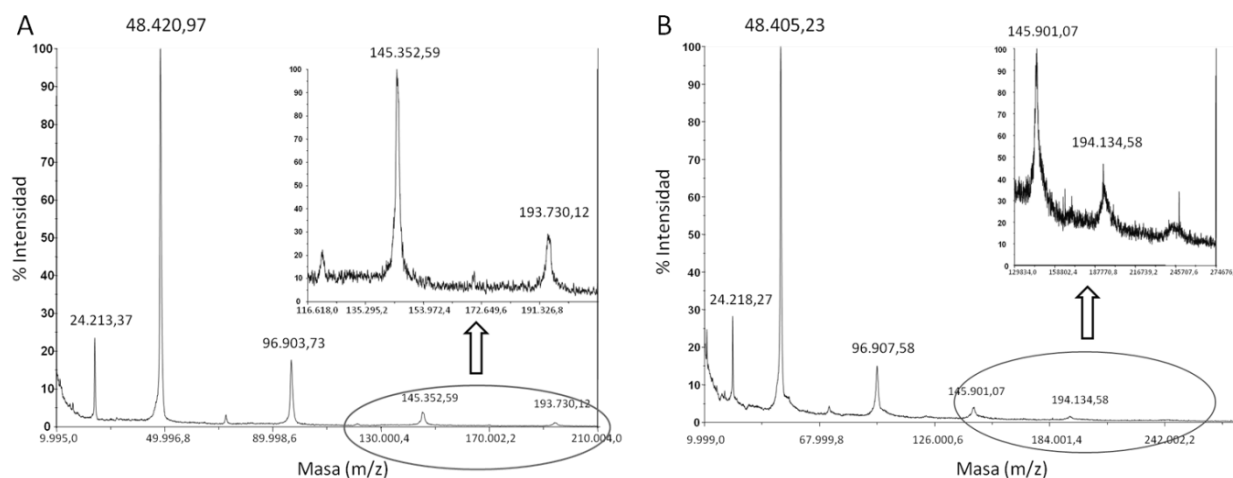


Figura 30: Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de alícuotas purificadas de PhaZ_{Sex} (A) y PhaZ_{So} (B). Las regiones con picos minoritarios correspondientes a oligómeros se muestran ampliadas en la gráfica.

Estos picos mayoritarios corresponden claramente con la forma monomérica de la enzima, no obstante también se pueden observar picos minoritarios correspondientes a agregados o aductos de hasta cuatro moléculas de enzima, todos con una intensidad de señal inferior al 20% de la obtenida por el monómero. Asimismo, en ambos espectros se detectan también picos con la mitad de masa aparente que el monómero. Dichos picos corresponden a los monómeros que han adquirido dos cargas positivas en lugar de sólo una durante el proceso de ionización, de forma que al representar la relación masa/carga (m/z), ésta tiene un valor de la mitad de la masa molecular de la proteína. Estos resultados confirman la naturaleza monomérica de la forma activa de estas enzimas.

3.3 Cromatografía de filtración en gel de PhaZ_{Sex}

El análisis MALDI-TOF de PhaZ_{Sex} apunta claramente a una forma activa monomérica, pero también se detectaron picos pertenecientes a agregados oligoméricos. Para descartar definitivamente la existencia de una forma activa oligomérica, se sometió una alícuota de PhaZ_{Sex} purificada a una separación por cromatografía de filtración en gel en una columna Superose 12 10/300 GL mediante la cual las posibles formas oligoméricas pueden ser fácilmente separadas de la monomérica. Tras la cromatografía se representó la absorbancia a

280 nm de cada fracción así como su actividad PHB despolimerasa mediante el ensayo de actividad turbidimétrico (Figura 31).

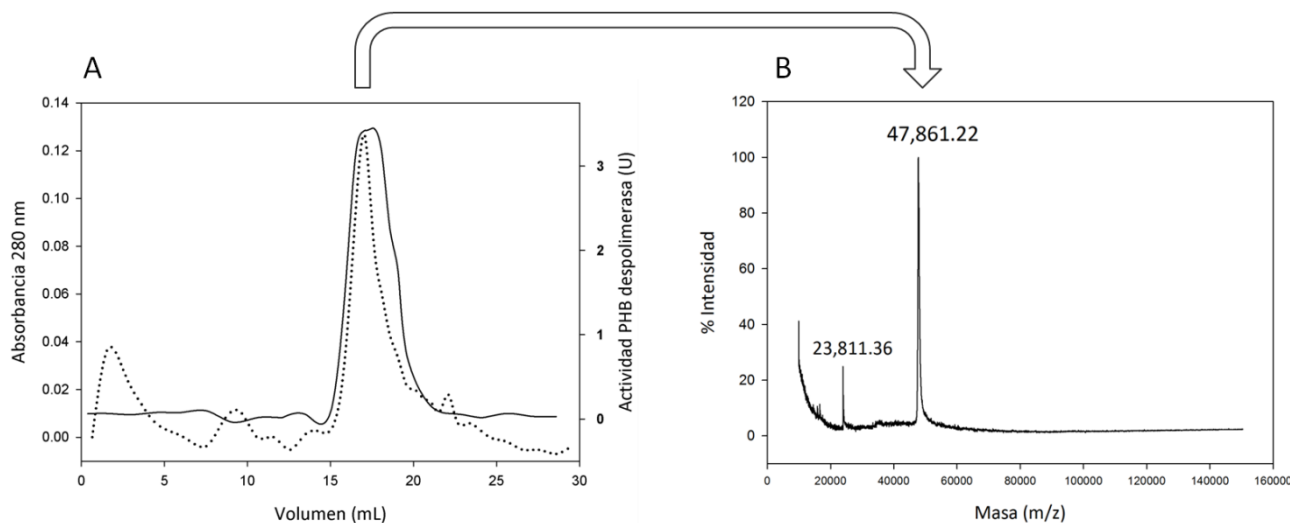


Figura 31: A. Perfil de elución de una muestra purificada de PhaZ_{Sex} aplicada en una columna de filtración en gel Superose 12 10/300 GL. Se representa la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas (línea de puntos) así como la actividad PHB despolimerasa de dichas fracciones (línea continua). B. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF de una de las fracciones correspondientes al pico de actividad PHB despolimerasa obtenido tras la filtración en gel.

Un único pico tanto de absorbancia como de actividad pudo ser detectado en este experimento. Una alícuota de la fracción con mayor actividad se sometió entonces a un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF, obteniendo el espectro que se muestra en la figura 31. En este espectro encontramos un pico mayoritario de 47.861 Da, coincidiendo con el monómero de PhaZ_{Sex} con una diferencia de -0,09% respecto a la masa teórica. También se observa el pico correspondiente a PhaZ_{Sex} con doble carga, que presenta un valor de m/z de la mitad que el pico mayoritario. Este experimento confirma definitivamente la naturaleza monomérica de la forma activa de PhaZ_{Sex}.

3.4 Ultracentrifugación analítica de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Muestras de PhaZ_{Sex} purificada con una concentración de 300 µg/mL y de PhaZ_{Sa} con tres concentraciones diferentes (65, 129 y 259 µg/mL) fueron sometidas a pruebas de velocidad de sedimentación para analizar las posible existencia de formas oligoméricas o agregados, así como para obtener información acerca del tamaño molecular aproximado y forma global de ambas PHB despolimerasas.

Al representar los resultados de la muestra de PhaZ_{Sex} mediante el programa SEDFIT se puede apreciar un pico mayoritario (53,4% del área total) correspondiente a la forma monomérica de la enzima, con un coeficiente de sedimentación de 3,32 S, un tamaño molecular estimado de 40,2 kDa (Figura 32) y una forma general de tipo globular. Se pueden observar otros dos picos adicionales de pequeño tamaño (3 y 14 kDa) que pueden ser generados por péptidos u otras moléculas contaminantes presentes en la muestra.

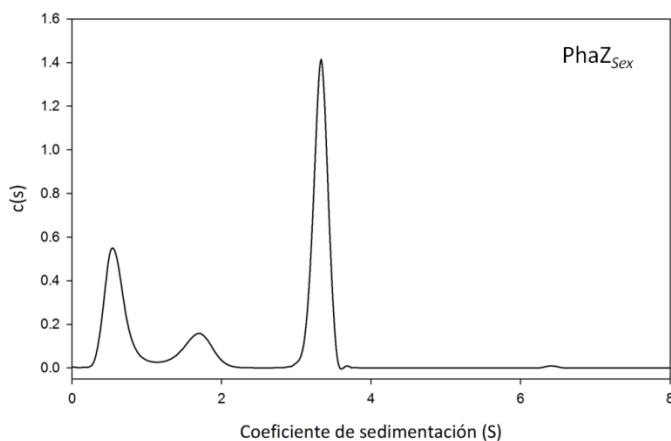


Figura 32: Análisis de la velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de una muestra purificada de PhaZ_{Sex} con una concentración de 300 µg/mL.

En el caso de PhaZ_{So} muestras de varias concentraciones fueron sometidas al análisis, con resultados muy similares (Figura 33).

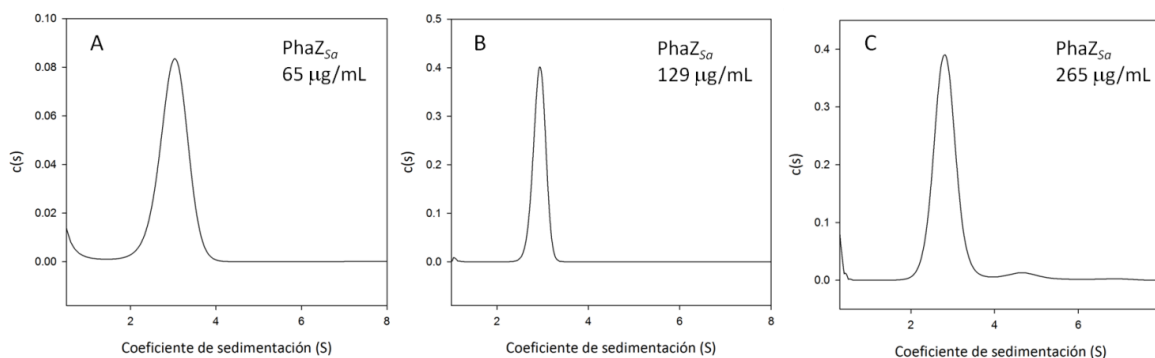


Figura 33: Análisis de la velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de muestras purificadas de PhaZ_{So} con tres concentraciones distintas: 65 µg/mL (A), 129 µg/mL (B) y 265 µg/mL (C).

En la muestra a 65 µg/mL solo aparece un pico, correspondiente al monómero de PhaZ_{So}, con un coeficiente de sedimentación de 2,98 S y un tamaño aproximado de 43 kDa. Con la concentración intermedia, de 129 µg/mL, aparece de nuevo una única especie molecular

(Figura 33), con coeficiente de sedimentación de 2,93 S y 39,6 kDa. Finalmente con la concentración más elevada, 259 $\mu\text{g/mL}$, encontramos el pico mayoritario del monómero, de 2,82 S y 45,8 kDa, y un pico muy minoritario, representando el 5,1% del área total, con un tamaño aproximado de 100,9 kDa, y que podría corresponder a un dímero formado por agregación a esta concentración proteica, como ya se observó mediante MALDI-TOF.

3.5 Estudios de dicroísmo circular

Con el fin de determinar experimentalmente la estructura secundaria general de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{SA}, se obtuvieron sus espectros de dicroísmo circular mediante un espectropolarímetro en el intervalo de longitudes de onda ultravioleta lejano, a 25°C (Figura 34).

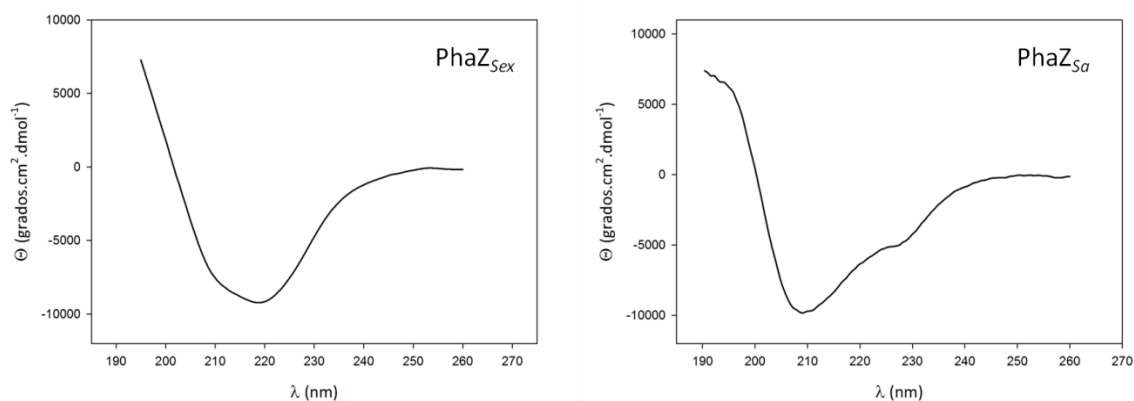


Figura 34: Espectros de dicroísmo circular en la región ultravioleta lejano de muestras purificadas de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{SA} (derecha).

Para la obtención de los porcentajes estructurales de cada PHB despolimerasa se realizó la deconvolución de los espectros de dicroísmo circular mediante el programa CDNN 2.1, hallando los valores estructurales recogidos en la *tabla 7*. Los resultados sugieren estructura mixta α/β (Richardson 1981) en ambas enzimas, predominando las α -hélices en PhaZSex y las láminas β en el caso de PhaZSA, siendo las láminas β mayoritariamente paralelas en ambas PHB despolimerasas.

Una vez establecidos los espectros de dicroísmo circular, se hallaron los mínimos de dichos espectros, la longitud de onda a la que cada enzima produce mayor desviación de la luz polarizada, siendo estos valores 218,8 nm para PhaZ_{Sex} y 209,0 nm en el caso de PhaZ_{SA}. Midiendo la elipticidad de las muestras de enzima a dichas longitudes de onda se realizó un barrido progresivo de temperaturas desde 25 hasta 85°C, para analizar la variación de la señal con el aumento de la temperatura, y así monitorizar la desnaturalización térmica de las PHB despolimerasas.

Tabla 7: Porcentajes de estructuras secundarias de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} obtenidos por dicroísmo circular

	PhaZ _{Sex}	PhaZ _{So}
α -hélice	25.8	16.7
Lámina β paralela	15.7	26.8
Lámina β antiparalela	5.5	5.3
Giro β	17.2	19.8
Ovillo al azar	35.4	31.2

Mediante este análisis se halló la temperatura media de desnaturalización (T_m) de las enzimas; PhaZ_{Sex} presenta una desnaturalización aparentemente bifásica, con un valor de T_m de 55,8°C en la primera fase y 70,0°C en la segunda. Por su parte, PhaZ_{So} presenta una desnaturalización simple con un único valor de T_m de 58,4°C (Figura 35).

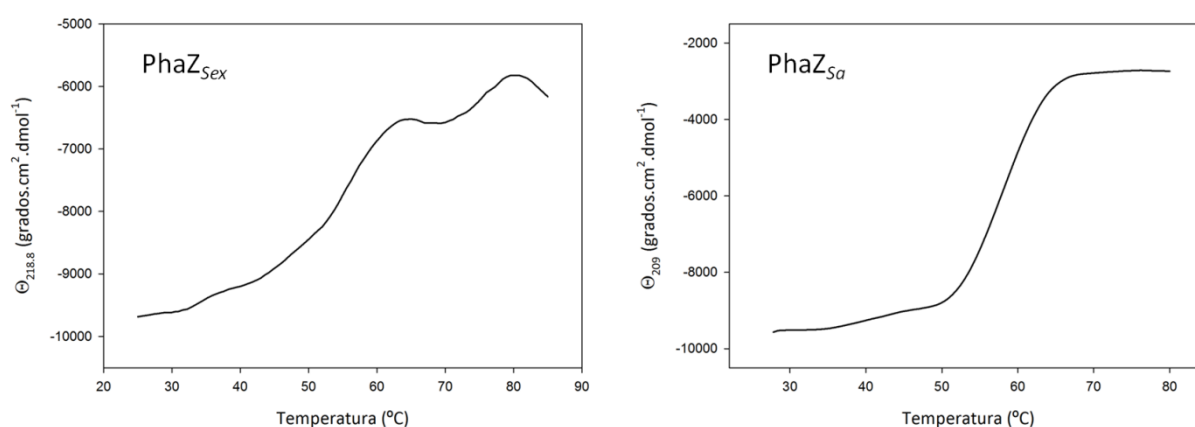


Figura 35: Desnaturalización térmica de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{So} (derecha) a temperaturas entre 25 y 85°C, monitorizada mediante la variación de señal de dicroísmo circular a 218.8 nm para PhaZ_{Sex} y a 209.0 nm para PhaZ_{So}.

3.6 Predicción de la estructura secundaria de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

La estructura secundaria de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fue estimada mediante distintos servidores y herramientas bioinformáticas: PSIPRED (disponible en bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) (McGuffin *et al.* 1999), Jpred3 (disponible en www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred) (Cole *et al.* 2008) y PredictProtein (Rost *et al.* 2004), una colección de herramientas de predicción de estructura disponible en www.predictprotein.org.

El contenido global de α -hélices, láminas β y otros tipos de estructura secundaria calculado mediante estas herramientas se muestra en la *tabla 8*. De forma general, los resultados muestran contenidos moderados tanto de α -hélices como de láminas β , siendo mayoritarias otras estructuras como los giros β o el ovillo al azar. Todos los servidores predicen mayor presencia de láminas β que de α -hélices en ambas despolimerasas, al contrario de lo estimado mediante dicroísmo circular en el caso de PhaZ_{Sex}.

Tabla 8: Comparación de los porcentajes de estructuras secundarias de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} obtenidos por métodos experimentales y predictivos

	Tipo de estructura	DC	PSIPRED	Jpred3	PredictProtein
PhaZ _{Sex}	α-hélice	25,8	22,1	16,2	10,2
	Lámina β	21,2	34,2	24,2	29,2
	Otros	52,7	43,7	59,6	60,6
PhaZ _{So}	α-hélice	16,7	12,4	11,5	8,2
	Lámina β	32,1	27,1	29,9	23,4
	Otros	51,0	60,5	58,6	68,3

3.7 Evaluación de los efectos del pH sobre la actividad y estabilidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Se estudió el efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} recombinantes mediante ensayos turbidimétricos de actividad en un sistema que emplea los tampones citrato, fosfato y borato simultáneamente, con una concentración 20 mM de cada compuesto, a diferentes valores de pH, a 40°C y una fuerza iónica constante de 120 mM.

Los perfiles de actividad frente a pH de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} se muestran en la *figura 32*. PhaZ_{Sex} mostró mayor actividad a valores alcalinos de pH, entre 7,5 y 9, siendo óptima a pH 8, mientras que PhaZ_{So} desarrolló su máxima actividad a pH 6, valor ligeramente ácido.

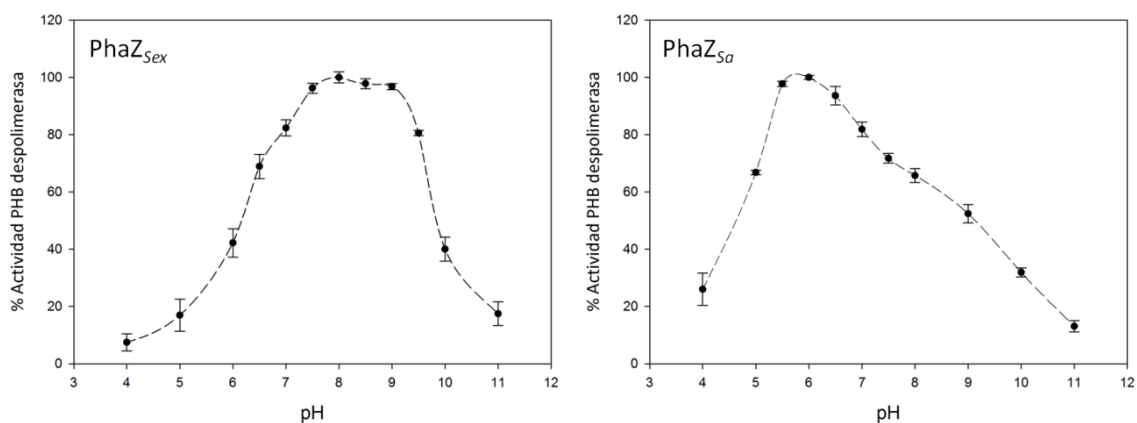


Figura 36: Perfil de actividad frente a distintos valores de pH de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{So} (derecha).

El efecto del pH sobre la estabilidad de las PHB despolimerasas se analizó mediante incubaciones de 45 minutos de alícuotas de enzima purificada a diferentes valores de pH, para a continuación evaluar la actividad residual al pH óptimo de cada enzima mediante el ensayo turbidimétrico estándar (*Figura 37*). PhaZ_{Sex} muestra una buena estabilidad a valores básicos de pH, sin embargo esta estabilidad se ve comprometida a valores de pH por debajo de 6. En

cambio, PhaZ_{St} se mantiene estable tras las incubaciones en todo el rango de valores de pH ensayados, de 4,5 a 9, sin mostrar ningún descenso aparente en su actividad.

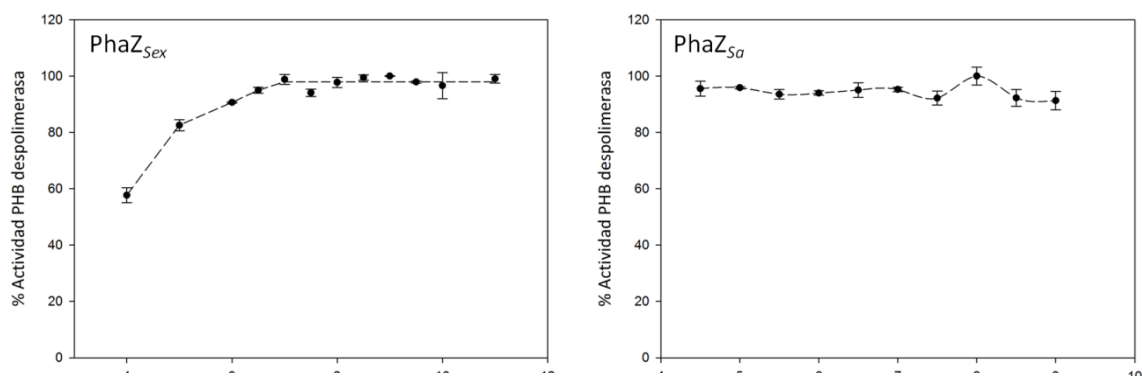


Figura 37: Estabilidad a distintos valores de pH de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{St} (derecha). Alícuotas de enzima pura fueron incubadas al pH correspondiente en hielo durante 45 minutos para después ensayar su actividad en las condiciones óptimas de cada enzima mediante ensayo turbidimétrico estándar.

3.8 Evaluación de los efectos de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{St}

El perfil de actividad a temperaturas entre 25 y 75°C de ambas PHB despolimerasas se determinó al pH óptimo de cada enzima, los resultados se muestran en la (Figura 38).

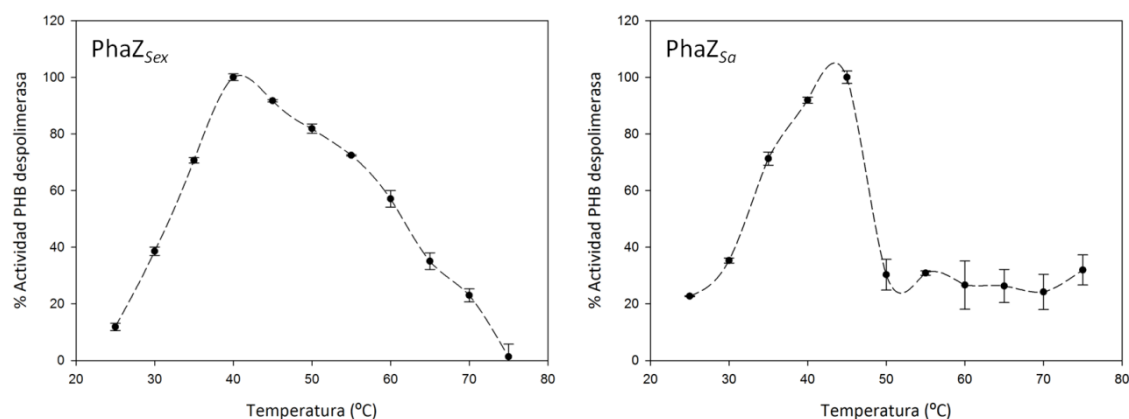


Figura 38: Perfil de actividad a distintas temperaturas de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{St} (derecha).

PhaZ_{Sex} exhibe su máxima actividad a 40°C, mientras que PhaZ_{St} presenta un óptimo de actividad a 45°C. PhaZ_{Sex} exhibe una actividad notablemente más elevada a temperaturas entre 50 y 65°C, sin embargo cabe destacar que PhaZ_{St}, a pesar de sufrir una importante caída en su actividad por encima de 50°C, aparentemente es capaz de retener alrededor de un 25% de su actividad máxima hasta los 75°C.

Resultados

La estabilidad térmica de ambas despolimerasas se evaluó mediante incubación de alícuotas de enzima purificada a distintas temperaturas durante 45 minutos y posterior ensayo turbidimétrico de actividad (*Figura 39*). PhaZ_{Sex} se mantuvo estable hasta una temperatura de 50°C, a partir de la cual se vio claramente afectada, descendiendo gradualmente su estabilidad hasta su inactivación a los 70°C. PhaZ_{So} muestra un comportamiento similar, permaneciendo estable en estas condiciones hasta los 50°C, sin embargo a partir de este punto su estabilidad sufrió una caída más acentuada que en el caso de PhaZ_{Sex}, quedando casi totalmente inactivada tras la incubación a 60°C.

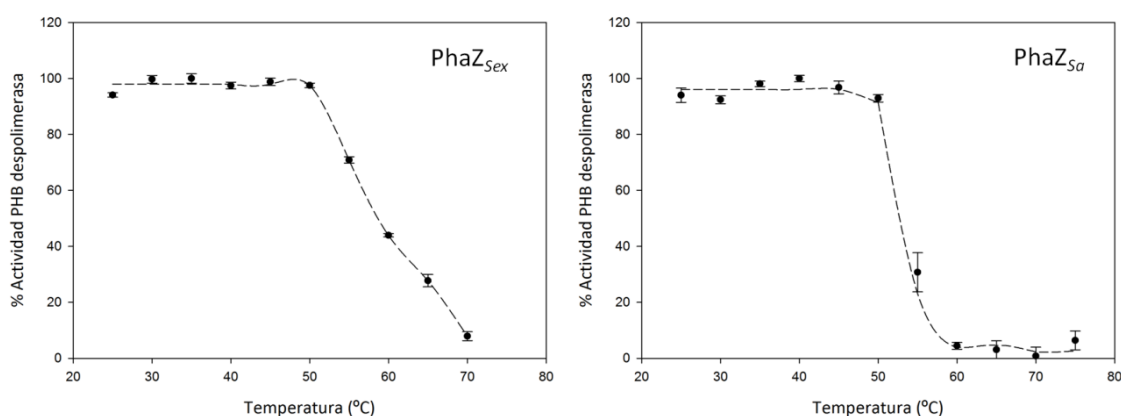


Figura 39: Estabilidad a distintas temperaturas de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{So} (derecha). Alícuotas de enzima pura fueron incubadas a la temperatura correspondiente durante 45 minutos para después ensayar su actividad en las condiciones óptimas de cada enzima mediante ensayo turbidimétrico estándar.

Asimismo se realizaron estudios de inactivación térmica a varias temperaturas: 50 y 55°C para PhaZ_{So} y 40, 50, 60 y 70°C en el caso de PhaZ_{Sex}. PhaZ_{Sex} presenta casi el 90% de su actividad después de 5 horas de incubación a 40°C, en cambio solo conserva una tercera parte de su actividad tras la incubación a 50°C durante el mismo periodo de tiempo, y un 13% tras la incubación a 60°C. PhaZ_{Sex} quedó totalmente inactivada tras ser incubada a 70°C durante aproximadamente 100 minutos (*Figura 40*). Por otro lado PhaZ_{So} mostró una mayor estabilidad a 50°C, reteniendo un 66% de actividad tras 4 horas de incubación, sin embargo esta despolimerasa sufrió una inactivación mucho más brusca a 55°C, con una fuerte caída inicial de actividad en la primera hora, y posteriormente conservando algo menos del 10% de su actividad inicial tras una incubación de 4 horas (*Figura 40*).

Adicionalmente se monitorizó la inactivación térmica de PhaZ_{Sex} a 40, 50 y 70°C en presencia de metil-β-ciclodextrina (MβCD) 5 mM, para evaluar un posible efecto estabilizador de este oligosacárido sobre la estructura de PhaZ_{Sex}. No se apreció ningún efecto protector de la ciclodextrina sobre PhaZ_{Sex} a las temperaturas ensayadas, obteniendo perfiles de inactivación

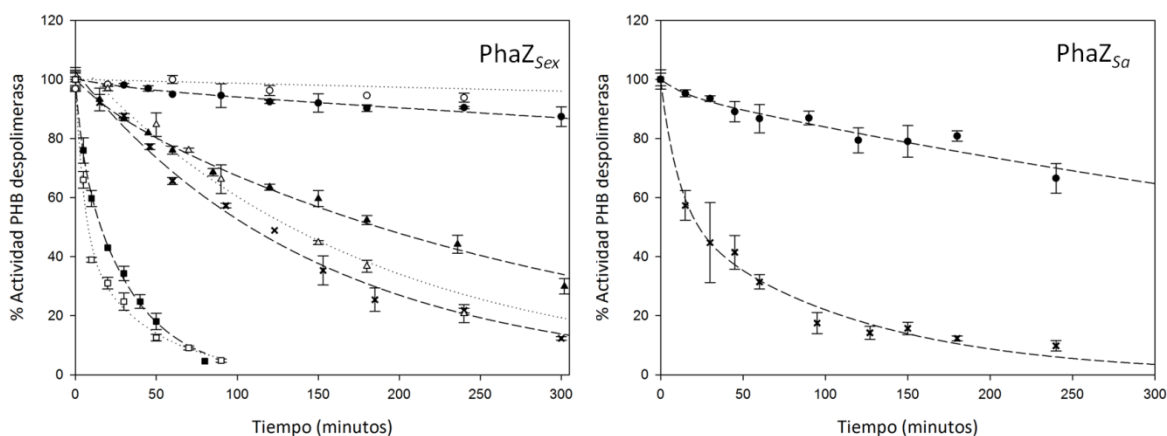


Figura 40: Estudios de inactivación térmica a distintas temperaturas de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{Sa} (derecha). La termoinactivación de PhaZ_{Sex} fue estudiada a cuatro temperaturas: 40 (●), 50 (▲), 60 (×) y 70°C (■). También fue monitorizada en presencia de metil-β-ciclodextrina 5 mM a 40 (○), 50 (△), y 70°C (□). En el caso de PhaZ_{Sa} (panel derecho) se estudió la inactivación térmica a 50 (●) y 55°C (×).

térmica bastante similares. Los datos de actividad de la termoinactivación fueron ajustados a un decrecimiento exponencial doble con cuatro parámetros, para estimar los tiempos de vida media que presentan estas enzimas a las distintas temperaturas ensayadas. Los resultados de estas cinéticas de inactivación se muestran en la *tabla 9*. El descenso de la actividad de las PHB despolimerasas recombinantes está, por lo tanto, ajustado a la siguiente fórmula general:

$$\% \text{ Actividad} = \alpha_1 \cdot e^{-k_1 t} + \alpha_2 \cdot e^{-k_2 t}$$

Donde α y k representan los parámetros de inactivación, y t es el tiempo en minutos.

Tabla 9: Constantes de desnaturalización y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} a distintas temperaturas

Enzima	Temperatura (°C)	α_1	α_2	$k_1 (\times 10^{-3})$	$k_2 (\times 10^{-3})$	$t_{1/2} (\text{min})$
PhaZ _{Sex}	40	2,62	97,56	29,3	0,4	1.744
	50	5,73	94,54	50,8	3,4	187
	60	50,71	51,93	6,7	6,7	108
	70	20,85	79,32	226,4	29,9	16
PhaZ _{Sa}	50	4,59	95,46	66,9	1,3	500
	55	42,62	57,32	110,4	9,6	22

3.9 Evaluación de los efectos de la fuerza iónica sobre la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

La actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} fue valorada mediante el ensayo turbidimétrico de actividad a distintos valores de fuerza iónica, obtenidos mediante concentraciones crecientes de cloruro sódico desde 0 hasta 3 M. Ambas enzimas mostraron un

descenso continuo y uniforme de su actividad conforme se incrementaba la fuerza iónica del medio de reacción, como se puede apreciar en la *figura 41*. La actividad remanente de ambas despolimerasas es inferior al 10% a una concentración de 2,5 M de NaCl.

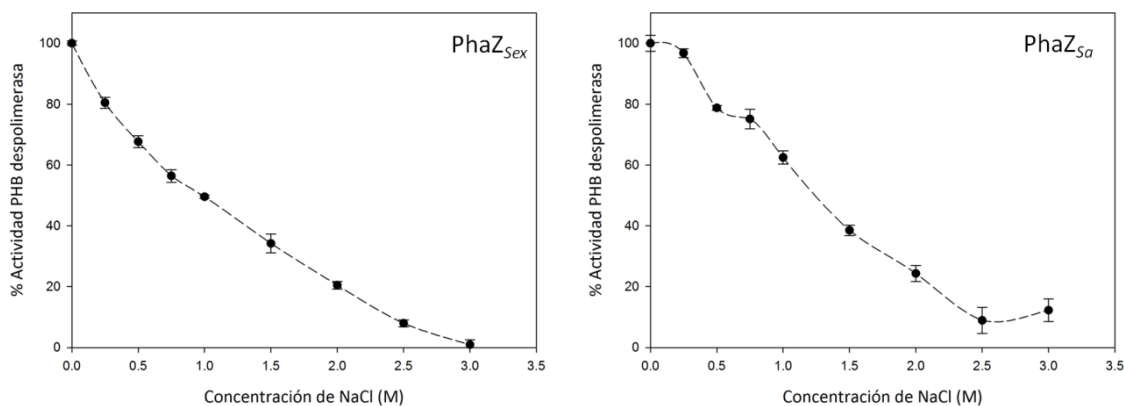


Figura 41: Perfil de actividad frente a fuerza iónica de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{Sa} (derecha). El incremento de fuerza iónica se logró con concentraciones crecientes de NaCl hasta 3 M.

3.10 Análisis de la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} en presencia de sales, disolventes, detergentes y otros compuestos

El efecto de distintos compuestos químicos a diferentes concentraciones sobre la actividad despolimerasa de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} fue analizado mediante el ensayo turbidimétrico de actividad. Los compuestos empleados fueron varios cloruros de cationes monovalentes o divalentes, EDTA, disolventes orgánicos, agentes reductores, detergentes y otros compuestos diversos como M β CD, sacarosa, almidón de maíz o PEG 3.350.

Se emplearon cinco sales en forma de cloruro para ensayar la actividad de las PHB despolimerasas, dos de ellas de cationes monovalentes (NaCl y KCl) y tres de cationes divalentes (CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂). Las concentraciones ensayadas fueron desde 0 a 10 mM para PhaZ_{Sex} y de 0 a 30 mM en el caso de PhaZ_{Sa}.

En la *figura 42* se puede apreciar cómo el magnesio produce un notable aumento de la actividad de PhaZ_{Sex} a las concentraciones ensayadas, llegando a obtener un 135% de la actividad control en presencia de MgCl₂ 5 mM. Con el calcio también se observó un incremento de actividad, pero solo concentraciones hasta 2 mM. En cambio, el manganeso parece producir un efecto inhibitorio sobre la actividad de PhaZ_{Sex}, reduciendo la actividad por debajo del 50% a 10 mM. Los cationes monovalentes, sodio y potasio, no parecen tener un efecto notorio sobre la actividad a estas bajas concentraciones.

En el caso de PhaZ_{SD} se puede observar que los tres cationes divalentes ensayados producen un fuerte incremento de la actividad, especialmente a concentraciones entre 2 y 5 mM, donde el nivel de actividad supera el 300%, a partir de ese punto se produce un descenso suave pero continuado en el efecto activador de estos cationes. La actividad de PhaZ_{SD}, al igual que la de PhaZ_{SEX}, no se ve afectada por las concentraciones de cationes monovalentes hasta 30 mM.

