

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



## TESIS DOCTORAL

Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*:  
implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos  
funcionalizados

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Fernández Escapa

Directora

María Auxiliadora Prieto Jiménez

Madrid, 2012





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en  
*Pseudomonas putida*: Implicaciones fisiológicas y  
aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos  
funcionalizados

TESIS DOCTORAL

**ISABEL FERNÁNDEZ ESCAPA**

Madrid, 2012



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en  
*Pseudomonas putida*: Implicaciones fisiológicas y  
aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos  
funcionalizados

TESIS DOCTORAL

**ISABEL FERNÁNDEZ ESCAPA**

DIRECTORA:

**MARÍA AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ**



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2012



*En la naturaleza existe la regularidad;  
no todo ocurre por accidente.*

**Mark Pagel**

*...pensaba que la vida se compone de  
demasiados quizás. Y de muy pocas cosas  
que se puedan saber con absoluta  
seguridad...*

“El perro que corría hacia una estrella” (Pag 171)

**Henning Mankell**



*A MIS PADRES*  
*A JAVIER*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a la Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Prieto por su trabajo en la dirección de esta Tesis Doctoral, gracias por acompañarme en los primeros pasos de mi camino en la Ciencia, por su apoyo y dedicación. Gracias al Prof. José Luis García por enseñarme que cada vez que se encuentra una respuesta aparecen mil preguntas nuevas.

Gracias a los doctores Eduardo Díaz, Pedro García, Ernesto García y Rubén López, por su apoyo científico y extracientífico. Gracias a todos aquellos que han pasado por sus laboratorios, porque todos hemos formado una gran familia.

Gracias a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio. Quiero señalar especialmente a la Dra. Laura de Eugenio por el trabajo conjunto realizado al inicio de esta Tesis Doctoral (ver Anexos) y la Dra. Beatriz Galán por iniciarme en el trabajo experimental. Quiero destacar el trabajo realizado por la Dra. Valle Morales en la caracterización de los polímeros PHACOS, así como la participación de Carlos del Cerro en la construcción de las cepas mutantes empleadas para la producción de PHA a partir de Glicerol. Gracias por su apoyo técnico a Mercedes Zazo, María Morales, Ana Valencia y Fernando de la Peña.

Gracias a los colegas y servicios del CIB. Gracias al personal de los servicios de Proteómica y Genómica, Citometría de Flujo (en especial a Dr. Pedro Lastres) y Secugen. Gracias a la Dra. Alicia Prieto por su colaboración en el empleo de las distintas técnicas cromatográficas y al Dr. Juan Román Luque por su ayuda en la medición del consumo de O<sub>2</sub>.

Gracias al servicio de Genómica y Proteómica del CNB por la hibridación y procesado de los *microarrays*.

Gracias al Prof. Fernando Rojo por la cesión del mutante KTCRC empleado en este trabajo.

Gracias al Prof. Andreas Schmid, por permitirme trabajar en su laboratorio de la Universidad Técnica de Dortmund (Alemania). Gracias al Dr. Bruno Bühler y al Prof. Lars Blank por ayudarme a adaptar su modelo de flujos metabólicos y a emplear el software FiatFlux para su análisis.

Gracias al grupo del Prof. Luc Avérous de la Universidad de Estrasburgo (Francia), a la Dra. Verónica Martino y al Dr. Eric Pollet, por colaborar en la caracterización físico-química de los polímeros PHACOS.

Gracias a Marta Tortajada y al resto del personal de Biópolis S.L., por su inestimable ayuda en múltiples aspectos de esta Tesis Doctoral, y en especial por la producción a escala industrial del PHA empleado como estándar cromatográfico.

Gracias al Prof. Miguel Arroyo de la UCM por la tutela académica de esta Tesis Doctoral y a la Prof.<sup>a</sup> Isabel de la Mata por su apoyo.

Gracias a los organismos y autoridades que han permitido la financiación de este trabajo: la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el ministerio Alemán de Ciencia y Educación y la Unión Europea. Gracias en especial al CSIC por la concesión de la beca I3P para la realización de esta Tesis Doctoral.

Gracias a mi familia y amigos, por su apoyo en todo momento, por soportarme en los momentos difíciles y acompañarme en los buenos. Gracias a mis profesores de la Universidad de León por animarme a iniciar esta aventura.

Gracias a mis padres por ayudarme en cada paso, porque os siento siempre muy cerca, porque me habéis enseñado a esforzarme y porque este es también vuestro trabajo.

Gracias a Javier, por estar siempre ahí, por tu infinita paciencia, por querer hacer Ciencia conmigo y por querer vivir la vida conmigo. Sabes que sin ti nada de esto sería posible.

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| ABREVIATURAS   | iii |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1   |
| <b>1. <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 como bacteria modelo en Biotecnología Medioambiental</b>  | 3   |
| <b>2. Características generales de los polihidroxicanoatos</b>   | 5   |
| 2.1. Propiedades físico-químicas de los PHA  | 7   |
| <b>3. Metabolismo de los PHA en <i>P. putida</i> KT2440</b>  | 9   |
| 3.1. Síntesis y degradación de los PHA: el ciclo del PHA   | 9   |
| 3.2. Rutas metabólicas implicadas en la producción de PHA en <i>P. putida</i>  | 11  |
| 3.2.1. Síntesis de mcl-PHA a partir de ácidos grasos   | 13  |
| 3.2.1.1. $\beta$ -oxidación de ácidos grasos   | 15  |
| 3.2.1.2. Transformación de intermediarios de la $\beta$ -oxidación en (R)-HA-CoA   | 16  |
| 3.2.1.3. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ciclo del glioxilato  | 17  |
| 3.2.2. Síntesis de mcl-PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los ácidos grasos   | 18  |
| 3.2.2.1. Catabolismo de monosacáridos  | 19  |
| 3.2.2.2. Catabolismo del glicerol  | 22  |
| 3.2.2.3. Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos  | 24  |
| 3.2.2.4. Transformación de intermediarios de la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en (R)-HA-CoA   | 27  |
| <b>4. Regulación del metabolismo de PHAs</b>   | 27  |
| 4.1. Regulación en cepas productoras de PHB  | 28  |
| 4.2. Regulación en <i>Pseudomonas</i>  | 29  |
| 4.2.1. Organización génica y control transcripcional específico del cluster <i>pha</i>   | 29  |
| 4.2.2. Papel regulador de las <i>fasinas</i>   | 31  |
| 4.2.3. Control enzimático de la síntesis y degradación de los PHA  | 31  |
| 4.2.4. Reguladores globales del metabolismo y producción de PHA  | 32  |
| <b>5. Importancia fisiológica de los PHA</b>   | 33  |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....   | 37  |
| <b>III. RESULTADOS</b> .....   | 41  |
| <b>1. El metabolismo de los PHA controla el derroche de carbono y energía en <i>P. putida</i></b>  | 43  |
| <b>2. Disrupción de la ruta de <math>\beta</math>-oxidación en <i>P. putida</i> KT2442 para la producción de PHA funcionalizados con grupos tioéster</b>                                 | 63  |
| <b>3. Manipulación de los circuitos reguladores para la optimización del crecimiento y producción de PHA en <i>P. putida</i> KT2440 a partir de glicerol: el papel del represor GIpR</b> | 81  |

|  |            |
|--|------------|
| <b>IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>  | <b>125</b> |
| <b>1. Importancia fisiológica de los PHA: El ciclo del PHA juega un papel crucial en el metabolismo de <i>P. putida</i> KT2440</b>   | <b>127</b> |
| 1.1. El ciclo metabólico del PHA es capaz de controlar el flujo celular de carbono y energía   | 127        |
| 1.2. El metabolismo de los PHA está condicionado por la disponibilidad de metabolitos provenientes de las rutas centrales del metabolismo del carbono                                  | 129        |
| 1.3. Influencia de los reguladores globales del metabolismo del carbono sobre la producción de PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los PHA         | 136        |
| <b>2. Aplicaciones biotecnológicas: Desarrollo de nuevas cepas de <i>P. putida</i> KT2440 modificadas genéticamente para la producción eficiente de PHA funcionalizados</b>            | <b>139</b> |
| 2.1. Empleo de sustratos de bajo coste para la producción de PHA en cepas de <i>P. putida</i>  | 140        |
| 2.2. Producción eficiente de PHA funcionalizados en cepas de <i>P. putida</i>  | 142        |
| <b>V. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>149</b> |
| <b>ANEXOS</b>  | <b>175</b> |
| <b>1. Diploma de Estudios Avanzados: Estudio de las bases moleculares de la regulación del metabolismo de polihidroxicanoatos en <i>Pseudomonas putida</i> KT2442</b>                  | <b>177</b> |
| <b>2. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance</b>        | <b>221</b> |
| <b>3. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the <i>pha</i> genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in <i>Pseudomonas putida</i> KT2442</b> | <b>239</b> |

## ABREVIATURAS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| (R)-HA                  | ácido (R)-3-hidroxicarboxílico  |
| (R)-HA-CoA              | (R)-3-hidroxiacil-CoA   |
| 6PG                     | 6-fosfo-gluconato   |
| ACP                     | proteína transportadora de grupos acilo ( <i>acyl carrier protein</i> )     |
| ACS1                    | acil-CoA sintetasa 1  |
| ADN                     | ácido desoxirribonucleico   |
| ARN                     | ácido ribonucleico  |
| ARNm                    | ácido ribonucleico mensajero  |
| ATP                     | adenosín nucleósido trifosfato  |
| ATP                     | adenosina 5'-trifosfato   |
| CAT                     | ciclo de los ácidos tricarboxílicos   |
| CoA                     | coenzima A  |
| DHAP                    | dihidroxiacetona fosfato  |
| ED                      | Entner-Doudoroff  |
| G3P                     | glicerol-3-fosfato  |
| GAP                     | proteína asociada al gránulo ( <i>granule associated protein</i> )          |
| GLP                     | <i>glycerol liquid phase</i>  |
| KDPG                    | 2-ceto-3-desoxi-6-fosfo-gluconato   |
| LCFA                    | ácidos grasos de cadena larga ( <i>long-chain fatty acids</i> )             |
| mcl-PHA                 | polihidroxialcanoato de cadena media ( <i>medium-chain length PHA</i> )     |
| NAD                     | nicotinamida-adenina-dinucleótido   |
| NADH(+H <sup>+</sup> )  | nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido                                  |
| NADP                    | fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido                                |
| NADPH(+H <sup>+</sup> ) | fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido                       |
| ORF                     | <i>open reading frame</i>   |
| PEP-PTS                 | <i>phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase transport system</i> |
| PHA                     | polihidroxialcanoato  |
| PHB                     | polihidroxibutirato   |
| scl-PHA                 | polihidroxialcanoato de cadena corta ( <i>short-chain length PHA</i> )      |



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. *Pseudomonas putida* KT2440 como bacteria modelo en Biotecnología Medioambiental

---

Las bacterias del género *Pseudomonas*, bacilos Gram negativos pertenecientes a la clase de las gamma proteobacterias, conforman un importante grupo de microorganismos ubicuos caracterizados por su amplia versatilidad metabólica (28). Las bacterias pertenecientes a este grupo se distinguen por su gran adaptabilidad a diversos medios, de hecho han sido aisladas en suelos, aguas, alimentos, así como asociados a distintas especies de animales y plantas. Así mismo, son de gran importancia desde el punto de vista ecológico al participar en los ciclos ambientales de los principales elementos y en la degradación de contaminantes biogénicos y de origen antropogénico (255). Los Pseudomonados han sido ampliamente estudiados debido a su gran potencial biotecnológico en áreas como la biodegradación/biotransformación (21, 111), bioaumentación (53), biocatálisis (223), biocontrol (266) y producción de bioplásticos (149, 189).

Entre las bacterias del género *Pseudomonas* de importancia biotecnológica y medioambiental destaca *Pseudomonas putida*, un microorganismo no patógeno capaz de vivir en suelos, rizosfera y aguas dulces, que es un paradigma de versatilidad metabólica (236, 273). La cepa *P. putida* KT2440 (4, 200) es la cepa mejor caracterizada de esta especie así como la primera del género *Pseudomonas* en ser secuenciada (161). Se trata de la una bacteria Gram negativa aislada del suelo y certificada por el “*National Institutes of Health*” (NIH) de los Estados Unidos como segura para la clonación y expresión de genes heterólogos (66). Gracias a esta acreditación *P. putida* KT2440, se ha convertido en un organismo modelo para estudios de biodegradación, adaptación a diversos ambientes y para el desarrollo de herramientas biotecnológicas (59, 265). La cepa *P. putida* KT2442 es un mutante espontáneo de la estirpe KT2440 resistente a rifampicina (4, 74). La cepa KT2442 ha sido ampliamente utilizada, ya que la resistencia a rifampicina facilita la aplicación de las distintas técnicas de Biología Molecular y manipulación genética.

*P. putida* KT2440 posee un genoma de 6,18 Mb en el cual, a pesar de presentar un 85% de similitud con el de la especie patógena *P. aeruginosa*, no están

presentes factores de virulencia como la exotoxina A, ciertas enzimas hidrolíticas y los sistemas de secreción tipo III (161). Por el contrario su genoma codifica información para un elevado número de enzimas relacionadas con la protección frente a sustancias tóxicas (dioxigenasas, monooxigenasas, oxidorreductasas, ferredoxinas, citocromos, deshidrogenasas, bombas de protones y glutatión transferasas), así como rutas para la degradación de compuestos aromáticos (111). Su gran versatilidad metabólica está en consonancia con la identificación de al menos 350 sistemas de transporte en la membrana citoplasmática (un 12% de su secuencia genómica), muchos de ellos directamente implicados en el transporte de compuestos aromáticos. Sin embargo sólo se ha identificado un sistema de transporte de azúcares tipo PEP-PTS (*phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase transport system*), específico para la fructosa (261). Según ha revelado el análisis genómico de esta bacteria la gran variedad de habilidades metabólicas codificadas en el cromosoma de *P. putida* KT2440 implican la participación de elementos móviles en su adquisición. Además algunas estirpes de *P. putida* poseen plásmidos que permiten ampliar aún más el rango de compuestos degradados por este versátil microorganismo; como el plásmido TOL pWW0 que porta los genes de la ruta de degradación del tolueno en la cepa *P. putida* mt-2, o el plásmido OCT implicado en la degradación de alcanos en la cepa *P. putida* GPo1 (212, 255). Hay que destacar que *P. putida* KT2440 exhibe un complejo repertorio de sistemas quimiosensores, de transducción de señales, de regulación génica y de respuesta a estrés que justifican su enorme versatilidad metabólica y capacidad de adaptación (59, 273).

El rango de actividades metabólicas potencialmente presentes en el estudio *in silico* de *P. putida* KT2440 (59) excede el espectro de reacciones metabólicas confirmadas experimentalmente en esta bacteria. Además, esta gran versatilidad genómica ha sido ampliada gracias a la expresión heteróloga de actividades y/o rutas metabólicas procedentes de otros microorganismos. Esta cepa ha sido de gran utilidad en el diseño experimental de nuevas rutas metabólicas para el catabolismo de contaminantes orgánicos, en particular de tipo aromático, con aplicaciones futuras en el campo de la biorremediación (64, 197, 211, 254). Asimismo, esta

combinación de características metabólicas y genéticas justifican el uso de *P. putida* KT2440 como herramienta biotecnológica para la producción de compuestos de alto valor añadido como el polihidroxialcanoato (PHA) (46-50, 65, 78, 149, 154, 157-158, 187-189) (Anexos) (Fig. 1), enzimas de interés comercial, epóxidos, derivados de catecoles y compuestos heterocíclicos (223). Recientemente se han reconstruido *in silico* las redes metabólicas de esta cepa bacteriana a escala genómica (163, 190). Estos modelos bioinformáticos son herramientas muy útiles en el estudio de la fisiología y adaptabilidad a los distintos ambientes de *P. putida* KT2440, así como en potenciales aplicaciones biotecnológicas de dicho microorganismo. Ambos modelos han sido empleados con éxito para mejorar la producción de polihidroxialcanoatos a partir de varias fuentes de carbono, modificando los flujos globales del metabolismo central hacia la acumulación de precursores de dichos compuestos de interés. Por lo tanto, el uso de aproximaciones globales gracias a las técnicas que ofrece la Biología de Sistemas (transcriptómica, proteómica, metabolómica, fluxómica, etc.), aportan una nueva perspectiva al estudio de la extraordinaria versatilidad de este microorganismo, no sólo a nivel de rutas metabólicas, sino también de sistemas de regulación y de interconexión con señales ambientales.

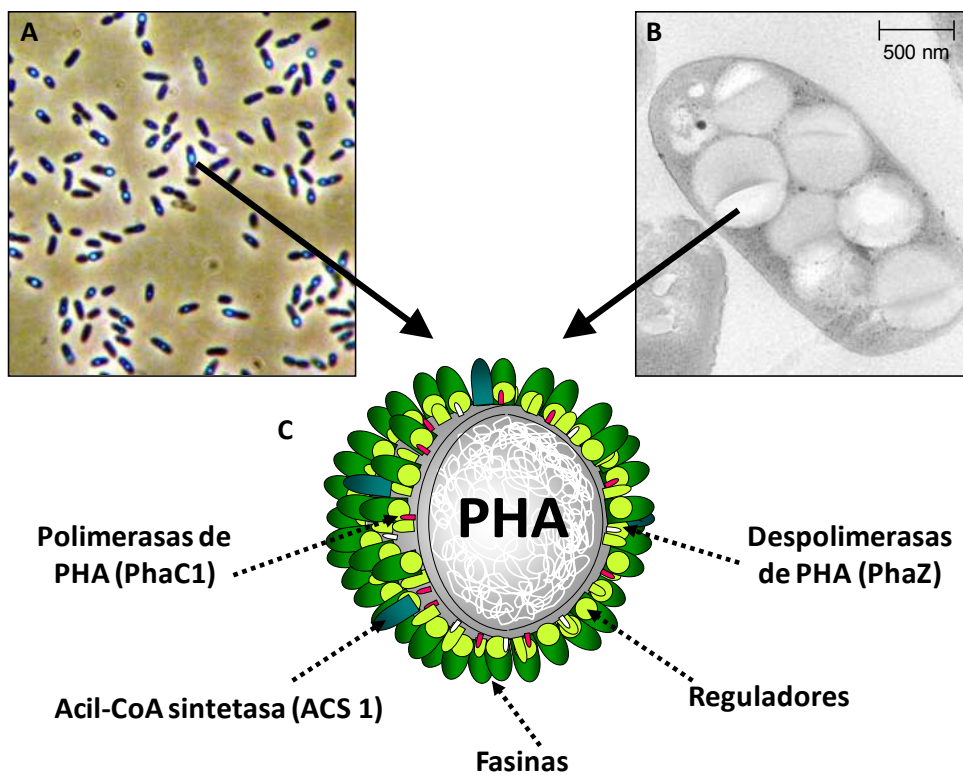
## **2. Características generales de los polihidroxialcanoatos**

---

Los PHA son biopoliésteres no tóxicos, biodegradables y biocompatibles producidos de forma natural por un amplio rango de microorganismos, incluyendo el grupo de las pseudomonas. Estos biopolímeros son poliésteres lineales de ácidos (*R*)-3-hidroxicarboxílicos ((*R*)-HA) sintetizados por las bacterias en condiciones de desequilibrio nutricional como reserva de carbono y energía que puede ser empleada por la célula cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (149, 151, 189).

Dependiendo del organismo, la producción de PHA puede alcanzar niveles de hasta el 90% del peso seco de la célula. En el interior de las células bacterianas los PHA se disponen formando gránulos de naturaleza hidrofóbica rodeados por una monocapa lipídica en la que se encuentran ancladas proteínas implicadas en el

metabolismo de los PHA y que se denominan GAP (*granule associated protein*) (189) (Fig. 1). Las GAP caracterizadas hasta ahora en las especies del género *Pseudomonas* son: polimerasas y despolimerasas de PHA, involucradas respectivamente en la síntesis y degradación del polímero; fasinas, las GAP más abundantes y con una función estructural y reguladora (78); y la acil-CoA sintetasa 1 (ACS1) encargada de activar los productos de la despolimerización convirtiéndolos de nuevo en moléculas de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA ((*R*)-HA-CoA) (49, 219) (Anexo 2). El número y tamaño de los gránulos, así como su disposición y estructura macromolecular dependen del organismo productor y de las condiciones de producción (78, 151).



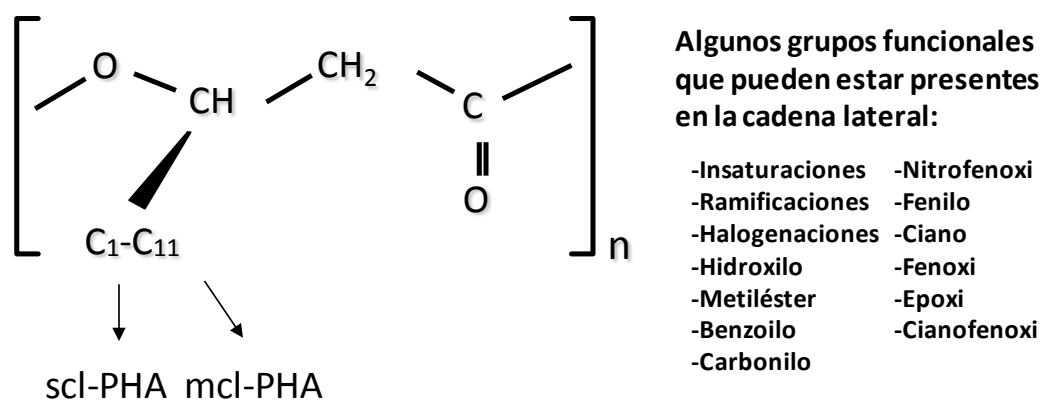
**Figura 1. Producción de PHA en *P. putida* KT2440 y esquema de la morfología del gránulo de PHA.** En la parte superior de la imagen se aprecia la morfología de células de *P. putida* KT2440 que están produciendo gránulos de PHA. Los gránulos se ven como estructuras intracelulares refringentes al microscopio de contraste de fases (Panel A), y como inclusiones citoplásmicas esféricas de tamaño variable al microscopio electrónico de transmisión (Panel B). En el centro de la figura (Panel C) se puede observar una representación esquemática de un gránulo de PHA. El PHA se dispone formando gránulos recubiertos por una monocapa fosfolipídica (en gris en el esquema) en la que se integran proteínas de unión al gránulo (*granule associated protein* o GAP). Las principales GAP son las fasinas, la polimerasa y la despolimerasa intracelular, proteínas reguladoras, y la acil-CoA sintetasa 1 (ACS1).