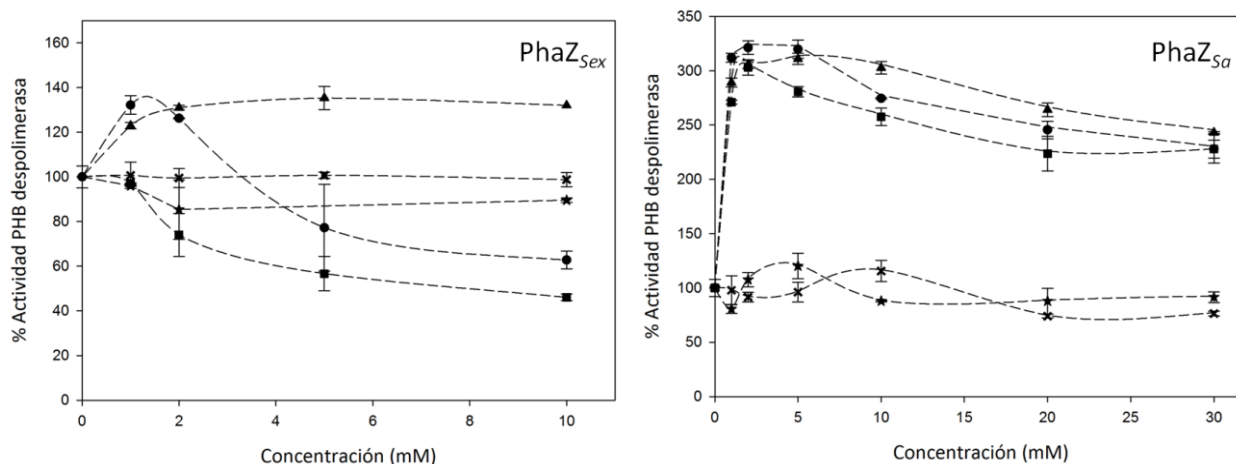


Figura 42: Actividad de PhaZ_{SEX} (izquierda) y PhaZ_{SD} (derecha) en presencia de distintas concentraciones de cloruros de cationes divalentes: magnesio (▲), calcio (●) y manganeso (■), o monovalentes: sodio (×) y potasio (★).

La actividad de ambas PHB despolimerasas en presencia de un 10% (v/v) de doce disolventes orgánicos miscibles en agua también fue ensayada con el método turbidimétrico, los resultados se muestran en la *tabla 11*. De los porcentajes de actividad registrados se infiere que PhaZ_{SD} tolera considerablemente mejor la presencia de disolventes en general, de hecho el metanol es el único disolvente al que PhaZ_{SEX} presenta mayor actividad que PhaZ_{SD}. En cualquier caso todos los disolventes empleados producen un descenso de actividad en ambas enzimas, aunque como única excepción, el descenso experimentado por PhaZ_{SD} con glicerol 10% es casi despreciable. De los disolventes ensayados, los mejor tolerados por ambas enzimas son el glicerol seguido del etilenglicol, y en tercer lugar el metanol para PhaZ_{SEX} y el tetrahidrofurano en el caso de PhaZ_{SD}. También cabe destacar los drásticos efectos de disolventes como el etanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida o acetona sobre la actividad de ambas enzimas.

La actividad de ambas PHB despolimerasas también fue ensayada en presencia de varias concentraciones de diversos compuestos. Los resultados obtenidos están recogidos en las *tablas 11 y 12*.

Tabla 10: Porcentaje de actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en presencia de distintos disolventes orgánicos al 10% (v/v)

Disolvente	PhaZ _{Sex}	PhaZ _{So}
Etilenglicol	39	72
Glicerol	69	97
Metanol	35	9
Etanol	15	16
DMSO	0	14
Dimetilformamida	4	15
Acetonitrilo	18	30
2-Propanol	6	29
Acetona	0	18
Tetrahidrofurano	0	49
Dietilenglicol	25	29
Trietilenglicol	11	24
Control	100	100

Actividad medida mediante el ensayo turbidimétrico de actividad realizando los correspondientes controles con disolventes y sin enzima.

Tabla 11: Efecto de distintas concentraciones de varios reactivos en la actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{Sex}*

Reactivo	Concentración	Actividad relativa (%)
Control	-	100
EDTA (+2 mM MgCl₂)	1 mM	80
	10 mM	74
	20 mM	76
Metil-β-ciclodextrina	1 mM	141
	5 mM	145
	10 mM	140
PEG 3.350	1 mM	117
	5 mM	118
	10 mM	75
Sacarosa	100 mM	85
DTT	1 mM	No detectada
	5 mM	
	10 mM	
2-Mercaptoetanol	1 mM	97
	5 mM	83
	10 mM	55
SDS	0,1 %	1,6
	1 %	0,4
	10 %	0
Tween-20	0,1 %	0

El efecto del agente quelante de metales EDTA sobre la actividad de las despolimerasas se analizó en presencia de 2 mM MgCl₂, ya que dichos efectos en ausencia de cationes divalentes no fueron concluyentes. PhaZ_{Sex} experimenta un descenso en su actividad del 20% a

concentraciones de EDTA a partir de 1 mM, acentuándose ligeramente dicha pérdida de actividad a concentraciones mayores, manteniéndose en un nivel en torno al 60% de actividad hasta 75 mM (*Figura 43*). Por su parte, PhaZ_{5a} sufre un efecto más acusado del EDTA sobre su actividad, que cae hasta el 18% con 10 mM de EDTA. A partir de esta concentración mantiene estable un nivel mínimo de actividad cercano al 15%, demostrando un mayor nivel de dependencia de PhaZ_{5a} con los metales divalentes en el medio de reacción.

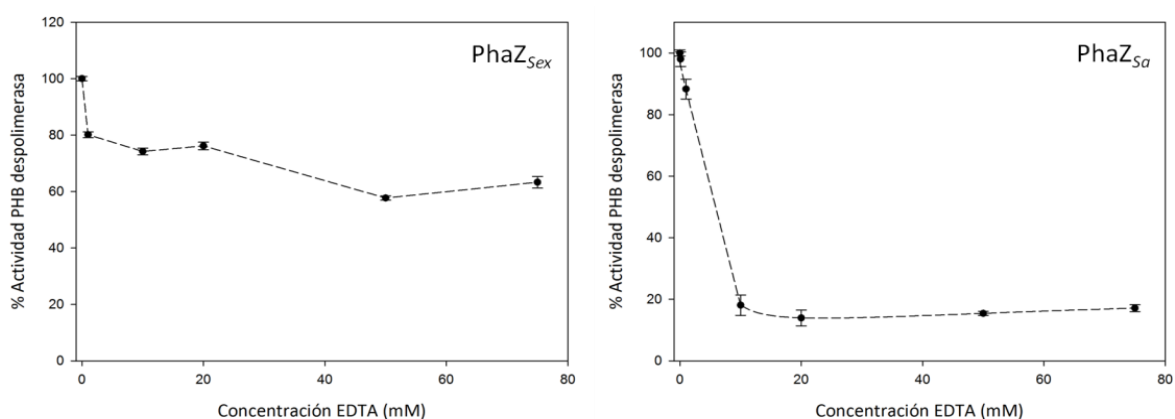


Figura 43: Actividad de PhaZ_{5sex} (izquierda) y PhaZ_{5a} (derecha) en presencia de distintas concentraciones de EDTA hasta 75 mM, con MgCl₂ 2 mM.

También se analizó la actividad de PhaZ_{5sex} y PhaZ_{5a} en presencia de dos agentes reductores, el 2-mercaptoetanol y el ditiotreitól (DTT). Como se muestra en las *tablas 11* y *12*, PhaZ_{5sex} pierde aproximadamente la mitad de su actividad en presencia de 2-mercaptoetanol 10 mM, mientras que PhaZ_{5a} exhibe una mayor tolerancia a este agente reductor, ya que es capaz de conservar más del 90% de su actividad hasta 10 mM. En el caso del DTT, un agente reductor más fuerte, la actividad de PhaZ_{5sex} es completamente suprimida a todas las concentraciones de DTT ensayadas, de 1 a 10 mM, en cambio, PhaZ_{5a} a pesar de mostrar mucha mayor sensibilidad al DTT que al 2-mercaptoetanol, conserva una cuarta parte de su actividad en presencia de DTT 10 mM, corroborando una mayor resistencia de PhaZ_{5a} a los agentes reductores comparada a la de PhaZ_{5sex}.

Se emplearon tres compuestos para determinar la actividad de las PHB despolimerasas en presencia de detergentes: un detergente aniónico, dodecilsulfato sódico (SDS), y dos detergentes no iónicos: Tween-20 y Triton X-100. En todos los casos las actividades de PhaZ_{5sex} y PhaZ_{5a} fueron drásticamente disminuidas por la presencia de cualquier detergente, anulando casi por completo su actividad desde concentraciones tan bajas como 0,1% (p/v para SDS y v/v para Tween-20 y Triton X-100).

Tabla 12: Efecto de distintas concentraciones de varios reactivos en la actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{Sa}

Reactivo	Concentración	Actividad relativa (%)
Control	-	100
EDTA (+2 mM MgCl₂)	1 mM	88
	10 mM	18
	20 mM	14
Metil-β-ciclodextrina	1 mM	126
	5 mM	146
	10 mM	146
PEG 3.350	1 mM	112
	5 mM	106
	10 mM	98
DTT	1 mM	90
	5 mM	44
2-Mercaptoetanol	10 mM	27
	1 mM	100
	5 mM	97
Almidón de maíz	10 mM	91
	50 µg/ml	103
	200 µg/ml	99
	400 µg/ml	98
SDS	1.000 µg/ml	104
	0,1 %	
	1 %	
Tween-20	0,1 %	No detectada
	1 %	
Triton X-100	0,1 %	
	1 %	

La actividad PHB despolimerasa de estas enzimas también fue ensayada en presencia de un oligosacárido cíclico, la metil-β-ciclodextrina (MβCD). Sorprendentemente este compuesto produce un notable incremento de la actividad de PhaZ_{Sa} y PhaZ_{Sexr} en torno a un 45% a partir de 5 mM. Estos resultados fueron obtenidos con el ensayo turbidimétrico y corroborados posteriormente mediante el ensayo con β-hidroxibutirato deshidrogenasa para descartar artefactos relativos al ensayo de actividad.

Análogamente se ensayó la actividad en presencia de polietilenglicol 3.350 (PEG 3.350), un poliéter con un comportamiento complejo en soluciones acuosas. Nuevamente observamos un incremento de actividad en ambas enzimas, especialmente PhaZ_{Sexr}, que aumenta su actividad entre un 15 y un 20% en presencia de PEG 3.350 en concentraciones de 1 a 5 mM.

Otros compuestos ensayados son el almidón de maíz para PhaZ_{Sa}, que no produce ningún efecto significativo sobre su actividad a concentraciones hasta 1 mg/mL; y sacarosa en el caso de PhaZ_{Sexr}, que produce una disminución de actividad poco importante a concentraciones hasta 100 mM.

3.11 Experimentos de liofilización de PhaZ_{Sex} en presencia de aditivos

Para determinar la capacidad lioprotectora de varios compuestos sobre PhaZ_{Sex}, se liofilizaron durante 24 horas alícuotas de enzima purificada, previa congelación mediante nitrógeno líquido. Una vez recuperadas las muestras se reconstituyó su volumen original, y se procedió a medir su actividad residual en comparación con la de réplicas de dichas alícuotas sin liofilizar, obteniendo los resultados de la *tabla 13*.

Tabla 13: Actividad conservada de PhaZ_{Sex} tras su liofilización en presencia de distintos aditivos

Reactivo	Concentración	% Actividad conservada
Control	-	47
Metil-β-ciclodextrina	1,5 mM	82
	15 mM	80
PEG 3.350	1 mM	9
	10 mM	19
Glicerol	10% (v/v)	76
	20% (v/v)	21
KCl	50 mM	30
	500 mM	51

Como puede apreciarse, PhaZ_{Sex} perdió cerca de la mitad de su actividad original tras ser liofilizada sin aditivos. Únicamente la metil-β-ciclodextrina a las dos concentraciones ensayadas y el glicerol al 10% (v/v) mostraron una clara capacidad lioprotectora.

3.12 Estudios de especificidad de sustrato de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Para analizar la especificidad de sustrato de las PHB despolimerasas frente a monómeros con distinta longitud de cadena alifática lateral se recurrió al ensayo cromogénico con distintos ésteres de *p*NP (*Tabla 14*).

Estos ensayos se llevaron a cabo a pH 6, debido a la elevada hidrólisis espontánea experimentada por los sustratos cromogénicos a pH básico. En el caso de PhaZ_{Sex} este pH sólo permite una actividad del 42% de la máxima, por lo que se empleó una concentración de 5 mM de sustrato para obtener actividades detectables. Para los ensayos con PhaZ_{Sex} se usaron como sustrato *p*NP-acetato, *p*NP-butilato y *p*NP-valerato, ya que fueron los únicos con los que se pudo detectar una actividad clara frente a la absorbancia de los controles.

En el caso de PhaZ_{Sa} los ensayos se realizaron al pH óptimo de la enzima, por lo que la sensibilidad del ensayo fue mucho mayor. Para esta enzima se emplearon cinco sustratos cromogénicos: *p*NP-acetato, *p*NP-butilato, *p*NP-hexanoato, *p*NP-octanoato y *p*NP-decanoato, a una concentración final de 2 mM.

Asimismo, se emplearon distintos disolventes para solubilizar los sustratos previamente al ensayo de actividad, basándonos en los datos de actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en presencia de disolventes orgánicos de la *tabla 10*, se empleó metanol para los ensayos de actividad de PhaZ_{Sex} y acetonitrilo para los de PhaZ_{So}.

Tabla 14: Actividad esterasa relativa de las PHB despolimerasas frente a distintos ésteres de pNP

Sustrato	Actividad relativa PhaZ _{Sex} (%)	Actividad relativa PhaZ _{So} (%)
pNP-acetato	100	100
pNP-butirato	52	68
pNP-valerato	9	-
pNP-hexanoato	-	19
pNP-octanoato	-	2
pNP-decanoato	-	1

Como puede apreciarse en la *tabla 14*, ambas enzimas muestran mayor nivel de actividad cuanto menor es la longitud de la cadena alifática del sustrato, siendo el tamaño de este radical un factor limitante de la actividad desarrollada. De hecho, ambas despolimerasas mostraron mayor actividad con el éster de menor tamaño (pNP-acetato) que con el más similar a su sustrato natural (pNP-butirato).

3.13 Estudio de los parámetros cinéticos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} empleando PHB como sustrato

Los parámetros cinéticos K_M (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} (velocidad máxima) de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} para la hidrólisis de PHB, su sustrato natural, fueron calculados mediante regresión hiperbólica no lineal, utilizando como valores iniciales los proporcionados por la representación de Hanes-Woolf. Estos valores iniciales se usaron para realizar la regresión no lineal, ajustando los datos a la mejor hipérbola, como se muestra en la *figura 44*.

De esta forma se obtienen los parámetros cinéticos aparentes de PhaZ_{Sex} con PHB, que se muestran en la *tabla 15*. Para convertir los valores de K_M de concentración a molaridad se consideró peso molecular promedio en masa (M_w) del PHB facilitado por el fabricante (437.000 g/mol).

Estos parámetros revelan una menor K_M de PhaZ_{Sex}, aproximadamente la mitad, y por lo tanto mayor afinidad por el PHB que PhaZ_{So}, en cambio la velocidad máxima de PhaZ_{So} es 3,5 veces mayor que la presentada por PhaZ_{Sex}. Dada la inexactitud de expresar la concentración de un polímero en términos de molaridad se han empleado las unidades de actividad definidas en la

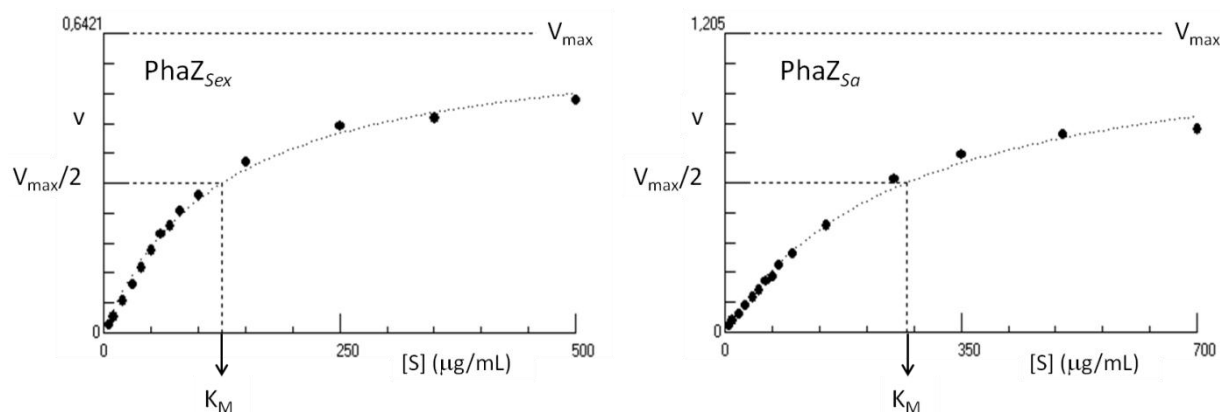


Figura 44: Regresión hiperbólica no lineal de los valores de actividad a distintas concentraciones de PHB obtenidos para PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{Sa} (derecha), realizada para calcular los parámetros cinéticos aparentes V_{max} y K_M .

sección de materiales y métodos, basadas en el descenso de la absorbancia a 600 nm, en lugar de las unidades internacionales (μ moles de producto liberados por minuto), por lo tanto no es posible hallar la eficacia catalítica de estas enzimas. No obstante se puede obtener una estimación de la eficacia mediante la relación V_{max}/K_M . Considerando este parámetro se puede deducir que PhaZ_{Sa} presenta una eficacia aproximadamente 1,7 veces superior a la de PhaZ_{Sex}.

Tabla 15: Parámetros cinéticos aparentes de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

	PhaZ _{Sex}	PhaZ _{Sa}
K_M (μ g/ml)	125,0 \pm 19,32	268,6 \pm 48,46
K_M (μ M)	0,29 \pm 0,04	0,61 \pm 0,11
V_{max} (U/mg de enzima)	2.780 \pm 187	9.797 \pm 845
V_{max}/K_M	9.586	16.061

3.14 Identificación de los productos de reacción de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

La naturaleza de los productos de reacción de las PHB despolimerasas estudiadas se determinó mediante HPLC-MS. Para ello se realizaron ensayos de hidrólisis de PHB a tiempo final (18 horas) añadiendo 1 μ g de enzima purificada en las condiciones óptimas para cada despolimerasa. Posteriormente se procedió a la derivatización de los productos presentes en la mezcla de reacción mediante bromuro de bromofenacilo (BPB) para su detección por absorbancia ultravioleta. Las muestras derivatizadas se aplicaron en una columna de fase reversa C18 para tratar de separar los monómeros y diversos oligómeros producidos por la hidrólisis de PHB, y finalmente los picos de absorbancia detectados fueron analizados

mediante espectrometría de masas para determinar la masa molecular de los productos presentes.

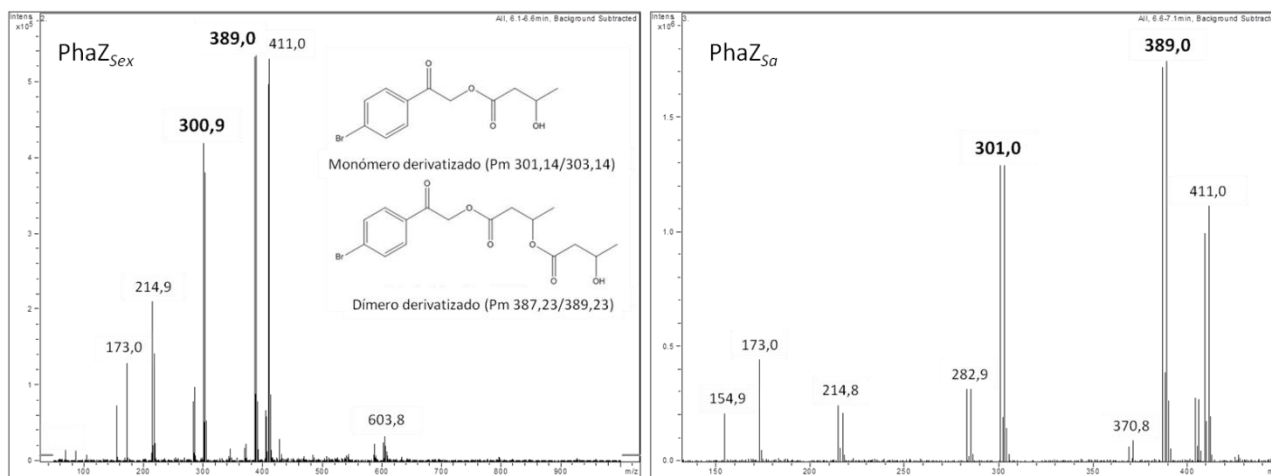


Figura 45: Análisis de los productos de reacción de PhaZ_{Sex} (izquierda) y PhaZ_{Sa} (derecha) derivatizados con BPB, mediante HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. Se muestran las moléculas detectadas mediante MALDI-TOF, los picos dobles de intensidad similar y una diferencia en masa de 2 Da corresponden a moléculas que contienen bromo, debido a la similar abundancia isotópica de este elemento (50,69 % de Br⁷⁹ y 49,31 % de Br⁸¹). En el panel izquierdo se muestran las estructuras químicas de los productos derivatizados detectados y sus masas moleculares. Se indican en negrita las masas de los picos correspondientes a estos productos de reacción. Los picos de masa 411 Da, presentes en ambos espectros, corresponden a un aducto de dímero derivatizado y un catión sodio.

En las muestras hidrolizadas tanto por PhaZ_{Sex} como por PhaZ_{Sa} se localizan, como únicos productos de reacción identificables, picos correspondientes al monómero así como al dímero de 3-hidroxibutirato, derivatizados con BPB (Figura 45). Asimismo se encuentran picos correspondientes a aductos iónicos de monómeros o dímeros con iones de sodio o potasio, probablemente procedentes de los tampones de reacción y los ácidos o bases empleados para ajustar el pH de los mismos. La presencia de dichos aductos iónicos dificulta la cuantificación precisa de cada producto de reacción. Adicionalmente no se logró una separación completa mediante HPLC de los monómeros y dímeros liberados, lo que llevó a la aparición de ambos productos en varios picos de absorbancia de HPLC, sin embargo este método nos permitió identificar los monómeros y dímeros de 3-hidroxibutirato como productos mayoritarios de reacción generados por PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}.

3.15 Experimentos de degradación enzimática de películas de PHB, PHBV y PHB-almidón mediante PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Para analizar la capacidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} de degradar PHB y PHBV en una fase sólida y no en suspensión se realizaron experimentos de degradación de películas finas de polímero,

preparadas mediante la disolución de 100 mg del PHA correspondiente en cloroformo caliente y la evaporación del disolvente tras verter la disolución en una placa de vidrio.

Para los experimentos con PhaZ_{sex} se emplearon películas de tres tipos de PHA de origen natural: homopolímero de PHB, y copolímeros PHBV con un 5% (p) de 3-hidroxivalerato y PHBV con 12% (p) de 3-hidroxivalerato. Estas películas se pusieron en contacto con 5 mL de tampón y 10 µg de PhaZ_{sex}, y se incubaron a 37°C durante 24 horas sin agitación, tomando imágenes a determinados tiempos para evaluar el progreso de la degradación (Figura 46).

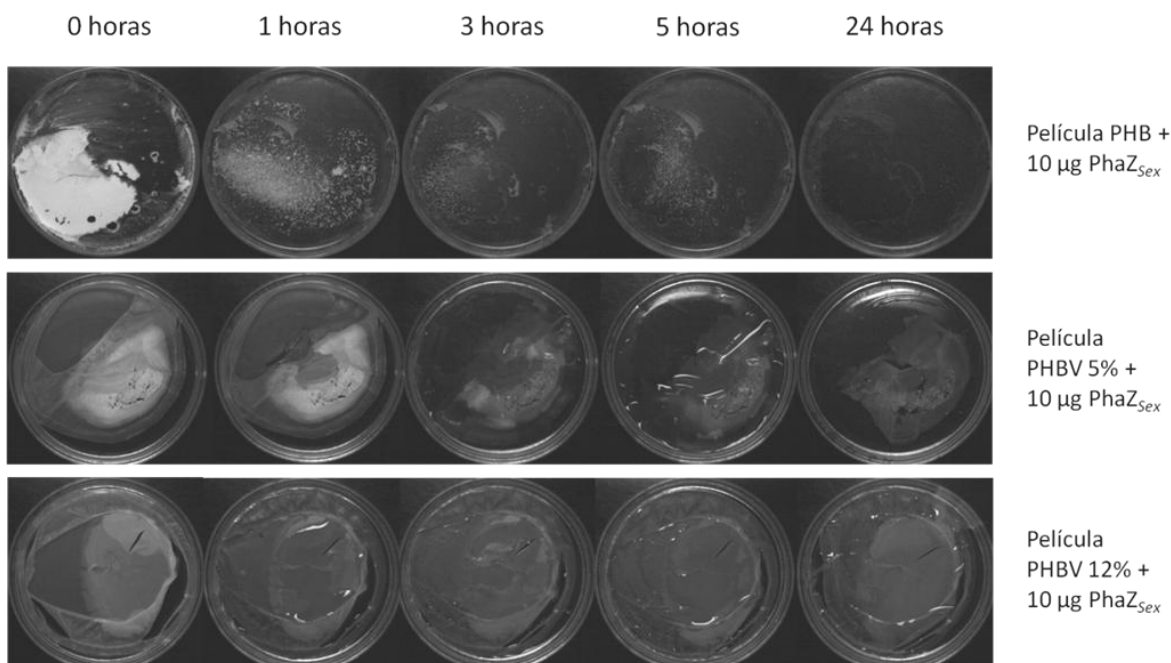


Figura 46: Degradación de películas de PHB y copolímeros PHBV con 5 o 12% de valerato mediante PhaZ_{sex}. Las películas se incubaron en 5 mL de tampón Tris-HCl pH 8 con MgCl₂ 2 mM y 10 µg de enzima purificada y se incubaron durante 24 horas a 37°C sin agitación, tomando imágenes a distintos tiempos.

Se puede observar cómo los copolímeros con un contenido de 3-hidroxivalerato se degradan más lentamente que el homopolímero de 3-hidroxibutirato, especialmente el copolímero con un 12% de valerato, en el que apenas se observa degradación tras 24 horas.

En el caso de PhaZ_{sa} los experimentos de degradación de películas de PHA se llevaron a cabo con los tres polímeros empleados para PhaZ_{sex} y adicionalmente se ensayó una mezcla de homopolímero PHB y almidón de maíz en proporción 7:3, preparada del mismo modo que los demás polímeros. Las películas de polímero se sumergieron en 20 mL de tampón MES a un pH ligeramente ácido de 6, con MgCl₂ 5 mM y MβCD 4 mM para facilitar la degradación; a esta mezcla se le añadieron 30 µg de PhaZ_{sa} por placa. Las películas se incubaron a 37°C durante 40 horas sin agitación, tomando imágenes a distintos tiempos para mostrar la progresión de los experimentos (Figura 48).

Como se puede apreciar en la *figura 48*, PhaZ_{5a} degrada con facilidad las películas de PHB puro, desintegrando más de la mitad en menos de 9 horas, y llegando a su completa degradación a las 30 horas. En el caso de los copolímeros se puede apreciar que la película con un 5% de 3-hidroxivalerato se degrada de forma muy similar a la compuesta por homopolímero, alcanzando también una completa solubilización a las 30 horas. En cambio, la película con 12% de 3-hidroxivalerato se degrada de forma sensiblemente más lenta, y solo se consigue la desintegración de aproximadamente la mitad de la película en las condiciones ensayadas. En último lugar, la película de PHB mezclado con almidón en proporción 7:3 se degrada sorprendentemente rápido, perdiendo su integridad casi completamente durante las primeras 7 horas de incubación. El almidón no puede ser degradado por las PHB despolimerasas, por lo que permanece como un polvo en suspensión una vez desintegrada la totalidad de la película. En la *figura 47* se compara el aspecto macroscópico de una película de PHB intacta, con un fragmento de película tras su incubación con 30 µg de PhaZ_{5a} durante 7 horas. Se puede apreciar la aparición de oquedades en toda la superficie de la película, producida por la acción de la despolimerasa.

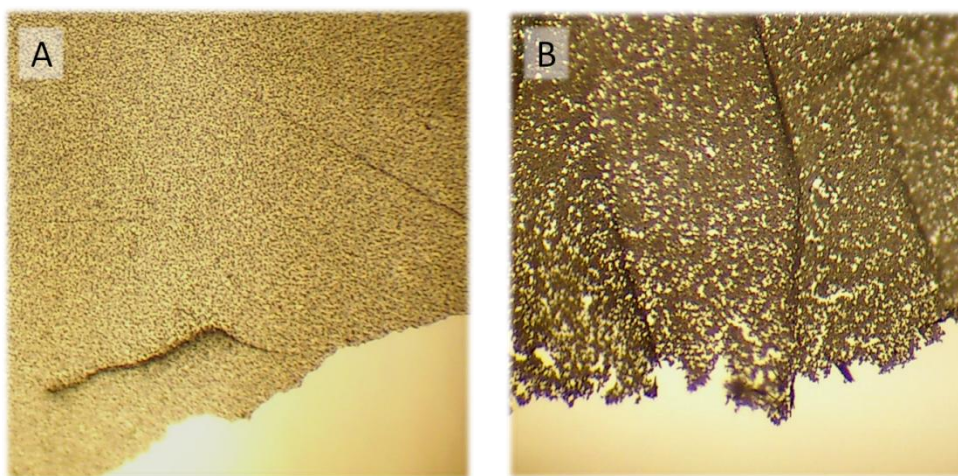


Figura 47: Aspecto macroscópico de películas de PHB tomadas con cuatro aumentos. **A.** Película de PHB intacta. **B.** Película de PHB tras 7 horas de incubación con 30 µg de PhaZ_{5a}. a 37°C, se puede apreciar la desintegración producida en la superficie de la película debido a la hidrólisis enzimática.

En esta ocasión además de seguir visualmente la degradación de las películas también se monitorizó la liberación enzimática de (*R*)-3-hidroxibutirato a lo largo del experimento, mediante el ensayo de actividad de la β-hidroxibutirato deshidrogenasa, como se muestra en la *figura 49*. Podemos apreciar en la gráfica una progresión similar de la degradación de las películas de PHB, PHBV 5% y PHB-almidón, aunque esta última rinde una concentración final

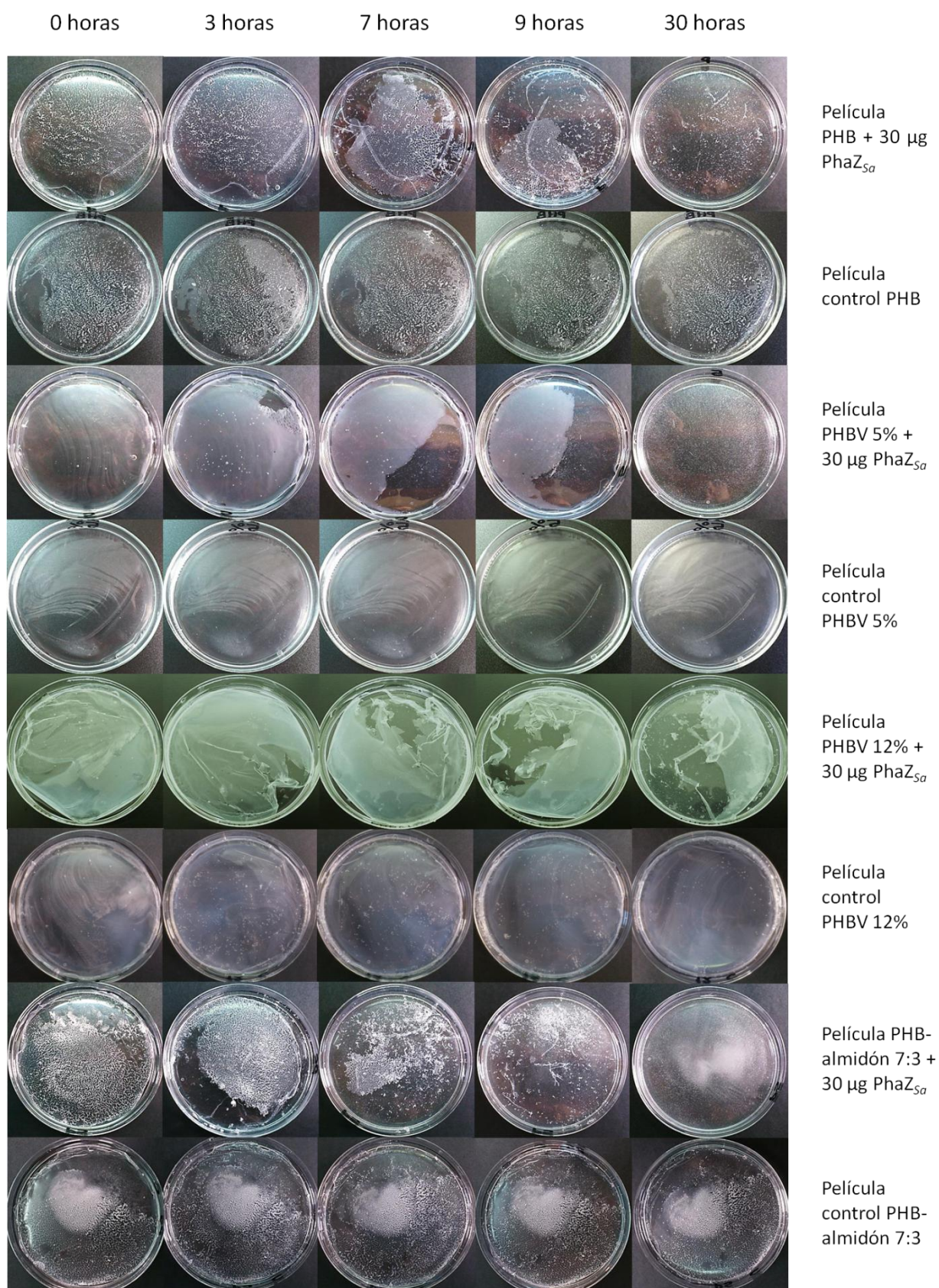


Figura 48: Degradación de películas de PHB, copolímeros PHBV con 5 o 12% de valerato y mezcla de PHB con almidón en proporción 7:3, mediante PhaZ₅₀. Las películas se incubaron en 20 mL de tampón MES pH 6 con MgCl₂ 5 mM, MβCD 4 mM y 30 µg de enzima purificada, o volumen equivalente de tampón para los controles negativos. Las placas se incubaron durante 40 horas a 37°C sin agitación, tomando imágenes y alícuotas de sobrenadante a distintos tiempos

ligeramente más baja de 3-hidroxiacetato, esperable ya que solo contiene un 70% de PHB. En cambio, la película de PHBV 12% refleja su degradación más lenta y menos eficaz a tiempo final. Inesperadamente, la película que libera mayor concentración de 3-hidroxiacetato al medio de reacción es la del copolímero PHBV con 5% de 3-hidroxiacetato, aunque las diferencias con el homopolímero son escasas y pueden estar dentro del error experimental intrínseco.

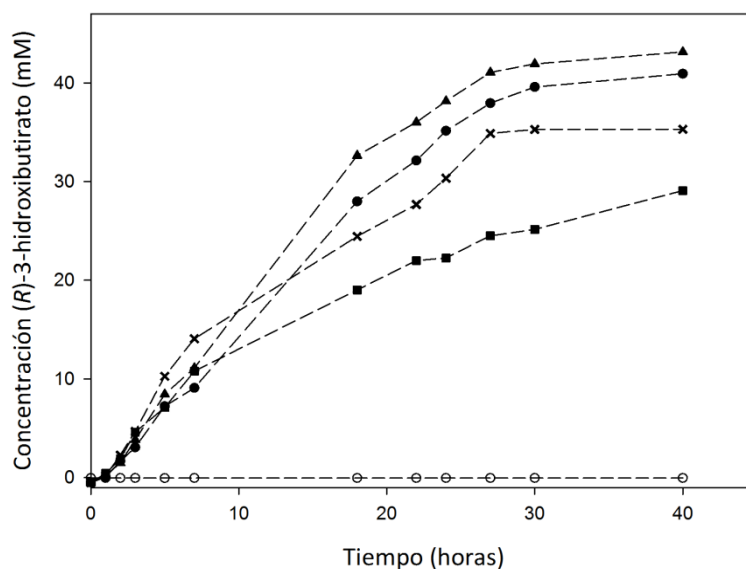


Figura 49: Liberación de (*R*)-3-hidroxiacetato de diferentes películas de PHB catalizada por PhaZ₅₀. La concentración de (*R*)-3-hidroxiacetato soluble en los sobrenadantes se monitorizó durante las primeras 40 horas de reacción mediante el ensayo de la β -hidroxiacetato deshidrogenasa. Las películas usadas son: PHB (●), PHBV 5% (▲), PHBV 12% (■) y PHB-almidón en proporción 7:3 (×). Todos los controles sin enzima (○) presentaron niveles indetectables de (*R*)-3-hidroxiacetato en el sobrenadante.

Como experimento control negativo también se valoró la liberación de 3-hidroxiacetato de todas las películas ensayadas en ausencia de PHB despolimerasa, sin obtener concentraciones detectables de producto en ninguno de los tiempos de reacción.

Se ha realizado un cálculo teórico de la concentración máxima de 3-hidroxiacetato que se podría liberar al hidrolizar totalmente 100 mg de PHB puro por acción de la enzima. Para ello, se ha considerado una masa molecular de 86 Da, correspondiente a la masa de un monómero esterificado dentro de una cadena de polímero. De esta forma, tras una reacción enzimática se podría alcanzar una concentración máxima aproximada de 58 mM de (*R*)-3-hidroxiacetato cuando se emplea PHB puro como sustrato, o 41 mM en el caso de la mezcla de PHB y almidón, ya que sólo contiene un 70% de PHB. Este cálculo teórico concuerda aproximadamente con las concentraciones halladas experimentalmente, que confirmarían una solubilización prácticamente completa de las películas de homopolímero de PHB, copolímero

PHBV 5% y PHB-almidón, liberando (*R*)-3-hidroxi butirato junto con diversos oligómeros. La diferencia entre las concentraciones teóricas de (*R*)-3-hidroxi butirato y las halladas experimentalmente se deben a que este método no refleja la liberación de (*R*)-3-hidroxi valerato, dímeros y otros oligómeros liberados durante el proceso, sino exclusivamente la cantidad de (*R*)-3-hidroxi butirato.

3.16 Modificación química de aminoácidos

Con el fin de determinar la naturaleza de los aminoácidos imprescindibles para la catálisis de las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sta}, se realizaron ensayos de modificación química de las enzimas con reactivos modificadores específicos para distintos tipos de aminoácido; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para modificar serinas, dietilpircarbonato (DEPC) para modificar histidinas, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que cataliza la conjugación de glicinamida con grupos carboxilos de los ácidos aspárticos o glutámicos de la enzima y *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB), que modifica las cisteínas reaccionando con sus grupos sulfhidrilo reducidos; este último solo se empleó con PhaZ_{Sex}. Tras concluir los ensayos de modificación de las enzimas, se evaluó su actividad remanente mediante el ensayo de actividad turbidimétrico. Los resultados se muestran en la *tabla 16*.

Tabla 16: Actividad residual tras modificación química de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sta}

Reactivo	PhaZ _{Sex}		PhaZ _{Sta}	
	Concentración (mM)	Actividad relativa (%)	Concentración (mM)	Actividad relativa (%)
Control	-	100	-	100
PMSF	0,5	73	0,5	4
	1	57	1	0
DEPC	5	27	5	60
	10	14	20	10
EDC + Glicinamida	10	38	1	85
	20	21	5	67
<i>p</i> HMB	1	84	-	-
	5	69	-	-

A la vista de los resultados, podemos concluir que ambas enzimas sufren una desactivación clara debido a la modificación de histidinas producida por el DEPC y también de grupos carboxilo debida a la conjugación con glicinamida. Tanto PhaZ_{Sex} como PhaZ_{Sta} pierden buena parte de sus actividad después del tratamiento con PMSF, sin embargo es llamativa la

diferencia en sensibilidad hacia este reactivo que exhiben ambas despolimerasas, mientras que PhaZ_{sa} está completamente inactivada tras la incubación con PMSF 1 mM, PhaZ_{sex} aun conserva más de la mitad de la actividad original, lo que puede originarse por una distinta accesibilidad de los centros activos de ambas despolimerasas. PhaZ_{sex} también muestra una inactivación parcial debida a la incubación con pHMB, reactivo específico para modificación de cisteínas libres.

Las cisteínas libres (no involucradas en enlaces disulfuro) de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} fueron cuantificadas mediante titulación de sus grupos sulfhidrilo, usando el reactivo de Ellman (DTNB). Los resultados obtenidos apuntan a la presencia de dos cisteínas libres en ambas enzimas, lo que considerando el número total de cisteínas presentes en PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} (10 y 8, respectivamente) implica la existencia de cuatro enlaces disulfuro intracatenarios estabilizando la estructura terciaria de PhaZ_{sex}, y tres de estos enlaces en el caso de PhaZ_{sa}.

3.17 Modelado de la estructura terciaria de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa}

Las estructuras terciarias tridimensionales de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} fueron modeladas de acuerdo con su homología con otras proteínas de estructura conocida mediante los siguientes servidores bioinformáticos: Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) (Kelley y Sternberg 2009), Robetta Full-Chain Protein Structure prediction server (Raman *et al.* 2009, Song *et al.* 2013), I-TASSER (Zhang 2008, Roy *et al.* 2010). Estos servidores combinan la predicción por homología estructural con algoritmos para la predicción *ab initio* de estructuras de secuencias sin homólogos con plegamiento conocido. Las imágenes fueron producidas mediante el software Discovery Studio 4.0 (Accelrys Software Inc.)

El modelado de PhaZ_{sex} mediante Phyre2 produce un modelo muy fiable (Figura 50), especialmente en la región catalítica de esta enzima. Los aminoácidos catalíticos postulados (Ser²⁴, Asp¹¹¹ e His¹⁴³), así como la cavidad del oxianión (His²³⁷), quedan concentrados en la misma región del plegamiento, conformando el centro activo. Por otra parte, las ocho cisteínas del dominio catalítico quedan distribuidas en cuatro parejas (Cys⁵⁴-Cys⁶⁶, Cys¹⁵⁴-Cys¹⁶⁵, Cys²²⁴-Cys²³⁰ y Cys²³⁹-Cys²⁸²) indicando la posibilidad de establecimiento de cuatro puentes disulfuro intracatenarios, tres de ellos circundando el centro activo y garantizando su estabilidad conformacional. En cambio, las cisteínas del dominio de unión a sustrato, incluyendo la cisteína C-terminal, quedan muy separadas en este modelo para formar enlaces entre sí. En la figura 50 también se puede observar la localización del dominio de unión a sustrato, representado con el volumen real que ocuparía, mostrando la clara separación entre el dominio catalítico y el dominio de unión a PHB, separación provista por el dominio separador fibronectina tipo III.

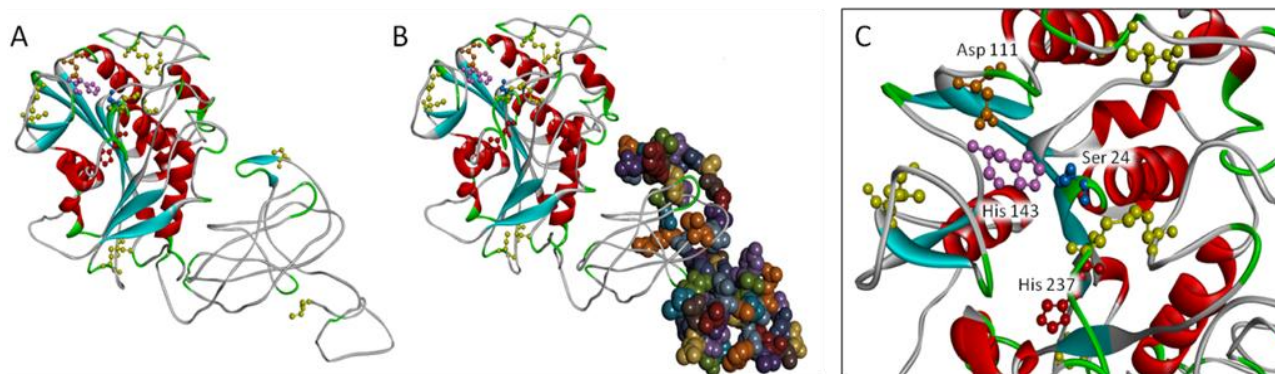


Figura 50: Modelado tridimensional de PhaZ_{Sex} mediante el servidor Phyre2. **A.** Representación del modelo obtenido, solo se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos y las cisteínas. Las láminas β se muestran en azul claro, α -hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en gris. **B.** Representación del modelo con el dominio de unión a sustrato mostrado con el volumen real ocupado, para ilustrar la estructura en módulos catalítico y de unión a sustrato, separados por el motivo fibronectina tipo III. **C.** Detalle del centro activo mostrando la ubicación de los aminoácidos de la triada catalítica (en marrón, morado y azul oscuro), la posible histidina de la cavidad del oxianión (en rojo) y las cisteínas (en amarillo).

Los demás servidores también proveen algunos modelos coherentes con la función propuesta para cada región, a continuación se muestran dos ejemplos generados por los servidores Robetta y I-TASSER (Figura 51).

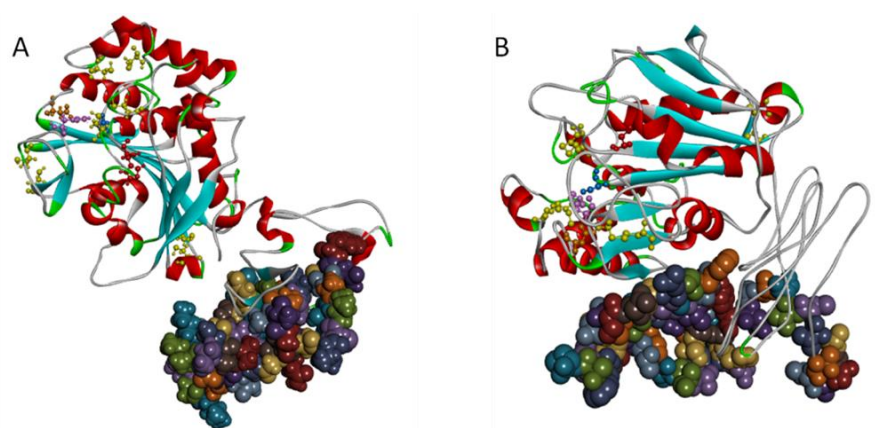


Figura 51: Modelado tridimensional de PhaZ_{Sex} mediante los servidores Robetta (**A**) y I-TASSER (**B**). Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos y cisteínas. El dominio de unión a sustrato se representa con su volumen real, para facilitar su localización. Las láminas β se muestran en azul claro, α -hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en

En líneas generales estos modelos coinciden en un dominio catalítico formado por diez láminas β , de las cuales seis están empaquetadas paralelamente, y junto con dos antiparalelas forman un plano girado. También muestran en torno a ocho α -hélices cubriendo ambos lados de dicho plano de láminas β . Como norma general, estos servidores no reconocen homología

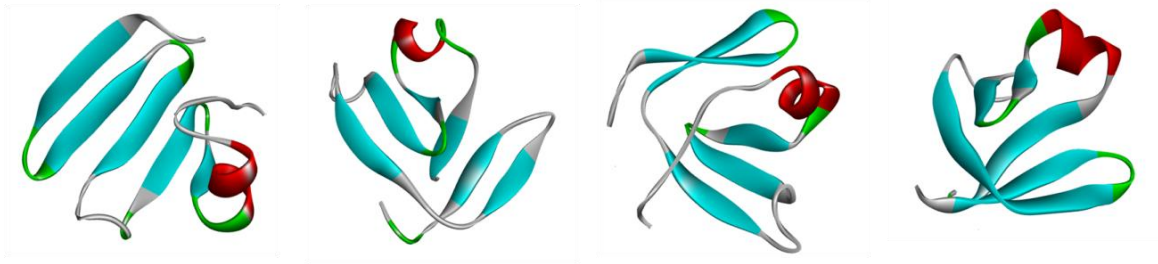


Figura 52: Modelado tridimensional *ab initio* de los 60 aminoácidos del extremo C-terminal de PhaZ_{Sex} (dominio de unión a PHB) mediante el servidor QUARK. Se representan cuatro de los modelos más probables generados por el servidor, mostrando una estructura secundaria mayoritariamente β -láminar. Las β -láminas se muestran en azul claro, α -hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en gris.

estructural del dominio de unión a PHB, situado en el extremo C-terminal, con ninguna proteína de estructura tridimensional conocida, lo que resulta en modelos con un plegamiento mayoritariamente en ovillo al azar para este dominio. Dada la ausencia de proteínas homólogas adecuadas, y para dilucidar la posible estructura terciaria del dominio de unión a sustrato, se recurrió al modelado exclusivamente *ab initio* de los 60 aminoácidos del extremo C-terminal, mediante el servidor QUARK (Xu y Zhang 2012). Este servidor genera los diez plegamientos estructurales más probables, cuatro de los cuales se muestran en la *figura 52*, en todos ellos predominan las estructuras tipo lámina β empaquetadas de forma antiparalela, con un contenido mínimo de α -hélice.

En el caso de PhaZ_{So}, los modelos más coherentes son el generado por el servidor Phyre2, que se muestra en detalle en la *figura 53*, y dos de los cinco generados por I-TASSER (*Figura 54*). De

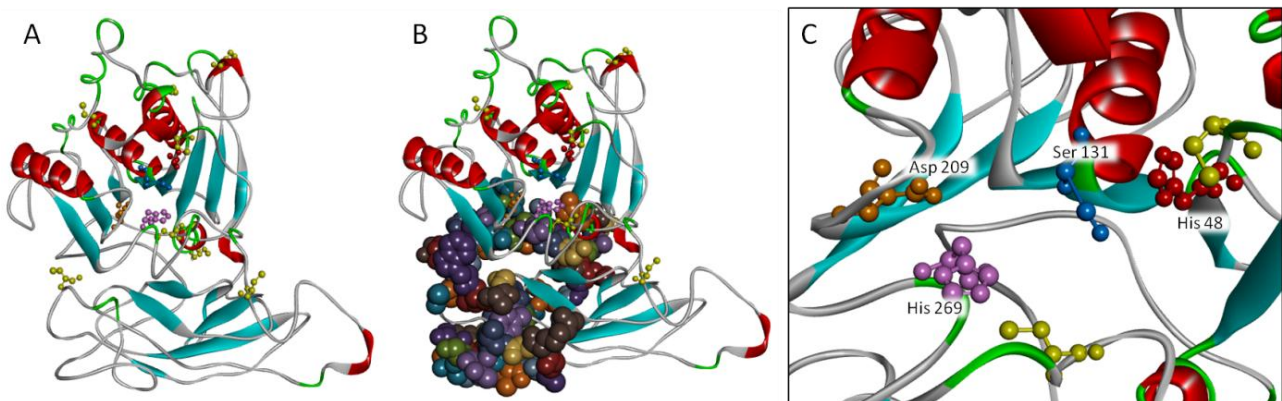


Figura 53: Modelado tridimensional de PhaZ_{So} mediante el servidor Phyre2. **A.** Representación del modelo obtenido, se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos y las cisteínas. Las β -láminas se muestran en azul claro, α -hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en gris. **B.** Representación del modelo con el dominio de unión a sustrato mostrado con el volumen real ocupado, para ilustrar la estructura en módulos catalítico y de unión a sustrato, separados por el motivo fibronectina tipo III. **C.** Detalle del centro activo mostrando la ubicación de los aminoácidos de la triada catalítica (en marrón, morado y azul oscuro), la posible histidina de la cavidad del oxianión (en rojo) y las cisteínas (en amarillo).

nuevo vemos cómo los aminoácidos propuestos como catalíticos (Ser¹³¹, Asp²⁰⁹ e His²⁶⁹) se agrupan junto a la histidina 48, postulada como parte de la cavidad del oxianión, constituyendo el centro activo de PhaZ_{So}. Sin embargo, en este caso ninguno de los modelos analizados sitúa las cisteínas por parejas capaces de formar un enlace disulfuro, sino que están demasiado espaciadas entre sí, lo que hace pensar que el plegamiento real del centro activo puede concordar con los modelos pero sólo en ciertas regiones, como el centro activo de la enzima. Del mismo modo que en el caso de PhaZ_{Sexr}, estos modelos presentan un dominio catalítico constituido por un conjunto de láminas β mayoritariamente paralelas cubiertas por una serie de α-hélices.

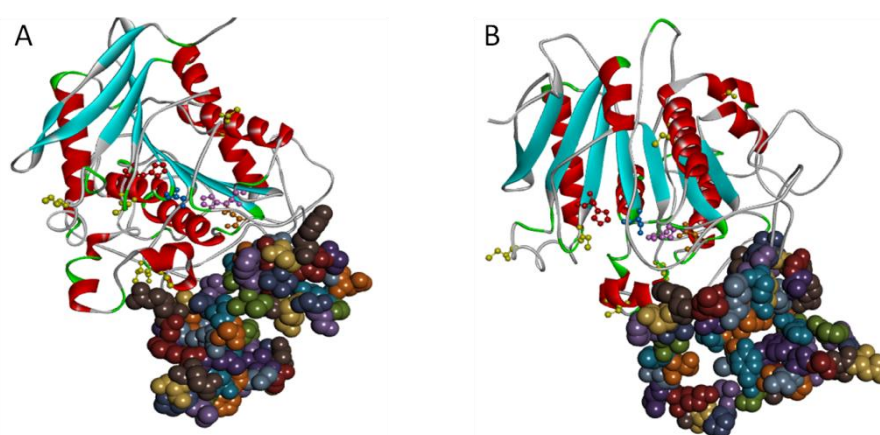


Figura 54: Modelado tridimensional de PhaZ_{So} mediante el servidor I-TASSER (A y B). Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos y cisteínas. El dominio de unión a sustrato se representa con su volumen real, para facilitar su localización. Las β-láminas se muestran en azul claro, α-hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en gris.

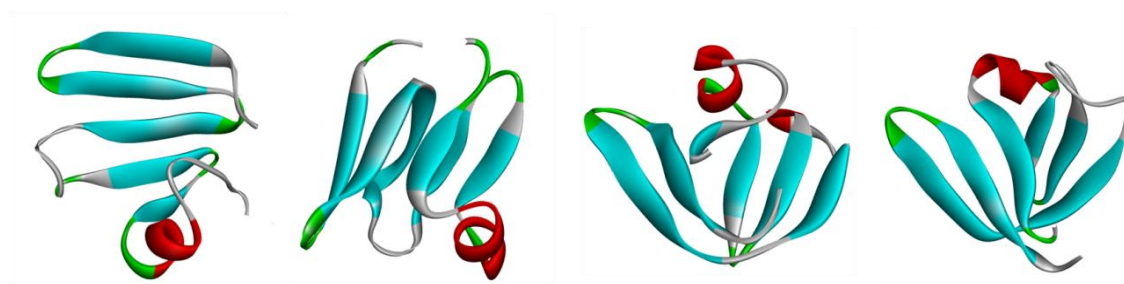


Figura 55: Modelado tridimensional *ab initio* de los 60 aminoácidos del extremo C-terminal de PhaZ_{So} (dominio de unión a PHB) mediante el servidor QUARK. Se representan cuatro de los modelos más probables generados por el servidor, mostrando una estructura secundaria mayoritariamente β-laminar. Las β-láminas se muestran en azul claro, α-hélices en rojo, giros β en verde y ovillo al azar en gris.

En otra ubicación se localizan el dominio espaciador, compuesto por láminas β antiparalelas, y el de unión a sustrato. Nuevamente, los servidores no son capaces de identificar por homología la estructura del dominio de unión a sustrato de PhaZ_{So}, por lo que se modeló este

dominio independientemente mediante el servidor QUARK, obteniendo los modelos más probables, algunos de los cuales se muestran en la *figura 55*. La estructura secundaria de este dominio estimada por QUARK es principalmente β -laminar antiparalela, con una pequeña proporción de α -hélice, al igual que sucedía con el dominio de PhaZ_{Sex}, lo que es esperable dado que en ambos casos se trata de dominios de unión a sustrato tipo 1.

3.18 Mutagénesis dirigida de PhaZ_{So}

El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de PhaZ_{So} comparándola con otras secuencias de PHB despolimerasas bacterianas que presentan distinto grado de similitud revela ciertos aminoácidos y regiones con un elevado nivel de conservación evolutiva, lo que sugiere que se trata de regiones esenciales para la función biológica de la enzima. Entre los aminoácidos más conservados destacan algunos que pueden participar en la formación de la triada catalítica, estructura muy extendida entre las hidrolasas, son la Ser¹³¹, (incluida dentro de una caja lipasa, presente en todas las serín hidrolasas), Asp²⁰⁹ e His²⁶⁹. Para confirmar la identidad e importancia de estos aminoácidos concretos se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida, con el fin de sustituir los aminoácidos objetivo por otros de distinta naturaleza química, y a continuación evaluar si los mutantes conservan la actividad PHB despolimerasa. Las mutaciones elegidas fueron: Ser¹³¹ por alanina o cisteína (mutantes S131A y S131C), Asp²⁰⁹ por asparagina (mutante D209N) e His²⁶⁹ por glutámico o glutamina (mutantes H269E y H269Q). Una vez construidos los plásmidos mutantes derivados de pHPNV se

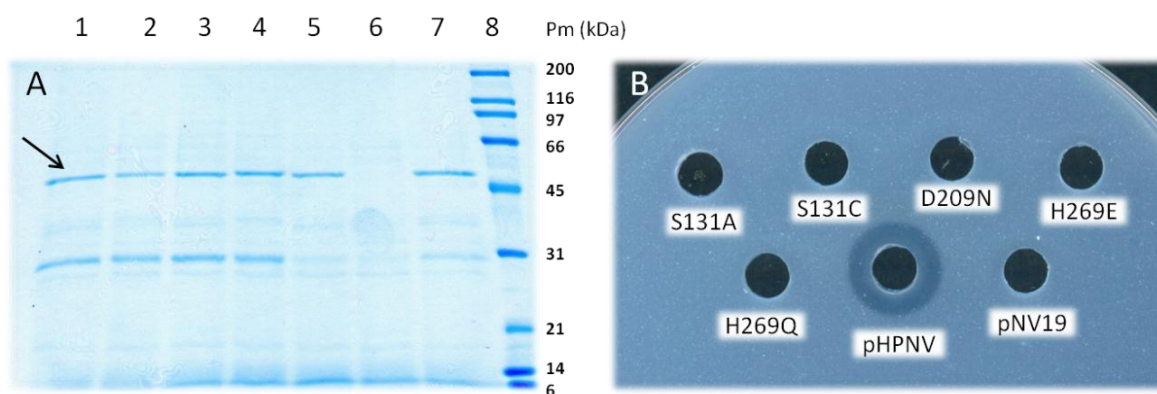


Figura 56: Mutagénesis dirigida de los aminoácidos de la triada catalítica de PhaZ_{So}. **A.** Análisis SDS-PAGE de los caldos de fermentación de las cepas de *Rhodococcus* sp. T104 portando las versiones mutantes del plásmido pHPNV. Carril **1**: S131A, carril **2**: S131C, carril **3**: D209N, carril **4**: H269E, carril **5**: H269Q, carril **6**: control negativo pNV19, carril **7**: control positivo pHPNV, carril **8**: patrón de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad). La flecha indica las bandas correspondientes a PhaZ_{So} o sus formas mutantes. **B.** Ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa de los caldos de fermentación de las cepas de *Rhodococcus* sp. T104 portando las versiones mutantes del plásmido pHPNV así como los controles negativo (pNV19) y positivo (pHPNV).

transfirieron a la cepa productora *Rhodococcus* sp. T104 para llevar a cabo las pruebas de expresión y actividad.

Los caldos de fermentación de estas cepas mutantes de *Rhodococcus* sp. T104, tras 72 horas de fermentación a 30°C con agitación orbital, se analizaron mediante SDS-PAGE para confirmar la correcta expresión y secreción de las formas mutantes de PhaZ_{5a}. Como se puede observar en la *figura 56*, todas las construcciones mutantes producen claramente una proteína extracelular de tamaño coincidente con PhaZ_{5a}, y que no se encuentra en el cultivo control de pNV19, confirmando la producción extracelular de todas las formas mutantes de PhaZ_{5a}.

Adicionalmente se analizó la actividad PHB despolimerasa mediante un ensayo de actividad en placa de estos caldos de fermentación, comparando con el caldo control no productor (pNV19) y con el control positivo productor de PhaZ_{5a} sin mutar (pHPNV) (*Figura 56*). Se puede observar claramente cómo ninguno de los mutantes exhibe una actividad PHB despolimerasa detectable, al contrario que la enzima sin mutar. A la vista de estos resultados podemos confirmar la importancia de estos aminoácidos concretos, ya que resultan imprescindibles para la catálisis desempeñada por PhaZ_{5a}.

4. Aplicaciones biotecnológicas de PhaZ_{5ex} y PhaZ_{5a}

4.1 Inmovilización de PhaZ_{5ex} en agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)

PhaZ_{5ex} fue inmovilizada en forma de agregados entrecruzados de enzima (CLEAs), mediante su precipitación química con acetona en presencia de distintas cantidades de albúmina de suero bovino (BSA), que actúa como cebador proteico. Los agregados proteicos resultantes se trataron posteriormente con diferentes concentraciones de glutaraldehído, un agente entrecruzante que reacciona con los grupos amino de lisinas y argininas, creando enlaces covalentes entre moléculas de proteína. Gracias al elevado número de lisinas de la BSA y a su carácter inerte, esta proteína proporciona un soporte físico a la despolimerasa y facilita la manipulación del derivado producido.

4.1.1 Preparación de CLEAs

Diferentes agregados entrecruzados e insolubles de PhaZ_{5ex} fueron preparados usando concentraciones variables de glutaraldehído, así como diferentes proporciones de BSA: PhaZ_{5ex}, para después evaluar la actividad presentada por cada uno de los distintos derivados mediante el ensayo turbidimétrico para CLEAs, los valores registrados se muestran en la *tabla 17*. Los valores más altos de actividad retenida (18,4%) se detectan en el derivado PhaZ_{5ex}-

CLEA4, obtenido con una concentración de glutaraldehído de 12,5 mM y una proporción 100:1 de BSA- PhaZ_{Sex}, respectivamente.

Tabla 17: Actividad de los distintos derivados CLEAs preparados con PhaZ_{Sex} empleando distintas concentraciones de glutaraldehído y proporciones BSA:PhaZ_{Sex}

Derivado	[Glutaraldehído] (mM)	Proporción BSA:PhaZ _{Sex}	Actividad específica (U/gramo húmedo) ^a	Actividad retenida (%) ^b
PhaZ _{Sex} -CLEA1	12,5	Sin BSA	247,7	17,9
PhaZ _{Sex} -CLEA2	25	Sin BSA	206,1	14,9
PhaZ _{Sex} -CLEA3	50	Sin BSA	211,7	15,3
PhaZ_{Sex}-CLEA4	12,5	100:1	255,0	18,4
PhaZ _{Sex} -CLEA5	25	100:1	223,4	16,1
PhaZ _{Sex} -CLEA6	50	100:1	194,2	14,0
PhaZ _{Sex} -CLEA7	12,5	200:1	112,5	8,1
PhaZ _{Sex} -CLEA8	25	200:1	177,4	12,8
PhaZ _{Sex} -CLEA9	50	200:1	226,1	16,3
PhaZ _{Sex} -CLEA10	12,5	500:1	104,5	7,5
PhaZ _{Sex} -CLEA11	25	500:1	137,8	9,9
PhaZ _{Sex} -CLEA12	50	500:1	201,4	14,5
PhaZ _{Sex} -CLEA13	12,5	1.000:1	50,3	3,6
PhaZ _{Sex} -CLEA14	25	1.000:1	89,4	6,5
PhaZ _{Sex} -CLEA15	50	1.000:1	No detectada	No detectada

a: Actividad detectada mediante ensayo turbidimétrico específico para CLEAs (ver sección de materiales y métodos).

b: Porcentaje de actividad del derivado con respecto a la misma cantidad de enzima soluble.

Partiendo de estas condiciones óptimas de preparación, el derivado PhaZ_{Sex}-CLEA4 se empleó para optimizar el tiempo de entrecruzamiento, usando distintos periodos de tratamiento con glutaraldehído, de 30 a 180 minutos. Como se puede observar en la *tabla 18*, el tiempo que proporciona una actividad más elevada fue 120 minutos.

Una vez optimizado el proceso de preparación de PhaZ_{Sex}-CLEAs, se procedió a la caracterización de este derivado.

4.1.2 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs

El perfil de actividad frente a distintos valores de pH exhibido por los PhaZ_{Sex}-CLEAs fue realizado mediante el ensayo turbidimétrico, empleando 10 mg (peso húmedo) de derivado, debido a la hidrólisis espontánea que sufren los derivados de pNP, sobre todo a valores básicos de pH. La actividad máxima se logró a pH 7, aunque presenta un buen nivel de actividad en el

intervalo de valores entre 6 y 8. En la *figura 57* se puede observar este perfil de actividad en comparación con el obtenido para la enzima soluble, mostrando un desplazamiento del óptimo hacia valores ácidos.

Tabla 18: Efecto del tiempo de incubación con glutaraldehído en la actividad de los derivados PhaZ_{Sex}-CLEA¹

Tiempo (min)	Actividad específica (U/g)	Actividad relativa (%)
30	104,6	41
60	107,1	42
90	219,0	86
120	255,0	100
180	155,6	61

¹ Condiciones de entrecruzamiento: 12,5 mM glutaraldehído y proporción BSA:PhaZ_{Sex} de 100:1

² Actividad PHB despolimerasa, determinada mediante el ensayo de actividad específico para CLEAs. Unidades de actividad por gramo húmedo de soporte.

Del mismo modo que la enzima soluble, se ensayó la estabilidad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs mediante la incubación de 5 mg en tampón borato-citrato-fosfato a distintos valores de pH durante 45 minutos. Tras el periodo de incubación se midió la actividad remanente con el ensayo cromogénico de actividad, los resultados se exponen en la *figura 57*. El derivado presenta buena estabilidad a valores de pH por encima de 5, su estabilidad se ve afectada a valores más ácidos, mostrando una gran similitud con la estabilidad de la enzima soluble, aunque el derivado inmovilizado presenta una estabilidad ligeramente superior a pH 5.

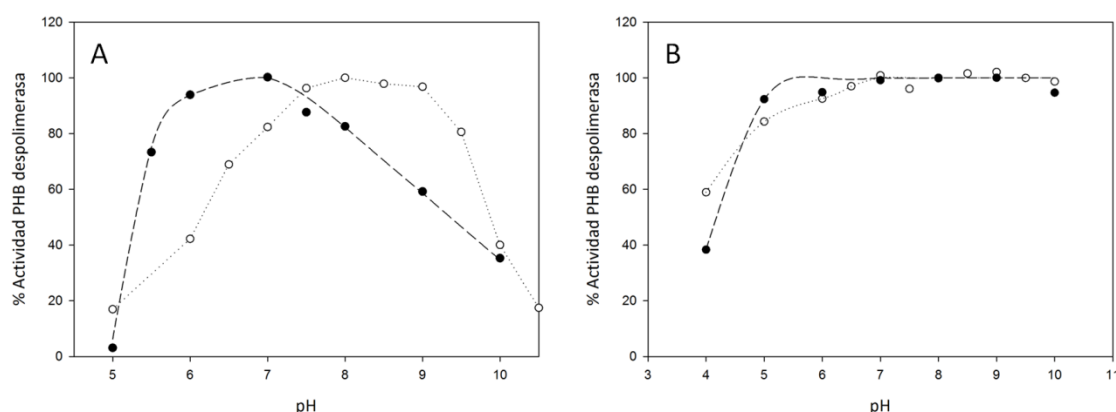


Figura 57: Efectos del pH sobre la actividad (A) o la estabilidad (B) del derivado inmovilizado PhaZ_{Sex}-CLEAs (●). El perfil de actividad frente a pH fue realizado mediante el ensayo turbidimétrico de actividad específico para CLEAs, el estudio de la estabilidad se llevó a cabo con el ensayo cromogénico específico para CLEAs. También se muestran los porcentajes obtenidos en el caso de la enzima PhaZ_{Sex} soluble (○), para permitir su comparación directa. La actividad enzimática correspondiente al 100% en el perfil de actividad es de 255 U/gramo húmedo de derivado, y 3.959 U/mg en el caso de la enzima soluble.

4.1.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de los PhaZ_{Sex}

La actividad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs a distintas temperaturas fue medida mediante el ensayo cromogénico con *p*NP-butirato como sustrato. Como se muestra en la *figura 58*, la actividad máxima fue encontrada a 60°C, lo que supone un aumento de 20°C en la temperatura óptima respecto a la enzima soluble, indicando una notable estabilización térmica de la enzima inmovilizada, consecuencia del proceso de entrecruzamiento.

La estabilidad del derivado PhaZ_{Sex}-CLEA fue ensayada en las mismas condiciones que en el caso de la enzima soluble, mediante la incubación de 5 mg de derivado durante 45 minutos en tampón a pH 7 y distintas temperaturas desde 30 a 80°C, para a continuación evaluar la actividad residual con el ensayo cromogénico. En la *figura 58* se muestra la estabilidad hallada a distintas temperaturas comparada con la de PhaZ_{Sex} soluble. Los PhaZ_{Sex}-CLEAs presentan una gran estabilidad hasta los 60°C, a partir de esta temperatura la estabilidad se ve considerablemente reducida. Este resultado revela una clara estabilización respecto a la enzima soluble, que solo es estable hasta 50°C, y queda totalmente inactivada tras la incubación a 70°C, mientras que los PhaZ_{Sex}-CLEAs conservan la mitad de su actividad tras someterlos al mismo procedimiento.

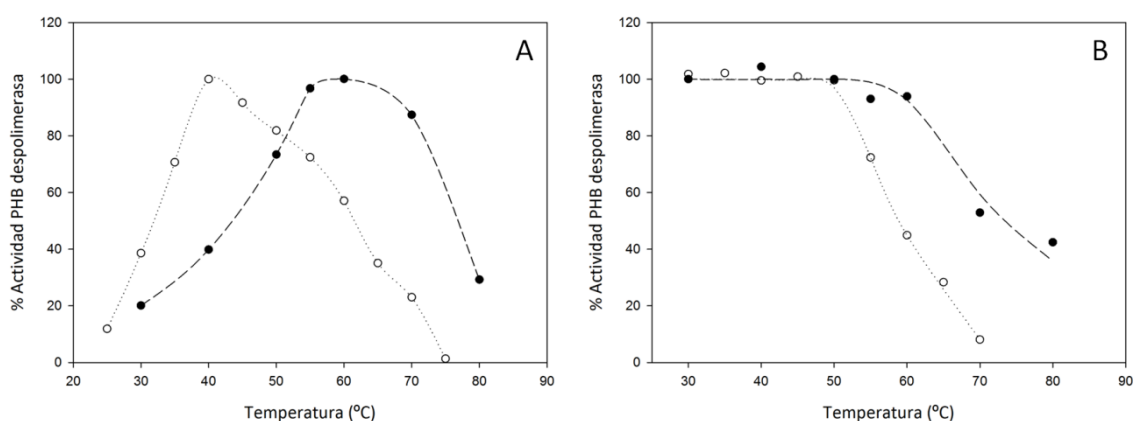


Figura 58: Efectos de la temperatura sobre la actividad (A) o la estabilidad (B) del derivado inmovilizado PhaZ_{Sex}-CLEAs (●) realizado mediante el ensayo cromogénico de actividad específico para CLEAs. También se muestran los valores obtenidos en el caso de la enzima PhaZ_{Sex} soluble (○) con el ensayo turbidimétrico, para permitir su comparación directa. La actividad enzimática correspondiente al 100 % en el perfil de actividad es de 0,38 UI/gramo húmedo de derivado y 5.980 U/mg en el caso de la enzima soluble.

4.1.4 Termoinactivación de PhaZ_{Sex}-CLEAs

Adicionalmente se estudió la inactivación térmica de este derivado inmovilizado a 40 y 60°C ensayando la actividad conservada a distintos tiempos hasta 275 minutos (*Figura 59*). A 40°C no se observa pérdida de actividad con el tiempo, de forma similar a lo observado en PhaZ_{Sex} soluble, y a 60°C se aprecia una ligera pérdida de actividad a tiempos superiores a 3 horas. Este

resultado indica nuevamente una estabilización del derivado inmovilizado respecto a la forma soluble, que a 60°C durante 240 minutos pierde el 80% de su actividad original.