Los PHA han sido ampliamente estudiados debido a sus aplicaciones en la industria como bioplásticos y en biomedicina como biomateriales para implantes (33, 35, 151, 194, 258, 283). Al ser materiales biodegradables y que pueden ser sintetizados a partir de fuentes renovables suponen un menor impacto ambiental que los polímeros plásticos convencionales (82, 179, 234). Además, dada la naturaleza enantiopura de los monómeros de (*R*)-HA que constituyen estos polímeros, los PHA son una fuente potencial de intermediarios de naturaleza quiral precursores de productos de alto valor añadido (34, 49, 208) (Anexo 2). Por otro lado, en los últimos años se ha comenzado a estudiar la utilidad de los PHA, o derivados de estos, en la producción de biodiésel (79).

## **2.1. Propiedades físico-químicas de los PHA**

Las propiedades mecánicas y físico-químicas de los PHA tales como rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a solventes orgánicos dependen de la composición monomérica del polímero. Son poliésteres lineales en los que la variabilidad reside en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, así como en la proporción en que se encuentre cada tipo de monómero en el polímero final (Fig. 2). Los polímeros de PHA pueden estar formados por monómeros de igual naturaleza (homopolímeros), o estar constituidos por más de un tipo de unidades monoméricas diferentes (heteropolímeros o co-polímeros) (151). En función del número de carbonos que conformen la cadena lateral de los monómeros, los PHA se clasifican en dos tipos principales: los PHA de cadena corta (scl-PHA), obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono, y los de cadena media (mcl-PHA), constituidos por monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. En líneas generales, los scl-PHA son poliésteres rígidos y quebradizos, con un alto grado de cristalinidad y con propiedades mecánicas y térmicas similares a las del polipropileno, aunque este es algo menos quebradizo (245). Por el contrario, los mcl-PHA presentan temperaturas de fusión y de transición vítrea más bajas, una cristalinidad limitada y una gran flexibilidad (105, 245).

Además de la longitud, la naturaleza química de la cadena lateral también va a influir en las propiedades del poliéster resultante. Se ha descrito una gran variedad de PHA, que se corresponde con la presencia de cadenas laterales lineales, ramificadas, saturadas, insaturadas, de tipo aromático, etc. (103, 167, 169, 224-225) (Fig. 2). En una revisión de 1995 Steinbüchel y Valentin ya apuntaban la existencia de unos 100 monómeros que daban lugar a diferentes PHA; sin embargo, hasta la fecha, sólo unos pocos han sido explotados a escala industrial (35, 204). La presencia de grupos funcionales en la cadena lateral (p. ej., halogenados, carboxil, hidroxil, epoxi, fenoxi, cianofenoxi, nitrofenoxi, tiofenoxi, metiléster, etc.) es de gran interés, ya que estos grupos permiten modificaciones químicas de los polímeros resultantes (5, 58, 89, 122, 125-126, 140, 145, 169, 240). En este sentido, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es desarrollar estrategias de cultivo, y/o nuevas cepas derivadas de *P. putida*, que permitan la producción de nuevos PHA funcionalizados, dando lugar a una nueva generación de biomateriales con un alto valor añadido.



**Figura 2. Estructura química del PHA y variabilidad en función de los grupos presentes en la cadena lateral.** Según la longitud de la cadena lateral se puede distinguir entre PHA de cadena corta (*short-chain length* PHA (scl-PHA)), obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono, y PHA de cadena media (*medium-chain length* PHA (mcl-PHA)), constituidos por monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. La longitud y naturaleza de las cadenas laterales del PHA así como su variabilidad monomérica se correlacionan con el sustrato o mezcla de sustratos empleados en la fermentación.

### 3. Metabolismo de los PHA en *P. putida* KT2440

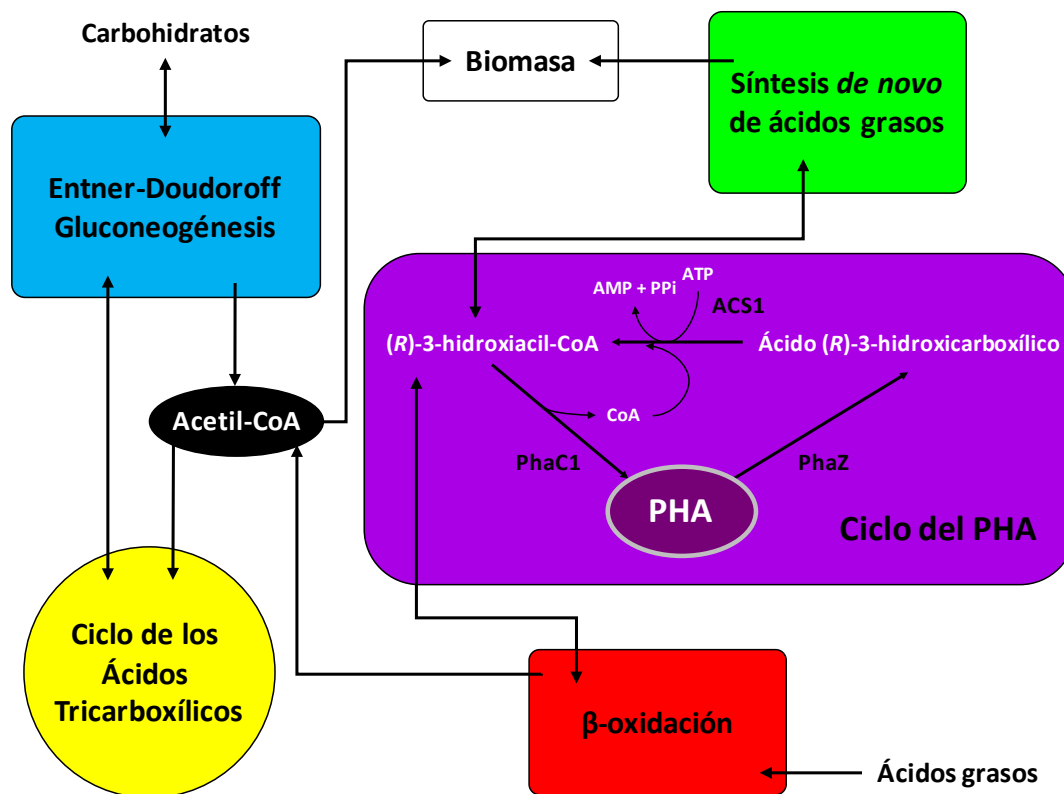
En las últimas décadas son numerosos los trabajos que han afrontado el estudio del metabolismo, la bioquímica y la fisiología de los PHA. Los avances en el campo de la Genética Molecular han permitido la clonación y caracterización de un amplio número de genes que codifican las enzimas involucradas en la formación y degradación de PHA en numerosos microorganismos (46, 110, 189, 202). De estos estudios puede deducirse que las rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de los PHA son enormemente complejas y que varían en función del origen filogenético y del nicho ecológico del microorganismo productor. Además, debe destacarse que la maquinaria metabólica involucrada en la producción del PHA no se circunscribe únicamente a las proteínas que catalizan la síntesis e hidrólisis del polímero y la formación del gránulo, sino que implica una importante conexión con otras rutas centrales y periféricas del metabolismo bacteriano. Por eso, uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es analizar la interconexión del metabolismo global del carbono de *P. putida* KT2440 con las rutas específicas que conducen a la síntesis del PHA (Fig. 3).

#### 3.1. Síntesis y degradación de los PHA: el ciclo del PHA

Las enzimas encargadas del ensamblaje de los monómeros de PHA para dar lugar al poliéster final son las polimerasas de PHA. Polimerizan los (*R*)-HA-CoA solubles para sintetizar el polímero insoluble, con la correspondiente liberación de una molécula de CoA (202, 244). En función de su estructura primaria, su especificidad de sustrato *in vivo*, y los tipos de subunidades que las forman, las polimerasas de PHA se han clasificado en cuatro clases (202). Las polimerasas de clase I (p. ej., *Ralstonia eutropha* H16\*), clase III (p. ej., *Chromatium vinosum*) y clase IV (p. ej., *Bacillus megaterium*) son activas principalmente sobre (*R*)-HA-CoA con 3 a 5 átomos de carbono como grupo acilo. Por el contrario las PHA polimerasas

\*Nota aclaratoria: La cepa *Ralstonia eutropha* H16 ha sido reclasificada como *Cupriavidus necator* H16 (181). Sin embargo a lo largo de esta Tesis Doctoral se ha adoptado la nomenclatura antigua, más extendida a la hora de designar esta bacteria en el campo de los PHA.

de clase II (PhaC1 y PhaC2) se encuentran principalmente en Pseudomonados y usan de manera preferente sustratos de 6 a 14 átomos de carbono (cadena media) (104-105, 252-253). Hay que destacar que en las especies del género *Pseudomonas* hay dos genes que codifican para polimerasas de PHA. En algunas cepas se ha demostrado que ambas son funcionales *in vivo*, si bien la especificidad de cada una de ellas podría ser distinta (1, 37, 81, 207).



**Figura 3. Esquema de las rutas del metabolismo central del carbono interconectadas con el ciclo del PHA en *P. putida* KT2440.** Los intermediarios para la síntesis de los PHA provienen de rutas conectadas con el metabolismo central del carbono: la β-oxidación y la síntesis *de novo* de ácidos grasos. El acetil-CoA es un intermediario clave en la síntesis de PHA, como punto de conexión entre las rutas catabólicas y anabólicas implicadas en este sistema. El ciclo del PHA es un proceso continuo de síntesis (PhaC1) y degradación (PhaZ) del polímero en el que la acil-CoA sintetasa (ACS1) se encarga de transformar los productos de la despolimerización en intermediarios CoA. Los (R)-3-hidroxiacil-CoA ((R)-HA-CoA) resultantes de la actividad de la ACS1 son sustratos potenciales para la propia polimerasa o para las enzimas del metabolismo de ácidos grasos (β-oxidación y síntesis *de novo*).

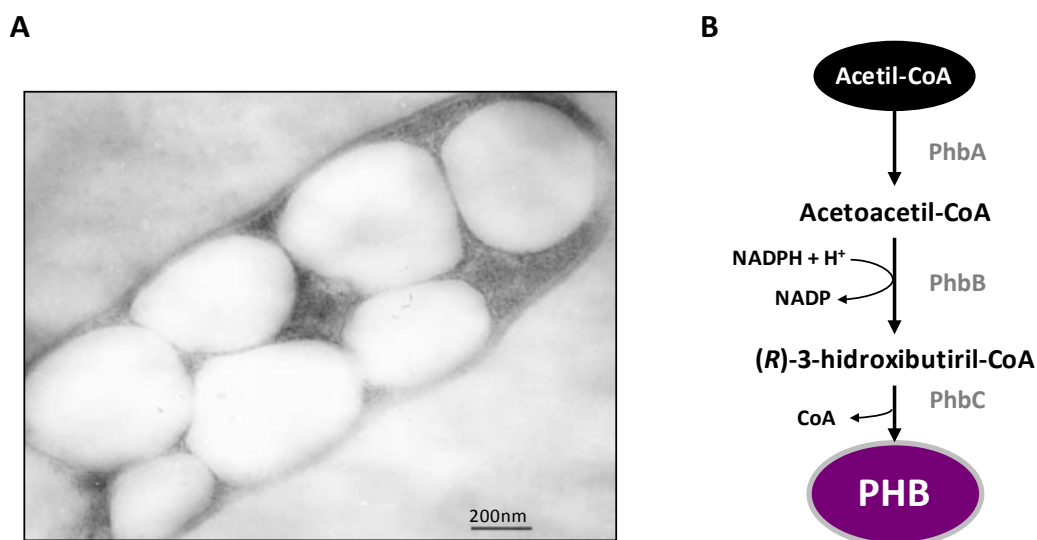
En cuanto a las enzimas encargadas de la despolimerización del PHA, existen dos tipos: las despolimerasas extracelulares y las intracelulares. Algunos microorganismos no productores de PHA poseen despolimerasas extracelulares que les permiten obtener carbono y energía por hidrólisis de PHA exógeno, el cual puede provenir de la lisis de microorganismos acumuladores de dicho polímero. Esta es la denominada degradación extracelular, en la que los gránulos son liberados al entorno e hidrolizados hasta oligómeros solubles en agua y monómeros por medio de enzimas secretables (47, 80, 110). Por otro lado, las bacterias productoras de PHA llevan a cabo la degradación intracelular del polímero acumulado gracias a la acción de despolimerasas intracelulares ancladas a la superficie del gránulo de PHA (46, 48, 73, 110, 243).

Los procesos de síntesis y degradación intracelular de los PHA se describen a menudo como procesos independientes, sin embargo, estudios recientes en *P. putida* KT2442 han demostrado que el metabolismo de los PHA es un ciclo continuo en el que la polimerasa y la despolimerasa se encuentran activas de forma simultánea (49, 209, 219) (Anexo 2). Como ya se ha apuntado anteriormente, en la superficie de los gránulos de PHA se encuentra presente una acil-CoA sintetasa (ACS1) capaz de activar los productos de la despolimerización convirtiéndolos en (*R*)-HA-CoA, como parte del proceso cíclico de síntesis y degradación del polímero. La acción coordinada de estas actividades enzimáticas (polimerasa, despolimerasa y acil-CoA sintetasa) da lugar al “ciclo del PHA” que actúa como un “ciclo metabólico amortiguador” capaz de canalizar los intermediarios metabólicos hacia la síntesis de PHA o hacia otros destinos en función de la demanda celular (49) (Anexo 2) (Fig. 3) (ver apartado 5. “Importancia fisiológica de los PHA en *P. putida*”).

### **3.2. Rutas metabólicas implicadas en la producción de los PHA en *P. putida***

Al hablar de las rutas de biosíntesis de los PHA hay que tener en cuenta que estas difieren en función del microorganismo estudiado y que el polímero resultante puede ser de tipo scl-PHA o mcl-PHA. La ruta específica de síntesis de poli-(3-hidroxibutirato) (PHB), el scl-PHA más caracterizado hasta la fecha, ha sido

estudiada ampliamente en la cepa bacteriana *R. eutropha* H16. El PHB se forma a partir de acetil-CoA en tres pasos enzimáticos (3, 151, 175, 245) (Fig. 4). En un primer lugar tiene lugar la condensación de dos moléculas de acetil-CoA dando lugar a acetoacetil-CoA mediante una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa codificada por el gen *phbA*. A continuación el acetoacetil-CoA generado es reducido de manera estereoselectiva a (*R*)-3-hidroxiacil-CoA por una deshidrogenasa dependiente de NADPH (PhbB). Por último, los monómeros de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA son polimerizados por la polimerasa de PHB que codifica el gen *phbC*.



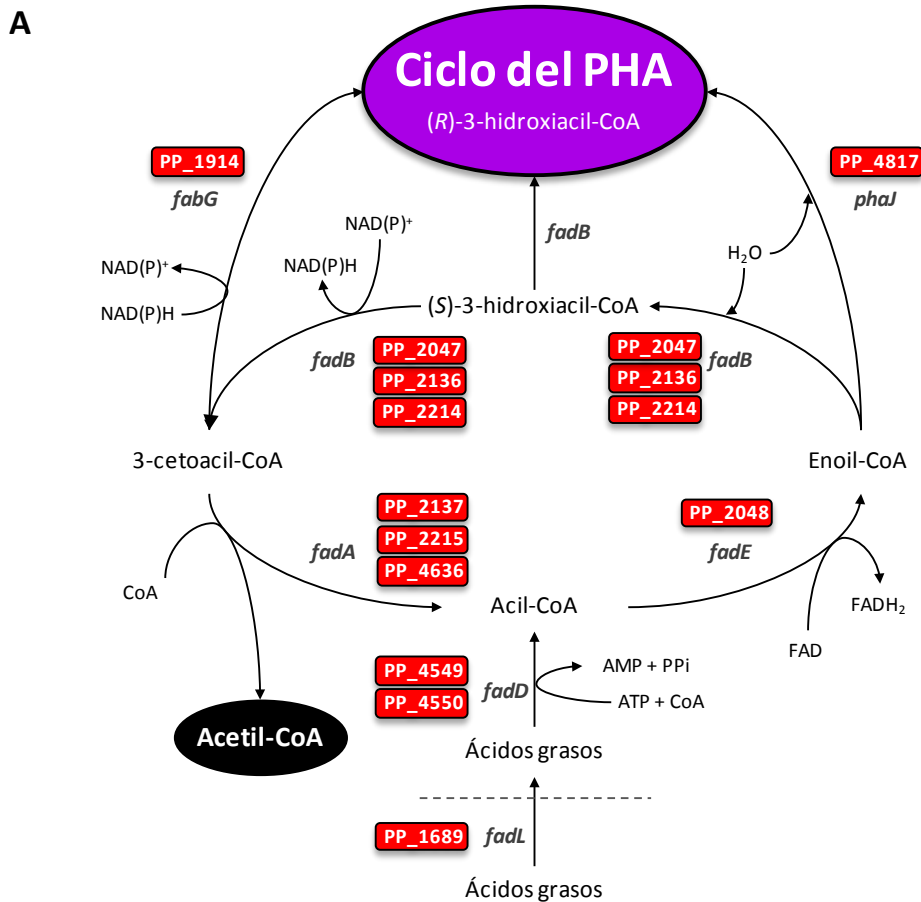
**Figura 4. Producción de PHB en *Ralstonia*.** **A.** Morfología de *R. eutropha* H16 produciendo gránulos de PHB, microfotografía tomada de Pötter *et al.* (183). **B.** Esquema de la ruta de biosíntesis de PHB en *Ralstonia*. El PHB es sintetizado a partir del acetil-CoA en 3 pasos sucesivos gracias a la acción de una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (PhbA), una acetoacetil-CoA deshidrogenasa (PhbB) y una polimerasa de PHB (PhbC).

En el caso de los mcl-PHA, el sustrato de las polimerasas de PHA son los (*R*)-HA-CoA (52, 136), obtenidos en las especies del género *Pseudomonas* a partir de las rutas de la  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* de ácidos grasos (103, 140, 267) (Fig. 3). Debido a que esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la producción de PHA en *P. putida*, un microorganismo productor natural de mcl-PHA, a continuación se describen de manera detallada las rutas metabólicas implicadas en la producción de mcl-PHA (Fig. 3).

### 3.2.1. Síntesis de mcl-PHA a partir de ácidos grasos

En distintas especies del género *Pseudomonas* se ha observado una estrecha relación entre la estructura de los ácidos grasos utilizados como fuente de carbono y la composición del PHA producido: los monómeros presentes en el polímero presentan cadenas laterales de igual longitud que el ácido graso empleado como sustrato o acortadas en un número par de átomos de carbono (61, 140). Esta correlación estructural sugiere que los ácidos grasos pueden incorporarse al PHA directamente a través de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación sin necesidad de ser completamente oxidados a acetyl-CoA. Por lo tanto, en estos microorganismos la ruta de síntesis de PHA es una rama de la  $\beta$ -oxidación, y la PHA polimerasa debe competir por sus sustratos con las enzimas del catabolismo de los ácidos grasos. El papel de las rutas capaces de aportar intermediarios para la síntesis de mcl-PHA a partir de ácidos grasos ha sido ampliamente estudiado en cepas recombinantes de *Escherichia coli* (247). Se ha observado que para producir mcl-PHA en cepas de *E. coli* modificadas para expresar distintas polimerasas de PHA es necesario ralentizar la  $\beta$ -oxidación añadiendo un inhibidor de dicha ruta como el ácido acrílico o emplear mutantes específicos en determinados pasos de la  $\beta$ -oxidación (141, 174, 188, 191-192, 205). Del mismo modo, la producción de PHA se incrementa notablemente en mutantes defectivos en la  $\beta$ -oxidación en distintas cepas de *P. putida*, presumiblemente al haber más sustratos disponibles para las polimerasas de PHA (22, 39, 81, 146-147, 150, 167-168, 170).

Dado que la ruta de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos está claramente conectada con la síntesis de PHA (Fig. 5), el estudio de la bioquímica y regulación del catabolismo de los ácidos grasos resulta de enorme interés para la optimización de la producción de PHA. Además, el uso de ácidos grasos con grupos funcionales podría permitir la incorporación de estos al poliéster; obteniéndose así polímeros con nuevas propiedades físico-químicas y que serían susceptibles de sufrir modificaciones químicas posteriores a su síntesis.



| Gen         | Actividad enzimática  |
|-------------|---|
| <i>fadL</i> | Transportador de ácidos grasos de cadena larga (LCFAs)  |
| <i>fadD</i> | Acil-CoA sintetasa  |
| <i>fadE</i> | Acil-CoA deshidrogenasa   |
| <i>fadB</i> | Actividades del complejo multienzimático FadBA: enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, <i>cis</i> - $\Delta^3$ - <i>trans</i> - $\Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa y 3-hidroxiacil-CoA epimerasa |
| <i>fadA</i> | Actividad del complejo multienzimático FadBA: 3-cetoacil-CoA tiolasa  |
| <i>phaJ</i> | Enoil-CoA hidratasa estereoselectiva para isómeros de tipo <i>R</i>   |
| <i>fabG</i> | 3-cetoacil-CoA reductasa  |

**Figura 5. La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y su conexión con el metabolismo de PHA en *Pseudomonas*.** **A.** Esquema con los principales pasos metabólicos implicados en dichas rutas metabólicas. En los cuadrados rojos se señalan las ORF cuya función ha sido demostrada experimentalmente en *P. putida*. (39, 106, 146-147, 150, 167, 170, 219, 221, 263-264, 269, 277). **B.** Genes y actividades enzimáticas que participan en la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos, según la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 (284).

### 3.2.1.1. $\beta$ -oxidación de ácidos grasos

El catabolismo de los ácidos grasos, así como las enzimas involucradas en su ruta (Fad) (Fig. 5) se encuentran conservadas en los distintos grupos bacterianos, y han sido ampliamente estudiados en la bacteria modelo *E. coli* (10, 227). Esta bacteria es capaz de emplear ácidos grasos de distinta longitud de cadena como única fuente de carbono y energía degradándolos a través de la ruta de la  $\beta$ -oxidación. También puede emplearlos como precursores de la síntesis de fosfolípidos de membrana sin necesidad de metabolizarlos hasta acetil-CoA. La ruta de degradación de ácidos grasos está catalizada por las enzimas codificadas por el regulón *fad*, responsable del transporte y activación de los ácidos grasos de cadena larga (*long-chain fatty acids* o LCFA) y su catabolismo oxidativo hasta acetil-CoA. Los LCFA son transportados a través de la membrana celular a la vez que son activados a la forma acil-CoA mediante un mecanismo que implica a una proteína de la membrana externa, FadL (8, 260), y a una acil-CoA sintetasa, FadD, asociada a la membrana interna (9, 278). Mientras que los organismos eucariotas poseen múltiples acil-CoA sintetasas con diferente especificidad en función de la longitud de cadena del ácido graso metabolizado, *E. coli* presenta una única acil-CoA sintetasa, FadD, con una amplia especificidad de sustrato (116, 171). El primer paso de la  $\beta$ -oxidación, una vez los ácidos grasos han sido activados a la forma acil-CoA, es su transformación a enoil-CoA por la proteína FadE, que parece ser la única acil-CoA deshidrogenasa de *E. coli* (18). Los siguientes pasos de hidratación, oxidación, y rotura tiólica son llevados a cabo por un complejo tetramérico conformado por dos copias de los productos de los genes *fadB* y *fadA* (7). Este complejo multienzimático codifica cinco actividades enzimáticas distintas: enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, *cis*- $\Delta^3$ -*trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa, 3-hidroxiacil-CoA epimerasa, y 3-cetoacil-CoA tiasa (185). La  $\beta$ -oxidación es una ruta cíclica en la que en cada ronda del proceso se origina una molécula de acil-CoA con dos átomos de carbono menos que el ácido graso inicial, a la vez que se libera una molécula de acetil-CoA. En la última vuelta del ciclo una molécula de acetoacil-CoA se rompe dando lugar a dos moléculas de acetil-CoA. En el caso de los ácidos grasos con un número impar de carbonos el producto final de la última rotura tiólica es una

molécula de acetil-CoA y una de propionil-CoA. En *E. coli* los genes del regulón *fad* están controlados por el represor transcripcional FadR en condiciones de crecimiento aeróbico. La expresión de dichos genes se ve inducida de manera coordinada ante la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el medio de cultivo (19, 275). *E. coli* es capaz de crecer también en condiciones anaeróbicas a partir de ácidos grasos gracias a una ruta mediada por los genes *fadJ*, *fadI* y *fadK* y que es independiente de FadR (19, 160). Por otro lado, los genes *fadM* y *fadH* codifican enzimas auxiliares de la  $\beta$ -oxidación implicadas en la degradación de ácidos grasos insaturados (67-68).

En *Pseudomonas* se han localizado genes homólogos a los que codifican para diferentes actividades de la  $\beta$ -oxidación en *E. coli* (146, 284). En la figura 5 se resumen las principales actividades enzimáticas de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y se señalan los genes que, recientemente, han sido asociados a ellas en *P. putida* (39, 106, 146-147, 150, 167, 170, 219, 263, 269, 277). En cuanto a la regulación del catabolismo de ácidos grasos en este grupo bacteriano, se ha demostrado que el regulador implicado en el control transcripcional de los genes *fad* en *P. aeruginosa* es PsrA, un miembro de la familia TetR, y no un ortólogo del regulador FadR de *E. coli* (117-118, 120).

### **3.2.1.2. Transformación de intermediarios de la $\beta$ -oxidación en (R)-HA-CoA**

Debe destacarse que los intermediarios de la  $\beta$ -oxidación son de tipo (S)-3-hidroxiacil-CoA, mientras que los sustratos de las polimerasas de PHA son de tipo (R)-HA-CoA. Se ha postulado que los (R)-HA-CoA pueden ser suministrados por tres tipos de actividades enzimáticas diferentes (Fig. 5): la enoil-CoA hidratasa estereoselectiva para isómeros de tipo R (PhaJ) (43, 70, 76, 221, 256), la epimerasa capaz de interconvertir los dos tipos de isómeros (FadB) (185), y la 3-cetoacil-CoA reductasa (FadG) que reduce los intermediarios 3-cetoacil-CoA de la  $\beta$ -oxidación a compuestos de tipo (R)-HA-CoA (248). La expresión en cepas recombinantes de *E. coli* productoras de PHA de los genes *phaJ* o *fadG* parece confirmar el papel de ambas actividades enzimáticas en la interconexión entre la ruta de  $\beta$ -oxidación y la síntesis

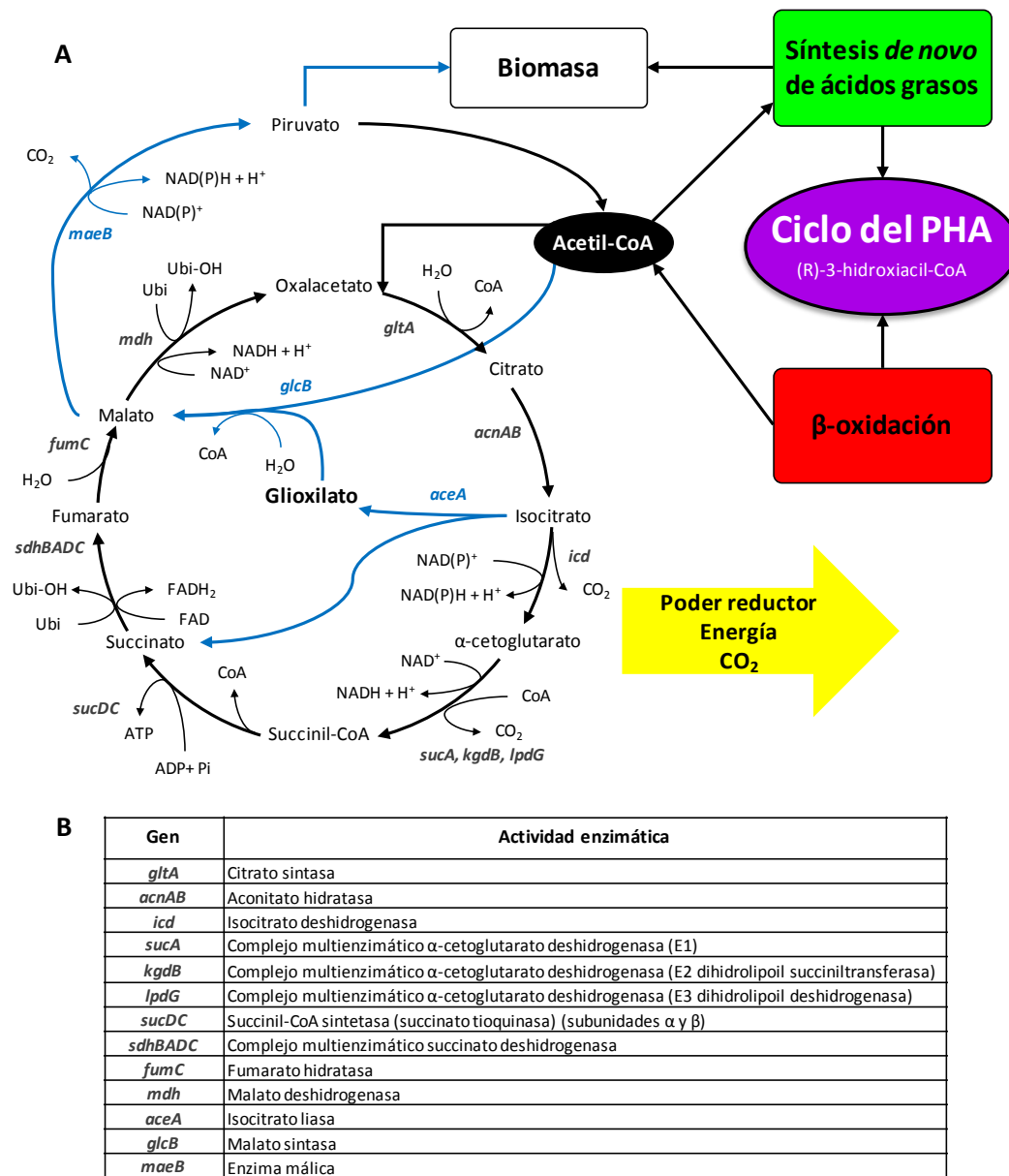
de PHA (77, 206, 248, 257). La importancia fisiológica de las distintas ramas que interconectan la degradación de los ácidos grasos y la producción de PHA en cepas productoras naturales productoras no está del todo clara. La actividad epimerasa asignada a la proteína FadB en *E. coli* (185), no parece ser fisiológicamente relevante en las especies del género *Pseudomonas* (70). Las enzimas de tipo PhaJ son preferentemente utilizadas, comparadas con FadG, para la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos en *P. putida* (264). En base a los niveles de transcripción génica y expresión de proteína observados en condiciones de producción de PHA a partir de ácidos grasos, la enoil-CoA hidratasa *R*-específica codificada por el gen *phaJ4* (PP\_4817) se ha propuesto como uno de los principales conectores entre estas rutas (221, 269).

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es analizar la conexión entre la degradación de ácidos grasos y el metabolismo de mcl-PHA en *P. putida* KT2440 aplicando este conocimiento a la producción de biopolímeros funcionales con nuevas propiedades.

### **3.2.1.3. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ciclo del glioxilato**

El acetil-coA generado en la degradación de los ácidos grasos puede canalizarse hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT o ciclo de Krebs) para la obtención de energía (principalmente en forma de poder reductor) o para ser incorporado a rutas biosintéticas. Cuando los ácidos grasos (o ciertos aminoácidos que son degradados a acetil-CoA) se emplean como única fuente de carbono, el ciclo del glioxilato permite la conversión neta del acetato en intermediarios del CAT de cuatro átomos de carbono que pueden ser canalizados hacia la ruta gluconeogénica. En la figura 6 se resumen los principales pasos metabólicos, así como los genes responsables, implicados en estas rutas metabólicas (134-135, 137).

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es analizar cómo la canalización de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación hacia la síntesis de PHA altera los flujos metabólicos hacia la obtención de energía (CAT) o hacia la producción de biomasa (vía ciclo del glioxilato / gluconeogénesis).



**Figura 6.** El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y el ciclo del glioxilato y su conexión con el metabolismo de PHA en *Pseudomonas*. **A.** Esquema con los principales pasos metabólicos implicados en dichas rutas metabólicas. Las flechas azules señalan los pasos correspondientes al ciclo del glioxilato y a la posterior formación neta de biomasa a través de la gluconogénesis. **B.** Genes y actividades enzimáticas que participan en la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos, según la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 (284).

### 3.2.2. Síntesis de mcl-PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los ácidos grasos

Cuando la fuente de carbono empleada para el crecimiento y producción de PHA no es un ácido graso, y por lo tanto su naturaleza no está químicamente relacionada con los (R)-HA-CoA, la composición final del poliéster resultante es

independiente de la fuente de carbono empleada. Se ha observado que cuando se emplean sustratos no relacionados con los ácidos grasos, el polímero acumulado por las especies del género *Pseudomonas* está compuesto mayoritariamente por monómeros de tipo (*R*)-3-hidroxidecanoato. Aunque también aparecen, en menor medida, otro tipo de monómeros, tanto saturados como insaturados (p. ej., (*R*)-3-hidroxi-5-*cis*-dodecenoato) (87, 251). En este sentido, Huijberts *et al.* (103) señalaron que la composición monomérica del PHA en *P. putida* cuando se emplean fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos, como la glucosa o el glicerol, es similar, en longitud de cadena y distribución de las insaturaciones, a la de los ácidos grasos de la membrana lipídica de la bacteria. Estos sustratos son metabolizados a través de las rutas centrales del catabolismo de la bacteria para dar lugar a acetil-CoA, que conecta con la ruta biosintética de los ácidos grasos. La síntesis *de novo* de ácidos grasos es una ruta anabólica que emplea como sustrato principal el acetil-CoA originado en el catabolismo de la fuente de carbono utilizada. La disponibilidad de metabolitos que puedan ser redirigidos hacia la producción de PHA a través de la biosíntesis de ácidos grasos va a depender, en última instancia, del flujo de carbono en el interior celular. Por lo tanto, la producción de PHA está intrínsecamente relacionada con todas las rutas centrales del catabolismo del carbono (Fig. 3).

### 3.2.2.1. Catabolismo de monosacáridos

Como ya se ha comentado previamente, una característica propia de los Pseudomonados es su gran versatilidad metabólica. Sin embargo, mientras que la glucosa es un sustrato preferente en bacterias modelo como *E. coli* o *Bacillus subtilis*, ni la glucosa, ni otros carbohidratos como el gluconato, el glicerol o la fructosa, son fuentes de carbono preferentes en *Pseudomonas* (213). Por lo tanto, existen claras diferencias entre estos grupos bacterianos en cuanto al transporte, metabolismo y regulación del catabolismo de azúcares (Fig. 7).

En *Enterobacteria* y *Firmicutes* la glucosa es transportada a través de la membrana citoplasmática y fosforilada en forma de glucosa-6-fosfato gracias al sistema de transporte PEP-PTS (213). El sistema PEP-PTS (138) ha sido identificado

como responsable del transporte de diversos carbohidratos en múltiples microorganismos. Además se ha estudiado en profundidad su interrelación con el control de la represión catabólica (56, 182). Sin embargo, en *Pseudomonas* la fructosa parece ser el único carbohidrato que se transporta al interior celular a través de un sistema de tipo PEP-PTS (60), ya que la glucosa y otros azúcares entran en el espacio periplásmico a través de una porina (OprB) localizada en la membrana externa (274). A pesar de que el metabolismo de glúcidos no es preferencial en las especies del género *Pseudomonas*, el catabolismo de la glucosa es bioquímicamente muy profuso, ya que existen tres rutas convergentes capaces de transformar este azúcar en el intermediario 6-fosfogluconato (6PG) (41-42, 54-55). En la figura 7 se resumen los pasos bioquímicos implicados en estas tres rutas periféricas, así como su compartimentalización en los distintos espacios celulares. La glucosa puede ser directamente fosforilada a glucosa-6-fosfato dentro del citoplasma bacteriano; transformarse en gluconato en el periplasma, el cual es fosforilado a 6PG en el interior celular; o bien continuar la oxidación hasta 2-cetogluconato que, tras entrar en la célula, es fosforilado y reducido en dos pasos enzimáticos que convergen en 6PG. Aunque las tres rutas funcionan de manera simultánea, se ha demostrado que la glucosa-6-quinasa y el bucle del 2-cetogluconato son cuantitativamente más importantes que la fosforilación del gluconato por parte de la glucoquinasa (54). En *E. coli* y *B. subtilis* los intermediarios fosforilados de los carbohidratos son asimilados a través de la glucólisis, mientras que la ruta Entner-Doudoroff (ED) juega un papel menor (75).

**Figura 7. Esquema del catabolismo de carbohidratos y su conexión con el metabolismo de PHA en *Pseudomonas*.** El diagrama presentado se basa en los trabajos de del Castillo *et al.* (55) y Kim *et al.* (124), así como en la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 (284). Las ORF mostradas en recuadros azules están bajo el control transcripcional del regulador HexR de forma directa (azul oscuro) o indirecta a través del sistema de dos componentes GltR2/GltS (azul claro) (55). El 2-ceto-3-desoxi-6fosfogluconato (KDPG) (*sombreado azul claro*) ha sido propuesto como el inductor de HexR (41). Las ORF mostradas en recuadros granates se hallan bajo el control del regulador transcripcional PtxS, cuyo inductor es el 2-cetogluconato (*sombreado rojo claro*) (42). Las ORF señaladas en recuadros naranjas están bajo el control transcripcional del regulador GnuR (55). Los genes mostrados en letras de color rojo poseen motivos de unión para la proteína Crc (*catabolite repression control*) (14). (La figura se muestra en la página siguiente)



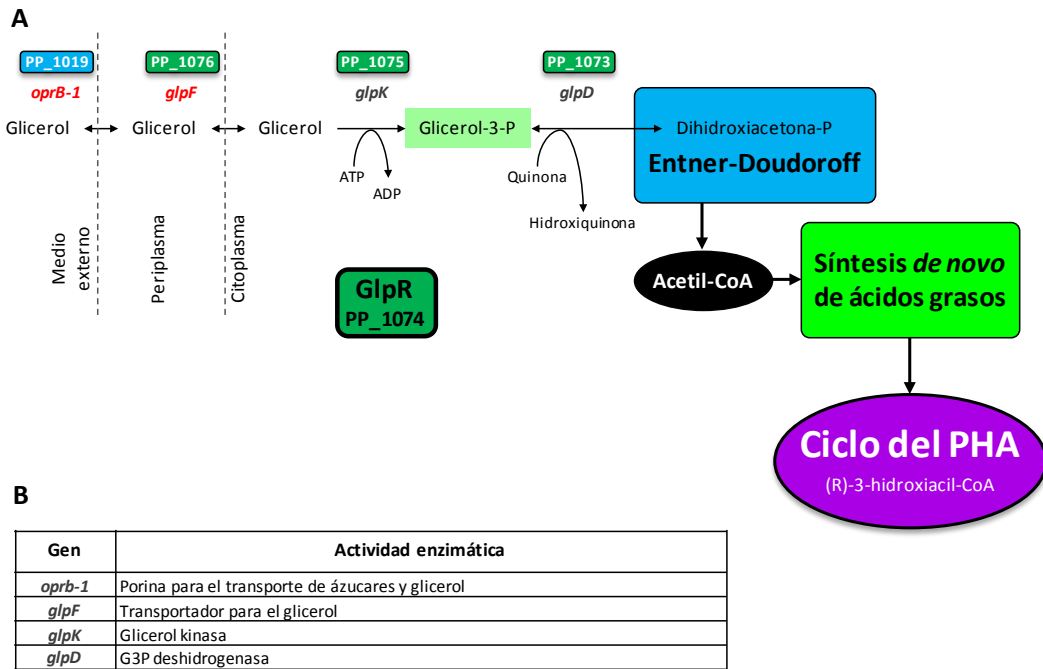
La mayor parte de las especies del género *Pseudomonas* carecen de la enzima fosfofructoquinasa, la cual cataliza un paso clave en la ruta glucolítica (fosforilación del la fructosa-6-fosfato para dar lugar a fructosa-1,6-bisfosfato), y por lo tanto metabolizan la glucosa a través de la ruta ED (54, 75). El primer paso de esta ruta implica la transformación del 6PG, originado por cualquiera de las rutas periféricas anteriormente descritas, en 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG) mediado por la enzima Edd (6-fosfogluconato deshidratasa). A continuación el KDPG es hidrolizado por la KDPG aldolasa (Eda) dando lugar a una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y una de piruvato. El gliceraldehído-3-fosfato se metaboliza a través de la ruta glucolítica por medio de una serie de pasos que lo transforman en piruvato. Finalmente el piruvato, originado por una u otra vía, es descarboxilado a acetil-coA que puede entrar en el CAT o ser derivado hacia rutas biosintéticas como la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Como hemos visto el transporte y metabolismo de azúcares difiere enormemente entre los Pseudomonados y bacterias tradicionalmente empleadas como modelo bioquímico, como *E. coli*. La regulación del catabolismo central de carbohidratos en *Pseudomonas* ha de permitir el control del complejo entramado de rutas metabólicas convergentes que coexisten en este microorganismo. Se han identificado cuatro reguladores transcripcionales implicados en el control del catabolismo de la glucosa y se ha logrado esclarecer en gran medida los circuitos reguladores que controlan este proceso (41-42, 55, 124, 177). Todos estos reguladores, así como las agrupaciones génicas que se encuentran bajo su control transcripcional se han esquematizado en la figura 7.

### **3.2.2.2. Catabolismo del glicerol**

En la actualidad el glicerol se ha posicionado como una fuente de carbono de gran interés medioambiental. En el proceso de producción de biodiésel se genera como subproducto una gran cantidad de residuos de glicerol de bajo coste que pueden ser revalorizados a través de su fermentación y transformación en productos de mayor valor añadido como los PHA (40, 237). En las bacterias que son capaces de emplear el glicerol como fuente de carbono y energía, este se

metaboliza a través de una serie de etapas que comprenden: el transporte al interior celular, la transformación en glicerol-3-fosfato (G3P) y la posterior conversión en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), compuesto intermediario de la glucólisis (Fig. 8).



**Figura 8. El catabolismo del glicerol y su conexión con el metabolismo de PHA en *Pseudomonas*.** **A.** Esquema con los principales pasos metabólicos implicados en dichas rutas metabólicas. La ORF mostrada en un recuadro azul claro está bajo el control transcripcional del regulador HexR de manera indirecta a través del sistema de dos componentes GltR2/GltS (55) (ver Fig. 7). Las ORF mostradas en recuadros verdes se hallan en *P. aeruginosa* bajo el control del regulador transcripcional GlpR, cuyo inductor propuesto es el glicerol-3-fosfo (G3P) (*sombreado verde claro*) (229). Los genes mostrados en letras de color rojo poseen motivos de unión para la proteína Crc (*catabolite repression control*) en *P. putida* KT2440 (14). **B.** Genes y actividades enzimáticas que participan en el catabolismo del glicerol, según la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 (284).

El transporte y metabolismo del glicerol en los Pseudomonados ha sido especialmente estudiado en la especie patógena humana *P. aeruginosa* debido a la importancia de este compuesto como fuente de carbono en los pulmones durante la infección causada por esta bacteria en pacientes de fibrosis quística (272). El glicerol atraviesa la membrana externa de la bacteria a través de OprB, una porina

que, participa en el intercambio de glucosa y que presenta altos niveles de expresión tanto en condiciones de limitación de glicerol como de glucosa (272). De esta forma se permite la entrada de dichos compuestos al interior celular, aún cuando estos estén presentes a muy bajas concentraciones en el medio de cultivo. Una vez que el glicerol atraviesa la membrana externa de la célula es trasladado al citoplasma a través de un sistema de transporte facilitado mediado por GlpF y asociado a la fosforilación del glicerol a G3P catalizada por la glicerol kinasa GlpK (230). A continuación, gracias a la acción de una G3P deshidrogenasa asociada a la membrana citoplasmática (GlpD) (228) el G3P es transformado en DHAP, la cual es catabolizada a través de una rama de la ruta ED (30, 156).

En lo que atañe a la regulación del metabolismo del glicerol (229) señalaron a GlpR como el represor transcripcional que regula la expresión de los operones *glpFK* y *glpD* en *P. aeruginosa*, y al G3P como el inductor del sistema (Fig. 8).