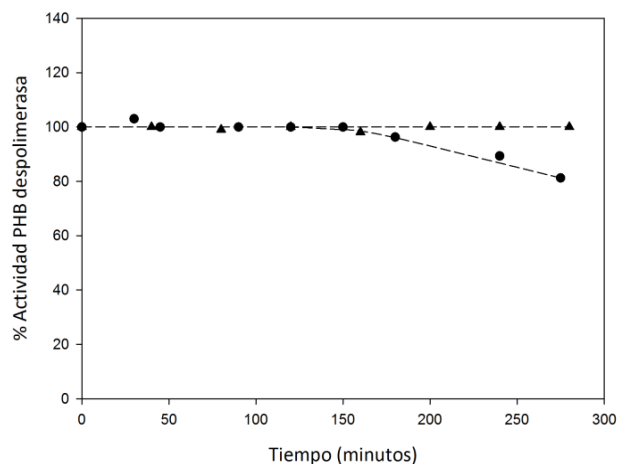


Figura 59: Estudios de inactivación térmica de los PhaZ_{sex}-CLEAs a 40 (▲) y 60°C (●), realizados con el ensayo cromogénico de actividad específico para CLEAs.

4.1.5 Actividad de PhaZ_{sex}-CLEAs en presencia de distintos disolventes orgánicos

La actividad PHB despolimerasa de los PhaZ_{sex}-CLEA en presencia de distintos disolventes orgánicos al 10% de concentración (v/v) fue ensayada mediante el ensayo turbidimétrico, y comparada con la presentada por la forma soluble de esta enzima (Figura 60).

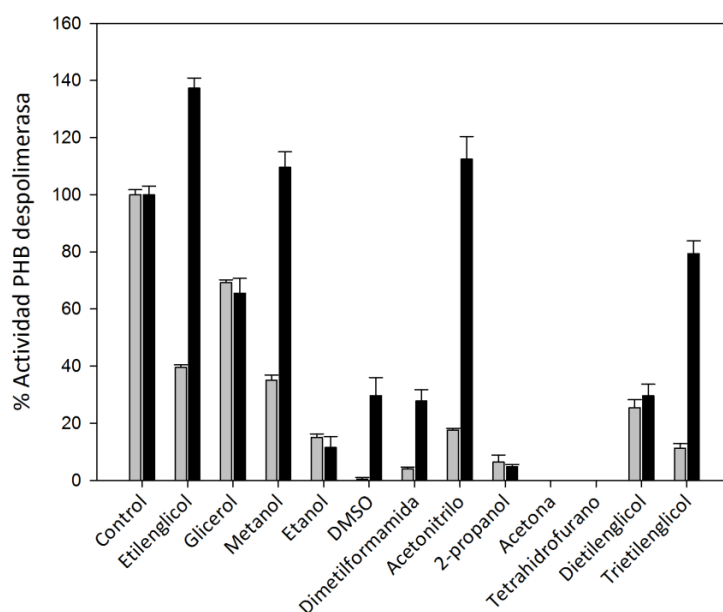


Figura 60: Actividad PHB despolimerasa del derivado PhaZ_{sex}-CLEAs (barras negras) en presencia de un 10 % (v/v) de distintos disolventes orgánicos, valores obtenidos mediante el ensayo turbidimétrico de actividad específico para CLEAs. Se muestran también los resultados equivalentes obtenidos con la enzima PhaZ_{sex} soluble (barras grises), para permitir su comparación.

La enzima inmovilizada presentó un porcentaje de actividad muy superior a la enzima soluble en presencia de varios disolventes como etilenglicol, acetonitrilo, metanol, DMSO, DMF o trietilenglicol, llegando a experimentar un incremento de actividad con etilenglicol, acetonitrilo y metanol.

4.1.6 Reciclado de PhaZ_{Sex}-CLEAs

El reciclado de los derivados enzimáticos es un importante requisito para su aplicación en biorreactores industriales. Para evaluar la capacidad de reciclado de los PhaZ_{Sex}-CLEAs se ensayó su actividad en varios ciclos consecutivos empleando el ensayo cromogénico específico para estos derivados. La actividad presentada en cada ciclo está representada en la *figura 61*. Se puede observar que los PhaZ_{Sex}-CLEAs pueden ser reutilizados durante al menos 20 ciclos consecutivos sin pérdida significativa de actividad, indicando una considerable resistencia y estabilidad operacional.

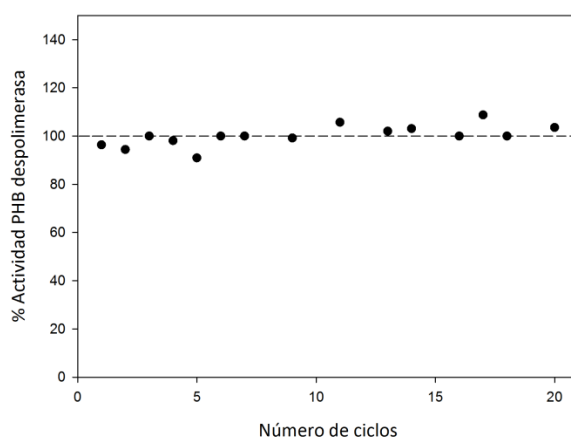


Figura 61: Estudio de reutilización del derivado PhaZ_{Sex}-CLEAs durante 20 ciclos consecutivos realizado mediante el ensayo cromogénico de actividad específico para CLEAs.

4.1.7 Microscopía confocal de PhaZ_{Sex}-CLEAs

La distribución de las moléculas de PHB despolimerasa en la superficie de las partículas de PhaZ_{Sex}-CLEAs fue analizada mediante microscopía confocal. Para ello 10 mg de derivado se trataron con anticuerpos generados en conejo anti-PhaZ_{Sex} y posteriormente con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 para revelar las zonas con anticuerpo adsorbido.

En la *figura 62*, las zonas que presentan fluorescencia verde representan la despolimerasa PhaZ_{Sex} inmovilizada y marcada con el fluoróforo, que produce una máxima emisión de fluorescencia a 519 nm. Una vez capturadas varias secciones bidimensionales (ejes x e y)

individuales a diferentes profundidades (eje z) a intervalos de 1 μm , se pudo reconstruir un volumen tridimensional de cada partícula analizada, en la que se puede observar la distribución de PhaZ_{Sex} sobre la superficie de partícula de derivado. Este análisis indicó una distribución homogénea de PhaZ_{Sex} en los CLEAs analizados, y permitió estimar el tamaño de dichas partículas de derivado, que resultó oscilar en el intervalo entre 50 y 300 μm .

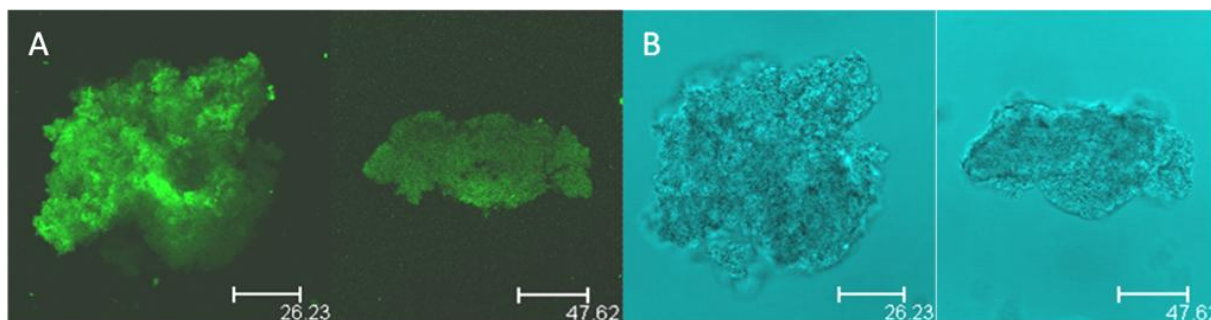


Figura 62: Imágenes de microscopía confocal de barrido (A) y microscopía óptica (B) de dos partículas de PhaZ_{Sex}-CLEAs. Las partículas fueron tratadas con anticuerpo primario anti-PhaZ_{Sex} y anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 488. Las imágenes de fluorescencia obtenidas mediante microscopía confocal (A) son la suma de secciones bidimensionales (xy) individualmente capturadas a diferentes profundidades (z) con incrementos de 1 μm , de una misma partícula. En cada imagen se indica el tamaño relativo en μm mediante la barra de escala.

4.2 Inmovilización de PhaZ_{Sa} en partículas magnéticas

Se realizaron diferentes ensayos de inmovilización de la PHB despolimerasa PhaZ_{Sa} en partículas magnéticas previamente sometidas a un proceso de silanización con el fin de dotarlas de grupos amino en su superficie.

4.2.1 Inmovilización covalente de PhaZ_{Sa} empleando glutaraldehído como agente de conjugación

Conjugación directa con glutaraldehído

En primer lugar se trató de inmovilizar covalentemente PhaZ_{Sa} en partículas magnéticas silanizadas mediante conjugación directa con glutaraldehído, para ello se aplicaron dos cantidades distintas de enzima (70 y 140 μg) así como dos concentraciones diferentes de glutaraldehído: 0,125 y 0,375% (v/v), equivalentes a 13 y 40 mM aproximadamente. Tras incubar la despolimerasa con el glutaraldehído y 10 mg de partículas magnéticas silanizadas en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7 a temperatura ambiente y con agitación durante 2

horas se descartaron los sobrenadantes y se lavaron las partículas tres veces con tampón MES 100 mM pH 6. Finalmente se midió la actividad PHB despolimerasa de estos derivados mediante el ensayo de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa. Las actividades detectadas en todos los casos son muy bajas, reteniendo menos del 0,1% de la actividad ofrecida en todos los casos, por lo que se decidió cambiar de estrategia de inmovilización.

Conjugación con glutaraldehído en dos fases

Para evitar la fuerte inactivación de PhaZ_{So} producida por la exposición prolongada al glutaraldehído se intentó llevar a cabo la conjugación de la enzima con las partículas magnéticas silanizadas en dos pasos.

En una primera fase se activaron las partículas magnéticas mediante la incubación de éstas durante 16 horas en presencia de un 5% de glutaraldehído con agitación vigorosa a temperatura ambiente, para después lavar exhaustivamente las partículas activadas, primero con agua desionizada y a continuación dos veces con tampón MES 100 mM pH 6.

En la segunda fase se incubaron 10 mg de las partículas magnéticas activadas con 0,84 UI de PhaZ_{So} en tampón MES 100 mM pH 6 a temperatura ambiente y con agitación, durante diferentes tiempos de 5 a 25 minutos, a intervalos de 5 minutos. Transcurrido el tiempo correspondiente se añadieron 0,6 mg de BSA a cada derivado para bloquear los grupos aldehído remanentes, y se incubaron durante 5 minutos adicionales. Finalmente se lavaron las partículas resultantes tres veces y se procedió a medir su actividad despolimerasa mediante el ensayo de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa.

Las actividades presentadas por estos derivados enzimáticos se muestran en la *tabla 19*. Son actividades muy bajas en relación a la elevada cantidad de enzima aplicada. Todos los tiempos de exposición de la enzima con las partículas magnéticas activadas producen derivados con un nivel muy similar de actividad, sin embargo, al analizar la actividad en los sobrenadantes de cada derivado mediante ensayos en placa y β -hidroxibutirato deshidrogenasa, se observó que el incremento en dicho tiempo de exposición reduce claramente la actividad en el eluido, que a los 20 minutos ya es casi indetectable (*Figura 63*). Teniendo en cuenta la actividad perdida en el sobrenadante, la actividad retenida en las partículas es mayor cuanto más corto es el tiempo de exposición a las partículas activadas, siendo máxima a los 5 minutos, con aproximadamente un 9% de actividad retenida. El hecho de que los derivados retengan menos actividad con tiempos de exposición más prolongados sugiere una unión multipuntual de la enzima al soporte, provocando su inactivación, posiblemente debido a la distorsión de la estructura proteica.

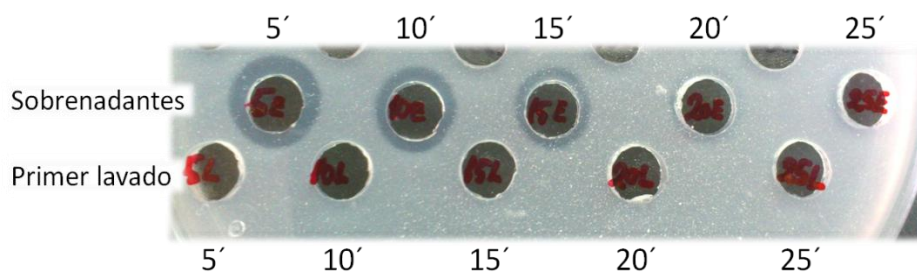


Figura 63: Ensayo de actividad PHB despolimerasa en placa de los sobrenadantes y primeros lavados de los derivados de PhaZ_{S_a} preparados por conjugación en dos pasos con glutaraldehído. Se puede observar como decrece la actividad eluída al aumentar el tiempo de exposición de la enzima con el soporte activado.

A continuación se llevó a cabo un lavado de las distintas partículas magnéticas con tampón MES 100 mM pH 6 con NaCl 1 M, facilitando la desorción de las moléculas de enzima retenidas por interacciones electrostáticas, para verificar el carácter covalente de esta inmovilización. Los resultados mostrados en la *tabla 19* reflejan una pérdida de entre el 16 y el 22% de la actividad previa al lavado con NaCl, indicando que parte de la enzima presente en las partículas no está unida por enlaces covalentes sino por adsorción electrostática.

Tabla 19: Inmovilización de PhaZ_{S_a} en partículas magnéticas silanizadas y activadas con glutaraldehído.

Tiempo de exposición (minutos)	5	10	15	20	25
Actividad del derivado (UI/g)	1,89	1,98	1,90	1,65	1,85
Actividad ofrecida (UI)	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Actividad eluída (UI)	0,62	0,35	0,20	0,08	0,06
Inmovilización (%)	26	59	76	91	93
Actividad retenida (%)	8,8	4,0	3,0	2,2	2,4
Actividad tras lavado con NaCl (UI/g)	1,47	1,66	1,53	1,31	1,47

4.2.2 Inmovilización covalente de PhaZ_{S_a} empleando EDC como agente de conjugación

Debido al efecto perjudicial del glutaraldehído sobre la actividad de PhaZ_{S_a}, se diseñó otra estrategia de inmovilización consistente en el empleo de la carbodiimida hidrosoluble 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), agente de conjugación capaz de establecer uniones covalentes entre grupos amino y carboxilo.

Para evitar una exposición prolongada de la enzima con EDC, que podría inactivarla, se llevó a cabo una primera fase de activación de los grupos carboxilo presentes en los residuos de ácidos aspárticos y glutámicos de PhaZ_{S_a} durante tiempos cortos, de 5 ó 30 minutos, en

tampón MES 100 mM pH 5, en presencia de tres concentraciones diferentes de EDC: 0,1, 1 y 10 mM. Transcurrido el tiempo correspondiente se añadieron las preparaciones de enzima activada a 10 mg de partículas magnéticas silanizadas en tampón MES 100 mM pH 6. Esta mezcla se incubó con agitación orbital a temperatura ambiente durante 2 horas, para finalmente separar las partículas del sobrenadante y lavarlas 3 veces con tampón MES 100 mM pH 6. Adicionalmente se preparó un derivado control sin activar la enzima con EDC, por lo que el número total de derivados distintos fue de 7. La actividad PHB despolimerasa de estos derivados, así como la de los sobrenadantes eluidos, se evaluó mediante el ensayo de actividad de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa (Tabla 20).

Como se puede observar en la tabla 20, todos los derivados presentan un nivel similar de actividad, de 5,5 a 5,9 UI/gramo de derivado, excepto el incubado 30 minutos con EDC 10 mM, que pierde la mayor parte de la enzima aplicada y presenta una actividad de 3,2 UI/gramo. Todos los derivados, incluido el control sin EDC, presentan una actividad retenida baja, por debajo del 9% de la actividad que correspondería a la enzima en solución.

Como era de esperar, el derivado control es el que pierde más actividad tras el lavado con alta fuerza iónica, conservando tan solo un 22% de la actividad inicial, aunque los derivados conjugados con EDC también sufren un importante descenso en su actividad, de entre el 50 y el 75%, lo que indica que la mayor parte de la actividad retenida puede deberse a enzima unida mediante interacciones no covalentes de tipo hidrofóbico e iónico, no logrando la unión covalente buscada mediante el uso de este tipo de agentes conjugantes.

Tabla 20: Inmovilización de PhaZ_{Sa} previamente activada mediante EDC en partículas magnéticas silanizadas.

Tiempo de exposición (min)	5	5	5	30	30	30	Control
[EDC] (mM)	0,1	1	10	0,1	1	10	0
Actividad del derivado (UI/g)	5,61	5,82	5,88	5,47	5,73	3,18	5,73
Actividad ofrecida (UI)	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77
Actividad eluída (UI)	0,26	0,36	0,60	0,45	0,22	1,39	0,22
Inmovilización (%)	85	79	66	75	87	21	88
% Actividad retenida	3,7	4,2	5,0	4,2	3,7	8,5	3,7
Actividad tras lavado con NaCl (UI/g)	1,50	1,46	2,05	2,49	2,07	1,68	1,26

4.2.3 Inmovilización no covalente de PhaZ_{Sa} mediante adsorción física

Dado que buena parte de la actividad inmovilizada parece atribuirse a interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas no covalentes, y el efecto negativo de glutaraldehído y EDC sobre la actividad de PhaZ_{Sa}, se decidió realizar ensayos de adsorción física de la despolimerasa a partículas magnéticas silanizadas prescindiendo de agentes conjugantes.

Optimización del pH y tiempo de adsorción

Para maximizar la adsorción de PHB despolimerasa a las partículas magnéticas se analizó el efecto del pH sobre el porcentaje de inmovilización y la actividad retenida de dichas partículas magnéticas. Se incubaron 10 mg de partículas silanizadas con 142 μg de PhaZ_{5a}, equivalentes a 3,53 UI de actividad PHB despolimerasa, en presencia de tampones 100 mM con diferentes valores de pH: tampón MES pH 5 ó 6, y tampón Tris-HCl pH 8. La incubación se realizó con agitación orbital a temperatura ambiente durante 18 horas, tomando varias alícuotas de sobrenadante a distintos tiempos para evaluar la adsorción de enzima al soporte sólido. Una vez terminada la incubación se lavaron tres veces las partículas con tampón MES 100 mM pH 6 y se procedió al ensayo de su actividad mediante la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, calculando los valores de la *tabla 21*.

Tabla 21: Actividad de los derivados de PhaZ_{5a} por adsorción electrostática a diferentes valores de pH.

pH	5	6	8
Actividad del derivado (UI/g)	10,11	10,41	8,09
Actividad ofrecida (UI)	3,53	3,53	3,53
Actividad eluída (UI)	0,65	0,87	0,85
Inmovilización (%)	82	75	76
% Actividad retenida	3,5	3,9	3,0

Estos derivados se obtuvieron mediante la incubación de la enzima con las partículas magnéticas silanizadas durante 18 horas a temperatura ambiente.

A la vista de estos valores de actividad se concluyó que los valores ácidos de pH promueven la adsorción más eficazmente que los básicos. Concretamente a pH 6 se logra la mayor actividad del derivado, aunque el porcentaje de inmovilización es ligeramente inferior que a pH 5.

De esta forma confirmamos que los valores ácidos de pH retienen mayor cantidad de enzima en la superficie de las partículas magnéticas. Por otra parte se observó que la mayor retención de proteína se logra en general a tiempos cortos, entre 30 y 60 minutos, por lo que no es necesaria una incubación prolongada para obtener resultados óptimos de adsorción. En los experimentos subsiguientes se optó por un tiempo de adsorción de 30 minutos.

Optimización de la carga enzimática

Una vez establecido un valor de pH, así como un tiempo de incubación, adecuados para promover la adsorción de PhaZ_{5a} a las partículas magnéticas silanizadas, se procedió a optimizar la carga enzimática aplicada a las partículas magnéticas. Con este propósito se

incubaron 10 mg de partículas con distintas cantidades de PhaZ_{So} entre 19 y 116 µg, en tampón MES 100 mM pH 6, a temperatura ambiente, con agitación orbital durante 30 minutos. A continuación se lavaron tres veces los derivados con el mismo tampón y se midió su actividad PHB despolimerasa mediante el ensayo de actividad de la β-hidroxibutirato deshidrogenasa, obteniendo los valores mostrados en la *tabla 22*.

La actividad PHB despolimerasa de los sobrenadantes tras la incubación se analizó mediante ensayo en placa, no hallando un nivel detectable de actividad en ninguno de ellos, por lo que se asume que hay un 100% de actividad inmovilizada. Como se puede apreciar en los resultados, la actividad neta presentada por los derivados aumenta según se incrementa la cantidad de enzima aplicada, sin embargo, el aumento de actividad de los derivados no es proporcional al aumento de la cantidad de enzima aplicada, por lo que el mayor porcentaje de actividad retenida, ligeramente superior al 11%, se logra con la carga enzimática más baja, que en este caso es de 1,9 mg de PhaZ_{So} por gramo seco de partículas magnéticas silanizadas.

Tabla 22: Optimización de la carga enzimática en 10 mg de partículas magnéticas silanizadas.

Cantidad de PhaZ_{So} (µg)	19,3	38,7	77,3	116,0
Actividad del derivado (UI/g)	4,71	6,64	7,26	7,80
Actividad ofrecida (UI)	0,42	0,84	1,67	2,51
Actividad eluída (UI)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Inmovilización (%)	100	100	100	100
% Actividad retenida	11,3	7,9	4,3	3,1

Estos derivados se obtuvieron mediante la incubación de la enzima con las partículas magnéticas silanizadas durante 30 minutos a pH 6 y temperatura ambiente.

4.3 Experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos empleando PhaZ_{Sex} como catalizador

Una preparación liofilizada de PhaZ_{Sex} fue empleada como catalizador en distintas reacciones de síntesis orgánica en medios no acuosos, con el fin de evaluar la capacidad de esta PHB despolimerasa para llevar a cabo reacciones diferentes a su actividad hidrolítica natural, como polimerización, acilación o transesterificación. Los experimentos llevados a cabo se pueden clasificar en los siguientes bloques:

4.3.1 Experimentos de polimerización de lactonas por apertura de anillo (ROP)

La capacidad de PhaZ_{Sex} para polimerizar los compuestos cíclicos β-butirolactona, γ-butirolactona y ε-caprolactona, fue ensayada mediante la mezcla de 10 mg de liófilo

conteniendo 1,2 mg de PhaZ_{sex} y 100 mg de la correspondiente lactona, sin disolvente, con agitación mecánica y a 80°C durante 48 horas; en el caso de la β -butirolactona se ensayaron dos tiempos de reacción distintos: 24 y 48 horas. Los resultados se muestran en la *tabla 23*.

Se puede observar que PhaZ_{sex} únicamente presenta cierta actividad sintética con β -butirolactona como sustrato en estas condiciones, obteniendo como producto PHB con M_n cerca de los 3.700 Da, lo que equivale a cadenas poliméricas de entre 40 y 45 monómeros de 3-hidroxibutirato.

Tabla 23: Resultados de experimentos de polimerización por apertura de anillo con PhaZ_{sex} como catalizador

Monómero	Tiempo (h)	Conversión (%)	M_n (Da)	\mathcal{D}
β -butirolactona	24	58,6	3.779	1,23
β -butirolactona	48	53,1	3.685	1,15
γ -butirolactona	48	-	-	-
ϵ -caprolactona	48	-	-	-

M_n : Masa molecular promedio en número de un polímero. \mathcal{D} : Dispersidad del polímero sintetizado. Ver sección de material y métodos.

4.3.2 Experimentos de polimerización contra acilación

En estos experimentos también se llevó a cabo la polimerización de 100 mg de β -butirolactona mediante PhaZ_{sex}, pero en presencia de tres compuestos diferentes con uno o más grupos hidroxilo, estos compuestos son: 3-fenil-propanol (1 grupo -OH), glicerol (3 grupos -OH) y 2-etil-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (trimetilolpropano) (3 grupos -OH). La cantidad de grupos hidroxilo añadidos en cada experimento fue el doble de la cantidad molar de β -butirolactona usada (proporción molar β -butirolactona:-OH de 1:2).

Los experimentos se llevaron a cabo durante 72 horas en agitación, con 1,2 mg de PhaZ_{sex} en 1,8 mL de tolueno como disolvente y a 80°C. En la *tabla 24* podemos ver los resultados de estos experimentos. Con 3-fenil-propanol no se genera ningún polímero, en cambio en presencia de las concentraciones seleccionadas de glicerol y trimetilolpropano se detectan polímeros de idénticas características, con un M_n de 800 Da y una dispersidad muy baja, de 1,03, indicando la existencia de múltiples cadenas de oligómero de tamaño muy homogéneo integradas aproximadamente por unos 9 monómeros de 3-hidroxibutirato. Los espectros de RMN revelaron que se habían producido múltiples uniones entre los monómeros y los grupos hidroxilo del glicerol o del trimetilolpropano.

Tabla 24: Resultados de experimentos de polimerización contra acilación con PhaZ_{Sex} como catalizador

Monómero	Alcohol	Resultado RMN	M _n (Da)	Đ
β-BL	3-fenil-propanol	No polímero	-	-
β-BL	Glicerol	Polímero, múltiples uniones	800	1,03
β-BL	Trimetilolpropano	Polímero, múltiples uniones	800	1,03

4.3.3 Experimentos de polimerización de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-butirato de etilo

También se realizaron ensayos de polimerización de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-butirato de etilo mediante PhaZ_{Sex}. Para ello se mezclaron 100 mg del monómero correspondiente con 20 mg de líofilo conteniendo 2,4 mg de PhaZ_{Sex}, directamente sin disolvente, y los viales se incubaron en agitación a 80°C durante 48 horas. Como se muestra en la *tabla 25*, PhaZ_{Sex} muestra cierto potencial para la polimerización de 3-hidroxi-butirato, produciendo pequeños oligómeros de unos 7 monómeros de 3-hidroxi-butirato, sin embargo no se detecta ninguna clase de polímero en el caso del 3-hidroxi-butirato de etilo.

Tabla 25: Resultados de experimentos de polimerización de 3-hidroxi-butirato y etil-3-hidroxi-butirato con PhaZ_{Sex} como catalizador

Monómero	Tiempo (h)	Conversión (%)	M _n (Da)	Đ
3-hidroxi-butirato	48	22	600	1,12
3-hidroxi-butirato de etilo	48	-	-	-

4.3.4 Experimentos de transesterificación entre PHB y alcoholes

En este bloque de experimentos se intentó realizar una reacción de transesterificación entre PHB y uno de los siguientes alcoholes: 3-fenil-propanol, glicerol o trimetilolpropano, mediante PhaZ_{Sex}. Para ello, se disolvió 1 g de PHB en 10 mL de cloroformo a 80°C con reflujo refrigerado para evitar la pérdida de disolvente, en esta ocasión no se empleó tolueno como disolvente ya que el PHB presenta una solubilidad muy baja en tolueno. 1 mL de esta solución (100 mg de PHB) se mezcló con la cantidad correspondiente del alcohol para conseguir una proporción molar entre monómeros de PHB y grupos -OH de 5:1. A cada una de estas mezclas se le añadieron 2,4 mg de PhaZ_{Sex} y se incubaron a 80°C durante 72 horas con agitación.

Al analizar los espectros de RMN del resultado de estas reacciones no se detectaron evidencias de transesterificación en ninguna de las pruebas realizadas, por lo que se descartó la capacidad de PhaZ_{Sex} para llevar a cabo este tipo de reacciones en las condiciones ensayadas.

Discusión de los resultados

Los polihidroxicanoatos o PHAs son biopolímeros producidos por una amplia variedad de microorganismos en determinadas circunstancias metabólicas. Estos PHAs son polioxoésteres isotácticos y lineales desde el punto de vista químico, y presentan un comportamiento termoplástico similar al de algunos plásticos derivados del petróleo. La producción de los plásticos tradicionales a partir de materias primas no renovables y el gran problema de su dificultosa biodegradación hacen necesaria su sustitución por nuevos plásticos biodegradables, más respetuosos con el medio ambiente y que se puedan obtener a partir de materias primas renovables, ayudando así a paliar a largo plazo el impacto medioambiental originado por el desahogado empleo comercial e industrial de los plásticos tradicionales. Los PHAs han suscitado un gran interés en las últimas décadas, no sólo por su potencial aplicación como plásticos biodegradables, sino especialmente por la enorme diversidad de sus propiedades fisicoquímicas, dependientes principalmente del tipo y longitud de la cadena radical de sus monómeros constituyentes. Aparte de su relativamente sencilla biodegradabilidad y su producción a partir de multitud de materias primas renovables, los PHAs poseen además una serie de cualidades adicionales que los hacen más adecuados para determinadas aplicaciones: su biocompatibilidad, su ausencia de toxicidad o la gran versatilidad de sus propiedades, modulables mediante el control de su composición monomérica.

De forma general, los PHAs más frecuentes en la naturaleza se dividen en dos grandes grupos, en función de la longitud de la cadena alifática lateral de sus monómeros, los PHAs de cadena corta (scl-PHAs), con solo uno o dos carbonos, y los de cadena media (mcl-PHAs), a partir de tres carbonos. Sus características fisicoquímicas son sensiblemente diferentes, siendo los scl-PHA bioplásticos más rígidos y quebradizos, con un mayor grado de cristalinidad, mientras que los mcl-PHAs se caracterizan por ser mayormente amorfos, mucho más elásticos y de consistencia gomosa.

Los PHAs son degradados naturalmente para liberar sus monómeros u oligómeros constituyentes por las enzimas conocidas como PHA despolimerasas. Esta degradación puede llevarse a cabo en el citoplasma de una bacteria acumuladora con el fin de movilizar las reservas intracelulares de carbono y energía que suponen los PHAs, o bien puede producirse en el medio extracelular, mediante despolimerasas secretadas por microorganismos que pueden ser productores de PHA o no serlo, para convertir estos polímeros en moléculas más pequeñas y asimilables por dichos microorganismos. Estos dos procesos están claramente diferenciados y compartimentalizados, y son llevados a cabo por distintas familias de despolimerasas, con características bioquímicas y mecanismos de acción diferentes.

La despolimerización enzimática de los PHAs es un proceso muy interesante, no solo de cara a la degradación de posibles residuos plásticos evitando su acumulación en el medio ambiente,

sino también para la producción industrial de intermediarios quirales enantioméricamente puros, de alto valor añadido. Esto es posible gracias a la estricta enantioselectividad de las PHA sintetas, las enzimas encargadas de generar las cadenas de PHA, lo que permite que estos PHAs estén constituidos exclusivamente por 3-hidroxiácidos con conformación *R*. La despolimerización enzimática de los PHAs produce la liberación de estos (*R*)-3-hidroxiácidos, muy valiosos como materiales de partida en la síntesis de un gran número de fármacos y otros compuestos químicos quirales, cuya síntesis a partir de compuestos en mezclas racémicas es más costosa y requiere de pasos adicionales para obtener un producto enantioméricamente puro.

En esta tesis nos hemos interesado principalmente por la degradación extracelular del scl-PHA más conocido y probablemente el PHA más abundante en la naturaleza, el poli[(*R*)-3-hidroxi butirato] o PHB, llevada a cabo mediante PHB despolimerasas extracelulares producidas por bacterias Gram positivas del género *Streptomyces*, concretamente las PHB despolimerasas procedentes de las cepas *S. exfoliatus* (PhaZ_{sex}) y *S. ascomycinicus* (PhaZ_{sa}). La elección de estos microorganismos se debe a que el conocimiento bioquímico de las PHB despolimerasas extracelulares de bacterias Gram positivas es comparativamente inferior al acumulado acerca de sus homólogas en Gram negativas, especialmente en bacterias del género *Pseudomonas* y en *Paucimonas lemoignei*, en la que se han descrito un total de siete PHB despolimerasas extracelulares. Por otra parte, las bacterias Gram positivas del suelo tal como *Streptomyces*, son especialmente interesantes en este sentido, porque han demostrado representar buena parte de los microorganismos degradadores de PHA en ambientes naturales, y disponen de sofisticadas maquinarias enzimáticas para la degradación de cualquier tipo de biopolímero, ya sea natural o sintético, que pueda presentarse en el medio ambiente.

Este estudio científico integral y exhaustivo ha abarcado la detección de la actividad desarrollada por estas enzimas, su identificación, clonación, expresión heteróloga y aislamiento mediante técnicas cromatográficas, para después desarrollar una completa caracterización bioquímica, funcional y estructural de las dos enzimas estudiadas. Además se ha explorado la utilización de PhaZ_{sex} para la creación de catalizadores enzimáticos reutilizables, así como su empleo en experimentos de síntesis orgánica en medios no acuosos. Finalmente, se ha iniciado el desarrollo de nuevos biocatalizadores inmovilizados de PhaZ_{sa}, que también podrían ser interesantes para la hidrólisis enzimática de PHB.

1. Identificación y análisis de PHB despolimerasas extracelulares de *Streptomyces*

El proceso de selección de enzimas candidatas para su estudio comenzó con la búsqueda *in silico* de secuencias génicas completas clasificadas como PHB despolimerasas y pertenecientes a cepas del género *Streptomyces*, lo que nos llevó a las secuencias de los genes *phaZ_{Sex}* y *fkBU*, de las cepas *S. exfoliatus* K10 y *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus*, respectivamente. Esta última especie bacteriana fue posteriormente reclasificada como *S. ascomycinicus*, por lo que se hace referencia a esta clasificación más reciente (Kumar y Goodfellow 2010).

La primera de las PHB despolimerasas, PhaZ_{Sex}, producida por la cepa K10 de *S. exfoliatus*, ya había sido clonada en *E. coli*, semipurificada a partir del extracto periplásmico, y parcialmente caracterizada (Klingbeil *et al.* 1996). Esta enzima presenta propiedades que la hacen ser una candidata adecuada para su aplicación biotecnológica, por lo que en el presente estudio se decidió profundizar en su estudio y caracterización, previa optimización de los sistemas de expresión y purificación. Por su parte, la existencia de la PHB despolimerasa de *S. ascomycinicus* solamente había sido inferida previamente por la homología que presenta el gen *fkBU* con el gen que codifica la PHB despolimerasa extracelular PhaZ3 de *Paucimonas lemoignei* ATCC 17989 (Briese *et al.* 1994, Jendrossek 2001b). El gen *fkBU* había sido descrito como uno de los genes estructurales integrantes del cluster FK520, encargado de las distintas etapas de biosíntesis del macrólido ascomicina (Wu *et al.* 2000). La función propuesta para el producto de *fkBU* fue degradar el PHB acumulado con el fin de proporcionar un nivel adecuado de 3-hidroxi butirato, el cual, por acción de una CoA ligasa, se convertiría en 3-hidroxi butiril-CoA, primer compuesto en la ruta de biosíntesis de la ascomicina.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, deducidas de los genes *phaZ_{Sex}* y *fkBU*, reveló dos proteínas de tamaño similar, con 488 y 519 aminoácidos, respectivamente. Sin embargo, al analizar estas secuencias mediante el servidor SignalP 4.1 se halló una probabilidad muy elevada de que ambas proteínas contuvieran un péptido señal de secreción en posición N-terminal, lo que concordaba con la presunta naturaleza extracelular de ambas enzimas. En el caso de PhaZ_{Sex}, ya había sido previamente descrito un péptido señal de 26 aminoácidos de longitud. Sin embargo, el péptido señal de PhaZ_{So} es excepcionalmente largo, con una longitud de 58 aminoácidos (Figura 15). El péptido señal de PhaZ_{Sex} encaja bastante bien con la estructura típica de los péptidos señal de secreción, que comprende una región N-terminal con varios residuos cargados positivamente, una región central compuesta mayormente por aminoácidos apolares y una parte C-terminal, que incluye algún aminoácido capaz de formar giros β , como glicina o prolina, así como el sitio de corte de las peptidasas

señal: dos alaninas flanqueando otro aminoácido que puede ser variable (A-X-A-sitio de corte) (Lammertyn y Anné 1998). No obstante, el supuesto péptido señal de PhaZ_{Se} presenta una región N-terminal inusualmente larga, que además tiene pocas cargas positivas. Esta excesiva longitud se confirmó mediante el servidor SignalP 4.1, apreciándose en la *figura 15* el bajo nivel de confianza estimado para la mitad N-terminal de este péptido señal. Una posible explicación para la longitud del péptido señal de PhaZ_{Se} es el posible inicio de la traducción proteica en un codón posterior al asumido, aunque no se tratara de un codón de inicio estándar ATG (codificante de una metionina), como se discutirá en detalle más adelante.

Una vez escindidos los correspondientes péptidos señal de ambas preproteínas citoplásmicas, se generarían unas PHB despolimerasas maduras PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Se} de 462 y 461 aminoácidos, con unas masas moleculares casi idénticas, de 47,9 y 48,0 kDa, y puntos isoeléctricos teóricos de 5,26 y 5,31, respectivamente.