### **3.2.2.3. Síntesis *de novo* de ácidos grasos**

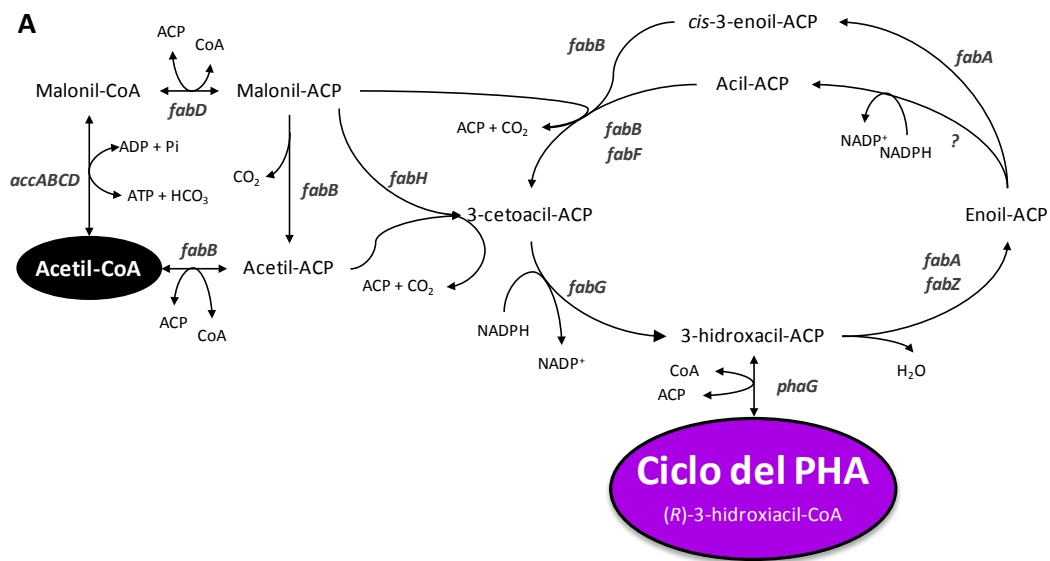
La síntesis de ácidos grasos es una ruta anabólica fundamental en la que se generan precursores de moléculas de gran importancia para los microorganismos como lipopolisacáridos, lipoproteínas, ramnolípidos y acil-homoserin-lactonas (231). La producción de todos estos compuestos tendrá que estar por lo tanto coordinada con la canalización de intermediarios de la síntesis *de novo* de ácidos grasos hacia la producción de PHA. La caracterización genética y bioquímica de la ruta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en Pseudomonados ha sido analizada principalmente en la especie patógena *P. aeruginosa* (95-97, 139); en muchos casos basándose en observaciones realizadas en *E. coli* (17, 29, 91). No obstante, se ha observado una alta similitud, tanto a nivel de la secuencia nucleotídica como de aminoácidos, entre los genomas de *P. aeruginosa* y *P. putida* (231).

Los intermediarios naturales de la ruta de síntesis *de novo* de ácidos grasos están activados por las denominadas ACP (*acyl carrier protein*). La ruta metabólica de síntesis de los ácidos grasos puede dividirse en dos fases: una fase de iniciación en la que el acetil-CoA es transformado en malonil-CoA y posteriormente activado a la forma malonil-ACP; y una fase de elongación en la que condensaciones sucesivas

de moléculas de malonil-ACP, seguidas de reacciones de condensación, reducción, deshidratación y reducción, dan lugar a ácidos grasos con distinta longitud de cadena (Fig. 9). La síntesis de ácidos grasos se inicia con la carboxilación del acetil-CoA por medio del complejo AccABCD (acetil-CoA carboxilasa) (6). A continuación el malonato es transtioesterificado desde la CoA a una molécula de ACP gracias a la malonil-CoA:ACP transacilasa, actividad codificada en el gen *fabD* en *P. aeruginosa* (139). El malonil-ACP generado es condensado por varias 3-cetoacil-ACP sintasas: en la primera ronda es condensado con una molécula de acetil-coA (probablemente gracias a FabH en *E.coli*) y en rondas sucesivas de elongación una nueva molécula de malonil-ACP se condensa con el 3-acil-ACP ya formado (catalizado por FabB o FabF) (17, 231). El papel de FabH como iniciador del proceso no está muy claro y se ha propuesto igualmente que FabB sea capaz de catalizar la descarboxilación del malonil-ACP a acetil-ACP y a continuación iniciar el ciclo condensando dos moléculas de malonil-ACP y acetil-ACP (29). El siguiente paso del ciclo es la reducción de las moléculas de 3-cetoacil-ACP resultantes gracias a una 3-cetoacil-ACP reductasa (FabG) (97) seguido por la formación de un doble enlace por la acción de una 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabA o FabZ) (91). En última instancia una enoil-ACP reductasa (FabI, FabK o FabL) da lugar al 3-acil-ACP final. En *P. aeruginosa* se han identificado los genes que codifican para enzimas de tipo FabI y FabK (96); pero no se ha determinado cual es el gen que codifica para la actividad enoil-ACP reductasa en *P. putida* KT2440 (231).

La ruta descrita anteriormente conduce a la síntesis de ácidos grasos saturados, si bien en *P. aeruginosa* se han descrito dos vías para producir ácidos grasos insaturados. En  $\alpha$  y  $\gamma$  proteobacterias existe una ruta anaeróbica para la síntesis de ácidos grasos insaturados asociada a la de ácidos grasos saturados. FabA cataliza la isomerización del *trans*-2-acil-ACP de 10 átomos de carbono a la forma *cis*-3-acil-ACP. El producto es condensado por FabB con una molécula de malonil-ACP formando un 3-cetoacil-ACP que, al haberse saltado el paso catalizado por FadI, conserva el doble enlace. Los dos genes clave de esta ruta se cotranscriben en el operón *fabAB* de *P. aeruginosa* (95), el cual presenta un alto grado de similitud con el correspondiente *cluster* de *P. putida* KT2440. Por otro lado en *P. aeruginosa*

existe una ruta aeróbica inducible en la que las desaturasas DesA y DesB son responsables de la formación de dobles enlaces en posición *sn*-2 en ácidos grasos unidos a membrana o exógenos respectivamente (282). El gen *desB* forma un operón con *desC*, que codifica una posible oxidorreductasa, y la expresión de *desB* está regulada negativamente por DesT, un regulador que es capaz de identificar la estructura de los ácidos grasos (279). FabF podría tener también un papel regulador al modular la longitud de la cadena de los ácidos grasos sintetizados (139).



**B**

| Gen            | Actividad enzimática  |
|----------------|---|
| <i>accABCD</i> | Complejo AccABCD (acetil-CoA carboxilasa)                                       |
| <i>fabD</i>    | Malonil-CoA-ACP transacilasa  |
| <i>fabB</i>    | 3-cetoacil-ACP sintasa  |
| <i>fabF</i>    | 3-cetoacil-ACP sintasa  |
| <i>fabH</i>    | 3-cetoacil-ACP sintasa  |
| <i>fabG</i>    | 3-cetoacil-ACP reductasa  |
| <i>fabA</i>    | 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa  |
| <i>fabZ</i>    | 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa  |
| ?              | Enoil-ACP reductasa (no se ha identificado el gen que codifica dicha actividad) |
| <i>phaG</i>    | 3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa   |

**Figura 9. La síntesis *de novo* de ácidos grasos y su conexión con el metabolismo de PHA en *Pseudomonas*. A.** Esquema con los principales pasos metabólicos implicados en dichas rutas metabólicas. **B.** Genes y actividades enzimáticas que participan en la ruta de síntesis *de novo* de ácidos grasos, según la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 (284).

### 3.2.2.4. Transformación de intermediarios de la síntesis *de novo* de ácidos grasos en (R)-HA-CoA

Como ya se ha indicado los intermediarios de la ruta de síntesis *de novo* de ácidos grasos están activados por las ACP, por lo tanto deben ser transformados a su correspondiente forma (R)-HA-CoA para poder incorporarse al polímero de PHA. Los (R)-3-hidroxiacil-ACP procedentes de la síntesis de ácidos grasos son dirigidos hacia la producción de PHA gracias a la transacilación catalizada por la proteína PhaG (99, 201) (Fig. 9). Esta transacilasa específica sería la responsable de catalizar la transferencia de la molécula de (R)-3-hidroxiacilo del tioéster de ACP al CoA. A pesar de que el gen *phaG* no está localizado en el *cluster pha*, se ha propuesto una regulación coordinada con el resto de genes implicados en el metabolismo del PHA (100). Debe destacarse que no todas las especies del género *Pseudomonas* son capaces de producir mcl-PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos y que este fenotipo se ha asociado a la ausencia del gen *phaG* en el caso de *P. fragi* (69-70), a una transcripción ineficaz del gen *phaG* en *P. oleovorans* (98) y *P. nitroreducens* 0802 (281) y a la presencia de una forma inactiva de la enzima PhaG en *P. mendocina* LZ (280).

Recientemente se ha señalado que en *E. coli* la proteína PhaG de *P. putida* podría funcionar como una (R)-3-hidroxiacil-ACP tioesterasa capaz de producir ácidos grasos libres, los cuales serían convertidos en intermediarios de tipo (R)-HA-CoA gracias a la acción de enzimas con actividad (R)-3-hidroxiacil-CoA ligasa como la codificada por el gen PP\_0763 (270).

## 4. Regulación del metabolismo de los PHA

Los PHA han sido ampliamente estudiados en términos de versatilidad estructural, propiedades físico-químicas, optimización de la producción y aplicaciones (35, 79, 204). Sin embargo, los mecanismos moleculares que están detrás de la regulación del metabolismo de los PHA aún no han sido completamente esclarecidos (121, 151, 203). Esto se debe, en parte, a la complejidad de un sistema de regulación que tiene lugar a diferentes niveles. Por un lado existe una regulación

de tipo enzimático, ejercida sobre las proteínas que catalizan la síntesis y degradación de los monómeros; y por otro, una regulación de la expresión génica, tanto de los genes implicados en las rutas específicas del metabolismo del PHA, como de los genes de las rutas metabólicas centrales relacionadas con este proceso. Este control de la expresión génica no sólo depende de la denominada regulación específica, mediada por la interacción del regulador específico de la ruta con el promotor en respuesta a una señal dada, sino que también tiene lugar a través de mecanismos de regulación global que relacionan la actividad individual de cada promotor con el metabolismo y el estado energético de la célula (57).

### 4.1. Regulación en cepas productoras de PHB

La regulación a nivel enzimático ha sido estudiada en profundidad en la cepa productora de PHB *R. eutropha* H16 (151). En este microorganismo las concentraciones intracelulares de CoA y acetyl-CoA tienen un papel esencial en la síntesis de PHB; el CoA libre inhibe la  $\beta$ -cetotilasa (PhbA), enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de PHB (15, 165, 233). Por otro lado, la síntesis de PHB se ve estimulada por niveles elevados de NAD(P)H o del ratio NAD(P)H/NAD(P) (86); lo cual parece estar conectado con un enlentecimiento del CAT vía una inhibición de la citrato sintasa por NAD(P)H (92). En relación con esto se ha observado una mayor acumulación de PHB en una cepa mutante de *R. eutropha* con menor actividad del CAT (173).

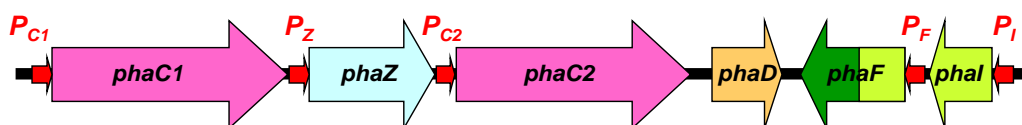
En cuanto a la regulación a nivel transcripcional, se ha demostrado que la expresión de los genes *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR*, y *phaZ1a* es constitutiva en *R. eutropha* H16, ya que se transcriben a lo largo de todas las etapas de crecimiento de la bacteria, producción y degradación de PHB. Mientras que la producción de la fase PhaP parece estar estrechamente regulada, ya que no se detecta fase libre en la célula, sino que se produce únicamente en los niveles requeridos para la unión al gránulo (142). Esta regulación parece estar mediada por PhaR, un regulador transcripcional capaz de unirse a las regiones promotoras de *phaR* y *phaP* en *R. eutropha* H16 y *Paracoccus denitrificans* (152, 183). Además, mutantes *phaR*<sup>-</sup> de *R. eutropha* H16 producen más proteína PhaP que la cepa silvestre (276).

## 4.2. Regulación en *Pseudomonas*

Aunque la regulación del metabolismo de mcl-PHA no ha sido tan ampliamente estudiada como lo ha sido la del PHB (121, 151), recientemente se ha descrito la regulación específica que dirige la expresión de los genes y la actividad de las enzimas del *cluster pha* en *Pseudomonas* (50) (Anexo 3). Igualmente se ha señalado el efecto de algunos reguladores globales del metabolismo sobre la producción de PHA en este grupo bacteriano. Como ya se ha indicado al hablar de las rutas específicas de síntesis de mcl-PHA, en *Pseudomonas* los sustratos de la polimerasa de PHA provienen de las rutas de  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* de ácidos grasos. Por lo tanto la regulación de estas rutas y la competencia por intermediarios de dichas vías metabólicas influirán en la regulación del metabolismo de los PHA (121) (Fig. 3).

### 4.2.1. Organización génica y control transcripcional específico del *cluster pha*

Los principales estudios sobre regulación de la ruta específica de síntesis y degradación de PHA se han centrado en la organización de los genes que codifican las principales enzimas involucradas dicha ruta. El *cluster* de genes responsable de la síntesis de PHA está bastante conservado entre las cepas productoras de mcl-PHA (46, 189). Sin embargo, las secuencias intergénicas presentan variaciones en función de la especie, lo que condiciona que el control transcripcional difiera de unas cepas a otras (105, 187, 189, 220, 238, 252).



**Figura 10. Esquema de la organización génica del *cluster pha*.** Las flechas grandes representan a los distintos genes de la agrupación génica. Los genes *phaC1* y *phaC2* codifican dos polimerasas, separadas por el gen *phaZ* que codifica la despolimerasa intracelular. El gen *phaD* codifica un regulador transcripcional de la familia TetR. Los genes *phaF* y *phaI*, que se transcriben en dirección opuesta codifican las dos fasinas. Las flechas pequeñas de color rojo representan los promotores identificados aguas arriba de los genes *phaC1*, *phaZ*, *phaC2*, *phaF* y *phaI* (50) (Anexo 3).

En la figura 10 se resume la organización génica del *cluster pha* en *P. putida* KT2440 (cepa objeto de estudio en esta Tesis Doctoral). *P. putida* KT2440 contiene dos genes que codifican las polimerasas PhaC1 y PhaC2, responsables de la síntesis del bioplástico (151, 189). Entre estos dos genes se localiza el gen *phaZ*, que codifica una despolimerasa responsable de la hidrólisis intracelular del polímero (46). También forma parte de este conjunto génico el gen *phaD*, un regulador transcripcional de la familia TetR (50, 127, 198) (Anexo 3). Además de manera divergente al resto del *cluster* se transcriben los genes *phaF* y *phal* que codifican para las GAP denominadas fasinas (78, 157, 187). Recientemente nuestro grupo ha identificado en *P. putida* KT2442 cinco promotores aguas arriba de los genes *phaC1*, *phaZ*, *phaC2*, *phaF* y *phal* (denominados respectivamente P<sub>C1</sub>, P<sub>Z</sub>, P<sub>C2</sub>, P<sub>F</sub> y P<sub>I</sub>); si bien los promotores P<sub>C1</sub> y P<sub>I</sub> parecen ser más activos y dan lugar a los operones *phaC1ZC2D* y *phalF* (50, 65) (Anexos 1 y 3) (trabajo previo a esta Tesis Doctoral, ver Anexos). En cuanto al control de la expresión génica del *cluster pha*, se ha demostrado que el gen *phaD* codifica para un activador transcripcional (50, 127, 220) (Anexo 3). En nuestro reciente trabajo (50, 65) (Anexos 1 y 3) hemos validado el papel de PhaD como activador transcripcional de los genes *pha* en *P. putida* KT2442. En este estudio se ha demostrado la capacidad de PhaD para unirse *in vitro* a los promotores P<sub>C1</sub> y P<sub>I</sub> del *cluster*; permitiendo la transcripción de los operones *phaC1ZC2D* y *phalF* y controlando además su propia expresión. Se han confirmado también las observaciones realizadas previamente en varias cepas de *Pseudomonas* (100-101, 187, 203) que apuntaban a la existencia de un nivel de expresión diferente entre los transcritos *phaF* y *phalF*, confirmado por el diferente grado de dependencia respecto al regulador PhaD. El control que ejerce la proteína PhaD es dependiente de la fuente de carbono empleada como sustrato para el crecimiento y producción de PHA. La expresión de los genes *pha* a partir de los distintos promotores del *cluster* (con excepción de P<sub>F</sub>) presenta una mayor inducción cuando se usan ácidos grasos como sustratos que cuando se emplea glucosa; lo que sugiere que el inductor del sistema es un derivado del metabolismo de ácidos grasos. La construcción de un modelo estructural 3D de PhaD nos ha llevado a proponer que dicho inductor es un derivado-CoA generado en la  $\beta$ -oxidación o en el CAT.

#### 4.2.2. Papel regulador de las fasinas

Las fasinas son proteínas de naturaleza anfifílica que se encuentran ancladas a la monocapa lipídica que rodea al gránulo de PHA estableciendo una interfase entre el citoplasma y el polímero, lo cual evita la coalescencia de los gránulos (240). Estas GAP son indispensables para el mantenimiento de la estructura de los gránulos y para el control de su número y tamaño (83, 180, 271). Además de este papel estructural se ha sugerido que estas proteínas están implicadas también en la regulación del metabolismo de los PHA (187, 220).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PhaF revela que está estructurada en dos dominios: el extremo N-terminal, que presenta un 57% de similitud con la secuencia de aminoácidos completa de la fasina PhaI (15,4 kDa), donde reside el dominio de unión al gránulo de PHA (157, 187) y la región C-terminal que contiene un dominio de unión a ADN, con 8 repeticiones en tándem de tipo AAKP, similar al de las histonas H1 de organismos eucariotas (78). Estudios realizados en *P. putida* U han señalado la relevancia de PhaF en la síntesis de los PHA (especialmente en los que presentan cadenas laterales de tipo aromático) y en el control del número y tamaño de los gránulos (220). Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que esta proteína bifuncional ejerce un papel crucial en la localización intracelular de los gránulos de PHA así como en su segregación a las células hijas en el momento de la división celular (78). La mutación del gen *phaF* altera los niveles de transcripción de los genes *pha*; sin embargo, los estudios *in vitro* señalan que PhaF es capaz de unirse al ADN a través de su extremo C-terminal de una manera inespecífica. Según la hipótesis planteada se propone que PhaF actúa como una proteína asociada al nucleóide ejerciendo un efecto global pleiotrópico sobre diversos genes en una acción coordinada con la segregación del cromosoma (78).

#### 4.2.3. Control enzimático de la síntesis y degradación de los PHA

Anteriormente se ha señalado que los ratios acetil-CoA/CoA y NAD(P)H/NAD(P) tienen un papel esencial en la regulación a nivel enzimático de la síntesis de PHB. Recientemente Ren *et al.* (209) han propuesto que este tipo de

regulación controla también el ciclo continuo de síntesis y degradación de PHA de forma coordinada con la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en *P. putida* Gpo1. Según este estudio el CoA libre actúa como inhibidor de la polimerasa de PHA en este microorganismo, mientras que ratios elevados de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD inhiben la actividad de las enzimas de la  $\beta$ -oxidación. En función del estado energético de la célula los (R)-HA-CoA son incorporados hacia la formación del polímero o son oxidados en la  $\beta$ -oxidación. Cuando las células están creciendo de forma activa se alcanzan elevados niveles de acetil-CoA, ATP y NADH (metabolitos altamente energéticos), lo cual implica elevados ratios acetil-CoA/CoA y NADH/NAD, que inhiben a las enzimas de la  $\beta$ -oxidación y favorecen la acumulación de (R)-HA-CoA. En esta situación PhaC se ve estimulada por ratios elevados de (R)-HA-CoA/CoA los (R)-HA-CoA son canalizados hacia la síntesis de PHA. Cuando las células alcanzan una situación energéticamente menos favorable y descienden los ratios de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD se estimula la  $\beta$ -oxidación y en consecuencia la acción de la despolimerasa y la ACS1 se ven favorecidas frente a la polimerasa, lo que conduce a la despolimerización del polímero (209-210).