Mediante alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Se} con otras secuencias de PHB despolimerasas homólogas, con una identidad inferior al 58% entre ellas, se han localizado ciertos dominios y regiones altamente conservados evolutivamente (*Figura 16*). Entre estas regiones, y basándonos en la bibliografía (Klingbeil *et al.* 1996, Jendrossek y Handrick 2002), podemos destacar los aminoácidos presumiblemente involucrados en la catálisis, totalmente conservados en todas las secuencias empleadas para el alineamiento. Estos residuos catalíticos incluyen una serina, situada en el interior de un pentapéptido comúnmente conocido como caja lipasa, con secuencia consenso (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly) (Brenner 1988). En el caso de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Se}, X₁ coincide con una leucina, mientras que la posición X₂ es ocupada por una serina en PhaZ_{Sex} y una alanina en PhaZ_{Se}. Los otros aminoácidos catalíticos propuestos son una histidina y un ácido aspártico, también conservados en todos los homólogos alineados, y cuyos residuos adyacentes no están tan altamente conservados como en el caso de las serinas catalíticas.

Los tres aminoácidos catalíticos mencionados, aunque distantes en la estructura primaria de las enzimas analizadas, convergen en una misma región espacial tras el plegamiento tridimensional de las despolimerasas, conformando lo que se conoce como una triada catalítica, estructura muy extendida en diversas familias de hidrolasas, como esterasas o proteasas. La región de la estructura terciaria donde se localiza la triada catalítica constituye el centro activo de esta clase de enzimas, en el que la serina catalítica es la encargada de realizar el ataque nucleofílico sobre el enlace éster entre los monómeros del PHB. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto podemos proponer las siguientes identidades de las triadas catalíticas: Ser²⁴-Asp¹¹¹-His¹⁴³ para PhaZ_{Sex}, y Ser¹³¹-Asp²⁰⁹-His²⁶⁹ en el caso de PhaZ_{Se}.

Aparte de los residuos que conforman dichas triadas catalíticas, también hay otras regiones de gran importancia para la función llevada a cabo por las PHB despolimerasas analizadas. Una de ellas es la denominada "cavidad del oxianión", una región del centro activo encargada de estabilizar el intermediario tetraédrico transitorio generado tras el ataque nucleofílico de la triada catalítica. Esta estabilización se realiza a menudo a través de puentes de hidrógeno entre el oxianión y ciertos enlaces amida entre dos residuos de la enzima (Jaeger *et al.* 1995). En el caso de las PHB despolimerasas analizadas, se ha propuesto una cavidad del oxianión basada en la similitud de secuencia con la cavidad de oxianión de lipasas bacterianas (Jaeger *et al.* 1995, Jendrossek y Handrick 2002). En el caso de PhaZ_{Sex} esta región se situaría en torno a la histidina 237, posición más cercana al extremo C-terminal que los aminoácidos catalíticos, tratándose, por tanto, de un dominio catalítico tipo 2. En cambio, la cavidad del oxianión de PhaZ_{Sa} estaría en las cercanías de la histidina 48, más próxima al extremo N-terminal, configurando un dominio catalítico tipo 1.

También cabe reseñar el elevado número de cisteínas encontrado en las secuencias de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}, que contienen 10 y 8 residuos de cisteína respectivamente. Estas cisteínas posibilitarían el establecimiento de varios puentes disulfuro intracatenarios que conferirían una mayor estabilidad a la estructura tridimensional de estas enzimas. Las cisteínas presentan un nivel de conservación muy elevado entre los homólogos seleccionados para el alineamiento, a diferencia de los residuos localizados en sus inmediaciones, lo que sugiere que estas cisteínas tienen un papel relevante para la función de las PHB despolimerasas. Dicho papel estaría relacionado con una mayor estabilidad estructural, imprescindible para muchas enzimas hidrolíticas que son secretadas al medio extracelular, donde las condiciones fisicoquímicas son considerablemente más rigurosas e inestables que en muchas localizaciones intracelulares.

En el extremo C-terminal de estas PHB despolimerasas podemos encontrar lo que se conoce como dominio de unión a sustrato o SBD (del inglés *substrate binding domain*). Se ha demostrado que este tipo de dominio es capaz de adherirse a la superficie del sustrato polimérico (Behrends *et al.* 1996, Briese y Jendrossek 1998), ya sea en forma de gránulo desnaturalizado vertido al medio por la lisis de bacterias acumuladoras, o en formas generadas artificialmente como puede ser una película de PHB. La naturaleza de esta unión aun no se ha dilucidado completamente, pero se cree que no solo se produce una serie de interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y el SBD, sino que también debe haber un reconocimiento específico de los enlaces éster y los grupos radicales en la superficie del polímero, mediado específicamente por determinados aminoácidos (Yamashita *et al.* 2001). La comparación de los SBD de un elevado número de PHB despolimerasas extracelulares permite clasificar estos

dominios en dos grupos de homología. En nuestro caso, los SBD de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa} se incluyen en el mismo grupo, siendo ambos considerados SBD de tipo 1. Una de las características que permiten diferenciar ambos tipos de SBD es la presencia de dos cisteínas en los de tipo 1 frente a un único residuo en los de tipo 2.

2. Detección de nuevas actividades PHB despolimerasa en cepas de *Streptomyces*

Con el objetivo de demostrar que *S. ascomycinicus* es una cepa productora de PHB despolimerasas extracelulares, y buscar además nuevas actividades PHA despolimerasa en otras cepas de *Streptomyces*, se cultivaron esporas frescas de *S. ascomycinicus*, así como de *S. albus*, *S. coelicolor*, *S. lavendulae* y *S. lividans* en placas de medio mínimo salino suplementadas con una capa fina de agar con una suspensión de PHB o emulsión de PHO como única fuente disponible de carbono. Estos ensayos se llevaron a cabo en un medio mínimo salino para evitar la represión catabólica producida por la elevada concentración de nutrientes de fácil asimilación presentes en los medios ricos empleados para el crecimiento de *Streptomyces*, como YEME o GYM (Kasuya *et al.* 1997, Sadocco *et al.* 1997, Romen *et al.* 2004). En estos experimentos también se sembraron esporas de *S. exfoliatus*, cepa descrita anteriormente como degradadora de PHB al igual que de PHO (Klingbeil *et al.* 1996), por lo que sirvió de control positivo.

Tal como se aprecia en la *figura 17*, se demostró la producción de PHB despolimerasa extracelular por parte de *S. ascomycinicus*, y adicionalmente se halló una actividad PHB despolimerasa no descrita anteriormente en *S. albus* J1074. Recientemente se ha publicado el genoma completo de esta cepa, lo que ha permitido identificar una secuencia codificante de una PHB despolimerasa extracelular putativa, con código de acceso YP_007747625.1 en NCBI (Zaburannyi *et al.* 2014), cuya actividad podría corresponder a la observada en estos experimentos.

3. Clonación y expresión heteróloga de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}

Conociendo las secuencias de nucleótidos de los genes *phaZ_{Sex}* y *fbkU*, que codifican las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{Sa}, se amplificaron estos genes mediante PCR, utilizando como molde el DNA cromosómico extraído de *S. exfoliatus* y *S. ascomycinicus*, para llevar a cabo su clonación y expresión en *E. coli* BL21(DE3). Una vez construidos los plásmidos de expresión pEPET1, pEPET2 y pHPET, se procedió a la inducción de los genes clonados, con el fin de

posibilitar su sobreexpresión. Como se muestra en la *figura 19*, no hay diferencias relevantes en cuanto a proteínas presentes en el caldo de fermentación o los extractos intracelulares solubles de los clones analizados con respecto al control negativo pET28. De hecho, hay muy pocas proteínas presentes en el caldo extracelular, ya que a pesar de precipitar 100 μ L de caldo se detectan pocas bandas mediante la tinción con azul de Coomassie. Sin embargo, al analizar los desechos celulares insolubles comparándolos con el control pET28, observamos claras muestras de sobreexpresión de una proteína de masa molecular ligeramente superior a los 45 kDa, lo que concuerda con el tamaño esperado para PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}. Esta banda es sensiblemente más abundante en los clones pEPET1 y pEPET2, que expresan PhaZ_{Sex} con y sin la secuencia de su péptido señal de secreción, respectivamente, mientras que en pHPET, que expresa PhaZ_{So}, se puede apreciar una banda aproximadamente del mismo tamaño, pero de forma menos patente.

En primer lugar, la detección de estas bandas proteicas únicamente en el desecho celular insoluble revela que, aunque la expresión de los genes clonados se está produciendo, el plegamiento de las enzimas producidas debe ser inadecuado, dado que no hay evidencia de la producción de enzima soluble, sino que se forman cuerpos de inclusión, es decir, agregados insolubles de proteína con un plegamiento erróneo. En segundo lugar, parece evidente que PhaZ_{Sex} se está sintetizando en mayor cantidad que PhaZ_{So}, lo que concuerda con el análisis del uso de codones de sus respectivos genes codificantes, en el que PhaZ_{So} presenta un 7% de codones raros, potencialmente problemáticos para su expresión en *E. coli*, frente al 5% de PhaZ_{Sex}.

En cualquier caso, el fracaso de la expresión heteróloga de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} en *E. coli* era previsible, conociendo el elevado contenido de G+C de los genes de actinomicetos en general, así como el bajo índice de adaptación de codones mostrado por los genes *phaZ_{Sex}* y *fkbU* en particular.

No obstante, al analizar la actividad PHB despolimerasa en placa de las distintas fracciones obtenidas de estos clones de *E. coli*, únicamente encontramos cierto nivel de actividad en el caldo extracelular de pHPET (*Figura 20*), lo que indica que se está produciendo una mínima cantidad de PhaZ_{So} con un plegamiento correcto, y que además está siendo secretada correctamente por la maquinaria enzimática de *E. coli*. Esta actividad solo se pudo detectar tras una prolongada incubación de la placa a 37°C, durante más de 24 horas, lo que indica que la cantidad de enzima en el caldo es muy baja, coincidiendo con la ausencia de bandas de proteína en los geles de electroforesis para el caldo extracelular de pHPET.

A la vista de estos resultados, se optó por un cambiar el microorganismo hospedador, buscando un sistema de expresión más adecuado para proteínas de bacterias Gram positivas, y más concretamente de actinomicetos.

El hospedador elegido para este propósito fue *Rhodococcus* sp. T104 (Hernández *et al.* 1997), otra especie de actinomiceto al igual que *Streptomyces*, pero de la familia Nocardiaceae. Esta cepa ya se había empleado anteriormente con éxito en nuestro laboratorio para expresar proteínas de otros organismos Gram positivos como *Streptomyces lavendulae* o *Actinoplanes utahensis* (Hormigo 2009). En este trabajo, el vector de expresión empleado es el plásmido bifuncional pNV19 (Chiba *et al.* 2007), diseñado para replicar en *E. coli*, así como en cepas Gram positivas como *Nocardia*, *Mycobacterium* o *Rhodococcus*. Los genes *phaZ_{Sex}* y *fbkU* fueron clonados en el vector pNV19, bajo el control del promotor *ermE**, fuerte y constitutivo, procedente del vector de expresión pEM4 (Bibb *et al.* 1985, Quirós *et al.* 1998), y así se obtuvieron las construcciones pEPNV1, que contiene el gen *phaZ_{Sex}* con la secuencia codificante del péptido señal, pEPNV2, con el gen *phaZ_{Sex}* sin péptido señal, y pHPNV, que contiene la secuencia íntegra del gen *fbkU*.

Estas construcciones fueron transferidas a células electrocompetentes de *Rhodococcus* sp. T104. Tras cultivar los clones de *Rhodococcus* sp. T104 con los plásmidos pEPNV1, pEPNV2, pHPNV y pNV19, se analizaron las distintas fracciones producidas mediante SDS-PAGE (Figura 23). No se aprecian diferencias relevantes en los extractos celulares (tanto solubles como insolubles) entre los distintos clones y el control negativo pNV19. En cambio, observamos la aparición de una clara banda de proteína en los caldos de fermentación de pEPNV1 y pHPNV, con el tamaño adecuado para tratarse de las PHB despolimerasas *PhaZ_{Sex}* y *PhaZ_{Sa}* maduras. Al comparar estos resultados con el ensayo de actividad de las fracciones (Figura 22), verificamos que hay un elevado nivel de actividad PHB despolimerasa en el caldo extracelular de pEPNV1 y pHPNV, a diferencia del control negativo y del clon pEPNV2, que contenía el gen *phaZ_{Sex}* sin la secuencia codificante de su péptido señal de secreción. Los extractos celulares tampoco presentaron actividad PHB despolimerasa en ningún caso.

Estos resultados evidencian el éxito de la expresión de estos dos genes en *Rhodococcus* sp. T104 y la idoneidad de este sistema para la expresión extracelular de enzimas procedentes de bacterias Gram positivas, pero además demuestra que esta cepa es capaz de reconocer adecuadamente elementos heterólogos de regulación de la expresión génica, como son el promotor *ermE**, procedente de *Saccharopolyspora erythraea*, la secuencia consenso de unión al ribosoma de *Streptomyces*, y los péptidos señal de secreción de ambas despolimerasas. Esto permite que toda la enzima producida sea secretada al medio extracelular, facilitando notablemente su subsiguiente purificación. Adicionalmente, la expresión extracelular de

PhaZ₅₈ confirma la existencia de un péptido señal en su secuencia. En este sentido, el fracaso de expresión de pEPNV2 pone de manifiesto la necesidad de uno de estos péptidos para la secreción de la enzima clonada, como se ilustra en la *figura 24*. La longitud de los péptidos señal de PhaZ₂₆ y PhaZ₅₈, se verificó mediante secuenciación de los extremos N-terminal de ambas enzimas maduras a partir del caldo de fermentación, obteniendo las secuencias de la *tabla 4*, y confirmando así los puntos de corte exactos pronosticados por el servidor SignalP 4.1, así como la longitud de los péptidos señal de PhaZ₂₆ (26 aminoácidos) y PhaZ₅₈ (58 aminoácidos).

Como ya se ha explicado en la sección de resultados, la gran longitud del péptido señal de PhaZ₅₈ y la localización de un posible sitio alternativo de inicio de la traducción proteica en el gen *fkbU*, mediante un codón GTG, llevaron a la construcción de una versión acortada del plásmido pHPNV (denominada pHPNV*GTG), con el fin de descartar que dicho gen se esté expresando a partir de ese codón alternativo, lo que implicaría que el péptido señal de PhaZ₅₈ contaría con 26 aminoácidos, y no los 58 deducidos por la secuencia del gen. Esta nueva construcción no produjo ninguna proteína extracelular de tamaño cercano al de PhaZ₅₈, ni se detectó ninguna actividad PHB despolimerasa en el caldo o las fracciones subcelulares. Este resultado negativo corrobora que *Rhodococcus* está reconociendo y expresando el péptido señal de 58 aminoácidos predicho inicialmente, lo cual no permite descartar que la cepa nativa *S. ascomycinicus* utilice el punto de inicio alternativo de la traducción.

Con respecto al péptido señal de PhaZ₅₈ también conviene reseñar que observando su secuencia encontramos que presenta cierta similitud con los péptidos señal de la ruta de secreción Tat, con un motivo de doble arginina y una longitud mucho mayor que los que emplean la ruta Sec (Berks 1996) (Chater *et al.* 2010), de hecho, al someter la secuencia completa de PhaZ₅₈ al servidor PRED-TAT (Bagos *et al.* 2010), específico para discriminar péptidos señal Tat y Sec, el resultado apunta a un péptido señal Tat con un nivel de confianza máximo, mientras que someter la secuencia con tan solo los 26 aminoácidos anteriores al punto de corte resulta en la predicción de un péptido Sec con el mismo nivel de confianza. Determinar a ciencia cierta qué tipo de ruta de secreción sigue PhaZ₅₈ para su translocación al medio extracelular requeriría de experimentación adicional con la cepa nativa, lo que escapa a los objetivos propuestos en este trabajo.

4. Purificación de las PHB despolimerasas PhaZ₂₆ y PhaZ₅₈

Los intentos de purificar las PHB despolimerasas mediante cromatografía de intercambio aniónico, ya sea con soportes activados con DEAE en discontinuo o activados con grupos

amonio cuaternario en continuo, solo permitieron alcanzar la purificación de una pequeña cantidad de la despolimerasa PhaZ_{So} producida en el caldo de cultivo de *Rhodococcus* sp. T104 pHPNV. Este resultado coincide con lo descrito en la bibliografía, donde se describe que la mayoría de e-PHA despolimerasas no son retenidas eficazmente en intercambiadores aniónicos (Jendrossek y Handrick 2002). En cambio, estas enzimas presentan una elevada afinidad por los materiales hidrofóbicos, característica atribuible al hecho de que su sustrato sea un polímero hidrofóbico, lo que les permite adsorberse con facilidad al PHA mediante su SBD, y llevar a cabo su actividad mediante la erosión superficial del polímero. Este hecho ha permitido el establecimiento de protocolos directos y sencillos para la purificación de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, obteniendo un nivel muy elevado de pureza en tan solo dos etapas, y una producción de más de 6 mg de proteína pura por litro de caldo de fermentación en ambos casos sin necesidad de emplear motivos de afinidad artificiales como colas de histidina o dominios GST o MBP para posibilitar su purificación. Al combinar dos soportes de interacción hidrofóbica con distinta selectividad a la hora de retener proteínas, se obtiene un nivel de resolución muy superior al que se puede lograr con una estrategia de un solo paso. Cabe destacar que la mencionada sencillez en la purificación de estas enzimas es posible gracias al éxito de su expresión extracelular, debido a la escasa presencia de proteínas en el caldo extracelular de *Rhodococcus* sp. T104.

5. Caracterización bioquímica y funcional de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

La obtención de ambas PHB despolimerasas con un gran nivel de pureza nos permitió llevar a cabo una completa caracterización de sus propiedades bioquímicas y funcionales. Se confirmaron las masas moleculares teóricas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y para descartar una posible forma activa multimérica se realizaron estudios de ultracentrifugación analítica de ambas enzimas, así como cromatografía de filtración en gel acoplada a espectrometría de masas de PhaZ_{Sex}, para identificar la forma activa de estas PHB despolimerasas. Todos los resultados apuntaron a que el monómero es la forma catalíticamente activa, a pesar de la aparición de estados multiméricos de agregación minoritarios, observados mediante MALDI-TOF, y que probablemente se puedan atribuir a una agregación reversible debida a las interacciones hidrofóbicas entre los dominios de unión a sustrato de estas enzimas.

Respecto a la actividad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, varios ensayos de actividad fueron adaptados o desarrollados para estas enzimas. La actividad más alta exhibida por PhaZ_{Sex} se registró a una temperatura de 40°C y en un intervalo de pH entre 7,5 y 9. Esta temperatura óptima coincide

exactamente con la publicada anteriormente, mientras que el intervalo óptimo de pH es ligeramente más amplio que el descrito anteriormente (Klingbeil *et al.* 1996). Por su parte, PhaZ_{So} mostró su máxima actividad entre 40 y 45°C, y a valores de pH de 5,5 a 6,5. Las temperaturas óptimas para la actividad enzimática de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} son bastante frecuentes entre las e-PHB despolimerasas de microorganismos del suelo (Asano y Watanabe 2001, Shah *et al.* 2008). Sin embargo, muchas de las PHB despolimerasas extracelulares de *Streptomyces* u otros géneros de bacterias Gram positivas, caracterizadas hasta la fecha pertenecen a cepas termófilas o termotolerantes (Çolak *et al.* 2005, Calabia y Tokiwa 2006, Takaku *et al.* 2006, Allen *et al.* 2011, Ma *et al.* 2011), por lo que se pueden encontrar actividades máximas hasta los 80°C. No obstante, la característica diferenciadora y poco común de PhaZ_{So} radica en presentar su máxima actividad en un intervalo de valores de pH ácido, con un óptimo en torno a 6. Mientras que este tipo de valores óptimos es muy frecuente entre las e-PHB despolimerasas producidas por hongos (Brucato y Wong 1991, Han *et al.* 1998, Zhou *et al.* 2009, Shivakumar *et al.* 2011), es muy raro entre especies bacterianas, de hecho solo se han podido encontrar dos ejemplos de e-PHB despolimerasas bacterianas con pH óptimo ácido, ambas producidas por la bacteria Gram negativa *Ralstonia pickettii* y con óptimos de 5,5 y 6 (Kurusu *et al.* 1994, Shiraki *et al.* 1995).

En los ensayos de estabilidad de las PHB despolimerasas frente a distintos valores de pH, PhaZ_{So} se mostró muy estable a valores entre 4,5 a 9, mientras que la actividad de PhaZ_{Sex} se mostró afectada en el intervalo de pH ácido, perdiendo casi la mitad de su actividad tras su exposición a pH 4 durante 45 minutos. Este dato refuerza la idoneidad de PhaZ_{So} para actuar a pH ligeramente ácido, ya que no sólo exhibe máxima actividad sino que también es muy estable. En consecuencia, la expresión de esta despolimerasa otorgaría cierta ventaja adaptativa a las comunidades bacterianas de *S. ascomycinicus*, cuando se encuentren creciendo en suelos pobres y ácidos.

En lo que respecta a la estabilidad térmica, ambas enzimas mostraron un comportamiento muy similar, manteniendo su estabilidad íntegra hasta los 50°C, y decayendo a partir de ese punto, siendo especialmente acusada la caída sufrida por PhaZ_{So}. Este brusco descenso también se observa en los estudios de inactivación térmica de PhaZ_{So} a 50 y 55°C, apreciándose una marcada diferencia entre los perfiles de inactivación a estas dos temperaturas (Figura 40). Adicionalmente, el análisis de la desnaturalización térmica mediante dicroísmo circular, en un intervalo amplio de temperaturas, también corrobora los resultados de estabilidad, determinándose unas temperaturas medias de desnaturalización (T_m) muy parecidas, de 55,8°C para PhaZ_{Sex} y 58,4°C para PhaZ_{So} (Figura 35). Estas temperaturas en las que se aprecia pérdida de estabilidad estructural coinciden muy aproximadamente con los valores a los que

se aprecia pérdida irreversible de actividad en ambas enzimas, y establecen un máximo de temperatura por debajo de la cual estas enzimas se pueden utilizar en cualquier tipo de aplicación biotecnológica sin perjuicio de su integridad funcional.

El análisis de los productos de reacción de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} mediante HPLC-MS ha permitido identificar claramente monómeros y dímeros de (*R*)-3-hidroxi butirato como los productos finales de degradación del PHB, lo cual demuestra que ambas despolimerasas poseen actividad exo-hidrolasa, atacando mayoritariamente al primer y segundo enlace éster desde un extremo de la cadena de PHB. Sin embargo, el hecho de no haber detectado oligómeros de mayor entidad que el dímero no descarta la posibilidad de una actividad endo-hidrolasa, de hecho, las despolimerasas tanto bacterianas como fúngicas analizadas en este sentido han exhibido ambos tipos de actividad (Scherer *et al.* 2000, Gebauer y Jendrossek 2006). Para esclarecer este mecanismo de hidrólisis sería necesario realizar análisis de los productos a tiempos más cortos de reacción, o bien ensayos de actividad con distintos oligómeros cíclicos.

La actividad de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} en presencia de distintas sales con cationes mono y divalentes ha revelado otra de las diferencias más notables en cuanto a la actividad de ambas despolimerasas: PhaZ_{sa} muestra una acusada dependencia de su actividad con la presencia de metales divalentes tales como calcio, magnesio o manganeso, triplicando su actividad con concentraciones bajas (≤ 5 mM) de estos metales; mientras que PhaZ_{sex} solo experimenta un moderado aumento de actividad en esas condiciones, y únicamente con calcio y magnesio, siendo el manganeso perjudicial para su actividad a cualquier concentración (Figura 42). Esta dependencia con la presencia de metales como el calcio se ha observado en muchas PHB despolimerasas (Jendrossek 2001a, Papanophytou *et al.* 2009)]. Complementariamente se analizó la actividad en presencia del agente quelante EDTA, observando, como era de esperar, un efecto inhibitorio más acusado sobre la actividad de PhaZ_{sa} (Figura 43). No obstante, el EDTA no llega a producir una inhibición total de la actividad de PhaZ_{sa}, que conserva cerca del 18% de su actividad incluso a concentraciones elevadas de este reactivo. Considerando estos resultados podemos concluir que PhaZ_{sa} experimenta un fenómeno de activación no esencial mediada por cationes divalentes. Por su parte, los cationes monovalentes no ejercieron un efecto claro sobre la actividad de PhaZ_{sex} y PhaZ_{sa} a concentraciones bajas, sin embargo, el aumento de la fuerza iónica obtenido mediante concentraciones crecientes de NaCl inhibe gradualmente la actividad de ambas PHB despolimerasas hasta su completa inactivación en torno a 3 M (Figura 41). Esta inhibición provocada por el aumento de la fuerza iónica se debe a la mayor dificultad para establecer uniones electrostáticas entre enzima y sustrato cuando hay una elevada concentración de iones en el medio, especialmente cuando ciertos aminoácidos catalíticamente importantes de la enzima están cargados o presentan una carga neta

significativa (Dale y White 1983), como es el caso de los aminoácidos de la triada catalítica de las PHB despolimerasas.

La actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{sex} y PhaZ₅₀ fue evaluada en presencia de una amplia batería de disolventes orgánicos miscibles en agua. Estos disolventes son frecuentemente empleados en aplicaciones biotecnológicas de enzimas para incrementar la solubilidad de ciertos sustratos o realizar la extracción de productos, por lo que es interesante conocer la tolerancia de las enzimas a la presencia de los distintos disolventes. También se analizó la actividad de ambas PHB despolimerasas en presencia de diversos reactivos empleados en distintas áreas de la bioquímica. Uno de los efectos más notables hallados en este análisis fue el ejercido por la metil- β -ciclodextrina (M β CD) sobre la actividad de ambas enzimas, en las que produce un incremento cercano al 50%. Este fenómeno de activación se detectó mediante el ensayo turbidimétrico de actividad y también mediante el ensayo de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, descartando de esta forma posibles artefactos espectroscópicos debidos a interacciones entre M β CD y PHB. Este efecto sobre las PHA despolimerasas nunca había sido descrito anteriormente, y su naturaleza no está bien definida, sin embargo las ciclodextrinas son oligosacáridos complejos, conocidos por su gran facilidad para crear complejos de inclusión con moléculas tanto polares como no polares, incluyendo polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol y también hidrofóbicos como el PHB (Shuai *et al.* 2002). Cuando las ciclodextrinas establecen complejos con un polímero lineal, sus cadenas adoptan conformaciones extendidas y segregadas de las cadenas vecinas, mientras que las ciclodextrinas se alinean en una conformación de tipo canal (Martínez y Gómez 2007). De esta forma, la M β CD podría disgregar las cadenas de PHB, facilitando el acceso de las despolimerasas para iniciar su degradación, y aumentando también la superficie de adsorción entre el polímero sólido y la enzima soluble. Otra posible explicación para el efecto positivo de la M β CD es la formación de complejos con los productos de la hidrólisis, como (*R*)-3-hidroxibutirato y sus oligómeros, que podrían incrementar su solubilidad y desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos.

Adicionalmente, también se han descrito varios efectos de las ciclodextrinas ejercidos directamente sobre lipasas, proteasas y otras enzimas, como la eliminación de inhibiciones por sustrato o producto, estabilización de su estructura mediante puentes de hidrógeno, incremento de su actividad catalítica y enantioselectividad en medios no acuosos (Kolossváry y Bánky-Előd 1996, Ghanem 2003, Hasegawa *et al.* 2003, Bonnet *et al.* 2010), o protección frente a liofilización (Ooe *et al.* 1999). Esta última propiedad lioprotectora ha sido comprobada experimentalmente con PhaZ_{sex} (Tabla 13), aunque los estudios de inactivación térmica en

presencia de M β CD no han revelado ningún efecto estabilizador frente a las altas temperaturas.

En resumen, no podemos descartar que el efecto potenciador de las ciclodextrinas sobre la actividad de las PHB despolimerasas sea una combinación de diversos efectos independientes ejercidos sobre el polímero así como sobre la enzima.

El polietilenglicol 3350 también produce un inédito efecto activador sobre las PHB despolimerasas ensayadas, aumentando su actividad entre un 10 y un 20%. Nuevamente el origen de esta activación es desconocido, y puede estar relacionado con la interacción del PEG con los productos de reacción, ya que es conocida la capacidad del PEG para promover la aparición de distintas fases acuosas con distinto contenido de PEG en soluciones en presencia de ciertas sales. Los productos de la hidrólisis del PHB pueden presentar distinta solubilidad en cada una de dichas fases, desplazando nuevamente el equilibrio de la reacción y estimulando la degradación del polímero (Willauer *et al.* 2002).

Por otra parte se observó un potente efecto inhibitorio de los tres detergentes ensayados, tanto aniónicos como no iónicos, sobre ambas PHB despolimerasas, incluso a concentraciones tan bajas como 0,1%. Este drástico efecto inhibitorio ya se ha observado en multitud de PHB despolimerasas (Shirakura *et al.* 1986, Shiraki *et al.* 1995, Sznajder y Jendrossek 2011), y puede ser atribuido a que los detergentes dificulten considerablemente la adsorción de las PHB despolimerasas al sustrato polimérico, bloqueando las interacciones hidrofóbicas que se deben establecer entre el dominio de unión a sustrato y el PHB. Tampoco se puede descartar que existan regiones hidrofóbicas en las inmediaciones del centro activo que puedan ser desplegadas por la presencia de detergentes, desestructurando el centro activo e impidiendo una adecuada catálisis.

Se realizó un estudio cinético de la degradación de PHB por las PHB despolimerasas PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, con el fin de estimar los parámetros que rigen su actividad y poder comparar sus características cinéticas entre ellas así como con otras despolimerasas descritas en la bibliografía. Con respecto al cálculo de los parámetros cinéticos de las PHB despolimerasas, se han ajustado los datos obtenidos a una cinética clásica de tipo Michaelis-Menten, a pesar de que la reacción desarrollada por las PHB despolimerasas es un claro ejemplo de catálisis heterogénea, en la que el sustrato y el catalizador se encuentran en distintas fases: el catalizador, en este caso la enzima, es un soluto, mientras que el sustrato es un sólido insoluble. Por lo tanto, la reacción se llevará a cabo con una primera fase de adsorción y otra posterior de hidrólisis, pudiendo ser la primera fase la limitante, determinando la velocidad máxima de reacción. Considerando estas particularidades, se han desarrollado modelos cinéticos que pueden reflejar más fielmente el comportamiento cinético de estas enzimas en

función de la concentración de sustrato, de enzima, y de otras características del sustrato, como la superficie ofrecida para la adsorción de las despolimerasas (Mukai *et al.* 1993b, Timmins *et al.* 1997). Sin embargo, a la vista del buen ajuste obtenido al aplicar las cinéticas michaelianas, se optó por este tratamiento por su mayor sencillez y facilidad de comparación con otros parámetros cinéticos publicados.

Teniendo este hecho en cuenta, hay que añadir que la naturaleza polimérica del sustrato de estas reacciones resulta problemática a la hora de expresar las concentraciones de sustrato en términos de molaridad, ya que el PHB no es una molécula con una masa molecular definida, sino que presenta un intervalo de tamaños moleculares. En este trabajo, abordamos este problema utilizando el peso molecular promedio en masa (M_w) del PHB, estimado por el fabricante (437.000 g/mol), para calcular los moles de polímero empleados en los ensayos de actividad con los que se realizó el estudio cinético. Usando esta aproximación se calcularon los parámetros cinéticos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, recogidos en la *tabla 15*. También conviene indicar que, dado que el PHB se utiliza en forma de partículas insolubles en suspensión, estos parámetros, especialmente K_M , son dependientes de las propiedades del PHB empleado, como su masa molecular promedio, composición monomérica y el tamaño de partícula, que afectará directamente a la superficie ofrecida para el ataque enzimático.

Es difícil comparar estos datos con los de otras PHB despolimerasas que se pueden encontrar en la literatura, dado que se han empleado métodos y condiciones de ensayo diferentes, sin embargo se pueden comparar los parámetros cinéticos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} entre sí. En este sentido, PhaZ_{So} muestra un valor de K_M del doble que PhaZ_{Sex}, y por lo tanto menor afinidad por el sustrato, mientras que su velocidad máxima (V_{max}) es 3,5 veces mayor que la de PhaZ_{Sex}. Esto se traduce en una mayor eficacia catalítica (estimada mediante V_{max}/K_M) de PhaZ_{So}, concretamente 1,75 veces superior que la de PhaZ_{Sex}. En términos generales, cuando se comparan los valores de K_M publicados para otras PHB despolimerasas, se pueden encontrar enzimas con mayor afinidad (menor K_M) por el PHB que PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, como las de *Leptothrix* sp. HS (Takeda *et al.* 1998), *Thermus thermophilus* HB8 (Papaneophytou *et al.* 2009) o el hongo *Paecilomyces lilacinus* (Oda *et al.* 1997), con una K_M inferior a la de PhaZ_{So}, pero casi idéntica a la PhaZ_{Sex}. Sin embargo comparando la K_M de PhaZ_{So} con las de otras PHB despolimerasas con un pH óptimo ácido (casi la totalidad de ellas de origen fúngico) solo encontramos valores muy superiores, que van desde 0,69 a 14 mg/mL (Brucato y Wong 1991, Miyazaki *et al.* 2000, Liu *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2009). Este resultado respalda a PhaZ_{So} como un biocatalizador muy útil para la degradación de PHB en condiciones ligeramente ácidas.

Los ensayos de actividad realizados con ésteres cromogénicos de *p*NP pusieron de manifiesto la mayor facilidad de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} para hidrolizar derivados de *p*NP de cadena alifática

corta. Ambas enzimas mostraron mayor actividad esterasa con el derivado más simple, el *p*NP-acetato, que con el que en principio podría parecerse más estructuralmente a su sustrato natural, el *p*NP-butirato, y la actividad continúa decayendo con sustratos de cadenas alifáticas más largas. Este fenómeno puede deberse al propio diseño del centro activo de las PHB despolimerasas, que no está preparado para acomodar polímeros con cadenas laterales más voluminosas que un grupo metilo, que es el que se encuentra naturalmente en el PHB, y por lo tanto tendrá más dificultad para hidrolizar derivados de *p*NP cuanto mayor sea su cadena alifática, debido a impedimentos estéricos. El reducido tamaño del *p*NP-acetato le permite difundir con facilidad hasta el centro activo de estas enzimas, donde es rápidamente hidrolizado.

Cabe destacar que los derivados de *p*NP son sustratos relativamente solubles en medio acuoso, al contrario que los PHAs que son polímeros insolubles, debido a esto, al emplear estos sustratos cromogénicos estamos analizando en mayor medida las características de los dominios catalíticos de estas PHB despolimerasas, ya que el dominio de unión a sustrato no desempeña en este caso un papel importante (no hay necesidad de adsorberse a la superficie de un polímero insoluble). En consecuencia, de los resultados anteriores podemos deducir que buena parte de la especificidad de sustrato de estas enzimas radica en el diseño de su dominio catalítico, más específicamente de su centro activo, aunque se ha demostrado que el dominio de unión a sustrato también juega un papel importante en el reconocimiento específico y posterior adsorción al polímero a degradar (Kasuya *et al.* 1999, Hiraishi *et al.* 2010).

Estos estudios de especificidad de sustrato se complementaron mediante experimentos de degradación de películas de polímeros preparadas mediante disolución en cloroformo, con las PHB despolimerasas purificadas. En el caso de PhaZ_{sex} se emplearon películas de PHB y sus copolímeros con 5 o 12% de (*R*)-3-hidroxivalerato, mientras que con PhaZ_{sa} se probó adicionalmente una mezcla de PHB con almidón de maíz, en proporción 7:3.

Ambas enzimas degradan rápidamente el homopolímero de PHB, y encuentran dificultad para degradar el copolímero con mayor contenido en (*R*)-3-hidroxivalerato. Los experimentos con PhaZ_{sa} fueron optimizados respecto a los de PhaZ_{sex}, empleando un volumen mayor de tampón para sumergir adecuadamente las películas, mayor cantidad de enzima para visualizar un progreso mayor en la degradación, y se incorporó M β CD al medio de reacción para estimular la despolimerización enzimática de las enzimas. Estas mejoras permitieron degradar completamente todas las películas excepto la de alto contenido en 3-hidroxivalerato en las primeras 30 horas (Figura 48). El análisis de la cantidad de (*R*)-3-hidroxibutirato producido con cada una de las películas muestra cómo la película de PHB-almidón comienza a degradarse a un ritmo muy elevado, más rápidamente incluso que la de homopolímero de PHB, esto se

puede confirmar con la casi completa pérdida de integridad que experimenta esta película en las primeras 10 horas. Asimismo, las películas de PHB y PHBV 5% se desintegran a un ritmo muy similar, y atendiendo a las concentraciones liberadas de (*R*)-3-hidroxi butirato, el copolímero PHBV 5% se degrada incluso ligeramente más deprisa que el de PHB. La película de PHBV 12% mostró mayor resistencia a la degradación, y algo menos de la mitad de la película mantuvo su integridad después de finalizado el experimento.