#### **4.2.4. Reguladores globales del metabolismo y producción de PHA**

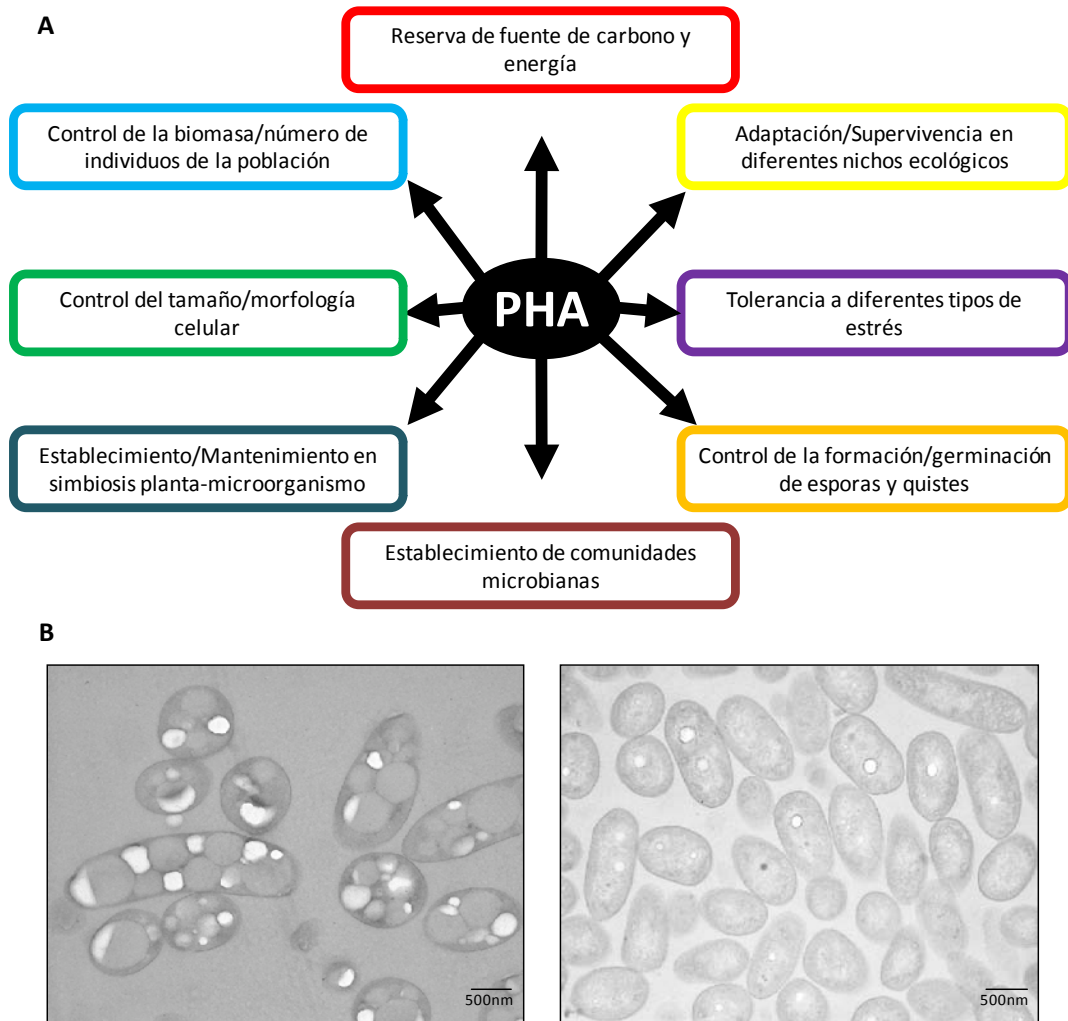
Los PHA son materiales de reserva de carbono y energía para los microorganismos, por lo tanto, su metabolismo está intrínsecamente relacionado con el flujo de carbono entre las distintas rutas catabólicas y anabólicas, así como con la situación global energética de la célula. Consecuentemente, los sistemas de regulación global que controlan respuestas como el estrés, factores de virulencia, motilidad, metabolismo secundario o represión catabólica, están implicados también en la regulación del metabolismo de los PHA. Algunos reguladores globales que se han propuesto como moduladores, directos o indirectos, del metabolismo de los PHA son: la proteína reguladora de la represión catabólica Crc (14, 213), el sistema PEP-PTS (186, 261), el sistema de dos componentes GacS/GacA (23, 48) (Fonseca *et al.*, en preparación), y el factor sigma alternativo de la ARN polimerasa RpoS (216).

Ya se ha indicado que los PHA son preferentemente acumulados por las bacterias cuando existe una situación de desbalance nutricional: por ejemplo limitación de nitrógeno y exceso de fuente de carbono (123, 143, 149, 151, 189). En este sentido son varios los estudios que han señalado el posible control sobre el metabolismo de los PHA por parte de reguladores globales relacionados con la asimilación de nitrógeno como el factor sigma RpoN (100-101, 252).

## 5. Importancia fisiológica de los PHA

---

Las aplicaciones de los PHA, o de sus derivados, a nivel industrial, médico, farmacéutico, agrícola y medioambiental están ampliamente documentadas (35, 79, 179, 194). Esto ha favorecido que se haya estudiado, no sólo su estructura y propiedades, sino también su metabolismo y los factores que lo controlan. Además de por sus aplicaciones biotecnológicas, los PHA han despertado el interés de la comunidad científica por su relevancia a la hora de desentrañar la fisiología y el metabolismo microbiano. Desde que Lemoigne (144) descubriera la producción de PHB en *Bacillus megaterium*, se ha descrito la capacidad para sintetizar y/o catabolizar PHA en especies de los tres grandes dominios: arqueas, bacterias y eucariotas. Incluyendo organismos presentes en una gran variedad de nichos ecológicos, con diferentes formas de vida (p. ej., especies de vida libre, parásitos, simbioses, comunidades microbianas) y metabólicamente muy diversos (p. ej., aerobios, anaeróbios, fotosintetizadores) (24, 36, 114-115, 149, 283). El hecho de que el metabolismo de los PHA esté tan ampliamente distribuido en la naturaleza, unido al hecho de que los genes *pha* han estado sujetos a un proceso de transferencia horizontal entre distintos grupos filogenéticos, indica que la síntesis de PHA supone algún tipo de ventaja para los microorganismos que lo producen de manera natural (24, 114-115). En la figura 11 se resumen las principales implicaciones que el metabolismo del PHA tiene sobre la eficacia biológica (*fitness*) de los microorganismos (24).



**Figura 11. Importancia fisiológica de los PHA.** **A.** Esquema de las principales implicaciones del metabolismo de PHA en la fisiología celular. **B.** Comparación al microscopio electrónico de la morfología de células de *P. putida* KT2442 (panel izquierdo) y de un mutante en la polimerasa PhaC1 (panel derecho), imagen tomada de (49) (Anexo 2).

Clásicamente los PHA se han definido como biopolímeros de reserva de fuente de carbono y energía sintetizados en caso de desbalance nutricional y movilizables ante cambios medioambientales (151). Según esto, se ha asumido que los PHA se producen en condiciones de crecimiento subóptimo, aunque en especies como *P. putida* la producción de PHA a partir de ácidos grasos tiene lugar sin necesidad de una limitación nutricional (71). Por lo tanto se ha sugerido que las funciones del PHA van más allá de ser una mera reserva y se han relacionado con la adaptación y supervivencia en nichos ecológicos muy competitivos en los que las

condiciones nutricionales son altamente cambiantes (p. ej., suelos, rizosfera) (114, 166, 249). La capacidad de acumular PHA ha sido relacionada también con la resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental: incluyendo frío y calor, radiaciones UV, desecación, presión osmótica y diferentes solventes y compuestos químicos (44, 113, 155, 215-216, 249). Además se ha señalado que el PHA podría mediar en las señales que desencadenan tanto la formación y germinación de esporas como la producción de quistes en diferentes especies (63, 232, 259). El metabolismo del PHA se ha relacionado a su vez con las interacciones entre microorganismos que tienen lugar en la formación de *biofilms* y tapetes microbianos (20, 178, 214, 262), así como en las relaciones de tipo simbiote que se establecen entre plantas y microorganismos de la rizosfera (26, 148, 184, 249, 268).

Como trabajo introductorio a esta Tesis Doctoral se analizó el impacto de la producción de PHA sobre la morfología y la viabilidad celular a lo largo de todas las fases de crecimiento en *P. putida* KT2442 (49, 65) (Anexos 1 y 2). En este trabajo se observó que en *P. putida* KT2442 la habilidad para producir PHA no incrementa la supervivencia a lo largo del tiempo, pero condiciona el número de individuos en la población y permite una mayor adaptabilidad ante condiciones ambientales cambiantes. Además se demostró que esta capacidad de respuesta ante cambios ambientales depende de la existencia de un ciclo continuo de síntesis y degradación del PHA (reciclaje o *turnover* del PHA). Debe destacarse que en este estudio se apreció que en un mutante *phaC1<sup>-</sup>* de *P. putida* KT2442 las células son de menor tamaño y se dividen hasta alcanzar un valor dos órdenes de magnitud superior al de la cepa silvestre. Sin embargo, la biomasa libre de PHA acumulada es independiente de la capacidad para producir PHA. Es decir, la síntesis de PHA en forma de gránulos dentro del citoplasma bacteriano condiciona enormemente la morfología celular al controlar la distribución de la biomasa en función del número y tamaño de las células (Fig. 11)\*.

**\*Nota aclaratoria:** Debido a la idiosincrasia propia del trabajo experimental con microorganismos productores de PHA, es conveniente esclarecer los siguientes conceptos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral:

- Densidad óptica (OD): Tradicionalmente esta medida se ha empleado para calcular el ratio de crecimiento en cultivos bacterianos. Sin embargo, la acumulación de PHA en el interior de las células altera las mediciones turbidimétricas y no permite emplearlas para el cálculo del ratio de crecimiento celular ( $\mu$ ).
- Biomasa o biomasa total: Hace referencia al peso seco total de un cultivo. Se expresa en g/l y se determina por métodos gravimétricos.
- Biomasa libre de PHA: Se define como la biomasa total de un cultivo menos la masa correspondiente al PHA acumulado. Se calcula restando los g/l de PHA producidos (determinados por cromatografía de gases) del total de g/l correspondientes al peso seco del cultivo. Este parámetro ha sido el empleado para el cálculo del ratio de crecimiento celular ( $\mu$ ).

## **II. OBJETIVOS**



Como ya se ha comentado en la *Introducción*, los PHA son una extensa familia de polímeros con diferentes propiedades que han sido ampliamente estudiados en virtud de sus múltiples aplicaciones y su naturaleza biodegradable. El propósito inicial de esta Tesis Doctoral ha sido ahondar en la importancia de los PHA desde el punto de vista de la fisiología y el metabolismo microbiano. Se ha pretendido estudiar la interrelación del metabolismo del PHA, entendido como un ciclo continuo de síntesis y degradación del polímero, con el resto de las rutas metabólicas en la bacteria modelo en Biotecnología Ambiental *P. putida* KT2440. Todo ello, con la intención de aplicar los conocimientos obtenidos hacia el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas en el campo de los biopolímeros.

Por lo tanto, se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el impacto del metabolismo de los PHA en *P. putida* desde un punto de vista global, analizando en su conjunto las implicaciones sobre la fisiología, expresión génica y flujos metabólicos.
- Analizar la conexión entre el catabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo de mcl-PHA en *P. putida*.
- Desarrollar estrategias de cultivo, y/o nuevas cepas derivadas de *P. putida*, que permitan el uso eficiente de fuentes de carbono apropiadas para la producción industrial de PHA.
- Producir PHA funcionalizados con nuevas propiedades físico-químicas y susceptibles de ser modificados químicamente (bioplásticos de segunda generación).



### **III. RESULTADOS**



**1. El metabolismo de los PHA controla el derroche de carbono y energía en *P. putida***

---



# The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*

I. F. Escapa,<sup>1</sup> J. L. García,<sup>1</sup> B. Bühler,<sup>2</sup> L. M. Blank<sup>2</sup> and M. A. Prieto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Laboratory of Chemical Biotechnology, Faculty of Biochemical and Chemical Engineering, TU Dortmund University, D44227 Dortmund, Germany.

## Summary

The synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs), the storage polymer of many bacteria, is linked to the operation of central carbon metabolism. To rationalize the impact of PHA accumulation on central carbon metabolism of the prototype bacterium *Pseudomonas putida*, we have revisited PHA production in quantitative physiology experiments in the wild-type strain vs. a PHA negative mutant growing under low nitrogen conditions. When octanoic acid was used as PHA precursor and as carbon and energy source, we have detected higher intracellular flux via acetyl-CoA in the mutant strain than in the wild type, which correlates with the stimulation of the TCA cycle and glyoxylate shunt observed on the transcriptional level. The mutant defective in carbon and energy storage spills the additional resources, releasing CO<sub>2</sub> instead of generating biomass. Hence, *P. putida* operates the metabolic network to optimally exploit available resources and channels excess carbon and energy to storage via PHA, without compromising growth. These findings demonstrate that the PHA metabolism plays a critical role in synchronizing global metabolism to availability of resources in PHA-producing microorganisms.

## Introduction

Environmental pollution caused by synthetic polymer wastes has been recognized as a large problem due to their resistance to biodegradability (Shah *et al.*, 2008; Sivan, 2011). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial biopolyoxoesters accumulated in the cytoplasm as

reserve storage granules (Madison and Huisman, 1999; Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). PHAs can be obtained from renewable resources, explaining why these biodegradable and recyclable thermoplastic polymers have been extensively studied for the past three decades (Witholt and Kessler, 1999; Luengo *et al.*, 2003; Serafim *et al.*, 2008). These biodegradable polymers have been broadly studied in terms of structural versatility, physico-chemical properties and production optimization (Suriya-mongkol *et al.*, 2007; Chen, 2009; Rehm, 2010; Escapa *et al.*, 2011).

The PHA metabolic machinery in bacteria is not limited to the specific genes coding for the proteins involved directly in PHA synthesis, hydrolysis, granule formation and regulation (de Eugenio *et al.*, 2010a; Galán *et al.*, 2011), but also implicates its connection with other central and peripheral metabolic pathways. In most bacteria, such as the paradigmatic *Ralstonia eutropha* H16 strain, PHB is synthesized in a three-step reaction starting with acetyl-CoA (Peoples and Sinskey, 1989) (Fig. 1). In the first step two acetyl-CoA molecules are condensed in a reaction catalysed by a 3-ketothiolase. Then, the acetoacetyl-CoA generated is stereoselectively reduced to (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA by a NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase. Finally, the (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA monomers are polymerized by a PHB synthase, releasing PHB and free CoA as end-products. *Pseudomonas* species rely on the  $\beta$ -oxidation pathway and fatty acid *de novo* synthesis to convert fatty acid or carbohydrate intermediates, respectively, into different (*R*)-3-hydroxyacyl-CoAs (Fig. 1). These metabolites are used as substrates by the PHA synthases, which catalyse the committed step of medium-chain-length PHA (mcl-PHA) biosynthesis and finally end up in a biopolyester composed of (*R*)-3-hydroxy fatty acids of 6 to 12 carbon atoms (Prieto *et al.*, 2007).

Regulation of PHA metabolism is complex, since it is exerted first at the enzymatic level, by cofactor inhibition and availability of the metabolites, and second at the transcriptional level, by specific and global transcriptional regulatory factors (Kessler and Witholt, 2001; de Eugenio *et al.*, 2010a). In PHB-producing bacteria such as *R. eutropha*, the intracellular concentrations of acetyl-CoA and free CoA play a central role in the regulation of polymer synthesis (Senior and Dawes, 1973; Budde *et al.*, 2010). Furthermore, PHB synthesis is stimulated by

Received 2 July, 2011; revised 22 November, 2011; accepted 25 November, 2011. \*For correspondence. E-mail auxi@cib.csic.es; Tel. (+34) 918 373 112; Fax (+34) 915 360 432.

© 2012 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd



**2. Disrupción de la ruta de  $\beta$ -oxidación en *P. putida* KT2442 para la producción de PHA funcionalizados con grupos tioéster**

---



# Disruption of $\beta$ -oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups

Isabel F. Escapa · Valle Morales · Verónica P. Martino ·  
Eric Pollet · Luc Avérous · José L. García ·  
María A. Prieto

Received: 14 October 2010 / Revised: 31 December 2010 / Accepted: 2 January 2011 / Published online: 26 January 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** This work describes the generation of novel PHAs (named PHACOS) with a new monomer composition containing thioester groups in the side chain, which confers new properties and made them suitable for chemical modifications after their biosynthesis. We have analyzed the PHACOS production abilities of the wild-type strain *Pseudomonas putida* KT2442 vs. its derived strain *P. putida* KT42FadB, mutated in the *fadB* gene from the central metabolic  $\beta$ -oxidation pathway involved in the synthesis of medium-chain-length PHA (mcl-PHA). Different fermentation strategies based on one- or two-stage cultures have been tested resulting in PHACOS with different monomer composition. Using decanoic acid as inducer of the growth and polymer synthesis and 6-acetylthiohexanoic acid as PHA precursor in a two-stage strategy, the maximum yield was obtained by culturing the strain KT42FadB. Nuclear magnetic resonance and gas chromatography coupled to mass spectrometry showed that polymers obtained from the wild-type and KT42FadB strains, included 6-acetylthio-3-hydroxyhexanoic acid (OH-6ATH) and the shorter derivative 4-acetylthio-3-hydroxybutanoic acid (OH-4ATB) in their composition, although in different ratios. While the polymer

obtained from KT42FadB strain contained mainly OH-6ATH monomer units, mcl-PHA produced by the wild-type strain contained OH-6ATH and OH-4ATB. Furthermore, polyesters showed differences in the OH-alkyl derivatives moiety. The strain KT42FadB overproduced PHACOS when compared to the production rate of the control strain in one- and two-stage cultures. Thermal properties obtained by differential scanning calorimetry indicated that both polymers have different glass transition temperatures related to their composition.

**Keywords** *Pseudomonas putida* KT2442 · Polyhydroxyalkanoates · Functionalized PHA · Thioester side chain

## Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are nontoxic, biodegradable, and biocompatible polyesters produced by a wide range of bacteria, including pseudomonads (Huisman et al. 1991; Rehm 2010) that are being considered as biodegradable bioplastics and biomaterials for tissue engineering (Chen 2009; Chen and Wu 2005a; Sendil et al. 1999; Valappil et al. 2006; Zinn et al. 2001). Furthermore, PHAs have also attracted considerable attention due to their potential use as sources of chiral monomers, scaffolds for the synthesis of added-value products since they are composed of enantiopure (*R*)-3-hydroxy fatty acids (Chen and Wu 2005b; de Eugenio et al. 2010a; Ren et al. 2010). PHA properties span from rigid and highly crystalline to flexible, rather amorphous and elastomeric depending on their monomer composition and the length of the side group in the polymer. Thus, short-chain-length PHAs (scl-PHAs), containing monomers consisting of 4 to 5 carbon atoms, are stiff and brittle polyesters of high

I. F. Escapa · V. Morales · J. L. García · M. A. Prieto (✉)  
Environmental Biology Department,  
Centro de Investigaciones Biológicas,  
CSIC, Ramiro de Maeztu, 9,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: auxi@cib.csic.es

V. P. Martino · E. Pollet · L. Avérous  
LIPHT-ECPM, EA(CNRS) 4379, Université de Strasbourg,  
25 rue Becquerel,  
67087 Strasbourg Cedex 2, France



**3. Manipulación de los circuitos reguladores para la optimización del crecimiento y producción de PHA en *P. putida* KT2440 a partir de glicerol: el papel del represor GIpR**

---

Artículo enviado a la revista *Environmental Microbiology*



**Manipulating the regulatory circuits for the optimization of *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol: the role of GlpR repressor**

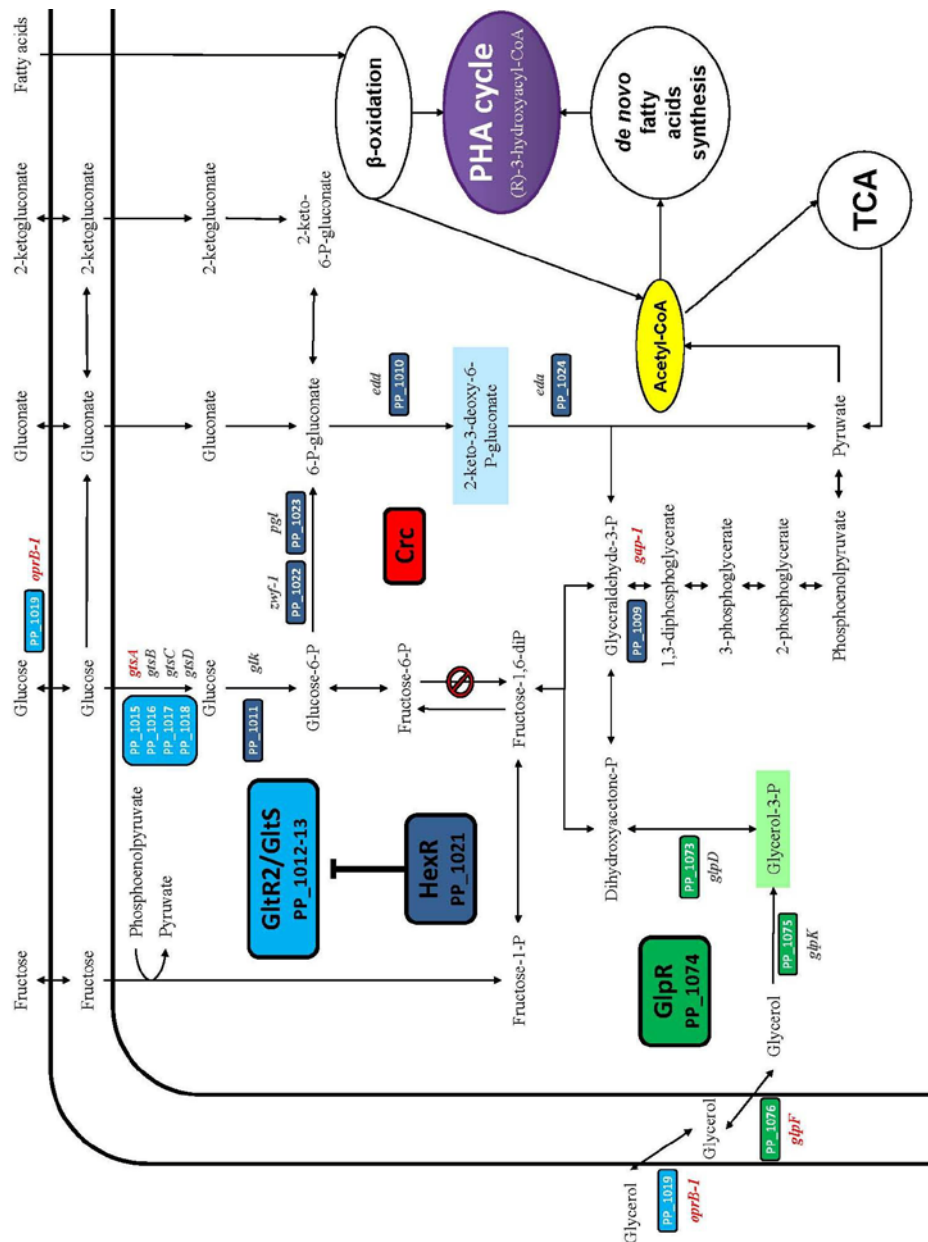
Escapa, I. F., del Cerro, C., García, J.L., and Prieto, M.A.

**Summary**

*Pseudomonas putida* KT2440 has evolved a tightly regulated system for metabolizing glycerol implying a prolonged growth lag-phase. We have learnt that this long lag-phase can be avoided by the addition of small amounts of some growth precursors. When octanoic acid was used as co-feeder, both growth and polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation were stimulated. To investigate this phenomenon, we have followed co-metabolic approaches combined with mutations of the specific and global regulatory networks connecting the glycerol catabolism and PHA synthesis. We have established that the GlpR regulator represses glycerol catabolism in this strain, being responsible for the long lag-phase. Based on this finding we have created a *glpR* knock-out mutant of *P. putida* KT2440 showing an efficient growth on glycerol. The production of PHA in this strain was improved not only for the reduction of the time invested in the process, but also to the higher final yield in terms of PHA accumulation when compared to that observed in wild type strain. This optimized glycerol consuming strain will be also very useful for the efficient transformation of raw glycerol into other valuable products.

### Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are storage bacterial polyesters accumulated in the cytoplasm as carbon and energy reserve materials that are synthesized when there is an unbalanced situation between the carbon supply and another essential nutrient, such as nitrogen or phosphorus (Madison and Huisman, 1999; Prieto, *et al.*, 2007; Rehm, 2010). These thermoplastic polymers have been proposed as a green alternative to the petroleum derivate material industry because of their biodegradable and recyclable nature (Luengo, *et al.*, 2003; Chen, 2009; Gao *et al.*, 2011). Large-scale production of PHAs implies elevated costs due to, not only to the fermentation and separation process (Sun *et al.*, 2007; Elbahloul and Steinbüchel, 2009; Martínez *et al.*, 2011), but also to the availability of appropriated carbon sources. Therefore, research efforts have been focused in the use of low cost industrial residues as fermentative substrates for PHA production (Solaiman *et al.*, 2006; Serafim *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2009). Glycerol is a by-product of biodiesel industry that has been postulated as one of the most attractive raw materials for the bacterial production of value-added products; it has been analyzed as substrate for PHA synthesis in natural PHA producers (Bormann and Roth, 1999; Cavalheiro *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2009; Ibrahim and Steinbüchel, 2010; Kawata and Aiba, 2010), including Pseudomonads (Huijberts *et al.*, 1992; Ashby *et al.*, 2005; Solaiman *et al.*, 2006), as well as in recombinant *Escherichia coli* carrying *pha* biosynthetic genes (Mahishi *et al.*, 2003; Nikel *et al.*, 2008). Some of the more extensively studied natural PHA producers are the *Pseudomonas* strains, especially *Pseudomonas putida* KT2440, a mcl-PHA producer that is a prototype microorganism for biotechnological purposes with a vast potential for environmental and industrial applications (Nelson *et al.*, 2002; Escapa *et al.*, 2011).



**Figure 1.** Scheme of glycerol and carbohydrates biochemical pathways in *P. putida* KT2440 based on genome annotation and the works by Schweizer and Po (1996), del Castillo *et al.* (2008), and Kim *et al.* (2008). Gene names and identification numbers as annotated in the genome data bank (KEGG Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) are shown. Genes enclosed in dark green boxes are under the control of the GlpR transcriptional regulator, whose inducer is glycerol-3-P (G3P) (light green box) (Schweizer and Po, 1996). Genes enclosed in blue boxes are under the control of the HexR transcriptional regulator directly (dark blue), or indirectly through GltR2/GltS two component system (cyan) (del Castillo *et al.*, 2008). 2-keto-3-deoxy-6-P-gluconate (KDPG) (light blue box) has been proposed to be HexR inducer (Daddaoua *et al.*, 2009). Gene names highlighted in red color identified genes bearing a Crc (catabolite repression control regulatory protein) binding motif (Browne *et al.*, 2010). *oprB-1*, outer-membrane porin; *gtsABCD*, sugar ABC transporter; *glk*, glucokinase; *zwf-1*, glucose 6-P dehydrogenase; *pgl*, 6-phosphogluconolactonase; *edd*, 6-phosphogluconate dehydratase; *eda*, 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase; *gap-1*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); *glpF*, glycerol facilitator; *glpK*, glycerol kinase; *glpD*, G3P dehydrogenase.

The improvement of glycerol utilization in bacterial PHA producers implies the study of the metabolic steps involve in glycerol catabolism, as well as their links with the central metabolic routes that connect glycerol dissimilation with PHA synthesis (Fig. 1). Within the *Pseudomonas* species glycerol uptake and metabolism have been biochemically characterized in the opportunistic human pathogen *P. aeruginosa*, in which glycerol can be utilized as an important carbon source within the lung (Williams *et al.*, 1994). In this strain the first step in glycerol uptake is mediated by OprB; an outer-membrane porin which is over-expressed under glycerol limitation (Williams *et al.*, 1994). A glycerol facilitator (GlpF), also involved in glycerol transport, is closely associated with a glycerol kinase (GlpK) that converts glycerol to glycerol 3-phosphate (G3P) (Fig. 1) (Schweizer *et al.*, 1997). Then, G3P is transformed to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) by a cytoplasmic-membrane-associated G3P dehydrogenase (GlpD) (Schweizer and Po, 1994), and the DHAP is further catabolized by a branch of the Entner-Doudoroff (ED) pathway (McCowen *et al.*, 1981; Cuskey and Phibbs, 1985). The *glp* operons (*glpFK* and *glpD*) of *P. aeruginosa* are negatively regulated by GlpR (Schweizer and Po, 1996). Nevertheless, our current knowledge concerning glycerol catabolism in *P. putida* is still very limited and it has been mainly based in its genome annotation (KEGG Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; Nelson *et al.*, 2002) and in the information derived from *P. aeruginosa* (Schweizer and Po, 1996). Figure 1 summarizes the proposed interconnections between glycerol catabolism and the other biochemical pathways (*e.g.*, carbohydrate catabolism, ED pathway, fatty acid oxidation and *de novo* synthesis, and PHA cycle) in *P. putida*, as well as the regulatory network driving these routes.

In this work, we have combined different co-metabolic strategies with the

manipulation of the specific and global regulatory networks to improve growth and PHA production in *P. putida* KT2440 when glycerol is used as the main carbon source. Our results demonstrate the key role played by the GlpR regulator in the optimization of PHA production from glycerol.

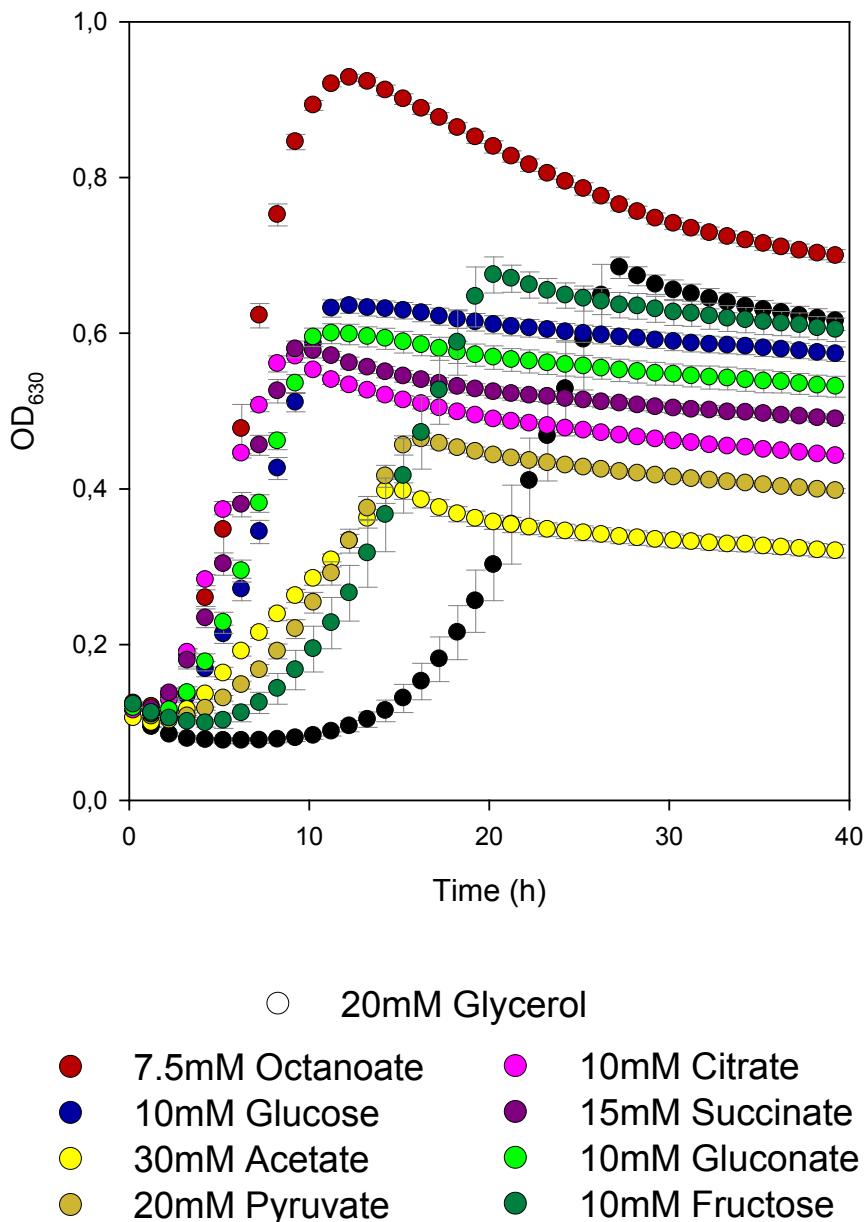
## Results

*Analyses of the P. putida KT2440 growth profiles as function of the carbon source:*

*The lag-phase of glycerol culture.*

Fatty acids are currently used as preferred substrates for the microbial mcl-PHA synthesis in Pseudomonads (Solaiman *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007; de Eugenio *et al.*, 2010b). To optimize the PHA production on non preferred industrial raw precursors, the growth of *P. putida* KT2440 on fatty acids and other carbon sources has been compared. Thus, quantitative growth assays were performed in M63 minimal medium in microwell plates using diverse carbon and energy sources that are incorporated to the central metabolism at different stages (Fig. 2). It is worth to mention that PHA production in *P. putida* KT2440 on octanoate can be achieved even under no nutrient limitations (Wang and Nomura, 2010; Follonier *et al.*, 2011). However, PHA accumulation in KT2440 requires a carbon/nitrogen (C/N) unbalance when PHA non related precursors such as gluconate are used as carbon sources (Follonier *et al.*, 2011). This phenomenon is shown by the remarkable difference in the OD<sub>630</sub> reached by cells growing in octanoate (from 9 hours on) comparing to the rest of the growth curves. The apparent growth rate in octanoate during the first 9 hours (*i.e.*, when PHA accumulation does not influence OD<sub>630</sub>) is 0.132 h<sup>-1</sup>. As expected, this is the highest

growth rate achieved from all the assayed carbon sources. Acetate and pyruvate showed the lowest growth rates, *i.e.*,  $\mu=0.024 \text{ h}^{-1}$  and  $\mu=0.041 \text{ h}^{-1}$ , respectively. When fructose or glycerol were used as the sole carbon source the growth rates were  $\mu=0.053 \text{ h}^{-1}$  and  $\mu=0.058 \text{ h}^{-1}$ , respectively, but cultures in glycerol showed a long lag-phase (up to 15 hours). The second highest rate corresponded to citrate ( $\mu=0.090 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figure 2.** OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT2440 cells growing in M63 media using different substrates as carbon sources. The represented values are the average ( $n \geq 6$ ) of the OD<sub>630</sub> data obtained from the 96-microwell experiments.

Thereafter, flask experiments were also performed to confirm these data (Table 1). When octanoate was used as substrate *P. putida* KT2440 produced around a 20% of PHA (% CDW), in agreement with the production observed when fatty acids are used as carbon sources in a C/N balanced medium (Follonier *et al.*, 2011). Final biomass free of PHA on octanoate was 0.76 g/l (g/l measured as total cell dry weight (CDW) minus g/l of PHA). As expected, PHA was not detected when any of the carbon sources different to fatty acid were assayed. Acetate and pyruvate reached the lower biomass values (0.54 g/l and 0.63 g/l, respectively), while the highest yields corresponded to fructose and glycerol (0.94 g/l and 0.93 g/l, respectively). Despite glycerol does not provide an elevated growth rate, the high biomass yield reached with this substrate makes it a suitable carbon source for fermentative processes (Pachauri and He 2006; Solaiman *et al.*, 2006). However, for scaling up purposes, shorting the extremely long lag-phase observed in glycerol is demanded.

**Table 1.** Growth parameters of M63 media *P. putida* KT2440 cultures.

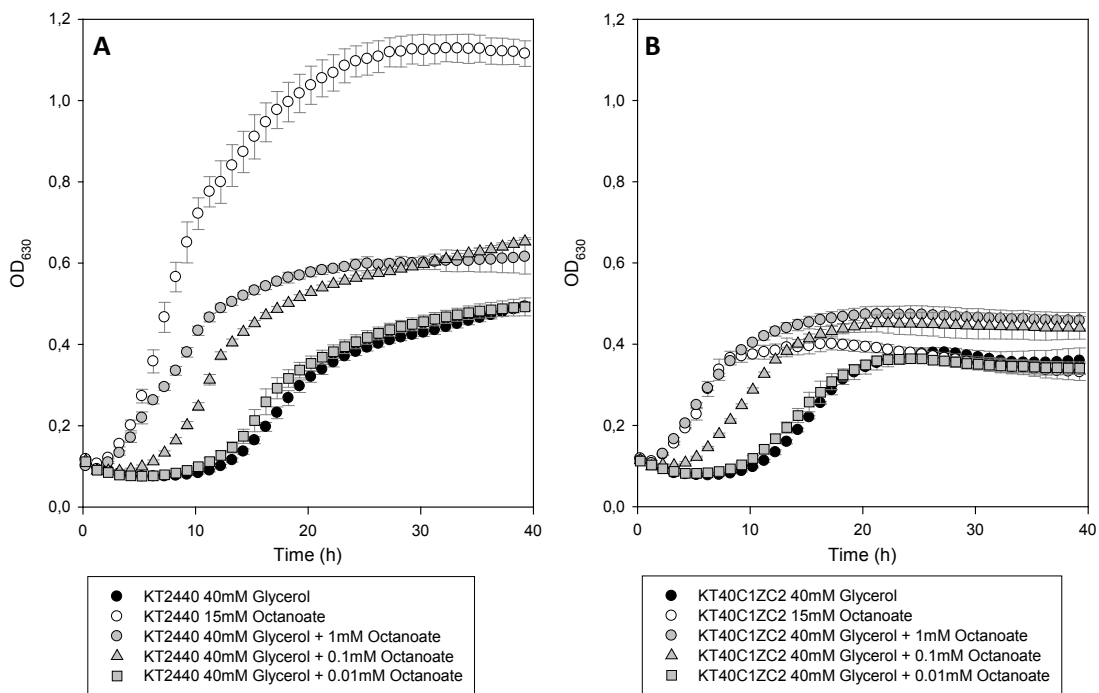
| Substrate       | DO <sub>600</sub> | Biomass (g/l) | PHA (% CDW) |
|-----------------|-------------------|---------------|-------------|
| 20mM Glycerol   | 2.12              | 0.93          | nd          |
| 7.5mM Octanoate | 2.15              | 0.97          | 21%         |
| 10mM Glucose    | 2.41              | 0.82          | nd          |
| 30mM Acetate    | 1.28              | 0.54          | nd          |
| 20mM Pyruvate   | 1.57              | 0.63          | nd          |
| 10mM Citrate    | 1.72              | 0.65          | nd          |
| 15mM Succinate  | 1.76              | 0.71          | nd          |
| 10mM Gluconate  | 2.03              | 0.80          | nd          |
| 10mM Fructose   | 2.,19             | 0.94          | nd          |

nd, not detected; CDW, Cell Dry Weight.

Data obtained in flask cultures after 46 h. The results corresponding to one experiment are shown, and values were reproducible in three separate experiments, with standard deviations of < 10%.

*Fatty acid based co-feeding strategies for stimulation of glycerol growth versus PHA and TCA (tricarboxylic acid) cycles activities.*

To design fermentation strategies for an efficient mcl-PHA production on glycerol in *P. putida* KT2440 we took into account that PHA metabolism and  $\beta$ -oxidation pathway are coordinately regulated in *P. putida* KT2440 via PhaD transcriptional activator (de Eugenio *et al.*, 2010b). PhaD allows the efficient transcription of *pha* genes when fatty acids or related intermediates of the  $\beta$ -oxidation pathway are available (de Eugenio *et al.*, 2010b). Moreover, we took advantage of the fact that co-metabolism with fatty acids has been applied to increase PHA production yields (Lenz *et al.*, 1992; Zinn *et al.*, 2001; Escapa *et al.*, 2011).



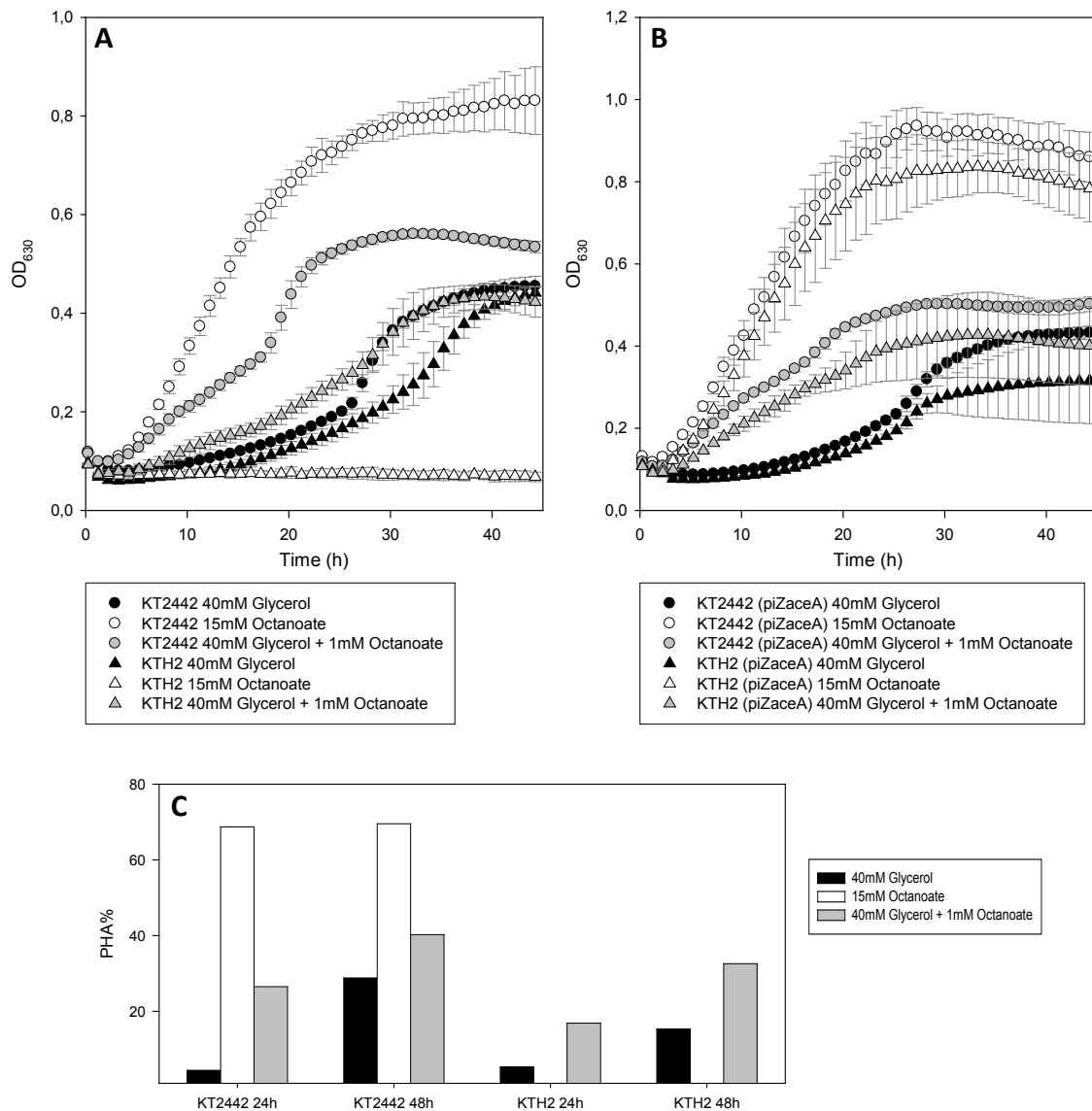
**Figure 3.** Fatty acid based co-feeding strategies for stimulation of glycerol growth *versus* PHA accumulation **A.** OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT2440 cells growing in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white circles) or 40 mM glycerol plus different octanoate concentrations (grey symbols) as carbon sources. **B.** OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT40C1ZC2 cells growing in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white circles) or 40 mM glycerol plus different octanoate concentrations (grey symbols) as carbon sources. The represented values are the average (n ≥ 6) of the OD<sub>630</sub> data obtained from the 96-microwell experiments.

Based on these observations, we have analyzed the effect of fatty acid co-feeding on growth and PHA production when cells of *P. putida* KT2440 were cultured in glycerol as carbon and energy source under PHA production conditions (*i.e.*, unbalanced high C/N ratio) (Fig. 3A). In the cultures induced with octanoate we have observed a higher final OD<sub>630nm</sub> that would be traduced in an enhanced growth, but also could be owing to the accumulation of a higher amount of PHA. Even more interesting was the unexpected observation that the lag-phase on glycerol was exceptionally reduced due to the presence of octanoate. When PHA accumulation was analyzed after 46 h of culture we observed a production of  $19 \pm 2\%$  of CDW in 40 mM glycerol vs.  $27 \pm 2\%$  in 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate. This effect was also detected in the presence of 0.1 mM octanoate.

These data allowed us to speculate about a putative role of the PHA cycle for controlling the metabolism of glycerol via initial transformation of octanoate into PHA. To study this possibility, we analyzed the growth profile of *P. putida* KT40C1ZC2, a *P. putida* KT2440 mutant unable to accumulate the polyester due to a deletion in the *phaC1ZC2* genes, coding for the PHA synthases and depolymerase (Fig. 3B, see Experimental procedures for details of the strain construction). We observed in the PHA minus mutant a similar octanoate effect over glycerol lag-phase, demonstrating that this phenomenon is not linked to the activity of PHA cycle.