Estos ensayos con películas son una buena manera de comparar la habilidad de estas enzimas para degradar los distintos copolímeros, ya que no se puede realizar una comparación fiable mediante ensayos turbidimétricos debido a las características físicas del PHBV 12%, menos cristalino que el PHB y el PHBV 5%, e imposible de preparar en una suspensión estable. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que una película de polímero no es la forma normal en la que se presenta el sustrato de estas enzimas en el medio natural, sino que el vertido de PHAs producido por la lisis de bacterias acumuladoras se producirá en forma de gránulos de tamaño nanométrico, que ofrecen una superficie de adsorción mucho mayor a la ofrecida por una película. Aun así, estos ensayos nos dan una idea muy aproximada de la aplicabilidad de estas enzimas para degradación de desechos sólidos fabricados con esta clase de polímeros, como parte de un proceso de revalorización que podría utilizarse para obtener productos de alto valor añadido como el (*R*)-3-hidroxi butirato y sus oligómeros.

Otro importante factor a tener en cuenta para el empleo a nivel industrial de estas enzimas es la composición de los polímeros que se deseen degradar, ya que los PHAs comercializados suelen presentar formulaciones en las que se incluyen distintas concentraciones de una enorme variedad de aditivos plastificadores, algunos sintéticos y otros biodegradables, que pueden modificar considerablemente las propiedades fisicoquímicas del producto final así como alterar su biodegradabilidad (Savenkova *et al.* 2000, Yoshie *et al.* 2002, Choi y Park 2004), por lo que sería necesario un estudio pormenorizado de los efectos de estas moléculas de bajo peso molecular sobre la actividad PHB despolimerasa, para determinar la idoneidad de estas enzimas en función de la composición química del polímero.

Por otra parte hay que destacar el buen resultado obtenido con la incorporación de almidón en combinación con PHB. Se ha demostrado anteriormente que las mezclas de PHB con almidón modifican las propiedades físicas y mecánicas del polímero, a menudo afectando negativamente, pero manteniéndolas en un intervalo útil, mientras que su biodegradabilidad en cultivos bacterianos mixtos se incrementa notablemente (Ramsay *et al.* 1993, Godbole *et al.* 2003). A estas consideraciones hay que añadir las grandes ventajas del almidón, que es un producto barato, renovable y disponible durante todo el año (Tokiwa *et al.* 2009), por lo que su uso en combinación con PHAs reduciría considerablemente el elevado coste de estos

plásticos a la vez que facilita su biodegradación. Este conjunto de ventajas convierte a las mezcla de PHB y almidón en materiales muy adecuados para productos de vida corta, incluso para uso alimentario, gracias a su ausencia de toxicidad y total biocompatibilidad.

6. Caracterización estructural de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

Como ya se ha comentado, estas PHB despolimerasas poseen una estructura modular, con un gran dominio catalítico N-terminal de un tamaño aproximado de 34 kDa, una región espaciadora homóloga con los dominios fibronectina tipo III, de aproximadamente 7 kDa, y un dominio de unión a sustrato C-terminal con cerca de 6 kDa.

Los dominios catalíticos son los mejor caracterizados, ya que presentan homología con una gran cantidad de carboxilesterasas cuya estructura tridimensional se ha podido resolver mediante cristalografía de rayos X. La naturaleza de los aminoácidos de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} esenciales para la catálisis fue inferida por homología y se ha podido confirmar mediante los experimentos de modificación química de aminoácidos, que revelan la participación de una serina, un residuo ácido y una histidina, residuos típicos de una triada catalítica. Sin embargo existe una notable diferencia en la sensibilidad hacia algunos de estos reactivos específicos, concretamente DEPC (modificador de histidinas), que manifiesta casi el doble de efecto inhibitorio sobre PhaZ_{Sex} que sobre PhaZ_{So} a 5 mM; y más acusadamente PMSF (modificador de serinas catalíticas), que produce una inhibición casi total de PhaZ_{So} mientras que solo reduce un 25% de la actividad de PhaZ_{Sex} a 0,5 mM. En cualquier caso, la existencia de un motivo de caja lipasa albergando la serina catalítica putativa es un apoyo adicional para la identificación de este residuo concreto como esencial para la catálisis.

PhaZ_{So} ha sido descrita y caracterizada por primera vez en este trabajo, por lo que se decidió profundizar en la identificación de su triada catalítica mediante experimentos de mutagénesis dirigida de los aminoácidos postulados. Este análisis permitió establecer de forma totalmente fiable la identidad de los residuos Ser¹³¹-Asp²⁰⁹-His²⁶⁹ como la triada catalítica de PhaZ_{So} (Figuras 53 y 56).

Con respecto a las estructuras secundarias de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, los estudios de dicroísmo circular han proporcionado una valiosa información acerca de los porcentajes de las diferentes estructuras secundarias posibles. Atendiendo a los datos generados mediante deconvolución de los espectros de DC, ambas enzimas presentan un plegamiento mixto α/β (Tabla 7), que concuerda con un plegamiento α/β hidrolasa, típico de muchas familias de hidrolasas, en especial de serina hidrolasas. En el caso de PhaZ_{Sex} la estructura secundaria sería

mayoritariamente α -helicoidal, mientras que en PhaZ_{5a} predominarían las láminas β . En cambio, los datos arrojados por los tres servidores informáticos de predicción apuntan a un predominio de láminas β también en PhaZ_{5ex} (Tabla 8), y en general asignan menores contenidos de todos los tipos de estructura secundaria en comparación con el método experimental. También mediante análisis de dicroísmo circular se determinaron las temperaturas medias de fusión (T_m) de las PHB despolimerasas. Destaca el hecho de que PhaZ_{5ex} presente un proceso de desnaturalización en dos fases (Figura 35), lo que podría indicar que los distintos dominios de la enzima se desnaturalizan a temperaturas diferentes, dando lugar a este perfil de desnaturalización doble, aunque esta hipótesis no parece muy probable porque en el caso de PhaZ_{5a}, que cuenta con dominios separador y de unión a sustrato del mismo tipo que PhaZ_{5ex}, se registró una desnaturalización en una única fase.

PhaZ_{5ex} y PhaZ_{5a} presentan un elevado número de cisteínas en su secuencia de aminoácidos, 10 y 8 cisteínas, respectivamente, lo cual hace bastante probable el hecho de que existan puentes disulfuro intracatenarios estabilizando el plegamiento tridimensional de las PHB despolimerasas. Para determinar el número de cisteínas que se hallan en estado libre, es decir, no enlazadas formando un puente disulfuro, se desarrolló un protocolo que emplea el reactivo de Ellman o DTNB para valorar los grupos sulfhidrilo libres por comparación con una recta patrón construida con concentraciones crecientes de cisteína. Los resultados de este ensayo sugieren la existencia de 2 cisteínas libres en ambas enzimas, lo que se traduce en 4 puentes disulfuro en PhaZ_{5ex} y 3 en PhaZ_{5a}. La existencia de estos enlaces intracatenarios concuerda con la inhibición producida por agentes reductores como el DTT y el 2-mercaptoetanol, aunque esta inhibición es mucho más acusada en el caso de PhaZ_{5ex}, confirmando las observaciones previamente publicadas (Klingbeil *et al.* 1996).

Cuando examinamos en detalle el modelo del plegamiento de PhaZ_{5ex} generado por el servidor Phyre2 (Figura 50), observamos cómo 8 de las cisteínas se encuentran emparejadas, a una estrecha distancia que permitiría el establecimiento de los cuatro enlaces disulfuro predichos, que estabilizarían la conformación del centro activo. En cambio, las dos cisteínas localizadas en el dominio catalítico están muy separadas en todos los modelos generados. En el caso de PhaZ_{5a} ninguno de los modelos generados ha situado las cisteínas en distancias compatibles con un puente disulfuro, lo cual no coincide con los resultados experimentales obtenidos, y probablemente indique defectos en el plegamiento predicho por los servidores en regiones no catalíticas de PhaZ_{5a}.

Los intentos de cristalizar PhaZ_{5ex} y PhaZ_{5a}, realizados en colaboración con el laboratorio de cristalografía de proteínas del Dr. Papageorgiou en Turku (Finlandia), con el fin de resolver su estructura tridimensional a nivel atómico, han sido infructuosos. Es probable que el diseño

modular de estas enzimas, que incluye un péptido espaciador entre el dominio catalítico y el de unión a sustrato, otorgue a estas PHB despolimerasas una gran flexibilidad en su estructura y conformación espacial, gracias a la cual pueden llevar a cabo la hidrólisis del PHB mientras están adsorbidas al polímero mediante su SBD. Esta gran flexibilidad puede ser la principal responsable de la dificultad para cristalizar estas enzimas, ya que las proteínas muy flexibles a menudo no forman cristales ordenados y homogéneos, necesarios para la determinación de su estructura tridimensional por difracción de rayos X, con resolución a nivel atómico.

En consecuencia, las dos únicas PHB despolimerasas cuyas estructuras se han conseguido resolver con éxito hasta la fecha son la del hongo *Penicillium funiculosum* (Hisano *et al.* 2006) y una de las siete descubiertas en la bacteria Gram negativa *Paucimonas lemoignei*, concretamente PhaZ7 (Papageorgiou *et al.* 2008). Ambas enzimas comparten una peculiaridad no muy extendida entre las PHB despolimerasas, y es que no presentan un dominio de unión a sustrato definido y diferenciado del dominio catalítico, por lo que no se tiene certeza del tipo de estructura tridimensional que adoptan estos dominios. Otra característica común de las dos PHB despolimerasas cristalizadas hasta ahora es que presentan 8 y 10 cisteínas en su secuencia, respectivamente, y todas están emparejadas formando puentes disulfuro. Este hecho respalda de nuevo la existencia de al menos 4 y 3 enlaces disulfuro en PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} respectivamente. Respecto a las dos cisteínas del SBD de estas enzimas, la valoración de sulfhidrilos libres indica que se encuentran aisladas, aunque no se puede descartar completamente la formación de un puente intracatenario adicional que estabilizase este dominio. Por otra parte, la suave inhibición observada por parte del pHMB sobre PhaZ_{Sex} apunta a que efectivamente existen cisteínas libres en PhaZ_{Sex} y estas podrían desempeñar alguna interacción con el sustrato, sin embargo podemos descartar que estén involucradas directamente en la catálisis.

En términos generales, los modelos tridimensionales elaborados mediante servidores informáticos muestran un plegamiento de tipo α/β -hidrolasa y con un diseño modular en el que se distingue, en primer lugar, un gran dominio catalítico N-terminal, formado por una serie de seis láminas β empaquetadas paralelamente junto con dos antiparalelas, formando un plano girado que interactúa por ambos lados con varias α -hélices; y en segundo lugar un dominio de unión a sustrato C-terminal con un motivo espaciador fibronectina tipo III, que dota a estas enzimas de la flexibilidad necesaria para hidrolizar el polímero al que se adsorben. El modelo generado con el servidor Phyre2 para PhaZ_{Sex} está basado principalmente en la homología con la PHB despolimerasa de *P. funiculosum*, lo que otorga gran fiabilidad a la estructura representada por este modelo. En cambio, el mejor molde homólogo detectado por el servidor para el modelado de PhaZ_{So} es la dipeptidil aminopeptidasa IV de la bacteria Gram

negativa *Stenotrophomonas maltophilia* (Nakajima *et al.* 2008). Al no tratarse de una PHB despolimerasa, la fiabilidad de este modelo es menor que la de PhaZ_{Sex}, sin embargo, al haberse basado en una serina hidrolasa encontramos que en este modelo los aminoácidos de la triada catalítica están perfectamente alineados para establecer un relé de carga y llevar a cabo el ataque nucleofílico.

Como ya se ha comentado, en los modelos seleccionados de las estructuras de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} (Figuras 50, 51, 53 y 54), los aminoácidos que habían sido propuestos como integrantes de la triada catalítica por alineamiento de secuencias, se encuentran correctamente posicionados y agrupados. Adicionalmente, las histidinas candidatas a desempeñar la función de cavidad del oxianión (His₂₃₇ en PhaZ_{Sex} e His₄₈ en PhaZ_{So}) también presentan una ubicación adecuada para dicha función, situándose muy próximas a la triada catalítica. Este hecho respalda de nuevo la arquitectura predicha por los servidores para el centro activo de ambas PHB despolimerasas, así como el papel de estas histidinas o los enlaces peptídicos adyacentes a la hora de estabilizar el intermediario tetraédrico de la reacción.

Ya se ha indicado que las dos PHB despolimerasas cristalizadas hasta ahora carecen de un SBD definido, este hecho, unido a la falta de proteínas de estructura conocida y que presenten homología con dichos dominios hace que el plegamiento que presentan estas regiones de las PHB despolimerasas sea totalmente desconocido. La única aproximación realizada es el modelado *ab initio* de estas regiones por separado, que nos puede suministrar una idea aproximada del plegamiento de estos dominios. Los modelos de los SBD de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} fueron generados por el servidor QUARK (Figuras 52 y 55), y en general muestran un elevado contenido en láminas β antiparalelas (al contrario que las ubicadas en el dominio catalítico) con las que estas enzimas podrían establecer interacciones con la superficie del PHB posibilitando la adsorción y posterior degradación del polímero (Hiraishi *et al.* 2010). Cabe destacar que los modelos tridimensionales predichos se ajustan correctamente a los datos obtenidos mediante difracción circular, que señalan la presencia de láminas β mayoritariamente paralelas, con un bajo contenido de láminas antiparalelas, que estarían ubicadas en el dominio espaciador fibronectina tipo III y en el SBD.

7. Aplicaciones biotecnológicas de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}

7.1 Inmovilización de PhaZ_{Sex} en CLEAs

La preparación de agregados entrecruzados de enzima (CLEAs) es una estrategia de inmovilización relativamente reciente (Sheldon *et al.* 2005, Sheldon 2007), en la que no se

emplea ningún soporte físico para retener la enzima, al contrario que ocurre con los métodos convencionales. La unión de la enzima a soportes físicos reduce considerablemente la actividad específica y volumétrica del biocatalizador en comparación con las partículas de enzima reticulada, que además presentan una serie de claras ventajas, como una elevada actividad enzimática por gramo de biocatalizador, elevada estabilidad física y un coste de producción reducido debido a que no es necesario un soporte adicional (Mengfan *et al.* 2010). La preparación de CLEAs es un método muy sencillo, que consiste en la precipitación de la enzima mediante la adición de una sal o disolvente orgánico, seguida del entrecruzamiento de los agregados resultantes con un reactivo bifuncional como el glutaraldehído, que es capaz de reaccionar con los grupos ϵ -amino de las lisinas para obtener un biocatalizador insoluble.

En ocasiones, esta reacción de entrecruzamiento puede afectar a residuos importantes para la catálisis, resultando en un descenso significativo de la actividad recuperada, en esos casos se debe escoger un agente entrecruzante alternativo. Otras veces, el entrecruzamiento puede no ser muy efectivo con enzimas de bajo contenido de grupos ϵ -amino, como es el caso de PhaZ_{sex} que solo cuenta con 11 lisinas, generando agregados con baja estabilidad mecánica o liberando moléculas de enzima al medio de reacción. Estos problemas se pueden resolver llevando a cabo el entrecruzamiento de la enzima en presencia de determinados aditivos con gran número de grupos amino, como polímeros poliiónicos (Wilson *et al.* 2009) o albúmina de suero bovino (BSA) (Shah *et al.* 2006, Cabana *et al.* 2007, Dong *et al.* 2010, Majumder y Gupta 2010).

De los diferentes CLEAs que se han preparado con PhaZ_{sex} variando las concentraciones de glutaraldehído y BSA, el mejor rendimiento en cuanto a actividad retenida, aproximadamente un 18%, se obtuvo con una concentración de glutaraldehído de 12,5 mM, una proporción en masa 100:1 de BSA:PhaZ_{sex} y un tiempo de entrecruzamiento de 120 minutos, logrando una actividad específica de 255 U/g de derivado para la hidrólisis de PHB. Aunque la adición de BSA apenas incrementa la actividad retenida, este aditivo inerte facilita notablemente la manipulación tras el proceso de entrecruzamiento, dado que la cantidad disponible de enzima no era muy elevada. Actividades retenidas moderadas como en este caso, se han descrito para otros CLEAs, debido a que las enzimas pueden ser inactivadas en gran medida o también agregadas de tal forma que sus centros activos sean inaccesibles para el sustrato (Aytar y Bakir 2008, Montoro-García *et al.* 2010).

Este derivado optimizado fue caracterizado en profundidad y su actividad relativa en distintas condiciones se comparó con la de la enzima soluble. De esta forma encontramos un valor óptimo de pH ligeramente ácido, en torno a 6, a diferencia de PhaZ_{sex} soluble, que presentaba un intervalo óptimo entre 8 y 9. Hay numerosos ejemplos en la literatura de valores óptimos

de pH diferentes entre una enzima soluble y su derivado inmovilizado, lo que suele atribuirse a alteraciones en el pH del microentorno en el que se encuentra la enzima inmovilizada (Hormigo *et al.* 2010). Dentro de la estructura del CLEA, PhaZ_{Sex} está rodeada por moléculas de BSA, que podrían desplazar el pH en las zonas circundantes hacia valores más básicos. La estabilidad frente a distintos valores de pH de los PhaZ_{Sex}-CLEAs fue similar a la de la enzima soluble, buena en un intervalo entre 5 y 10, y tan solo ligeramente superior a pH 5.

En cuanto al perfil de temperatura, se encuentra un valor óptimo a 60°C, y mantiene cerca de un 90% a 70°C. Esta temperatura óptima es 20°C superior a la de la enzima soluble, lo que demuestra una clara estabilización térmica como consecuencia del proceso de entrecruzado, que incrementa la rigidez de la enzima y ralentiza la desnaturalización a temperaturas elevadas. Este efecto también queda patente en el análisis de la estabilidad tras incubación de los PhaZ_{Sex}-CLEAs a distintas temperaturas durante 45 minutos, donde mostraron una buena estabilidad hasta los 60°C (10°C más que PhaZ_{Sex}) y mantuvieron más de la mitad de su actividad tras la incubación a 70°C, temperatura que desactiva totalmente a la enzima soluble en las mismas condiciones.

La enzima inmovilizada en los PhaZ_{Sex}-CLEAs exhibió una actividad superior a la forma soluble en presencia de varios disolventes orgánicos al 10% (v/v), principalmente acetonitrilo, etilenglicol, trietilenglicol, metanol, dimetilsulfóxido y dimetilformamida. Este tipo de protección frente al poder desnaturalizante de ciertos disolventes orgánicos se ha descrito también en CLEAs de subtilisina (Sangeetha y Abraham 2008). El descenso abrupto de actividad sufrido por la enzima soluble en presencia de disolventes orgánicos miscibles en agua se atribuye a la retirada de moléculas de agua esenciales de la superficie de la enzima, lo que conduce a su desnaturalización. El entrecruzamiento incrementa la rigidez conformacional de la enzima, reduciendo el despliegue estructural inducido por los disolventes. Asimismo, las moléculas BSA y el entramado que generan en torno a las enzimas también proporcionan un microambiente más estable y protegido del acceso de los disolventes.

En resumen, a la vista de los resultados obtenidos, la inmovilización de PhaZ_{Sex} recombinante en forma de CLEAs ha demostrado ser un procedimiento muy efectivo y que sólo requiere condiciones suaves, generando partículas de biocatalizador altamente dispersas e insolubles. Este método de inmovilización es atractivo debido a su simplicidad, y la adición de BSA como aditivo inerte ha demostrado facilitar considerablemente la manipulación del derivado. La buena actividad de los PhaZ_{Sex}-CLEAs en condiciones suaves, su robustez frente a temperaturas elevadas y varios disolventes orgánicos, así como la posibilidad de ser reciclados al menos 20 ciclos sin perder su actividad, permitirían su explotación industrial en biorreactores diseñados

para la degradación de PHB y la obtención de monómeros y dímeros quirales de (*R*)-3-hidroxiбутирато.

7.2 Inmovilización de PhaZ_{So} en partículas magnéticas silanizadas

Para la inmovilización de PhaZ_{So} se decidió explorar una técnica muy diferente a la de los CLEAs generados con PhaZ_{Sex}. En este caso se intentó inmovilizar la PHB despolimerasa sobre la superficie de partículas de magnetita comerciales con un tamaño promedio de 50 nm, que previamente habían sido sometidas a un proceso de silanización con APTMS. Mediante este proceso se consigue que los grupos hidroxilo presentes en la superficie de la partícula de magnetita reaccionen con los grupos metoxilo del APTMS en presencia de una pequeña cantidad de agua, liberando metanol y dotando a estas superficies de grupos funcionales aminopropilo, que se pueden emplear para unir una amplia variedad de moléculas biológicas a la superficie de las partículas mediante distintos agentes conjugantes (Bruce y Sen 2005, Hermanson 2008).

Inicialmente se intentó la conjugación mediante glutaraldehído de dichos grupos amino de las partículas con grupos amino pertenecientes a los residuos de lisina superficiales de PhaZ_{So} en un solo paso, pero se comprobó que el glutaraldehído produce una inactivación casi total de la enzima en las condiciones ensayadas, por lo que se probó un protocolo en dos pasos para minimizar la exposición directa de la enzima al glutaraldehído. En un primer paso se activaron las partículas magnéticas con este agente conjugante. Tras lavar convenientemente las partículas activadas para retirar los restos de glutaraldehído libre, se pusieron en contacto con la enzima, permitiendo que reaccionasen durante tiempos entre 5 y 25 minutos antes de neutralizar los grupos aldehído sobrantes mediante la adición de BSA. De esta forma, se generó una serie de derivados enzimáticos con actividades netas similares, moderadas en general, y actividades retenidas que alcanzaron un valor máximo del 9%, aproximadamente (*Tabla 19*). La actividad enzimática de los sobrenadantes obtenidos tras la inmovilización disminuye gradualmente a medida que aumenta el tiempo de exposición (*Figura 63*), y sin embargo no se produce un incremento significativo en la actividad neta de los derivados. Este hecho revela de nuevo el efecto inactivador del glutaraldehído, y sugiere una unión multipuntual de la enzima al soporte, que llevaría a una pérdida gradual de la estructura activa de la enzima.

Para evitar el uso de glutaraldehído, también se ensayó la conjugación de PhaZ_{So} a las partículas de magnetita mediante una carbodiimida hidrosoluble (EDC), este agente conjugante puede establecer uniones covalentes entre los grupos amino de las partículas activadas y los grupos carboxilo de ácidos aspárticos o glutámicos expuestos en la superficie de

PhaZ₅₀. Esta inmovilización dirigida a los grupos carboxilo podía plantear una ventaja en el caso particular de PhaZ₅₀, ya que el número de lisinas en esta despolimerasa es muy bajo, tan solo 7 lisinas en sus 461 aminoácidos, mientras que el número de aminoácidos con grupos carboxilo asciende a 38. Este hecho podía facilitar el establecimiento de puentes covalentes, pero nuevamente existía el riesgo de unión multipuntual que podría desactivar la enzima.

La conjugación con EDC también se llevó a cabo en dos fases: la primera dirigida a activar los grupos carboxilo de la enzima mediante exposición directa al EDC durante tiempos de 5 ó 30 minutos, y la segunda fase consistente en la conjugación de la enzima con el soporte tras su puesta en contacto con las partículas magnéticas silanizadas. Los derivados preparados de esta forma presentan una actividad neta bastante parecida en todas las condiciones ensayadas, en torno a 6 UI por gramo de partículas, más elevada que en el caso del glutaraldehído, aunque las actividades retenidas son inferiores. En este caso se llevó a cabo un control en idénticas condiciones pero sin EDC, y sorprendentemente presenta una actividad muy similar a las de los derivados generados con EDC, lo que indica que buena parte de la enzima inmovilizada está retenida por interacciones no covalentes de tipo electrostático o hidrofóbico.

En los derivados preparados tanto con glutaraldehído como con EDC se realizó un lavado con un tampón de alta fuerza iónica conteniendo NaCl 1M, para desorber la fracción de enzima inmovilizada por interacciones electrostáticas, y a continuación se midió su actividad PHB despolimerasa nuevamente. En ambos tipos de derivados se pierde cierta actividad neta, pero es en el caso de los derivados obtenidos con EDC donde este descenso es más notable, llegando a perder un 75% de la actividad original en algunas condiciones, e igualando la pérdida sufrida por el control sin EDC.

A la vista de los inconvenientes encontrados y el escaso éxito obtenido con el uso de agentes conjugantes se decidió explorar la inmovilización no covalente de PhaZ₅₀ sobre las partículas magnéticas silanizadas mediante adsorción no covalente, únicamente producida por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Se estableció que el pH más adecuado para esta interacción es ligeramente ácido, y que con tiempos cortos, en torno a 30 minutos, se logra un buen nivel de adsorción. Adicionalmente se optimizó la cantidad de enzima aplicada en estas partículas alcanzando una actividad retenida máxima del 11%, y derivados con actividad PHB despolimerasa de casi 8 UI por gramo.

La actividad de todos los derivados obtenidos con partículas magnéticas ha sido determinada mediante el ensayo indirecto de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa. Este ensayo valora específicamente la concentración de (R)-3-hidroxibutirato, uno de los productos de reacción de la PHB despolimerasa, a diferencia de otros ensayos que miden efectos secundarios de la degradación del PHB, como es el descenso de la turbidez de una suspensión, en el caso del

ensayo turbidimétrico, o la liberación de *p*NP, en el caso de los ensayos cromogénicos con ésteres de *p*NP. Además, los ensayos con ésteres de *p*NP valoran la actividad esterasa de la enzima y no proporcionan información sobre el estado y funcionamiento del dominio de unión a sustrato. Una desventaja del ensayo de actividad de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, sin embargo, es que valora exclusivamente la cantidad de monómero (*R*)-3-hidroxibutirato, y no la liberación de otros productos como dímeros y demás oligómeros, que como ya se ha demostrado, forman parte de los productos de reacción de PhaZ_{5a} (Figura 45), por lo que la actividad hidrolítica global estaría subestimada en este sentido.

Todos los resultados de los experimentos de inmovilización de PhaZ_{5a} sobre partículas magnéticas son preliminares, y deberán ser optimizados para conducir a la preparación de un biocatalizador inmovilizado con mayor actividad retenida y mayor carga enzimática, que posteriormente tendrá que ser caracterizado en cuanto a estabilidad, efectos del pH, la temperatura y otros factores fisicoquímicos, así como sus productos de reacción. Muchos aspectos del proceso de inmovilización presentan un amplio margen de optimización, comenzando desde las propias partículas magnéticas, que pueden ser sintetizadas químicamente para minimizar su tamaño, maximizando así la superficie ofrecida para la inmovilización. Asimismo se pueden emplear diferentes agentes de silanización para potenciar la adsorción hidrofóbica o electrostática, u otros agentes conjugantes para obtener una unión covalente de la enzima a las partículas.

Por todo lo anteriormente expuesto, este tipo de inmovilización en partículas magnéticas se presenta como un método de inmovilización muy prometedor para su aplicación con PHA despolimerasas. Por otra parte, la unión de la enzima al soporte mediante adsorción física no covalente proporciona gran rapidez y sencillez al proceso, y además permitiría una fácil recarga enzimática del soporte cuando la actividad específica del derivado comience a decaer. Además, las nanopartículas magnéticas resultan muy adecuadas para inmovilizar PHA despolimerasas, ya que la naturaleza polimérica del sustrato de estas enzimas dificulta en gran medida su difusión a través de soportes porosos de inmovilización, por lo que la mejor manera de maximizar la superficie de unión de enzima es emplear soporte de tamaño nanométrico, como en este caso. Las partículas magnéticas empleadas presentan un tamaño medio de 50 nm, ofreciendo una superficie muy superior a la de los PhaZ_{5ex}-CLEAs, por ejemplo, cuyo tamaño oscila entre 50 y 300 μ m, siendo más de mil veces superior.

Adicionalmente, el comportamiento magnético de estas nanopartículas permite la separación magnética de los derivados tras el desarrollo de una reacción, evitando la necesidad de procesos de separación costosos y complejos, como la centrifugación o ultrafiltración; y a la vez posibilita la agitación de los derivados mediante campos magnéticos, prescindiendo de

métodos mecánicos de agitación, que pueden tener efectos negativos para la estabilidad de los derivados, extendiendo así su vida útil.

7.3 Reacciones de síntesis orgánica catalizadas por PhaZ_{Sex}

Además de investigar en profundidad la degradación de PHB y sus copolímeros mediante las PHB despolimerasas estudiadas, también se exploró la capacidad de PhaZ_{Sex} para llevar a cabo reacciones de polimerización, esterificación y acilación en medios no acuosos. Este tipo de catálisis representa precisamente la reacción inversa a su actividad natural de hidrólisis, por lo que se emplea un medio de reacción anhidro en el que la hidrólisis no pueda llevarse a cabo. En consecuencia, las enzimas empleadas en este tipo de experimentos deben ser convenientemente deshidratadas para minimizar la presencia de agua. En este caso, PhaZ_{Sex} se sometió a un proceso de liofilización, tras el cual solo se conserva una capa esencial de moléculas de agua que solvatan las regiones polares en la superficie de la enzima (Kula 2002). El empleo de enzimas, particularmente lipasas y otras esterases, en procesos de síntesis orgánica en medios no acuosos está muy extendido, debido a varias ventajas que aportan las enzimas frente a otros tipos de catalizadores, como su gran estereo y regioselectividad, y la posibilidad de prescindir de catalizadores organometálicos caros y muy tóxicos, resultando en procesos más respetuosos con el medio ambiente (Albertsson y Srivastava 2008).

PhaZ_{Sex} fue empleada para ensayar varias reacciones de polimerización por apertura de anillo de varias lactonas (β -butirolactona, γ -butirolactona y ϵ -caprolactona), polimerización por condensación de monómeros lineales (3-hidroxibutirato y 3-hidroxibutirato de etilo), acilación/polimerización de β -butirolactona y transesterificación entre PHB y alcoholes. Excepto este último tipo de reacción, todas se llevaron a cabo sin disolvente o en tolueno. PhaZ_{Sex} demostró su capacidad para polimerizar β -butirolactona sin disolvente en 24 horas, consiguiendo una conversión del 59% y dando lugar a cadenas de PHB con una masa molecular promedio en número (M_n) de aproximadamente 3,8 kDa y una baja dispersidad, lo que equivale a cadenas de aproximadamente 40 monómeros con poca variación en su tamaño. Este resultado, aunque modesto, es muy prometedor, ya que otras muchas enzimas han sido empleadas para llevar a cabo esta reacción, como lipasas porcinas (Nobes *et al.* 1996, Matsumura *et al.* 1998), otras lipasas procedentes de bacterias del género *Pseudomonas* (Dong *et al.* 1998, Dong *et al.* 1999), de levaduras como *Candida antarctica* (Santos *et al.* 2012), e incluso otras PHB despolimerasas como la de *Alcaligenes faecalis* (Suzuki *et al.* 2001), *Pseudomonas stutzeri* (Suzuki *et al.* 2000) o las PHO despolimerasas de *Pseudomonas fluorescens* (Santos *et al.* 2012) y *Streptomyces venezuelae* SO1 (Santos *et al.* 2013). Esta variedad de enzimas se ha empleado en diversas condiciones, y solo se ha conseguido un

grado de polimerización ligeramente mayor con lipasas comerciales porcinas o de *Pseudomonas*, en este último caso usando tiempos de reacción 20 veces mayores que los ensayados en este trabajo (Dong *et al.* 1998, Matsumura *et al.* 1998, Dong *et al.* 1999).

Otra de las reacciones que se ha conseguido catalizar con PhaZ_{Sex} es la polimerización de 3-hidroxiбутирато mediante condensación lineal, sin embargo, se obtuvo un polímero de muy bajo peso molecular, en torno a 600 Da. Es posible que las moléculas de agua liberadas en cada reacción de condensación catalizada sean perjudiciales para este proceso, ya que posibilitan la hidrólisis de los enlaces éster que se establecen, dificultando el crecimiento de una cadena de PHB con un tamaño mayor.

Asimismo, se demostró que PhaZ_{Sex} es capaz de catalizar la acilación y polimerización simultáneas de β-butirolactona con glicerol y trimetilolpropano, obteniendo oligómeros con un M_n de 800 Da y uniones múltiples a los portadores de grupos hidroxilos.

En todos los casos, se llevó a cabo una batería de pruebas preliminar en unas condiciones determinadas sin posterior optimización del rendimiento, por lo que estos procesos catalizados por PhaZ_{Sex} presentan un gran margen de mejora, con la selección de disolventes apropiados en cada caso, optimización del tiempo de reacción, temperatura o incluso de la preparación previa de la enzima, para dar lugar a cadenas poliméricas más largas, en las que se podría incorporar otro tipo de monómeros o grupos funcionales que modificasen las propiedades finales del producto de una forma controlada. También sería interesante investigar la polimerización de otros monómeros, especialmente la β-propiolactona, con la que se han obtenido muy buenos resultados empleando lipasas (Matsumura *et al.* 1996) e incluso PHB despolimerasas (Suzuki *et al.* 2003) para la producción de poli(3-hidroxipropionato). Para el desarrollo de futuras aplicaciones industriales de esta enzima también será necesario estudiar la enantioselectividad de PhaZ_{Sex} en las reacciones de síntesis orgánica a partir de mezclas racémicas de monómero, para evaluar una posible preferencia de PhaZ_{Sex} por uno u otro estereoisómero, dando lugar a polímeros enriquecidos en uno de ellos

Conclusiones

1. *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov. DSMZ 40822 y *Streptomyces albus* J1074 se han confirmado por primera vez como cepas productoras de PHB despolimerasas extracelulares.
2. Las PHB despolimerasas de *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}) y de *Streptomyces ascomycinicus* (PhaZ_{So}) han sido clonadas y sobreexpresadas con éxito en el hospedador heterólogo *Rhodococcus* sp. T104 en forma activa, soluble y extracelular. Se ha demostrado experimentalmente que ambas enzimas presentan un péptido señal de secreción en su región N-terminal, de 26 aminoácidos en el caso de PhaZ_{Sex} y 58 en el de PhaZ_{So}. Las masas moleculares de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} son 47,9 y 48,0 kDa, respectivamente, y su forma activa es un monómero. Ambas despolimerasas constan de un dominio catalítico (tipo 2 en PhaZ_{Sex} y tipo 1 en PhaZ_{So}), un dominio espaciador fibronectina tipo III y un dominio de unión a sustrato (SBD) tipo 1 en ambos casos.
3. PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} han sido purificadas a homogeneidad electroforética mediante dos pasos consecutivos de cromatografía de interacción hidrofóbica. PhaZ_{Sex} pura muestra su máxima actividad a 40°C y valores de pH entre 8 y 9, permaneciendo estable tras su incubación a valores de pH entre 6 y 11 y temperaturas hasta los 50°C, y presentando una temperatura de desnaturalización aparentemente doble a 55,8 y 70°C. Por su parte, PhaZ_{So} alcanza su actividad máxima a 45°C y valores de pH entre 5,5 y 6,5, permaneciendo estable tras su incubación a valores de pH entre 4,5 y 9, y temperaturas hasta los 50°C. Presenta una única temperatura de desnaturalización a 58,4°C. Se trata de la primera PHB despolimerasa de una bacteria Gram positiva que presenta un pH óptimo ácido.
4. Concentraciones de cationes magnesio y calcio en torno a 2 mM producen un incremento de la actividad de PhaZ_{Sex} de cerca del 30%. En cambio, todos los cationes divalentes ensayados (magnesio, calcio y manganeso) hasta 5 mM, triplican la actividad de PhaZ_{So}, debido a un fenómeno de activación no esencial. Sin embargo, el incremento de la fuerza iónica del medio produce un descenso gradual de actividad PHB despolimerasa de PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So}, llegando a inactivarlas por completo a concentraciones en torno a 3M.
5. La metil-β-ciclodextrina (MβCD) produce un incremento de casi un 50% en la actividad de ambas PHB despolimerasas a concentraciones hasta 10 mM. El polietilenglicol 3.350 también produce un incremento, aunque más moderado, en la actividad de ambas enzimas a concentraciones hasta 5 mM. Además, la MβCD 1,5 mM y el glicerol al 10% (v/v) ejercen

Conclusiones

un efecto protector frente a la liofilización de PhaZ_{Sex}, preservando su actividad en mayor medida que en ausencia de aditivos. Por contra, El agente reductor DTT, al igual que la presencia de detergentes, tanto aniónicos como no iónicos, inhiben fuertemente la actividad de ambas PHB despolimerasas.

6. Los parámetros cinéticos aparentes para la degradación de PHB de PhaZ_{Sex} son una K_M de 125 µg/mL y V_{max} de 2.780 U/mg, determinados mediante el ensayo turbidimétrico. Por su parte, PhaZ_{So} presenta una K_M de 269 µg/mL y una V_{max} de 9.797 U/mg. La eficacia catalítica de PhaZ_{So} es 1,7 veces superior a la de PhaZ_{Sex}. Los productos mayoritarios de la reacción de ambas enzimas a tiempo final son monómeros y dímeros de (R)-3-hidroxi-butarato, demostrando actividad exo-hidrolasa, aunque no se descarta la existencia complementaria de actividad endo-hidrolasa. Adicionalmente, PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} presentan actividad esterasa frente a pNP-alcanoatos. Esta actividad esterasa es inversamente proporcional a la longitud de la cadena alifática del sustrato.
7. Ambas PHB despolimerasas son capaces de degradar películas de PHB y PHBV (5% de hidroxivalerato) preparadas mediante disolución en cloroformo y posterior evaporación. Concretamente una solución con 1,5 µg/mL de PhaZ_{So} puede solubilizar totalmente películas de 100 mg de PHB, PHBV 5% y PHB-almidón (proporción 7:3) a 37°C y pH 6 en menos de 30 horas.
8. PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} presentan una estructura secundaria mixta α/β, y un plegamiento tridimensional tipo α/β hidrolasa en el dominio catalítico. El plegamiento de los SBD no se ha logrado determinar experimentalmente, pero su modelado *ab initio* predice un contenido mayoritario de láminas β en su estructura secundaria. PhaZ_{Sex} presenta al menos 4 enlaces disulfuro intracatenarios en su estructura (Cys⁵⁴-Cys⁶⁶, Cys¹⁵⁴-Cys¹⁶⁵, Cys²²⁴-Cys²³⁰ y Cys²³⁹-Cys²⁸²) mientras que PhaZ_{So} tiene al menos 3, aunque su identidad concreta no está tan bien establecida como en caso de PhaZ_{Sex}.
9. PhaZ_{Sex} y PhaZ_{So} llevan a cabo la hidrólisis del PHB mediante una triada catalítica, cuya identidad en PhaZ_{Sex} es Ser²⁴-Asp¹¹¹-His¹⁴³, según se infiere por homología, y en el caso de PhaZ_{So} es Ser¹³¹-Asp²⁰⁹-His²⁶⁹, según se ha demostrado mediante mutagénesis dirigida de aminoácidos.

- 10.** PhaZ_{Sex} ha sido inmovilizada con éxito en forma de agregados entrecruzados de enzima (PhaZ_{Sex}-CLEAs) con una proporción BSA:PhaZ_{Sex} de 100:1, cuya actividad PHB despolimerasa máxima, medida mediante el ensayo turbidimétrico, es de 255 U/g de derivado con una actividad retenida del 18,4%. La actividad máxima de este derivado se alcanza a pH 7 y temperaturas entre 55 y 60°C, mostrando además una clara estabilización frente a temperatura con respecto a la enzima soluble, y una mayor tolerancia a ciertos disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. Este derivado es reutilizable durante al menos 20 ciclos sin pérdida significativa de actividad.

- 11.** Se ha explorado de forma preliminar la inmovilización de PhaZ_{So} en la superficie de nanopartículas magnéticas silanizadas, mediante uniones covalentes así como por adsorción física. La mayor actividad se alcanza mediante adsorción no covalente, superando las 10 UI/g de derivado. Mediante este método se ha alcanzado una actividad retenida máxima cercana al 11%.

- 12.** Se ha evaluado la capacidad de PhaZ_{Sex} liofilizada para catalizar reacciones de síntesis orgánica en medios no acuosos. PhaZ_{Sex} es capaz de polimerizar β-butirolactona por apertura de anillo (ROP), con una conversión del 59%, generando PHB con tamaño molecular de 3,8 kDa, y también oligomeriza 3-hidroxibutirato por condensación lineal con un 22% de conversión para dar oligómeros de 600 Da de tamaño. Asimismo es capaz de polimerizar β-butirolactona y realizar simultáneamente la acilación de glicerol o trimetilolpropano (TMP).

Conclusions

1. *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov. DSMZ 40822 and *Streptomyces albus* J1074 have been confirmed, for the first time, as extracellular PHB depolymerase producer strains.
2. PHB depolymerases from *Streptomyces exfoliatus* (PhaZ_{Sex}) and *Streptomyces ascomycinicus* (PhaZ_{So}) have been cloned and successfully overexpressed in the heterologous host *Rhodococcus* sp. T104 in an active, soluble and extracellular form. It has been experimentally demonstrated that both enzymes present a secretory signal peptide at the N-terminal region, with a length of 26 aminoacids in PhaZ_{Sex} and 58 in the case of PhaZ_{So}. Molecular masses of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} are 47.9 and 48.0 kDa, respectively, and its active form is a monomer. Both depolymerases are comprised by a catalytic domain (type 2 in PhaZ_{Sex} and type 1 in PhaZ_{So}), a fibronectin type III linker domain and a substrate binding domain (SBD) type 1 in both cases.
3. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} have been purified to electrophoretic homogeneity, by two consecutive hydrophobic interaction chromatography steps. Purified PhaZ_{Sex} shows maximum activity at 40°C, and pH values between 8 and 9, remaining stable after its incubation at pH values from 6 to 11, and temperatures up to 50°C, and presents two apparent melting temperatures, at 55.8 and 70.0°C. On the other hand, PhaZ_{So} reaches its maximum activity at 45°C and pH values between 5.5 and 6.5, remaining stable after its incubation at pH values from 4.5 to 9, and temperatures up to 50°C. It shows a single melting temperature at 58.4°C. This is the first report of a PHB depolymerase from a Gram positive bacterium with an acidic optimum pH.
4. Concentrations of magnesium and calcium cations, around 2 mM, produce a 30% increase of PhaZ_{Sex} activity. On the other hand, all divalent cations assayed (magnesium, calcium and manganese) up to 5 mM, triple PhaZ_{So} activity, owing to a non-essential activation phenomenon. However, increasing ionic strength of the medium causes a gradual decrease of the PHB depolymerase activity of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So}, leading to a complete inactivation at concentrations around 3 M of NaCl.
5. Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) increases about 50% the activity of both depolymerases, at concentrations up to 10 mM. Polyethylene glycol 3350 also produces a rise of the activity at concentrations up to 5 mM, though it is more moderate. Additionally, MβCD 1.5 mM and glycerol 10% (v/v) exert a protective effect against lyophilization of PhaZ_{Sex}, preserving its activity to a larger extent than in the absence of additives. On the other hand, reducing

agent DTT, as well as anionic or nonionic detergents, strongly inhibit the activity of both depolymerases.

6. The apparent kinetic parameters for PHB degradation of PhaZ_{Sex} are K_M of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and V_{max} of 2,780 U/mg of enzyme, measured by the turbidimetric activity assay. By contrast, PhaZ_{So} shows a K_M of 269 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and V_{max} of 9,797 U/mg of enzyme. The catalytic efficiency of PhaZ_{So} is 1.7 fold higher than that of PhaZ_{Sex}. The most abundant end-point reaction products of PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} are monomers and dimers of (*R*)-3-hydroxybutyrate, unveiling an exo-hydrolase activity, although the existence of a supplementary endo-hydrolase activity cannot be discarded. Additionally, PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} present esterase activity using *p*NP-alkanoates as substrate. The esterase activity of both enzymes is inversely proportional to the length of the aliphatic chain of these substrates.
7. Both PHB depolymerases are able to degrade PHB and PHBV (5% 3-hydroxyvalerate) films, prepared with chloroform by solvent-cast techniques. Specifically, a solution containing 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PhaZ_{So} can completely solubilize films made of 100 mg of PHB, PHBV 5% or PHB-starch (7:3 weight ratio), at 37°C and pH 6, in less than 30 hours.
8. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} present a mixed α/β secondary structure, and a three-dimensional folding type α/β hydrolase in their catalytic domains. The folding of the SBDs has not been experimentally determined, but their *ab initio* modeling predicts a predominantly β -sheet content in their secondary structure. PhaZ_{Sex} presents at least 4 intracatenary disulfide bonds in its structure (Cys⁵⁴-Cys⁶⁶, Cys¹⁵⁴-Cys¹⁶⁵, Cys²²⁴-Cys²³⁰ and Cys²³⁹-Cys²⁸²). PhaZ_{So} has at least three of these bonds, although their precise identities have not been as well established as those of PhaZ_{Sex}.
9. PhaZ_{Sex} and PhaZ_{So} carry out the hydrolysis of PHB by means of a catalytic triad, which identity in PhaZ_{Sex} is Ser²⁴-Asp¹¹¹-His¹⁴³, as inferred from homology. The catalytic triad of PhaZ_{So} is Ser¹³¹-Asp²⁰⁹-His²⁶⁹, as demonstrated by site-directed mutagenesis of aminoacids.
10. PhaZ_{Sex} has been successfully immobilized as cross-linked enzyme aggregates (PhaZ_{Sex}-CLEAs), with a BSA:PhaZ_{Sex} ratio of 100:1. The maximum PHB activity of this biocatalyst, measured by turbidimetric activity assay, is 255 U/g of derivative, with an activity recovery of 18.4%. Maximum activity of this derivative is achieved at pH 7 and temperatures

between 55 and 60°C. Additionally, it shows a clear stabilization effect against high temperatures when compared to the soluble enzyme, and a better tolerance to certain organic solvents such as methanol or acetonitrile. This biocatalyst can be used for at least 20 cycles without significant loss of activity.

- 11.** Preliminary exploration of PhaZ_{So} immobilization onto the surface of silanized magnetic nanoparticles has been carried out by covalent binding as well as by physical adsorption. Higher activity is reached with non-covalent adsorption, outreaching 10 IU/g of derivative. Highest activity recovery of about 11% is also obtained with non-covalent physical adsorption.

- 12.** The ability of lyophilized PhaZ_{Sex} to catalyze organic synthesis reactions in non-aqueous media has been assessed. PhaZ_{Sex} is able to polymerize β -butyrolactone by ring opening polymerization (ROP), with a conversion degree of 59%, generating PHB with a molecular size of 3.8 kDa; it also polymerizes 3-hydroxybutyrate by linear condensation, with a conversion degree of 22%, producing oligomers of 600 Da. Additionally, PhaZ_{Sex} is able to polymerize β -butyrolactone and simultaneously catalyze the acylation of glycerol and trimethylolpropane (TMP).

Anexos

Anexo 1: Secuencia de aminoácidos de PhaZ_{Sex} y secuencia de nucleótidos del gen***phaZ_{Sex}***

M	K	I	R	Q	L	L	V	A	A	L	T	A	V	G	I	A	A	18
ATG	AAG	ATC	AGA	CAA	CTC	CTC	GTC	GCC	GCC	CTG	ACG	GCC	GTC	GGA	ATC	GCC	GCG	54
T	T	V	G	G	A	T	A	A	V	P	A	P	T	P	G	S	L	36
ACG	ACG	GTC	GGC	GGT	GCG	ACG	GCG	GCC	GTT	CCG	GCG	CCG	ACC	CCC	GGC	TCG	CTC	108
Q	Q	Y	N	I	G	S	T	Y	V	S	G	L	S	S	G	G	F	54
CAG	CAG	TAC	AAC	ATC	GGC	TCG	ACC	TAC	GTG	AGC	GGG	CTC	TCG	TCC	GGT	GGG	TTC	162
M	A	N	Q	M	H	V	A	Y	S	D	V	F	E	G	A	G	I	72
ATG	GCC	AAC	CAG	ATG	CAC	GTC	GCC	TAC	TCC	GAC	GTC	TTC	GAG	GGC	GCG	GGC	ATC	216
F	S	A	G	P	Y	D	C	A	Q	N	S	V	N	T	A	Q	Y	90
TTC	TCG	GCC	GGC	CCG	TAC	GAC	TGC	GCC	CAG	AAC	AGT	GTC	AAC	ACG	GCC	CAG	TAC	270
A	C	M	D	T	F	M	A	R	K	T	P	A	Q	L	E	Q	L	108
GCG	TGT	ATG	GAT	ACC	TTC	ATG	GCC	CGT	AAG	ACC	CCG	GCT	CAG	CTC	GAG	CAG	TTG	324
T	R	D	R	A	T	A	G	K	V	D	P	V	A	N	L	S	G	126
ACC	AGG	GAC	CGG	GCG	ACG	GCC	GGC	AAG	GTC	GAC	CCC	GTC	GCC	AAC	CTG	TCG	GGC	378
D	K	V	W	L	F	H	G	T	N	D	S	T	V	K	A	A	V	144
GAC	AAG	GTC	TGG	TTG	TTC	CAC	GGC	ACC	AAC	GAC	AGC	ACC	GTC	AAG	GCG	GCT	GTG	432
N	D	D	L	A	T	Y	Y	R	D	F	G	A	D	V	V	Y	D	162
AAC	GAC	GAC	CTC	GCC	ACC	TAC	TAC	CGC	GAC	TTC	GGT	GCC	GAC	GTG	GTC	TAC	GAC	486
N	S	S	A	S	G	H	A	W	V	S	P	L	G	P	N	S	C	180
AAC	AGC	TCC	GCG	TCC	GGC	CAC	GCC	TGG	GTC	AGT	CCG	CTC	GGC	CCC	AAC	TCG	TGC	540
S	S	T	T	S	P	Y	V	N	T	C	G	G	D	P	V	R	D	198
TCC	TCC	ACC	ACC	TCG	CCG	TAC	GTC	AAC	ACC	TGC	GGT	GGC	GAC	CCG	GTG	AGG	GAC	594
M	L	T	H	L	L	G	S	V	N	P	A	S	S	S	A	L	T	216
ATG	CTG	ACC	CAC	CTG	CTC	GGC	AGC	GTG	AAC	CCC	GCG	AGC	TCG	TCC	GCC	CTC	ACC	648
G	K	L	V	Q	F	N	Q	S	G	Y	A	P	G	G	S	A	G	234
GGC	AAG	CTG	GTC	CAG	TTC	AAC	CAG	AGC	GGC	TAC	GCC	CCC	GGC	GGC	AGC	GCC	GGC	702
A	I	S	M	G	N	E	G	F	A	Y	V	P	Q	S	C	Q	S	252
GCG	ATC	AGC	ATG	GGC	AAC	GAG	GGC	TTC	GCC	TAC	GTC	CCG	CAG	TCC	TGC	CAG	AGC	756
G	A	S	C	K	L	M	V	T	L	H	G	C	Y	Q	Y	F	G	270
GGC	GCC	TCC	TGC	AAG	CTG	ATG	GTC	ACC	CTC	CAC	GGC	TGC	TAC	CAG	TAC	TTC	GGC	810
L	V	G	N	A	L	M	D	K	A	Y	L	N	E	Y	A	D	T	288
CTG	GTC	GGC	AAC	GCC	CTC	ATG	GAC	AAG	GCC	TAC	CTC	AAC	GAG	TAC	GCC	GAC	ACC	864
N	D	M	I	V	L	Y	P	Q	A	T	T	M	T	G	N	P	R	306
AAC	GAC	ATG	ATC	GTC	CTC	TAC	CCG	CAG	GCC	ACC	ACC	ATG	ACG	GGT	AAC	CCG	CGC	918
G	C	W	D	W	W	G	Y	K	S	A	D	Y	A	Q	K	S	G	324
GGC	TGC	TGG	GAC	TGG	TGG	GGG	TAC	AAG	TCA	GCC	GAC	TAC	GCG	CAG	AAG	AGC	GGT	972

Anexos

P	Q	M	T	A	V	M	N	M	A	R	A	L	G	A	G	G	E	342
CCG	CAG	ATG	ACG	GCC	GTG	ATG	AAC	ATG	GCC	AGG	GCC	CTC	GGC	GCA	GGT	GGC	GAG	1026
S	S	P	A	L	P	A	P	T	G	L	T	V	T	A	T	T	A	360
AGC	TCT	CCG	GCC	CTT	CCC	GCG	CCG	ACC	GGG	CTG	ACC	GTC	ACC	GCC	ACG	ACG	GCG	1080
T	T	A	S	L	S	W	N	S	V	P	G	A	A	S	Y	D	V	378
ACC	ACC	GCT	TCG	CTG	TCC	TGG	AAC	TCC	GTC	CCG	GGC	GCG	GCT	TCC	TAC	GAC	GTG	1134
Y	R	D	G	T	K	V	N	S	A	P	V	T	A	T	T	Y	T	396
TAC	CGC	GAC	GGC	ACC	AAG	GTC	AAC	AGC	GCT	CCG	GTC	ACG	GCC	ACC	ACC	TAC	ACC	1188
D	T	G	L	T	T	G	T	A	Y	S	Y	T	V	A	G	V	D	414
GAC	ACA	GGC	CTG	ACC	ACC	GGT	ACG	GCC	TAC	TCC	TAC	ACC	GTC	GCC	GGC	GTC	GAC	1242
T	A	G	T	A	G	A	R	T	T	P	V	T	A	T	T	T	G	432
ACG	GCC	GGA	ACG	GCC	GGC	GCC	AGG	ACC	ACG	CCT	GTC	ACC	GCG	ACC	ACC	ACG	GGA	1296
A	A	V	C	V	T	A	S	N	Y	A	H	T	Q	A	G	R	A	450
GCC	GCC	GTG	TGC	GTG	ACG	GCC	AGC	AAC	TAC	GCC	CAT	ACG	CAG	GCC	GGC	CGG	GCC	1350
H	Q	S	G	G	Y	T	Y	A	N	G	S	N	Q	N	L	G	L	468
CAC	CAG	TCC	GGC	GGC	TAC	ACC	TAC	GCC	AAC	GGC	TCG	AAC	CAG	AAC	CTC	GGC	CTG	1404
W	N	V	L	A	S	S	T	I	K	E	T	A	P	G	Y	W	V	486
TGG	AAC	GTC	CTG	GCC	TCC	AGC	ACC	ATC	AAG	GAG	ACC	GCC	CCG	GGC	TAC	TGG	GTC	1458
T	C	*																489
ACC	TGC	TGA																1467

Secuencia completa de aminoácidos de *PhaZ_{Sex}* (líneas superiores) y secuencia de nucleótidos del gen *phaZ_{Sex}* (líneas inferiores): Los aminoácidos pertenecientes al péptido señal de secreción se muestran en rojo, los del péptido separador fibronectina tipo III están en azul, y los del dominio de unión a sustrato en verde. Los aminoácidos que conforman la triada catalítica están señalados en violeta, y la supuesta histidina de la cavidad del oxianión en naranja.

Anexo 2: Secuencia de aminoácidos de PhaZ_{5a} y secuencia de nucleótidos del gen***fkbU***

M	Q	P	P	P	F	R	G	I	L	T	P	L	F	P	L	S	S	18
ATG	CAG	CCG	CCG	CCG	TTC	CGG	GGA	ATC	CTC	ACC	CCG	CTG	TTC	CCC	CTC	TCC	TCC	54
S	P	P	V	G	S	L	S	R	P	G	R	R	G	V	L	T	R	36
TCG	CCG	CCG	GTC	GGG	TCG	TTG	TCG	CGT	CCG	GGA	CGG	CGG	GGG	GTG	CTC	ACC	CGT	108
L	V	A	V	V	A	L	V	L	G	A	A	L	L	G	P	A	P	54
CTC	GTG	GCC	GTC	GTG	GCC	CTC	GTA	CTC	GGA	GCG	GCC	CTG	CTC	GGC	CCG	GCG	CCG	162
T	A	H	A	A	A	G	L	A	K	P	G	L	T	K	A	D	L	72
ACG	GCC	CAC	GCC	GCG	GCG	GGC	CTG	GCC	AAG	CCC	GGT	CTG	ACC	AAG	GCG	GAC	CTG	216
T	E	V	A	D	F	G	T	N	P	G	R	L	N	M	Y	V	Y	90
ACC	GAG	GTC	GCG	GAC	TTC	GGC	ACG	AAC	CCG	GGC	CGG	CTG	AAC	ATG	TAC	GTC	TAC	270
R	P	A	S	L	P	A	E	P	A	V	V	F	A	L	H	G	C	108
CGG	CCC	GCG	TCC	CTG	CCC	GCG	GAG	CCG	GCG	GTG	GTG	TTC	GCC	CTG	CAC	GGT	TGC	324
T	Q	D	A	Q	G	Y	A	D	N	S	G	L	L	S	F	A	D	126
ACC	CAG	GAC	GCC	CAG	GGC	TAC	GCC	GAC	AAC	TCC	GGC	CTG	CTC	TCA	TTC	GCG	GAC	378
R	Y	G	F	L	L	V	F	A	E	T	T	S	S	N	N	A	N	144
CGC	TAT	GGC	TTC	CTG	CTC	GTG	TTC	GCC	GAG	ACC	ACG	TCG	TCG	AAC	AAC	GCG	AAC	432
R	C	F	N	W	F	Q	S	S	D	N	R	R	G	Q	G	E	A	162
AGG	TGC	TTC	AAC	TGG	TTC	CAG	AGC	AGC	GAC	AAC	CGC	AGG	GGC	CAG	GGC	GAA	GCC	486
A	S	I	R	Q	M	A	A	H	T	V	S	A	Y	G	A	D	P	180
GCG	TCG	ATC	CGG	CAG	ATG	GCC	GCT	CAC	ACC	GTC	TCC	GCC	TAC	GGC	GCG	GAC	CCC	540
Q	R	T	Y	I	T	G	L	S	A	G	G	A	M	T	S	V	M	198
CAG	CGC	ACC	TAC	ATC	ACC	GGG	CTG	TCC	GCC	GGC	GGT	GCC	ATG	ACG	TCG	GTG	ATG	594
L	A	T	Y	P	D	V	F	Q	A	G	A	V	V	A	G	L	P	216
CTC	GCC	ACC	TAT	CCG	GAC	GTC	TTC	CAG	GCC	GGC	GCG	GTC	GTC	GCC	GGC	CTG	CCC	648
F	G	C	A	T	D	V	S	S	A	Y	L	C	M	N	P	G	T	234
TTC	GGC	TGT	GCC	ACC	GAC	GTC	AGC	AGC	GCG	TAC	CTG	TGC	ATG	AAC	CCC	GGG	ACC	702
D	L	T	A	D	Q	W	A	R	R	V	R	D	G	Y	P	S	W	252
GAC	CTG	ACC	GCG	GAC	CAG	TGG	GCG	CGG	CGG	GTC	CGT	GAC	GGC	TAC	CCC	TCG	TGG	756
S	G	P	W	P	R	V	A	I	W	H	G	D	K	D	T	T	V	270
TCG	GGC	CCG	TGG	CCG	CGC	GTG	GCC	ATC	TGG	CAC	GGC	GAC	AAG	GAC	ACC	ACC	GTC	810
A	P	R	N	A	D	E	L	R	D	Q	W	T	A	V	H	G	V	288
GCG	CCG	CGC	AAC	GCC	GAC	GAG	TTG	CGC	GAC	CAG	TGG	ACC	GCT	GTG	CAC	GGC	GTG	864
S	Q	T	P	D	R	T	S	V	I	G	P	N	S	T	R	H	E	306
TCC	CAG	ACG	CCG	GAC	CGT	ACC	TCG	GTG	ATC	GGC	CCG	AAC	TCC	ACC	CGG	CAC	GAG	918
E	Y	L	A	A	D	G	S	V	A	V	E	V	N	R	V	P	G	324
GAG	TAC	CTG	GCC	GCG	GAC	GGA	TCG	GTG	GCC	GTG	GAG	GTG	AAC	CGG	GTG	CCG	GCC	972

Anexos

I	G	H	G	T	P	V	D	P	G	T	G	A	Q	Q	C	G	S	342
ATC	GGG	CAC	GGC	ACC	CCG	GTC	GAT	CCC	GGC	ACC	GGA	GCA	CAG	CAG	TGC	GGC	AGC	1026
T	G	A	A	Y	F	L	D	S	I	C	S	S	Y	W	I	T	Q	360
ACC	GGC	GCC	GCC	TAC	TTC	CTG	GAC	TCG	ATC	TGT	TCC	AGC	TAC	TGG	ATC	ACG	CAG	1080
F	F	G	L	S	G	S	A	S	D	P	G	S	L	P	A	P	S	378
TTC	TTC	GGC	CTG	AGC	GGA	TCC	GCC	TCC	GAC	CCC	GGT	TCG	CTG	CCC	GCT	CCG	TCC	1134
G	L	A	A	T	G	A	T	D	T	T	I	S	L	T	W	K	P	396
GGC	CTG	GCC	GCC	ACC	GGC	GCC	ACC	GAC	ACC	ACC	ATC	AGC	CTG	ACC	TGG	AAA	CCC	1188
V	D	G	A	T	D	Y	A	V	H	R	D	G	A	Q	I	T	T	414
GTC	GAC	GGC	GCC	ACC	GAC	TAC	GCC	GTC	CAC	CGC	GAC	GGT	GCC	CAG	ATC	ACC	ACG	1242
S	A	T	T	S	Y	T	D	T	G	L	R	A	G	T	S	H	T	432
TCC	GCC	ACG	ACG	TCG	TAC	ACG	GAC	ACC	GGC	CTG	AGG	GCG	GGC	ACA	TCG	CAC	ACC	1296
Y	A	V	A	A	R	D	A	D	G	K	A	G	P	L	S	G	A	450
TAC	GCG	GTC	GCC	GCC	CGG	GAC	GCG	GAC	GGC	AAG	GCC	GGA	CCG	CTC	TCG	GGC	GCG	1350
V	T	A	Q	T	T	G	A	T	A	V	C	W	T	A	G	N	Y	468
GTC	ACC	GCG	CAG	ACG	ACC	GGT	GCC	ACG	GCC	GTC	TGC	TGG	ACC	GCC	GGC	AAC	TAC	1404
A	H	V	Q	A	G	R	A	T	T	S	A	G	Y	T	Y	A	K	486
GCT	CAC	GTC	CAG	GCG	GGC	CGC	GCC	ACG	ACG	AGC	GCC	GGT	TAC	ACC	TAC	GCC	AAG	1458
G	S	G	Q	N	M	G	L	Y	N	T	F	V	T	T	T	L	K	504
GGC	TCC	GGC	CAG	AAC	ATG	GGC	CTG	TAC	AAC	ACC	TTC	GTC	ACG	ACC	ACC	TTG	AAA	1512
E	S	P	T	G	Y	F	T	V	A	N	D	T	C	P	*			520
GAG	TCG	CCG	ACC	GGC	TAC	TTC	ACC	GTC	GCG	AAC	GAC	ACC	TGT	CCC	TGA			1560

Secuencia completa de aminoácidos de PhaZ_{sa} (líneas superiores) y secuencia de nucleótidos del gen *fbkU* (líneas inferiores): Los aminoácidos pertenecientes al péptido señal de secreción se muestran en rojo, los del péptido separador fibronectina tipo III están en azul, y los del dominio de unión a sustrato en verde. Los aminoácidos que conforman la triada catalítica están señalados en violeta, y la supuesta histidina de la cavidad del oxianión en naranja. El posible codón alternativo de inicio de la traducción proteica está resaltado en amarillo, y su correspondiente sitio de unión del ribosoma está resaltado en gris.

Bibliografía

- Albertsson, A. C. y Srivastava, R. K.** (2008). "Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization." *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**(9): 1077-1093.
- Alderete, J. E., Karl, D. W. y Park, C. H.** (1993). "Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture." *Biotechnology Progress* **9**(5): 520-525.
- Allen, A. D., Anderson, W. A., Ayorinde, F. y Eribo, B. E.** (2011). "Isolation and characterization of an extracellular thermoalkanophilic P(3HB-co-3HV) depolymerase from *Streptomyces* sp. IN1." *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**(6): 777-785.
- Anderson, A. S. y Wellington, E. M.** (2001). "The taxonomy of *Streptomyces* and related genera." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(3): 797-814.
- Arandes, J. M., Bilbao, J. y López-Valerio, D.** (2004). "Reciclado de residuos plásticos." *Revista Iberoamericana de Polímeros* **5**(1): 28-45.
- Arroyo, M., Garcia-Hidalgo, J., Villalon, M., de Eugenio, L., Hormigo, D., Acebal, C., Garcia, J. L., Prieto, M. A. y de la Mata, I.** (2011). "Characterization of a novel immobilized biocatalyst obtained by matrix-assisted refolding of recombinant polyhydroxyoctanoate depolymerase from *Pseudomonas putida* KT2442 isolated from inclusion bodies." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**(9): 1203-1209.
- Asano, Y. y Watanabe, S.** (2001). "Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading microorganisms and characterization of PHB-depolymerase from *Arthrobacter* sp. strain W6." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**(5): 1191-1194.
- Aytar, B. S. y Bakir, U.** (2008). "Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates." *Process Biochemistry* **43**(2): 125-131.
- Bachmann, B. M. y Seebach, D.** (1999). "Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1." *Macromolecules* **32**(6): 1777-1784.
- Bagos, P. G., Nikolaou, E. P., Liakopoulos, T. D. y Tsirigos, K. D.** (2010). "Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models." *Bioinformatics* **26**(22): 2811-2817.
- Becker, A. y Vorhölter, F. J.** (2008). Xanthan biosynthesis by *Xanthomonas* bacteria: an overview of the current biochemical and genomic data. En: Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. Applications and Perspectives. Ed: B. H. A. Rehm. Caister Academic Press. pp. 1-12.
- Behrends, A., Klingbeil, B. y Jendrossek, D.** (1996). "Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site." *FEMS Microbiology Letters* **143**(2-3): 191-194.
- Berdy, J.** (2005). "Bioactive Microbial Metabolites." *The Journal of Antibiotics* **58**(1): 1-26.
- Berks, B. C.** (1996). "A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?" *Molecular Microbiology* **22**(3): 393-404.
- Bhavani, A. L. y Nisha, J.** (2010). "Dextran - the polysaccharide with versatile uses." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1**(4): 569-573.
- Bibb, M. J., Janssen, G. R. y Ward, J. M.** (1985). "Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*." *Gene* **38**(1-3): 215-226.

- Bibb, M. J., White, J., Ward, J. M. y Janssen, G. R.** (1994). "The messenger RNA for the 23S ribosomal RNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site." *Molecular Microbiology* **14**(3): 533-545.
- Boatman, E. S.** (1964). "Observations on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*." *The Journal of Cell Biology* **20**: 297-311.
- Böhm, G., Muhr, R. y Jaenicke, R.** (1992). "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks." *Protein Engineering* **5**(3): 191-195.
- Bonnet, V., Gervaise, C., Favrelle, A., Sarazin, C. y Djedaini-Pilard, F.** (2010). "Enzymatic catalysis in presence of cyclodextrins." *Current Organic Chemistry* **14**(13): 1323-1336.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brandl, H., Bachofen, R., Mayer, J. y Wintermantel, E.** (1995). "Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(13): 143-153.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. y Genser, K. F.** (1998). "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects." *Journal of Biotechnology* **65**(2-3): 127-161.
- Brenner, S.** (1988). "The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines." *Nature* **334**(6182): 528-530.
- Briese, B. H. y Jendrossek, D.** (1998). "Biological basis of enzyme-catalyzed polyester degradation: 59 C-terminal amino acids of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase a from *Pseudomonas lemoignei* are sufficient for PHB binding." *Macromolecular Symposia* **130**(1): 205-216.
- Briese, B. H., Schmidt, B. y Jendrossek, D.** (1994). "*Pseudomonas lemoignei* has five poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) depolymerase genes: A comparative study of bacterial and eukaryotic PHA depolymerases." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **2**(2): 75-87.
- Brooks, M. S., Burdock, T. J., Ghaly, A. E. y Dave, D.** (2012). "Changes in cell structure, morphology and activity of *Streptomyces venezuelae* during the growth, shocking and jadomycin production stages." *Journal of Microbial & Biochemical Technology* **4**(3): 63-75.
- Brown, P. H. y Schuck, P.** (2006). "Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation." *Biophysical Journal* **90**(12): 4651-4661.
- Brucato, C. L. y Wong, S. S.** (1991). "Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**(2): 497-502.
- Bruce, I. J. y Sen, T.** (2005). "Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations." *Langmuir* **21**(15): 7029-7035.
- Cabana, H., Jones, J. P. y Agathos, S. N.** (2007). "Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals." *Journal of Biotechnology* **132**(1): 23-31.
- Calabia, B. P. y Tokiwa, Y.** (2006). "A novel PHB depolymerase from a thermophilic *Streptomyces* sp." *Biotechnology Letters* **28**(6): 383-388.
- Campanella, J. J., Bitincka, L. y Smalley, J.** (2003). "MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences." *BMC Bioinformatics* **4**(29 (1471-2105)).

- Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O. y Okon, Y.** (2010). Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates. En: Plastics from Bacteria. **14**. Ed: G. G. Q. Chen. Springer Berlin Heidelberg. pp. 39-61.
- Çolak, A., Şişik, D., Sağlam, N., Güner, S., Çanakçı, S. y Beldüz, A. O.** (2005). "Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2." *Bioresource Technology* **96**(5): 625-631.
- Cole, C., Barber, J. D. y Barton, G. J.** (2008). "The Jpred 3 secondary structure prediction server." *Nucleic Acids Research* **36**(sup 2): 197-201.
- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T. y Schrempf, H.** (2010). "The complex extracellular biology of *Streptomyces*." *FEMS Microbiology Reviews* **34**(2): 171-198.
- Chaudhary, A. K., Dhakal, D. y Sohng, J. K.** (2013). "An insight into the "-Omics" based engineering of Streptomycetes for secondary metabolite overproduction." *BioMed Research International* **2013**.
- Chen, G. Q.** (2009). "A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry." *Chemical Society Reviews* **38**(8): 2434-2446.
- Chen, G. Q.** (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates. En: Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. **14**. Ed: G. G.Q. Chen. Springer Berlin Heidelberg. pp. 17-37.
- Chiba, K., Hoshino, Y., Ishino, K., Kogure, T., Mikami, Y., Uehara, Y. y Ishikawa, J.** (2007). "Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors." *Japanese Journal of Infectious Diseases* **60**(1): 45-47.
- Chiba, T. y Nakai, T.** (1985). "A synthetic approach to (+)-thienamycin from methyl (*R*)-3-hydroxybutanoate - a new entry to (3*R*,4*R*)-3-[(*R*)-1-hydroxyethyl]-4-acetoxy-2-azetidinone." *Chemistry Letters* **14**(5): 651-654.
- Cho, M., Brigham, C. J., Sinskey, A. J. y Stubbe, J.** (2012). "Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo." *Biochemistry* **51**(11): 2276-2288.
- Chodak, I.** (2008). Chapter 22 - Polyhydroxyalkanoates: Origin, properties and applications. En: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Ed: M. N. Belgacem y A. Gandini. Elsevier. pp. 451-477.
- Choi, J. S. y Park, W. H.** (2004). "Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)." *Polymer Testing* **23**(4): 455-460.
- Dale, B. E. y White, D. H.** (1983). "Ionic strength: A neglected variable in enzyme technology." *Enzyme and Microbial Technology* **5**(3): 227-229.
- de Eugenio, L.** (2009). "Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida*: Aplicaciones biotecnológicas." Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- de Eugenio, L. I., García, J. L., García, P., Prieto, M. A. y Sanz, J. M.** (2008). "Comparative analysis of the physiological and structural properties of a medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas putida* KT2442." *Engineering in Life Sciences* **8**(3): 260-267.
- de Eugenio, L. I., Garcia, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Roman, J. S., Garcia, J. L. y Prieto, M. A.** (2007). "Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length

polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme." *The Journal of Biological Chemistry* **282**(7): 4951-4962.

del Campo, A., Sen, T., Lellouche, J. P. y Bruce, I. J. (2005). "Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**(1): 33-40.

Delafield, F. P., Doudoroff, M., Palleroni, N. J., Lusty, C. J. y Contopoulos, R. (1965). "Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads." *Journal of Bacteriology* **90**(5): 1455-1466.

Dini-Andreote, F., Andreote, F. D., Araujo, W. L., Trevors, J. T. y van Elsas, J. D. (2012). "Bacterial genomes: Habitat specificity and uncharted organisms." *Microbial Ecology* **64**(1): 1-7.

Doi, Y., Segawa, A., Kawaguchi, Y. y Kunioka, M. (1990). "Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*." *FEMS Microbiology Letters* **55**(1-2): 165-169.