By serendipity, we had observed that *P. putida* KTH2, one of our collection strains, was not able to growth using octanoate as substrate (Fig. 4). When we tested the effect of octanoate on this strain, we observed that it was not able to stimulate glycerol growth (Fig. 4) suggesting that this stimulation was linked to the catabolism of

octanoate. *P. putida* KTH2 is a *P. putida* KT2442 derivative bearing an *hpaBC* cassette encoding the *E. coli* 4-HPA hydroxylase introduced into the chromosome via mini-transposon (Prieto *et al.*, 1996). Remarkably, other transconjugants of our collection bearing the same mini-transposon were able to grow in octanoate (data not shown) suggesting that the mini-transposon integrated in KTH2 had produced a disruption of a key gene for fatty acid catabolism. In fact, we have now demonstrated that the mini-transposon integration has generated an *aceA* disruption mutant in *P. putida* KTH2 (see Experimental procedures section). The *aceA* gene encodes the isocitrate lyase and its deletion impairs fatty acid metabolism due to a blockage of the glyoxylate bypass of the TCA cycle (Kornberg and Krebs, 1957; Kornberg, 1966). Figure 4A shows that octanoate induction over glycerol consumption is nearly undetectable in *aceA*<sup>-</sup> mutant strain compared to the wild type. This result suggests that either octanoate degradation to central intermediates from TCA cycle or gluconeogenesis is required to activate glycerol utilization in *P. putida*. This effect was confirmed by complementation of the *aceA*<sup>-</sup> mutant, showing that *P. putida* KTH2 phenotype was exclusively due to the *aceA* mutation (Fig. 4B). Interestingly, despite of the lack of octanoate induction over glycerol growth in the strain KTH2, the analysis of PHA production from glycerol showed that both strains (KT2442 and KTH2) accumulated PHA more efficiently when glycerol is supplemented with octanoate (Fig. 4C). This result suggests that although octanoate cannot support the growth of KTH2, it can contribute to the synthesis of PHA through the PHA cycle.

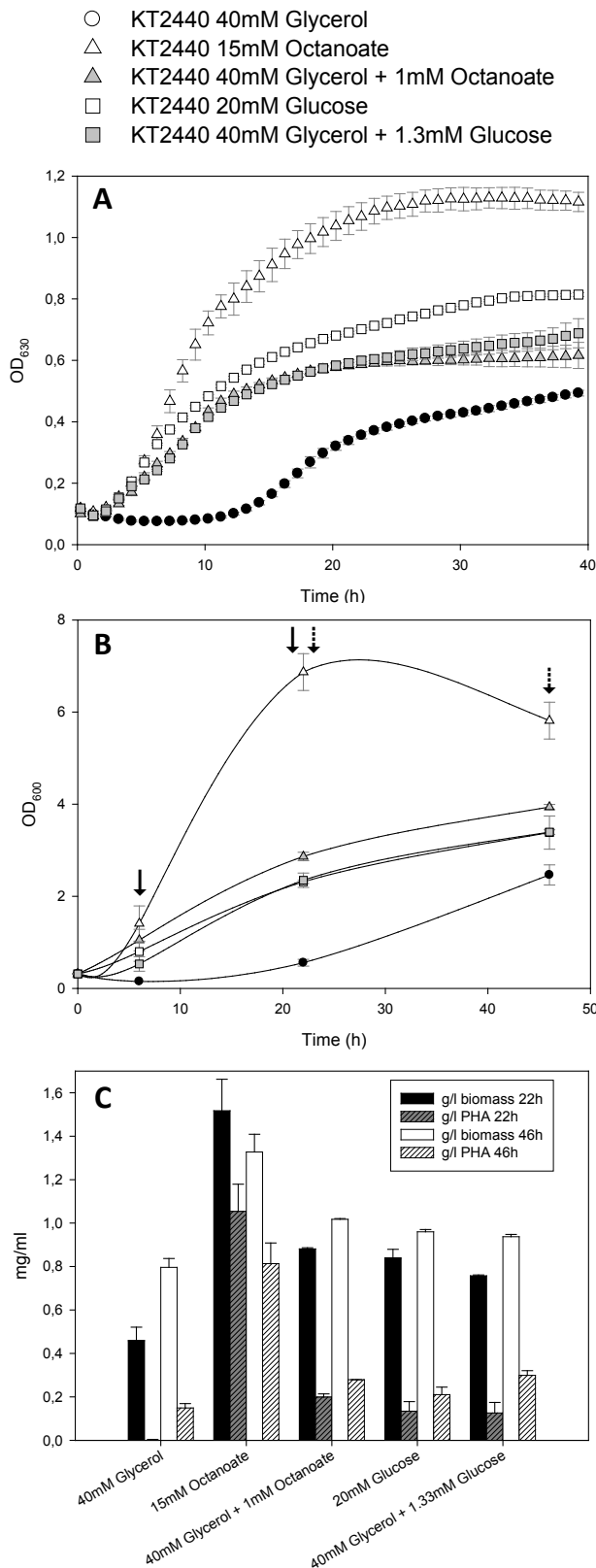


**Figure 4.** Fatty acid based co-feeding strategies for stimulation of glycerol growth *versus* TCA cycle functionality **A.**  $OD_{630}$  turbidimetric profiles of *P. putida* KT2442 (circles) and *P. putida* KTH2 (triangles) cells growing in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black symbols), 15 mM octanoate (white symbols) or 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey symbols) as carbon sources. **B.**  $OD_{630}$  turbidimetric profiles of *P. putida* KT2442 (piZaceA) (circles) and *P. putida* KTH2 (piZaceA) (triangles) cells growing in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black symbols), 15 mM octanoate (white symbols) or 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey symbols) as carbon sources. The represented values are the average ( $n \geq 6$ ) of the  $OD_{630}$  data obtained from the 96-microwell experiments. **C.** PHA content (% of the total CDW) of *P. putida* KT2442 and *P. putida* KTH2 cells growing in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black bars), 15 mM octanoate (white bars) or 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey bars) as carbon sources. The results corresponding to one experiment are shown, and values where reproducible in three separate experiments, with standard deviations of < 10%.

#### *Glycerol catabolism in P. putida KT2440 relies on an active ED pathway.*

The results described above suggested that the role of octanoate over glycerol growth could rely either on a global activation of the cell energy state or on the generation of specific metabolites or cofactors needed for the activation of glycerol metabolism. To study this effect we compared growth and PHA accumulation of *P. putida* KT2440 under low nitrogen conditions (M63 0.1N media) using glycerol as the main carbon source with a small dosage of glucose or octanoate as co-feeders (Fig. 5). These results were also compared with that obtained from *P. putida* KT2440 cells growing exclusively with octanoate or glucose as carbon sources (Fig. 5). We observed similar growth stimulation pattern, this is, significant reduction of the initial lag-phase in glycerol, when carbon equimolar concentrations of octanoate or glucose were added to the glycerol growth media. As expected, in both cases cultures reached a higher final total biomass (around 1 g/l) than that observed when glycerol is used as the sole carbon source ( $0.8 \pm 0.04$  g/l) (Fig. 5C). Concerning PHA accumulation levels, when 1 mM octanoate was added to the media the cells accumulated a higher amount of PHA ( $31 \pm 1\%$  of CDW) than the cells using only glycerol as carbon source ( $21 \pm 4\%$  of CDW), or when glycerol was co-fed with glucose ( $20 \pm 2\%$  of CDW). This PHA increase observed in the presence of octanoate could be due to an increment of available PHA synthase substrates in the cytoplasm directly generated by  $\beta$ -oxidation of octanoate. This result is in agreement with the higher amount of 3-hydroxyoctanoate (C8) monomers present in this polyester compared to that produced from other carbon sources (see Supporting information Fig. S1). Summing up, co-feeding of glycerol containing media with a non-related PHA carbon source like glucose stimulate glycerol growth, but not PHA accumulation in *P. putida* KT2440, whereas co-feeding with a

related PHA carbon source like octanoate stimulate both glycerol growth and PHA production.



**Figure 5. A.** Evaluation of glycerol growth stimulation, biomass and PHA production in the strain *P. putida* KT2440. OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT2440 cells growing in microtiter plates in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white triangles), 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey triangles), 20 mM glucose (white squares) or 40 mM glycerol plus 1.3 mM glucose (grey squares) as carbon sources. The represented values are the average (n ≥ 6) of the OD<sub>630</sub> data obtained from the 96-microwell experiments. **B.** OD<sub>600</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT2440 cells growing in shaking flasks in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white triangles), 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey triangles), 20 mM glucose (white squares) or 40 mM glycerol plus 1.3 mM glucose (grey squares) as carbon sources. Media and standard deviation of three independent flask culture experiments are shown. ↓ indicates times of cultivation in which samples were taken for GADPH enzymatic assays. † indicates times of cultivation in which samples were taken for biomass and PHA content determination assays. **C.** Biomass and PHA content (mg/ml) of panel B cultures.

As detailed in Figure 1, once glycerol is transported into the cells, activated to G3P and transformed into DHAP by the action of the enzymes encoded by *glp* genes, it should be further catabolised by a branch of the ED pathway (McCowen *et al.*, 1981; Cuskey and Phibbs, 1985). This path connects the catabolic routes for glucose and glycerol assimilation to the gluconeogenesis and fatty acid catabolism via pyruvate (Fig. 1). Therefore, the stimulating phenotype observed for the cells growing in glycerol co-feed with a low amount of glucose or octanoate must correlate with the activation of the ED route. To demonstrate this assumption, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) enzymatic activity has been assayed after 6 and 22 hours of growth of *P. putida* KT2440 in different conditions (Table 2). Interestingly, when octanoate was used as carbon source, only a basal level of GAPDH activity was detected. As expected, a basal activity was detected after 6 hours in glycerol due to the lag-phase. After 22 hours of culturing in glycerol, the GAPDH enzymatic activity is more than tenfold compared to the basal level and in the range of the observed for glucose (Table 2). The induction of GAPDH activity is also evident when *P. putida* KT2440 strain was grown in glycerol in the presence of glucose or octanoate as inducers. Taking into account that octanoate is not metabolized through the ED pathway, and therefore, it does not induce GAPDH, this result suggests that the co-feeding effect cannot be ascribed specifically to a pre-activation of the ED pathway by fatty acids. Nevertheless, it is important to notice that the observed concomitant activation of the catabolic NAD<sup>+</sup> dependent GAPDH with glycerol utilization demonstrates that an efficient glycerol catabolism in *P. putida* KT2440 relies on an active ED pathway. Therefore, we can conclude that the ED pathway is activated due to glycerol metabolism and not to fatty acid metabolism.

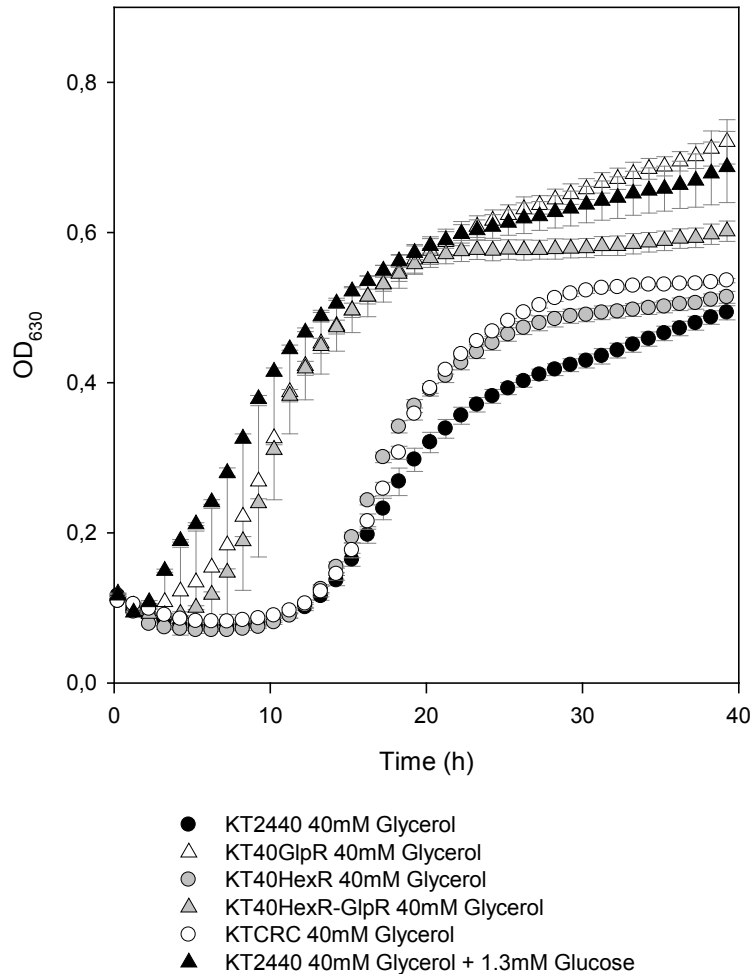
**Table 2.** GAPDH enzymatic activities (nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) after 6 and 22 hours of culture.

| Substrates                 | <i>P. putida</i> KT2440 |          | <i>P. putida</i> KT40GlpR |         |
|----------------------------|-------------------------|----------|---------------------------|---------|
|                            | 6 h                     | 22 h     | 6 h                       | 22 h    |
| 40mM Glycerol              | 36 ± 2                  | 514 ± 13 | 307 ± 10                  | 88 ± 6  |
| 15mM Octanoate             | 55 ± 2                  | 36 ± 1   | 36 ± 1                    | 24 ± 2  |
| 40mM Glycerol + 1mM Oct    | 545 ± 22                | 59 ± 2   | 641 ± 21                  | 61 ± 6  |
| 20mM Glucose               | 629 ± 27                | 166 ± 9  | 770 ± 45                  | 132 ± 2 |
| 40mM Glycerol + 1.33mM Glc | 401 ± 20                | 120 ± 5  | 485 ± 43                  | 77 ± 1  |

Media and standard deviation of three independent flask culture experiments are shown.

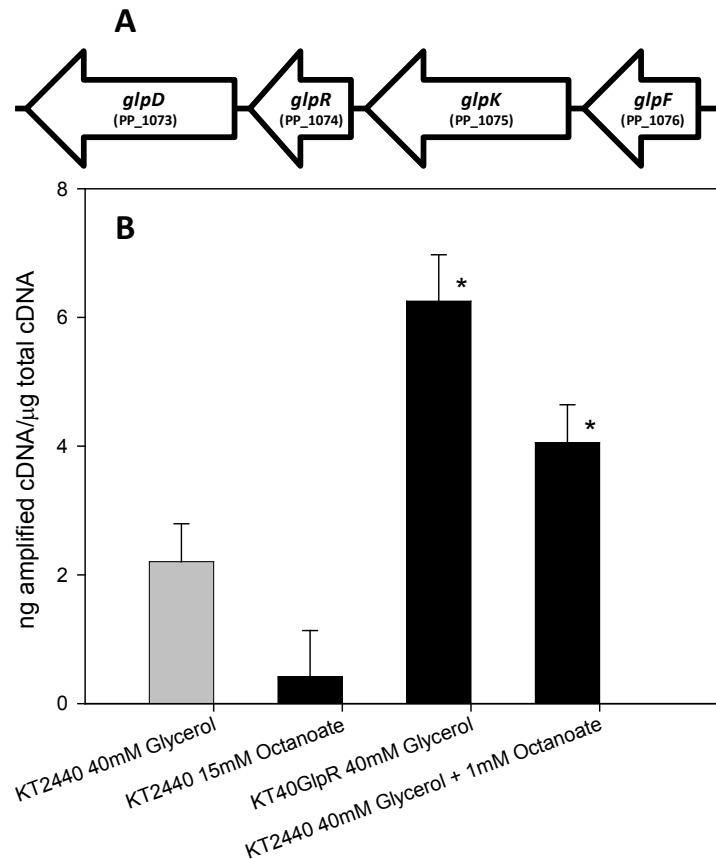
*Inactivation of the transcriptional regulator GlpR allows P. putida KT2440 to use glycerol as optimal PHA and growth precursor.*

According to Figure 1 we had proposed that GlpR and HexR transcriptional regulators, as well as Crc global carbon metabolism post-transcriptional regulator, form part of the regulatory network controlling the central metabolic pathways connected to ED route, including glycerol route. To investigate their role in the co-feeding activation effect, the *glpR*, *hexR* and *crc* genes were deleted in *P. putida* generating single and double mutant strains (see Experimental procedures for details in the constructions). When the effect of these deletions over *P. putida* KT2440 glycerol growth were analyzed (Fig. 6), we observed that the *glpR*<sup>-</sup> mutant (strain KT40GlpR) did not show the long lag-phase in glycerol detected in the wild type strain. However, the deletion of *hexR* gene (strain KT40HexR) did not change the growth curve of *P. putida* KT2440 on glycerol and moreover, the *hexR*<sup>-</sup>-*glpR*<sup>-</sup> double mutant (strain KT40HexR-GlpR) behaved as the single *glpR*<sup>-</sup> mutant (strain KT40GlpR) suggesting that HexR is not involved in the glycerol lag-phase effect. Finally, the mutation on *crc* (strain KTCRC) did not modify the long lag-phase on glycerol, suggesting that, CRC is not involved in this phenomenon.



**Figure 6.** Glycerol growth stimulation by inactivation of the transcriptional regulator GlpR. OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles in M63 0.1N media of *P. putida* KT2440 cells using 40 mM glycerol (black circles) or 40 mM glycerol plus 1.3 mM glucose (black triangles) as carbon sources and *P. putida* KT2440 mutant strains using 40 mM glycerol (KT40GlpR, white triangles; KT40HexR, grey circles; KT40HexR-GlpR, grey triangles; KTCRC, white circles). The represented values are the average (n ≥ 6) of the OD<sub>630</sub> data obtained from the 96-microwell experiments.

The stimulatory effect on glycerol growth observed in the absence of GlpR was confirmed by measuring the activity of the GAPDH in the KT40GlpR mutant (Table 2). As expected, GAPDH activity is activated at 6 hours of growth when cells of *P. putida* KT40GlpR were cultured in glycerol (Table 2). It is interesting to notice that the GAPDH expression is not constitutive in the KT40GlpR mutant since it remains at basal levels when cells are cultured in octanoate as the only carbon source. This result demonstrates that although the activation of ED pathway depends of the presence of glycerol it is not directly regulated by GlpR.

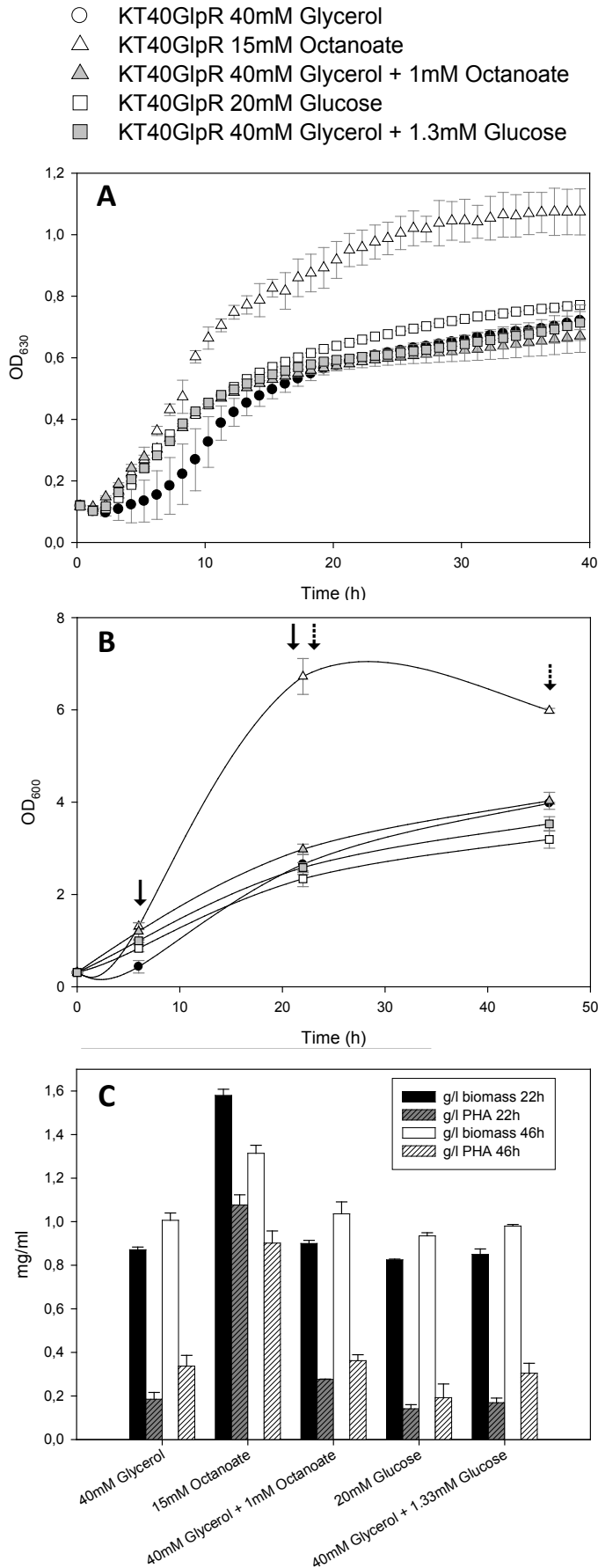


**Figure 7.** Transcriptional analysis by qRT-PCR of *glpF* gene in *P. putida* KT2440 and *GlpR* minus strains. **A.** Genetic organization of *glp* cluster in *P. putida* KT2440 based on genome data bank annotation (KEGG Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) and *P. aeruginosa* *glp* cluster analysis (Schweizer and Po, 1996). *glpF*, glycerol facilitator; *glpK*, glycerol kinase; *glpD*, G3P dehydrogenase; *glpR*, glycerol transcriptional regulator. **B.** Transcriptional analysis by qRT-PCR of *P. putida* KT2440 *glpF* gene. Media and standard error from three independent biological replicas are shown. \* Indicates statistical significance of  $p < 0.05$  between the expression level of the gene in *P. putida* KT2440 growing in 40 mM glycerol (grey bar) and the referred condition (black bars) (see Experimental Procedures section).