Dong, H., Cao, S.-G., Li, Z.-Q., Han, S.-P., You, D.-L. y Shen, J.-C. (1999). "Study on the enzymatic polymerization mechanism of lactone and the strategy for improving the degree of polymerization." *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry* **37**(9): 1265-1275.

Dong, H., Wang, H.-d., Cao, S.-g. y Shen, J.-c. (1998). "Lipase-catalyzed polymerization of lactones and linear hydroxyesters." *Biotechnology Letters* **20**(10): 905-908.

Dong, T., Zhao, L., Huang, Y. y Tan, X. (2010). "Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive." *Bioresource Technology* **101**(16): 6569-6571.

Doran-Peterson, J., Cook, D. M. y Brandon, S. K. (2008). "Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol." *The Plant Journal* **54**(4): 582-592.

Doudoroff, M. y Stanier, R. Y. (1959). "Role of poly-beta-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria." *Nature* **183**(4673): 1440-1442.

Duggleby, R. G. (1981). "A nonlinear regression program for small computers." *Analytical Biochemistry* **110**(1): 9-18.

Durst, H. D., Milano, M., Kikta, E. J., Connelly, S. A. y Grushka, E. (1975). "Phenacyl esters of fatty acids via crown ether catalysts for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography." *Analytical Chemistry* **47**(11): 1797-1801.

Edman, P. y Begg, G. (1967). "A protein sequenator." *European Journal of Biochemistry* **1**(1): 80-91.

Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**(1): 70-77.

Escapa, I. F., Garcia, J. L., Buhler, B., Blank, L. M. y Prieto, M. A. (2012). "The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*." *Environmental Microbiology* **14**(4): 1049-1063.

Fernández-Castillo, R., Rodríguez-Valera, F., González-Ramos, J. y Ruiz-Berraquero, F. (1986). "Accumulation of poly(β -hydroxybutyrate) by halobacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **51**(1): 214-216.

Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L. y Prieto, M. A. (2011). "Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442." *Molecular Microbiology* **79**(2): 402-418.

- Gangoiti, J., Santos, M., Llama, M. J. y Serra, J. L.** (2010). "Production of chiral (*R*)-3-hydroxyoctanoic acid monomers, catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* GK13 poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(11): 3554-3560.
- Gangoiti, J., Santos, M., Prieto, M. A., de la Mata, I., Serra, J. L. y Llama, M. J.** (2012). "Characterization of a novel subgroup of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerases from actinobacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(20): 7229-7237.
- García-Hidalgo, J., Hormigo, D., Arroyo, M. y de la Mata, I.** (2013). "Novel extracellular PHB depolymerase from *Streptomyces ascomycinicus*: PHB copolymers degradation in acidic conditions." *PLoS One* **8**(8): e71699.
- García-Hidalgo, J., Hormigo, D., Prieto, M. A., Arroyo, M. y de la Mata, I.** (2012). "Extracellular production of *Streptomyces exfoliatus* poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Rhodococcus* sp. T104: determination of optimal biocatalyst conditions." *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**(5): 1975-1988.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. y Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En: *The Proteomics Protocols Handbook*. Ed: J. M. Walker. Humana Press. pp. 571-607.
- Gebauer, B. y Jendrossek, D.** (2006). "Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 6094-6100.
- Ghanem, A.** (2003). "The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: enhanced reaction rate and enantioselectivity." *Organic & Biomolecular Chemistry* **1**(8): 1282-1291.
- Glenn, T. C.** (2011). "Field guide to next-generation DNA sequencers." *Molecular Ecology Resources* **11**(5): 759-769.
- Godbole, S., Gote, S., Latkar, M. y Chakrabarti, T.** (2003). "Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films." *Bioresource Technology* **86**(1): 33-37.
- Gould, P. L., Holland, S. J. y Tighe, B. J.** (1987). "Polymers for biodegradable medical devices. IV. Hydroxybutyrate-valerate copolymers as non-disintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms." *International Journal of Pharmaceutics* **38**(1-3): 231-237.
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A. y Rehm, B. H. A.** (2009). "Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications." *Biomacromolecules* **10**(4): 660-669.
- Griebel, R., Smith, Z. y Merrick, J. M.** (1968). "Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*." *Biochemistry* **7**(10): 3676-3681.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. y Rainey, F. A.** (1997). "Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers." *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(1): 202-206.
- Han, J. S., Son, Y. J., Chang, C. S. y Kim, M. N.** (1998). "Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase produced by *Penicillium pinophilum*." *Journal of Microbiology* **36**(2): 67-73.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* **166**(4): 557-580.

Handrick, R. y Jendrossek, D. (1998). Extracellular and intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: homologies and differences. En: Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers. Ed: A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 57-67.

Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M. y Jendrossek, D. (2001). "A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids." *The Journal of Biological Chemistry* **276**(39): 36215-36224.

Handrick, R., Reinhardt, S. y Jendrossek, D. (2000). "Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*." *Journal of Bacteriology* **182**(20): 5916-5918.

Hasegawa, M., Yamamoto, S., Kobayashi, M. y Kise, H. (2003). "Catalysis of protease/cyclodextrin complexes in organic solvents: Effects of reaction conditions and cyclodextrin structure on catalytic activity of proteases." *Enzyme and Microbial Technology* **32**(3-4): 356-361.

Hazer, B. y Steinbüchel, A. (2007). "Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(1): 1-12.

Hermanson, G. T. (2008). Bioconjugate Techniques. Academic Press (Elsevier).

Hermawan, S. y Jendrossek, D. (2010). "Tyrosine 105 of *Paucimonas lemoignei* PHB depolymerase Pha7 is essential for polymer binding." *Polymer Degradation and Stability* **95**(8): 1429-1435.

Hernández, B. S., Koh, S. C., Chial, M. y Focht, D. D. (1997). "Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil." *Biodegradation* **8**(3): 153-158.

Hiraishi, T., Komiya, N., Matsumoto, N., Abe, H., Fujita, M. y Maeda, M. (2010). "Degradation and adsorption characteristics of PHB depolymerase as revealed by kinetics of mutant enzymes with amino acid substitution in substrate-binding domain." *Biomacromolecules* **11**(1): 113-119.

Hisano, T., Kasuya, K., Tezuka, Y., Ishii, N., Kobayashi, T., Shiraki, M., Oroudjev, E., Hansma, H., Iwata, T., Doi, Y., Saito, T. y Miki, K. (2006). "The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters." *Journal of Molecular Biology* **356**(4): 993-1004.

Hopwood, D. A. (2006). "Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome." *Annual Review of Genetics* **40**: 1-23.

Hormigo, D. (2009). "Caracterización del centro activo de las acilasas de *Streptomyces lavendulae* y *Actinoplanes utahensis*. Búsqueda de nuevas actividades e inmovilización" Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Hormigo, D., de la Mata, I., Acebal, C. y Arroyo, M. (2010). "Immobilized aculeacin A acylase from *Actinoplanes utahensis*: Characterization of a novel biocatalyst." *Bioresource Technology* **101**(12): 4261-4268.

Horowitz, D. M. y Sanders, J. K. M. (1994). "Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications." *Journal of the American Chemical Society* **116**(7): 2695-2702.

Horowitz, D. M. y Sanders, J. K. M. (1995). "Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilization in vitro by proteins." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(13): 115-123.

Jaeger, K. E., Steinbüchel, A. y Jendrossek, D. (1995). "Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates)." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(8): 3113-3118.

Jendrossek, D. (2001a). "Microbial degradation of polyesters." *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 293-325.

Jendrossek, D. (2001b). "Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoignei*, a Gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species, *Paucimonas lemoignei* comb. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(3): 905-908.

Jendrossek, D. (2007). "Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination." *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(6): 1186-1196.

Jendrossek, D. (2009). "Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes)." *Journal of Bacteriology* **191**(10): 3195-3202.

Jendrossek, D., Backhaus, M. y Andermann, M. (1995a). "Characterization of the extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Comamonas* sp. and of its structural gene." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(Supl 1): 160-169.

Jendrossek, D., Frisse, A., Behrends, A., Andermann, M., Kratzin, H. D., Stanislawski, T. y Schlegel, H. G. (1995b). "Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system." *Journal of Bacteriology* **177**(3): 596-607.

Jendrossek, D. y Handrick, R. (2002). "Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates." *Annual Review of Microbiology* **56**: 403-432.

Jendrossek, D., Hermawan, S., Subedi, B. y Papageorgiou, A. C. (2013). "Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 mutants reveal the PHB binding site and details of substrate-enzyme interactions." *Molecular Microbiology* **90**(3): 649-664.

Jendrossek, D., Knoke, I., Habibian, R. B., Steinbüchel, A. y Schlegel, H. G. (1993). "Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **1**(1): 53-63.

Jendrossek, D. y Pfeiffer, D. (2014). "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)." *Environmental Microbiology*.

Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. y Castro-Sowinski, S. (2005). "Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates." *Critical Reviews in Microbiology* **31**(2): 55-67.

Kang, S. A., Jang, K. H., Seo, J. W., Kim, K. H., Kim, Y. H., Rairakhwada, D., Seo, M. Y., Lee, J. O., Ha, S. D., Kim, C. H. y Rhee, S. K. (2008). Levan: Applications and perspectives. En: Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives. Ed: B. H. A. Rehm. Caister Academic Press.

Kasuya, K., Inoue, Y., Tanaka, T., Akehata, T., Iwata, T., Fukui, T. y Doi, Y. (1997). "Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(12): 4844-4852.

Kasuya, K., Ohura, T., Masuda, K. y Doi, Y. (1999). "Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases." *International Journal of Biological Macromolecules* **24**(4): 329-336.

- Kasuya, K., Takano, T., Tezuka, Y., Hsieh, W. C., Mitomo, H. y Doi, Y.** (2003). "Cloning, expression and characterization of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Marinobacter* sp NK-1." *International Journal of Biological Macromolecules* **33**(4-5): 221-226.
- Kelley, L. A. y Sternberg, M. J. E.** (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nature Protocols* **4**(3): 363-371.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K. y Hopwood, D.** (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, England. The John Innes Foundation.
- Kim, D. Y., Kim, H. C., Kim, S. Y. y Rhee, Y. H.** (2005). "Molecular characterization of extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase genes from *Pseudomonas alcaligenes* strains." *The Journal of Microbiology* **43**(3): 285-294.
- Kim, D. Y., Nam, J. S. y Rhee, Y. H.** (2002). "Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Pseudomonas alcaligenes* LB19." *Biomacromolecules* **3**(2): 291-296.
- Kim, H., Ju, H. S. y Kim, J.** (2000a). "Characterization of an extracellular poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate) depolymerase from *Xanthomonas* sp. JS02." *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**(3): 323-327.
- Kim, H. J., Kim, D. Y., Nam, J. S., Bae, K. S. y Rhee, Y. H.** (2003). "Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces* sp. KJ-72." *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**(2): 183-189.
- Kim, H. M., Ryu, K. E., Bae, K. S. y Rhee, Y. H.** (2000b). "Purification and characterization of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas* sp RY-1." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**(2): 196-198.
- Kita, K., Mashiba, S., Nagita, M., Ishimaru, K., Okamoto, K., Yanase, H. y Kato, N.** (1997). "Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122, and characterization of its gene product." *Biochimica et Biophysica Acta* **1352**(1): 113-122.
- Klingbeil, B., Kroppenstedt, R. M. y Jendrossek, D.** (1996). "Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene." *FEMS Microbiology Letters* **142**(2-3): 215-221.
- Knoll, M., Hamm, T. M., Wagner, F., Martinez, V. y Pleiss, J.** (2009). "The PHA depolymerase engineering database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases." *BMC Bioinformatics* **10**(89).
- Kobayashi, T., Sugiyama, A., Kawase, Y., Saito, T., Mergaert, J. y Swings, J.** (1999). "Biochemical and genetic characterization of an extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Acidovorax* sp strain TP4." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **7**(1): 9-18.
- Kolattukudy, P. E.** (2002a). Cutin from Plants. En: *Biopolymers*. **3a**. Ed: Y. Doi y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kolattukudy, P. E.** (2002b). Suberin from Plants. En: *Biopolymers*. **3a**. Ed: Y. Doi y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kolossváry, G. J. y Bánky-Előd, E.** (1996). "Enhancement of enzymatic hydrolysis of triolein in aqueous solution by cyclodextrin derivatives." *Biotechnology Techniques* **10**(2): 115-120.
- Kornberg, A.** (1995). "Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable." *Journal of Bacteriology* **177**(3): 491-496.

Koyama, T. y Steinbüchel, A. (2002). Chemical structures and occurrence of natural polyisoprenoides. En: Biopolymers. 2. Ed: T. Koyama y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Kula, M. R. (2002). Enzyme catalysis in organic synthesis. En: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Ed: K. Drauz y H. Waldmann. Wiley-VCH Verlag GmbH. pp. 1-39.

Kumar, Y. y Goodfellow, M. (2010). "Reclassification of *Streptomyces hygroscopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60**(4): 769-775.

Kunioka, M. y Furusawa, K. (1997). "Poly(γ -glutamic acid) hydrogel prepared from microbial poly(γ -glutamic acid) and alkanediamine with water-soluble carbodiimide." Journal of Applied Polymer Science **65**(10): 1889-1896.

Kurusu, Y., Kohama, K., Uchida, Y., Saito, T. y Yukawa, H. (1994). Cloning and nucleotide sequencing of the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene from *Pseudomonas pickettii*. En: Biodegradable Plastics and Polymers. Ed: Y. Doi y K. Fukuda. Elsevier Science B. V. Amsterdam. pp. 357-361.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. y Witholt, B. (1988). "Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates." Applied and Environmental Microbiology **54**(12): 2924-2932.

Lammertyn, E. y Anné, J. (1998). "Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion." FEMS Microbiology Letters **160**(1): 1-10.

Lee, B. S., Vert, M. y Holler, E. (2002). Water-soluble aliphatic polyesters: Poly(malic acid)s. En: Biopolymers. Ed: Y. Doi y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Lemoigne, M. (1925). "Etudes sur l'autolyse microbienne acidification par formation d'acide β -oxybutyrique." Annales de l'Institut Pasteur **39**: 144-155.

Lemoigne, M. (1926). "Produits de l'hydratation et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique." Bulletin de la Société de Chimie Biologique **8**: 770-782.

Liu, H. Y., Zhang, H., Chen, S., Liu, D. B. y Xia, H. M. (2006). "Purification and properties of a poly (beta-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium* sp." Journal of Polymers and the Environment **14**(4): 419-426.

Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. y Chen, J. (2011). "Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives." Microbial Cell Factories **10**(99).

Lütke-Eversloh, T. y Steinbüchel, A. (2004). "Microbial polythioesters." Macromolecular Bioscience **4**(3): 165-174.

Ma, W. T., Lin, J. H., Chen, H. J., Chen, S. Y. y Shaw, G. C. (2011). "Identification and characterization of a novel class of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Bacillus* sp. strain NRRL B-14911." Applied and Environmental Microbiology **77**(22): 7924-7932.

Macrae, R. M. y Wilkinson, J. F. (1958). "Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*." Journal of General Microbiology **19**(1): 210-222.

- Madison, L. L. y Huisman, G. W.** (1999). "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**(1): 21-53.
- Majumder, A. B. y Gupta, M. N.** (2010). "Stabilization of *Candida rugosa* lipase during transacetylation with vinyl acetate." *Bioresource Technology* **101**(8): 2877-2879.
- Marchessault, R. H., Morin, F. G., Wong, S. y Saracovan, I.** (1995). "Artificial granule suspensions of long side chain poly(3-hydroxyalkanoate)." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(13): 138-142.
- Martínez, G. y Gómez, M. A.** (2007). "Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros." *Revista Iberoamericana de Polímeros* **8**(4): 300-312.
- Martinez, V., de la Peña, F., Garcia-Hidalgo, J., de la Mata, I., Garcia, J. L. y Prieto, M. A.** (2012). "Identification and biochemical evidence of a medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* predatory hydrolytic arsenal." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(17): 6017-6026.
- Matavulj, M. y Molitoris, H. P.** (1992). "Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi." *FEMS Microbiology Reviews* **9**(2-4): 323-331.
- Matsumura, S., Beppu, H., Tsukada, K. y Toshima, K.** (1996). "Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of β -propiolactone." *Biotechnology Letters* **18**(9): 1041-1046.
- Matsumura, S., Suzuki, Y., Tsukada, K., Toshima, K., Doi, Y. y Kasuya, K. I.** (1998). "Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of β -butyrolactone to the cyclic and linear poly(3-hydroxybutyrate)." *Macromolecules* **31**(19): 6444-6449.
- Mayer, F. y Hoppert, M.** (1997). "Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer." *Journal of Basic Microbiology* **37**(1): 45-52.
- McChalicher, C. W. y Srienc, F.** (2007). "Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers." *Journal of Biotechnology* **132**(3): 296-302.
- McGuffin, L., Bryson, K. y Jones, D. T.** (1999). "The PSIPRED protein structure prediction server." *Bioinformatics* **16**: 404-405.
- Mengfan, W., Wei, Q., Rongxin, S. y Zhimin, H.** (2010). "Advances in cross-linked enzyme aggregates." *Progress in Chemistry* **22**(1): 173-178.
- Mergaert, J., Anderson, C., Wouters, A. y Swings, J.** (1994). "Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **2**(3): 177-183.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. y Swings, J.** (1993). "Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(10): 3233-3238.
- Mergaert, J., Wouters, A., Anderson, C. y Swings, J.** (1995). "In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(Supl 1): 154-159.
- Merrick, J. M. y Doudoroff, M.** (1964). "Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by intracellular enzyme system." *Journal of Bacteriology* **88**: 60-71.

- Miguélez, E. M., Hardisson, C. y Manzanal, M. B.** (1999). "Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote." *The Journal of Cell Biology* **145**(3): 515-525.
- Miyazaki, K., Takahashi, K., Shiraki, M., Saito, T., Tezuka, Y. y Kasuya, K.** (2000). "Properties of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*." *Journal of Polymers and the Environment* **8**(4): 175-182.
- Monties, B. y Fukushima, K.** (2002). Occurrence, function and biosynthesis of lignins. En: *Biopolymers*. 1. Ed: M. Hofrichter y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Montoro-Garcia, S., Gil-Ortiz, F., Navarro-Fernandez, J., Rubio, V., Garcia-Carmona, F. y Sanchez-Ferrer, A.** (2010). "Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl beta-lactam antibiotics intermediates." *Bioresource Technology* **101**(1): 331-336.
- Moraes, L. P., Brito, P. N. y Alegre, R. M.** (2013). "The existing studies on biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) by fermentation." *Food and Public Health* **3**(1): 28-36.
- Mukai, K., Doi, Y., Sema, Y. y Tomita, K.** (1993a). "Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases." *Biotechnology Letters* **15**(6): 601-604.
- Mukai, K., Yamada, K. y Doi, Y.** (1993b). "Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases." *International Journal of Biological Macromolecules* **15**(6): 361-366.
- Nakajima, Y., Ito, K., Toshima, T., Egawa, T., Zheng, H., Oyama, H., Wu, Y. F., Takahashi, E., Kyono, K. y Yoshimoto, T.** (2008). "Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* exhibits activity against a substrate containing a 4-hydroxyproline residue." *Journal of Bacteriology* **190**(23): 7819-7829.
- Nakayama, K., Saito, T., Fukui, T., Shirakura, Y. y Tomita, K.** (1985). "Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*." *Biochimica et Biophysica Acta* **827**(1): 63-72.
- Nobes, G. A. R., Kazlauskas, R. J. y Marchessault, R. H.** (1996). "Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones: A novel route to poly(hydroxyalkanoate)s." *Macromolecules* **29**(14): 4829-4833.
- Noda, I., Lindsey, S. B. y Caraway, D.** (2010). Nodax™ class PHA copolymers: Their properties and applications. En: *Plastics from Bacteria*. 14. Ed: G. G. Q. Chen. Springer Berlin Heidelberg. pp. 237-255.
- Nojiri, M. y Saito, T.** (1997). "Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1." *Journal of Bacteriology* **179**(22): 6965-6970.
- Notredame, C., Higgins, D. G. y Heringa, J.** (2000). "T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *Journal of Molecular Biology* **302**(1): 205-217.
- Oda, Y., Osaka, H., Urakami, T. y Tonomura, K.** (1997). "Purification and properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the fungus *Paecilomyces lilacinus* D218." *Current Microbiology* **34**(4): 230-232.
- Oeding, V. y Schlegel, H. G.** (1973). "Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism." *Biochemical Journal* **134**(1): 239-248.

- Ohura, T., Kasuya, K. I. y Doi, Y.** (1999). "Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(1): 189-197.
- Ooe, Y., Yamamoto, S., Kobayashi, M. y Kise, H.** (1999). "Increase of catalytic activity of alpha-chymotrypsin in organic solvent by co-lyophilization with cyclodextrins." *Biotechnology Letters* **21**(5): 385-389.
- Papageorgiou, A. C., Hermawan, S., Singh, C. B. y Jendrossek, D.** (2008). "Structural basis of poly(3-hydroxybutyrate) hydrolysis by PhaZ7 depolymerase from *Paucimonas lemoignei*." *Journal of Molecular Biology* **382**(5): 1184-1194.
- Papaneophytou, C. P., Pantazaki, A. A. y Kyriakidis, D. A.** (2009). "An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8." *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**(4): 659-668.
- Pederson, E. N., McChalicher, C. W. y Srienc, F.** (2006). "Bacterial synthesis of PHA block copolymers." *Biomacromolecules* **7**(6): 1904-1911.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H.** (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nature Methods* **8**(10): 785-786.
- Pfeiffer, D. y Jendrossek, D.** (2013). "Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in Gram-negative bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **79**(9): 2989-2999.
- Pfeiffer, D. y Jendrossek, D.** (2014). "PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*." *Applied and Environmental Microbiology* **80**(2): 555-563.
- Pfeiffer, D., Wahl, A. y Jendrossek, D.** (2011). "Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16." *Molecular Microbiology* **82**(4): 936-951.
- Philip, S., Keshavarz, T. y Roy, I.** (2007). "Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **82**(3): 233-247.
- Preusting, H., Nijenhuis, A. y Witholt, B.** (1990). "Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons." *Macromolecules* **23**(19): 4220-4224.
- Pridham, T. G. y Gottlieb, D.** (1948). "The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination." *Journal of Bacteriology* **56**(1): 107-114.
- Quirós, L. M., Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Méndez, C. y Salas, J. A.** (1998). "Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*." *Molecular Microbiology* **28**(6): 1177-1185.
- Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., Kim, D., Kellogg, E., DiMaio, F., Lange, O., Kinch, L., Sheffler, W., Kim, B. H., Das, R., Grishin, N. V. y Baker, D.** (2009). "Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta." *Proteins* **77** (Supl 9): 89-99.
- Ramsay, B. A., Langlade, V., Carreau, P. J. y Ramsay, J. A.** (1993). "Biodegradability and mechanical properties of poly-(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate)-starch blends." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(4): 1242-1246.

- Ramsay, B. A., Saracovan, I., Ramsay, J. A. y Marchessault, R. H.** (1994). "A method for the isolation of microorganisms producing extracellular long-side-chain poly (β -hydroxyalkanoate) depolymerase." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **2**(1): 1-7.
- Remminghorst, U. y Rehm, B. H. A.** (2008). Microbial production of alginate: biosynthesis and applications. En: *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. Applications and Perspectives*. Ed: B. H. A. Rehm. Caister Academic Press. pp. 13-42.
- Ren, Q., Ruth, K., Thony-Meyer, L. y Zinn, M.** (2010). "Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(1): 41-52.
- Romen, F., Reinhardt, S. y Jendrossek, D.** (2004). "Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of *Schlegelella* sp KB1a." *Archives of Microbiology* **182**(2-3): 157-164.
- Rost, B., Yachdav, G. y Liu, J.** (2004). "The PredictProtein server." *Nucleic Acids Research* **32**(Web Server issue): 321-326.
- Roy, A., Kucukural, A. y Zhang, Y.** (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." *Nature Protocols* **5**(4): 725-738.
- Ruth, K., Grubelnik, A., Hartmann, R., Egli, T., Zinn, M. y Ren, Q.** (2007). "Efficient production of (*R*)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification." *Biomacromolecules* **8**(1): 279-286.
- Sabirova, J. S., Ferrer, M., Lunsdorf, H., Wray, V., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A., Timmis, K. N. y Golyshin, P. N.** (2006). "Mutation in a "tesB-like" hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2." *Journal of Bacteriology* **188**(24): 8452-8459.
- Sadocco, P., Nocerino, S., DubiniPaglia, E., Seves, A. y Elegir, G.** (1997). "Characterization of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Aureobacterium anophageum*: Active site and kinetics of hydrolysis studies." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **5**(1): 57-65.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C. y Saito, T.** (2001). "Cloning of an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product." *Journal of Bacteriology* **183**(1): 94-100.
- Saito, T., Suzuki, K., Yamamoto, J., Fukui, T., Miwa, K., Tomita, K., Nakanishi, S., Odani, S., Suzuki, J. y Ishikawa, K.** (1989). "Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*." *Journal of Bacteriology* **171**(1): 184-189.
- Saito, T., Takizawa, K. y Saegusa, H.** (1995). "Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*." *Canadian Journal of Microbiology* **41**(13): 187-191.
- Sambrook, J. y Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Puelles, J. M., Sanz, J. M., García, J. L. y García, E.** (1992). "Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose." *European Journal of Biochemistry* **203**(1-2): 153-159.
- Sangeetha, K. y Abraham, T. E.** (2008). "Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications." *International Journal of Biological Macromolecules* **43**(3): 314-319.

- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12): 5463-5467.
- Santos, M., Gangoiti, J., Keul, H., Moller, M., Serra, J. L. y Llama, M. J.** (2013). "Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* SO1." *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**(1): 211-222.
- Santos, M., Gangoiti, J., Llama, M. J., Serra, J. L., Keul, H. y Möller, M.** (2012). "Poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13: Catalysis of ester-forming reactions in non-aqueous media." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **77**(0): 81-86.
- Savenkova, L., Gerberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. y Kalnin, M.** (2000). "Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films." *Process Biochemistry* **35**(6): 573-579.
- Scherer, T. M., Fuller, R. C., Goodwin, S. y Lenz, R. W.** (2000). "Enzymatic hydrolysis of oligomeric models of poly-3-hydroxybutyrate." *Biomacromolecules* **1**(4): 577-583.
- Schirmer, A. y Jendrossek, D.** (1994). "Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) P(3HO) depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product." *Journal of Bacteriology* **176**(22): 7065-7073.
- Senesi, N. y Loffredo, E.** (2002). Soil humic substances. En: *Biopolymers*. **1**. Ed: M. Hofrichter y A. Steinbüchel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Shah, A. A., Eguchi, T., Mayumi, D., Kato, S., Shintani, N., Kamini, N. R. y Nakajima-Kambe, T.** (2013). "Purification and properties of novel aliphatic-aromatic co-polyesters degrading enzymes from newly isolated *Roseateles depolymerans* strain TB-87." *Polymer Degradation and Stability* **98**(2): 609-618.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. y Ahmed, S.** (2008). "A novel poly(3-hydroxybutyrate)-degrading *Streptovorticillium kashmirensis* AF1 isolated from soil and purification of PHB-depolymerase." *Acta Biologica Hungarica* **59**(4): 489-499.
- Shah, S., Sharma, A. y Gupta, M. N.** (2006). "Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder." *Analytical Biochemistry* **351**(2): 207-213.
- Sharp, P. M. y Li, W. H.** (1987). "The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications." *Nucleic Acids Research* **15**(3): 1281-1295.
- Sheldon, R. A.** (2007). "Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts." *Biochemical Society Transactions* **35**(Parte 6): 1583-1587.
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R. y Van Langen, L. M.** (2005). "Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review)." *Biocatalysis and Biotransformation* **23**(3-4): 141-147.
- Shih, I. L., Shen, M. H. y Van, Y. T.** (2006). "Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications." *Bioresource Technology* **97**(9): 1148-1159.
- Shinomiya, M., Iwata, T., Kasuya, K. y Doi, Y.** (1997). "Cloning of the gene for poly(3-hydroxybutyric acid) depolymerase of *Comamonas testosteroni* and functional analysis of its substrate-binding domain." *FEMS Microbiology Letters* **154**(1): 89-94.
- Shiraki, M., Shimada, T., Tatsumichi, M. y Saito, T.** (1995). "Purification and characterization of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **3**(1): 13-21.

- Shirakura, Y., Fukui, T., Saito, T., Okamoto, Y., Narikawa, T., Koide, K., Tomita, K., Takemasa, T. y Masamune, S.** (1986). "Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1." *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **880**(1): 46-53.
- Shirakura, Y., Fukui, T., Tanio, T., Nakayama, K., Matsuno, R. y Tomita, K.** (1983). "An extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Alcaligenes faecalis*." *Biochimica et Biophysica Acta* **748**(2): 331-339.
- Shivakumar, S., Jagadish, S. J., Zatakia, H. y Dutta, J.** (2011). "Purification, characterization and kinetic studies of a novel poly(β) hydroxybutyrate (PHB) depolymerase PhaZ(Pen) from *Penicillium citrinum* S2." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**(8): 1225-1236.
- Shuai, X., Porbeni, F. E., Wei, M., Bullions, T. y Tonelli, A. E.** (2002). "Formation of inclusion complexes of poly(3-hydroxybutyrate)s with cyclodextrins. 1. Immobilization of atactic poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) and miscibility enhancement between poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone)." *Macromolecules* **35**(8): 3126-3132.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J. y Baker, D.** (2013). "High-resolution comparative modeling with RosettaCM." *Structure* **21**(10): 1735-1742.
- Speicher, D. W.** (1994). "Methods and strategies for the sequence analysis of proteins on PVDF membranes." *Methods* **6**(3): 262-273.
- Steinbüchel, A.** (2005). "Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts." *Current Opinion in Biotechnology* **16**(6): 607-613.
- Steinbüchel, A. y Fächtenbusch, B.** (1998). "Bacterial and other biological systems for polyester production." *Trends in Biotechnology* **16**(10): 419-427.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A. y Valentin, H.** (1992). "Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* **9**(2-4): 217-230.
- Steinbüchel, A. y Schmack, G.** (1995). "Large-scale production of poly(3-hydroxyvaleric acid) by fermentation of *Chromobacterium violaceum*, processing, and characterization of the homopolyester." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **3**(4): 243-258.
- Steinbüchel, A. y Valentin, H. E.** (1995). "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids." *FEMS Microbiology Letters* **128**(3): 219-228.
- Steinbüchel, A., Valentin, H. E. y Schönebaum, A.** (1994). "Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester." *Journal of Environmental Polymer Degradation* **2**(2): 67-74.
- Sudesh, K., Abe, H. y Doi, Y.** (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters." *Progress in Polymer Science* **25**(10): 1503-1555.
- Sugimoto, A., Shiraki, M., Hatakeyama, S. y Saito, T.** (2008). "Secretion pathway for the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Ralstonia pickettii* T1." *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**(2): 223-232.
- Sugiyama, A., Kobayashi, T., Shiraki, M. y Saito, T.** (2004). "Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial PHB metabolism." *Current Microbiology* **48**(6): 424-427.

- Suzuki, Y., Ohura, T., Kasuya, K. I., Toshima, K., Doi, Y. y Matsumura, S.** (2000). "Enzyme-catalyzed Ring-opening Polymerization of β -Butyrolactone Using PHB Depolymerase." *Chemistry Letters*(4): 318-319.
- Suzuki, Y., Taguchi, S., Hisano, T., Toshima, K., Matsumura, S. y Doi, Y.** (2003). "Correlation between structure of the lactones and substrate specificity in enzyme-catalyzed polymerization for the synthesis of polyesters." *Biomacromolecules* **4**(3): 537-543.
- Suzuki, Y., Taguchi, S., Saito, T., Toshima, K., Matsumura, S. y Doi, Y.** (2001). "Involvement of catalytic amino acid residues in enzyme-catalyzed polymerization for the synthesis of polyesters." *Biomacromolecules* **2**(2): 541-544.
- Sznajder, A. y Jendrossek, D.** (2011). "Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules." *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**(5): 1487-1495.
- Takaku, H., Kimoto, A., Kodaira, S., Nashimoto, M. y Takagi, M.** (2006). "Isolation of a Gram-positive poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacterium from compost, and cloning and characterization of a gene encoding PHB depolymerase of *Bacillus megaterium* N-18-25-9." *FEMS Microbiology Letters* **264**(2): 152-159.
- Takeda, M., Kitashima, K., Adachi, K., Hanaoka, Y., Suzuki, I. y Koizumi, J.** (2000). "Cloning and expression of the gene encoding thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**(4): 416-421.
- Takeda, M., Koizumi, J., Yabe, K. y Adachi, K.** (1998). "Thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of a thermophilic strain of *Leptothrix* sp. isolated from a hot spring." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85**(4): 375-380.
- Tanaka, Y., Saito, T., Fukui, T., Tanio, T. y Tomita, K.** (1981). "Purification and properties of D(-)-3-hydroxybutyrate-dimer hydrolase from *Zoogloea ramigera* I-16-M." *European Journal of Biochemistry* **118**(1): 177-182.
- Timmins, M. R., Lenz, R. W. y Fuller, R. C.** (1997). "Heterogeneous kinetics of the enzymatic degradation of poly(β -hydroxyalkanoates)." *Polymer* **38**(3): 551-562.
- Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C. y Aiba, S.** (2009). "Biodegradability of Plastics." *International Journal of Molecular Sciences* **10**(9): 3722-3742.
- Tokiwa, Y. y Ugwu, C. U.** (2007). "Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer." *Journal of Biotechnology* **132**(3): 264-272.
- Vroman, I. y Tighzert, L.** (2009). "Biodegradable polymers." *Materials* **2**(2): 307-344.
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S. y Jendrossek, D.** (2012). "PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*." *BMC Microbiology* **12**: 262-273.
- Wang, Y., Inagawa, Y., Osanai, Y., Kasuya, K., Saito, T., Matsumura, S., Doi, Y. y Inoue, Y.** (2002). "Enzymatic hydrolysis of chemosynthesized atactic poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Acidovorax* sp. TP4 and *Ralstonia pickettii* T1." *Biomacromolecules* **3**(5): 894-898.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. y Barton, G. J.** (2009). "Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
- Weibull, C.** (1953). "Characterization of the protoplasmic constituents of *Bacillus megaterium*." *Journal of Bacteriology* **66**(6): 696-702.

- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A. y Mayer, F.** (1995). "Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*." *Journal of Bacteriology* **177**(9): 2425-2435.
- Wilkinson, G. N.** (1961). "Statistical estimations in enzyme kinetics." *Biochemical Journal* **80**: 324-332.
- Wilson, L., Illanes, A., Soler, L. y Henríquez, M. J.** (2009). "Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase." *Process Biochemistry* **44**(3): 322-326.
- Willauer, H. D., Huddleston, J. G. y Rogers, R. D.** (2002). "Solute partitioning in aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol and salt: The partitioning of small neutral organic species." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **41**(7): 1892-1904.
- Williamson, D. H. y Wilkinson, J. F.** (1958). "The isolation and estimation of the poly-beta-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species." *Journal of General Microbiology* **19**(1): 198-209.
- Wright, F. y Bibb, M. J.** (1992). "Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome." *Gene* **113**(1): 55-65.
- Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L. y Reeves, C. D.** (2000). "The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyeticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units." *Gene* **251**(1): 81-90.
- Xu, D. y Zhang, Y.** (2012). "*Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field." *Proteins* **80**(7): 1715-1735.
- Yamashita, K., Aoyagi, Y., Abe, H. y Doi, Y.** (2001). "Analysis of adsorption function of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 by using a quartz crystal microbalance." *Biomacromolecules* **2**(1): 25-28.
- Yoshie, N., Oike, Y., Kasuya, K., Doi, Y. y Inoue, Y.** (2002). "Change of surface structure of poly(3-hydroxybutyrate) film upon enzymatic hydrolysis by PHB depolymerase." *Biomacromolecules* **3**(6): 1320-1326.
- Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V. y Luzhetskyy, A.** (2014). "Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome." *BMC Genomics* **15**(1): 97.
- Zhang, K., Shiraki, M. y Saito, T.** (1997). "Purification of an extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain A1 and cloning and sequencing of its gene." *Journal of Bacteriology* **179**(1): 72-77.
- Zhang, X. J., Luo, R. C., Wang, Z., Deng, Y. y Chen, G. Q.** (2009). "Application of (*R*)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels." *Biomacromolecules* **10**(4): 707-711.
- Zhang, Y.** (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." *BMC Bioinformatics* **9**:40.
- Zhou, H. L., Wang, Z. Y., Chen, S., Liu, D. B. y Xia, H. M.** (2009). "Purification and characterization of extracellular poly(-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium* sp DS9701-D2." *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **48**(1): 58-63.