It has been proposed that in *P. putida* KT2440, *glpR* controls the expression of the *glp* genes (Fig. 1). According to genome annotation, the *glpF* gene coding for the glycerol facilitator and the *glpK* gene coding for the glycerol kinase seem to form an operon located upstream of *glpR*, whereas the *glpD* gene encoding the glycerol-3-phosphate dehydrogenase is located downstream of *glpR* (Fig. 7A). To confirm the implication of *GlpR* in the expression of these genes during the lag-phase (*i.e.*, during the first 3 hours of growth) we have determined by qRT-PCR the expression of *glpF* in the wild type *P. putida* KT2440 strain and in the *glpR*<sup>-</sup> mutant cultured in glycerol. No

statistically significant differences in *glpF* transcription levels during the lag-phase were detected when *P. putida* KT2440 cells growing in 15 mM octanoate as the sole carbon source were compared with 40 mM glycerol as unique substrate, suggesting that the lag-phase is due to a poor induction of the *glpFK* operon (Fig. 7B). However, when *P. putida* KT2440 was grown in a mixture of 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate, the *glpF* expression increased significantly, suggesting that the presence of octanoate contributes to the induction of the *glpFK* operon and thus, to activate glycerol consumption (Fig. 7B). The finding that the expression of *glpF* was very high in the KT40GlpR mutant strain in the presence of glycerol (Fig. 7B) suggests that GlpR is a repressor and agrees with the absence of lag-phase in this mutant when growing in glycerol.

In addition, we have analyzed how the deletion of GlpR repressor affects bacterial growth and PHA accumulation using glycerol as carbon source and small dosages of octanoate or glucose as co-feeding inducers (Fig. 8). As predicted, the initial growth long lag-phase disappears in KT40GlpR independently of inducer addition (Fig. 8A and 8B). While *P. putida* KT2440 wild type strain achieved a biomass of only  $0.50 \pm 0.06$  g/l after 22 hours of culture using glycerol as the sole carbon source (Fig. 5C), the KT40GlpR mutant strain reached  $0.90 \pm 0.01$  g/l (Fig. 8C). Furthermore, *P. putida* KT40GlpR mutant strain growing in glycerol accumulates a higher amount of PHA ( $34 \pm 6\%$  of CDW) (Fig. 8C), than the wild type strain ( $21 \pm 4\%$  of CDW) (Fig. 5C). This suggests that *glpR* inactivation in *P. putida* KT2440 not only results in a more rapid use of glycerol, but also allows a higher accumulation of PHA polymer, very likely due to an increase in the availability of central metabolites that are channeled to the polyester synthesis.



**Figure 8.** Evaluation of glycerol growth stimulation, biomass and PHA production in the strain *P. putida* KT40GlpR **A.** OD<sub>630</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT40GlpR cells growing in microtiter plates in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white triangles), 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey triangles), 20 mM glucose (white squares) or 40 mM glycerol plus 1.3 mM glucose (grey squares) as carbon sources. The represented values are the average (n ≥ 6) of the OD<sub>630</sub> data obtained from the 96-microwell experiments. **B.** OD<sub>600</sub> turbidimetric profiles of *P. putida* KT40GlpR cells growing in shaking flasks in M63 0.1N media using 40 mM glycerol (black circles), 15 mM octanoate (white triangles), 40 mM glycerol plus 1 mM octanoate (grey triangles), 20 mM glucose (white squares) or 40 mM glycerol plus 1.3 mM glucose (grey squares) as carbon sources. Media and standard deviation of three independent flask culture experiments are shown. ↓ indicates times of cultivation in which samples were taken for GADPH enzymatic assays. ↓ indicates times of cultivation in which samples were taken for biomass and PHA content determination assays. **C.** Biomass and PHA content (mg/ml) of panel B cultures.

### Resultados: Capítulo 3

Finally, for optimizing the PHA production, we have analyzed the PHA accumulation in KT40GlpR mutant strain at high C/N ratio. Wild type and mutant cells were cultured in 0.1N M63 medium containing 40 mM glycerol (C/N ratio of 40 mol/mol) or 80 mM glycerol (C/N ratio of 80 mol/mol) (Table 3). In this deeply C/N unbalance nutrient situation *P. putida* is able to reach high levels of PHA without compromise cell growth. The strain *P. putida* KT40GlpR accumulates higher levels of PHA than the wild type strain not only at 22 h of growth, when the wild type strain does not produce PHA, but even after 46 h reaching  $39 \pm 5\%$  of CDW, nearly double of the value achieved by the wild type strain.

**Table 3.** Growth parameters of M63 0.1N media *P. putida* cultures.

| Substrate      | Strain (culture time) | Total CDW (g/l) | PHA (% CDW) | PHA (g/l)       |
|----------------|-----------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 40 mM Glycerol | KT2440 (22h)          | $0.46 \pm 0.06$ | n.d.        | n.d.            |
|                | KT2440 (46h)          | $0.80 \pm 0.04$ | $19 \pm 2$  | $0.15 \pm 0.02$ |
|                | KT40GlpR (22h)        | $0.87 \pm 0.01$ | $21 \pm 4$  | $0.18 \pm 0.03$ |
|                | KT40GlpR (46h)        | $1.01 \pm 0.03$ | $34 \pm 6$  | $0.34 \pm 0.05$ |
| 80 mM Glycerol | KT2440 (22h)          | $0.56 \pm 0.09$ | $4 \pm 5$   | $0.02 \pm 0.05$ |
|                | KT2440 (46h)          | $1.02 \pm 0.10$ | $25 \pm 6$  | $0.26 \pm 0.06$ |
|                | KT40GlpR (22h)        | $0.89 \pm 0.10$ | $31 \pm 4$  | $0.28 \pm 0.01$ |
|                | KT40GlpR (46h)        | $1.22 \pm 0.03$ | $39 \pm 5$  | $0.47 \pm 0.06$ |

CDW, Cell Dry Weight.

n. d., non detected.

Media and standard deviation of three independent flask culture experiments are shown.

## Discussion

In the last decades we have attended to an important development of biodiesel industry and, therefore, to a decrease in the cost of some by-products generated in its synthesis (Solaiman *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2009). The crude glycerol obtained as the main derived sub-product of the industrial production of biodiesel cannot be used for direct food and cosmetic uses due to its low-grade purification quality (Johnson and Taconi, 2009). Thus, the development of new uses for this waste material will sensitively reduce the biodiesel production costs. As a result, glycerol has become a very attractive raw material in bacterial fermentation processes. The use of glycerol for microbial PHA synthesis has been analyzed in wild type microorganisms (revised in Gomez *et al.*, 2012), such as *Zobellella denitrificans*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Ralstonia eutropha*, several *Pseudomonas* strains, and *Bacillus* sp. (Bormann and Roth, 1999; Solaiman *et al.*, 2006; Ibrahim and Steinbüchel, 2009; Reddy *et al.*, 2009; Ibrahim and Steinbüchel, 2010). Glycerol has also been used as substrate for PHB synthesis in recombinant *E. coli* carrying the PHB biosynthetic genes (Mahishi *et al.*, 2003; Nikel *et al.*, 2008). PHAs obtained from glycerol were reported to show differences in terms of molecular weight with polymers synthesized from other substrates, and these differences are species dependent (Ashby *et al.*, 2005; Cavalheiro *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2009; de Almeida *et al.*, 2010).

In this work we have constructed a *P. putida* KT2440 derivative strain in which the deletion of *glpR*, the transcriptional repressor driven *glp* genes regulation, provides an efficient PHA accumulation using glycerol as growth and polyester precursor. We have demonstrated that GlpR regulator represses glycerol catabolism in this strain, and that

this repression appears to be responsible of the long lag-phase observed when cells were cultured in glycerol as the sole carbon and energy source (Fig. 2).

Glycerol metabolism has not been studied in detail in the environmental model strain *P. putida* KT2440 and therefore, only few biochemical and genetic data were available on this issue. According to genome annotation, the *glp* cluster (PP\_1076 to PP\_1073) exhibits a high degree of sequence identity of about 83%, 82%, 80% and 72% for *glpF*, *glpK*, *glpR* and *glpD* genes, respectively, with the homologous genes of *P. aeruginosa* (PA\_3581 to PA\_3584) (KEGG Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Although some preliminary studies postulated the presence of a positive regulator (GlpR) controlling *glp* gene expression in *P. aeruginosa* (Cuskey and Phibbs, 1985), this observation was subsequently denied because it was demonstrated the existence of two *glp* operons (*glpFK* and *glpD*) negatively regulated by GlpR (Schweizer and Po, 1996), in agreement with the regulation of the *glp* operon in *E. coli* that is repressed by GlpR (Zeng and Larson, 1996). The *glp* operon of *E. coli* is repressed by GlpR in absence of intracellular glycerol (specific repression), although this regulation is thought to be leaky, since GlpK is required to produce G3P that is the true effector of the system (Applebee *et al.*, 2011). G3P has been also proposed as inducer of *P. aeruginosa glp* regulon (Schweizer and Po, 1996). Schweizer and Po (1996) have identified some putative GlpR binding sites upstream *glpF* and *glpD* genes of *P. aeruginosa* based on their identity with the *E. coli glp* operator consensus sequences. We have identified a similar operator site upstream the *glpF* gene of *P. putida* KT2440 (data not shown). The Mg<sup>2+</sup>-ATP-dependent phosphorylation of glycerol to G3P catalyzed by the glycerol kinase (GlpK) is the key regulatory and rate-limiting step in glycerol utilization in *E. coli* (Zwaig *et al.*, 1970).

GlpK activity is affected by multiple factors, *i.e.*, ATP concentration (Applebee *et al.*, 2011), allosteric inhibition by fructose-1,6-bisphosphate (FBP) (Zwaig and Lin, 1966; de Riel and Paulus, 1978), and inhibition by the IAGlc cytosolic component of the bacterial phosphotransferase system (Novotny *et al.*, 1985). These factors generated by the metabolism or the uptake of glucose inhibit GlpK activity during growth on glucose and other catabolically preferred substrates.

The implications of GlpK and G3P in the regulation of the first step in the metabolism of glycerol in *P. putida* have not been demonstrated yet but the results shown in figure 7 suggest that the GlpR driven control of *glp* genes requires the presence of glycerol in the culture medium very likely because a derived metabolite of glycerol is the GlpR effector. Our results are also in agreement with the studies of Wang and Nomura (2010) showing that the expression of *glpF*, *glpK* and *glpD* genes in *P. putida* KT2440 was higher in cells cultured in glycerol than in other carbon sources. Finally, it has been demonstrated that mutations in the genes involved in the phosphotransferase system of this strain altered the growth on glycerol, suggesting that the glycerol catabolism of *P. putida* is controlled by a complex regulatory network (Velazquez *et al.*, 2007).

It was early suggested that glycerol catabolism relies on a functional and active ED pathway in *P. aeruginosa* (Blevins *et al.*, 1975; Heath and Gaudy, 1978) and in *P. putida* (Aparicio *et al.*, 1971; Vicente and Cánovas, 1973). Heath and Gaudy (1978) proposed that glycerol metabolism depends on the activation of GAPDH and, therefore, on an active metabolism of the hexosephosphate derivatives. This hypothesis is in agreement with the increase of GAPDH activity observed when glycerol is efficiently

used by the *P. putida* wild type strain in the presence of co-feeding inducers or by the KT40GlpR mutant strain in the absence of inducers (Table 2).

The expression of the main metabolic steps of the phosphorylative branch of carbohydrates metabolism and ED pathway in *P. putida* KT2440 is tightly regulated (del Castillo *et al.*, 2008) (summarised in Fig. 1). HexR is a transcriptional repressor controlling some key steps of these routes, including the catabolic GAPDH enzyme codified by *gap-1* gene (Daddaoua *et al.*, 2009). The specific inducer of HexR is 2-keto-3-deoxy-6-P-gluconate (KDPG), an intermediate in the ED pathway that could play a relevant role as signalling molecule in catabolite repression (Daddaoua *et al.*, 2009; Rojo, 2010). Whether the connection between the metabolism of carbohydrates and glycerol can be also ascribed in *P. putida* to FBP as occurs in *E. coli* via GlpK regulation (see above) should be further analyzed.

The importance of Crc mediated catabolic repression in the ED pathway has also been reported, since several genes of this route, including *gap-1*, are over-expressed in a *P. putida* KT2440 *crc* mutant (Moreno *et al.*, 2009). Furthermore, Browne *et al.* (2010) have identified in this strain several Crc recognition motifs upstream *glpF*, *oprB-1* and *gap-1* genes. Although this finding suggested that Crc might be also involved in controlling the lag-phase observed in glycerol cultures, we did not observe a shortened lag-phase in a *P. putida* *crc*<sup>-</sup> mutant under the growth conditions assayed in this work.

Our results have demonstrated that GlpR is a key regulator controlling glycerol catabolism, but we cannot exclude the implication of other regulators (*e. g.*, HexR and Crc), some enzymes (*e. g.*, GlpK and GAPDH) and some metabolites (*e. g.*, G3P, ATP and FBP) in this complex regulatory network. In fact, we propose that the effect of

octanoate and glucose might be due to an activation of the basal GlpK activity causing an increase in the levels of G3P inducer. This activation might be most probably due to a punctual increase of the ATP levels that could activate GlpK, which would produce a small amount of G3P for opening the circuit.

The finding that the long lag-phase of *P. putida* growing in glycerol can be avoided either, by the addition of small amounts of some co-feeding substrates or by the creation of a *glpR* knock-out mutant provides a great technological advance. Moreover, in the case of the KT40GlpR mutant we have observed that PHA production improves not only due to less time invested in the process, but also to the best final yield when compared to the wild type strain.

Finally, our experiments suggest that *P. putida* has evolved a tightly regulated system for metabolizing a common substrate like glycerol. The prolonged lag-phase could prevent the development of the strain in a competitive habitat in the absence of other common substrates like glucose or fatty acids. However, the glycerol lag-phase can be considerably reduced when small amounts of some co-substrates are present in the medium. A similar effect has been also observed in the fluorescent pseudomonad strain R62 where the prolonged lag-phase in glycerol was reduced by the addition of less than 0.05% of succinate or citrate (Saharan *et al*, 2010). These authors observed that the GlpK activity increased about 15 times in the presence of the inducers. Though, acquiring a fine tuning of the glycerol regulatory system for a rapid response might depend on their respective environments.

Summing up, our findings have contributed not only to unravel the physiological causes of the long lag-phase produced by glycerol in the model strain *P. putida* KT2440

that hinders its use as carbon source for biotechnological applications, but they have also settled the bases for a rational design of an improved strain very useful for the efficient transformation of raw glycerol derived from the biodiesel industry not only into PHA but also into other valuable products.

### Experimental procedures

#### *Bacterial strains, media and growth conditions*

Bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table 4. *P. putida* KT2440 genome complete nucleotide sequence is accessible in the data bank (Nelson *et al.*, 2002). *E. coli* and *P. putida* strains were grown routinely for DNA manipulations and for pre-cultures in lysogeny broth (LB) medium (Sambrook and Russell, 2001; Bertani 2004) at 37°C and 30°C, respectively. The appropriate selection antibiotics, gentamicin (10 µg/ml), chloramphenicol (34 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), or tetracycline (5 µg/ml) were added when needed.

Standard growth experiments of *P. putida* were performed in M63 minimal medium (13.6 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$ , 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$ , 0.5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$ , adjusted to pH 7.0 with KOH). For PHA production, *P. putida* strains were grown in 0.1 N M63 medium, which is a nitrogen-limited variation of the common M63 medium with only 0.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$  (ten times less ammonium) (Moldes *et al.*, 2004). These media were supplemented with the appropriated carbon sources; the substrate concentrations were chosen in order to use a carbon equimolar concentration for each of them. For the standard growth experiments 20 mM glycerol, 7.5 mM octanoate, 10 mM glucose, 30 mM acetate, 20 mM pyruvate, 10 mM citrate, 15 mM succinate, 10 mM gluconate

or 10 mM fructose were used as carbon sources. In the PHA production experiments and excess of carbon source were used, this is 40 mM and 80 mM glycerol, 15 mM octanoate or 20 mM glucose. Octanoate was assayed as inducer at 0.01 mM, 0.1 mM and 1mM, glucose was also used as inducer at 1.33 mM (equimolar to 1mM). All the medium components were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**Table 4.** Strains and plasmids used in this work.

| Strains                    | Phenotype   | Reference                        |
|----------------------------|---|----------------------------------|
| <i>P. putida</i>           |   |                                  |
| KT2440                     | <i>P. putida</i> mt-2 without TOL plasmid, <i>hsdR</i> .  | Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981 |
| KT2442                     | <i>P. putida</i> mt-2 without TOL plasmid, <i>hsdR</i> , Rf <sup>r</sup>  | Franklin <i>et al.</i> , 1981    |
| KT40C1ZC2                  | $\Delta$ <i>phaC1ZC2</i> KT2440 derivative strain   | This work                        |
| KTH2                       | <i>aceA::Tn5-hpaBC</i> KT2442 derivative strain   | Prieto <i>et al.</i> , 1996      |
| KT40GlpR                   | $\Delta$ <i>glpR</i> KT2440 derivative strain   | This work                        |
| KT40HexR                   | $\Delta$ <i>hexR</i> KT2440 derivative strain   | This work                        |
| KT40HexR-GlpR              | $\Delta$ <i>glpR</i> KT40HexR derivative strain   | This work                        |
| KTCRC                      | Tcr, KT2440 <i>crc::tet</i>   | Fonseca, 2011                    |
| <i>E. coli</i>             |   |                                  |
| DH10B                      | Host for plasmid construction and vector donor via conjugation  | Invitrogen                       |
| HB101                      | Host for plasmid pKR600   | Sambrook and Russell, 2001       |
| <b>Plasmids</b>            |   |                                  |
| pRK600                     | Cm <sup>r</sup> ColE1 <i>oriV</i> RK2 Mob <sup>+</sup> Tra <sup>+</sup> ; donor of transfer functions   | Kessler <i>et al.</i> , 1992     |
| pIZ1016                    | Gm <sup>r</sup> <i>oriP</i> BBR1 MCS Mob <sup>+</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , P <sub><i>tac</i></sub> / <i>lacI</i> <sup>q</sup> ; broad-host-range cloning vector | Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003 |
| pIZaceA                    | pIZ1016 vector carrying <i>P. putida</i> KT2442 <i>aceA</i> gene  | This work                        |
| pUC18Not                   | Am <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ . Identical to pUC18 but with <i>NotI</i> -polylinker of pUC18- <i>NotI</i> as MCS   | Herrero <i>et al.</i> 1990       |
| pK18 <i>mobsacB</i>        | Km <sup>r</sup> , ColE <i>oriV</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>sacB</i> ; vector for allelic exchange homologous recombination mutagenesis       | Schäfer <i>et al.</i> , 1994     |
| pK18 <i>mobsacB</i> -C1ZC2 | pK18 <i>mobsacB</i> derivative vector used for <i>phaC1ZC2</i> deletion   | This work                        |
| pK18 <i>mobsacB</i> -GlpR  | pK18 <i>mobsacB</i> derivative vector used for <i>glpR</i> deletion   | This work                        |
| pK18 <i>mobsacB</i> -HexR  | pK18 <i>mobsacB</i> derivative vector used for <i>hexR</i> deletion   | This work                        |

### Resultados: Capítulo 3

For *P. putida* growth experiments, LB pre-cultures cells were adjusted to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3 in 0.1 N M63 plus the selected carbon source or mixture of carbon sources. This culture process has been performed either in shake flask or 96-microwell plates. Culture growth (200 ml) was monitored in shaking flasks (250 rpm) of 500 ml with a Shimadzu UV-260 spectrophotometer at 600 nm for 46 h. For the cultivation in 96-microwell plates, 200 µl aliquots were distributed in the microwells. The plates were incubated at 30°C for 46 h, with 20 seconds of heavy orbital shaking every 15 min using a Multiskan Ascent Incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) that monitors optical density at 630 nm (OD<sub>630</sub>) every 15 min. The growth curves shown are the average values from ≥6 replicates.

**Table 5.** Oligonucleotides used in this work.

| Name                 | Primers nucleotide sequence                     | Fragment size (bp) | Description   |
|----------------------|---|--------------------|---|
| FR1-C1ZC2-5'         | GCTCTAGAGATCCAGATCCAGATCGACGCGGC                | 897                | Cloning of <i>phaC1ZC2</i> flanking regions in pK18 <i>mob</i> SacB |
| FR1-C1ZC2-3'         | CGGGATCCCATCTACGACGCTCCGTTGTCC                  |                    |   |
| FR2-C1ZC2-5'         | CGGGATCCGCCACGTATCTGGTCAGCTTGC                  | 737                | Cloning of <i>glpR</i> flanking regions in pK18 <i>mob</i> SacB     |
| FR2-C1ZC2-3'         | CCCAAGCTTATCCAGTCAGCAGCTCATCGG                  |                    |   |
| FR1- <i>GlpR</i> -5' | GCTCTAGAGGCCAAGCCAAGAATACCTACGG                 | 833                | Cloning of <i>hexR</i> flanking regions in pK18 <i>mob</i> SacB     |
| FR1- <i>GlpR</i> -3' | CGGGATCCGGGCGGTCTTTGGGGCTG                      |                    |   |
| FR2- <i>GlpR</i> -5' | CGGGATCCGGGCTGGTGGGTGCATGC                      | 793                | Cloning of <i>aceA</i> cloning in pIZ1016                           |
| FR2- <i>GlpR</i> -3' | CCCAAGCTTCTCTACACGTTCCGGCGCG                    |                    |   |
| FR1- <i>HexR</i> -5' | GCTCTAGACCCCAACGGCCCTCGATACC                    | 867                | Cloning of <i>rpoN</i> gene qRT-PCR assay                           |
| FR1- <i>HexR</i> -3' | CGCGGATCCGGGTGTGTCCTTGGGTCTGGG                  |                    |   |
| FR2- <i>HexR</i> -5' | CGGGATCCCTCAACTGAGCCGGTGC                       | 834                | Cloning of <i>glpF</i> gene qRT-PCR assay                           |
| FR2- <i>HexR</i> -3' | CCCAAGCTTCTTCTTCTCCTCGCAGCGGCC                  |                    |   |
| <i>aceA</i> -5'      | CCCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAATAATGGCACTGA           | 1326               | <i>aceA</i> cloning in pIZ1016                                      |
| <i>aceA</i> -3'      | CACGCGAACAGC<br>GCTCTAGATCAGTGGAAGTCTTCTTCCGGTC |                    |   |
| R- <i>rpoNq</i>      | TCCTGACGTTTCGAGCATCG                            | 131                | <i>rpoN</i> gene qRT-PCR assay                                      |
| F- <i>rpoNq</i>      | AAAATGGGCCAGCAACTGAC                            |                    |   |
| RT-5 <i>glpF</i>     | GAACCCAGCCGTGAGTATCG                            | 219                | <i>glpF</i> gene qRT-PCR assay                                      |
| RT-3 <i>glpF</i>     | TGCGGGTAGGTGGAGAACAC                            |                    |   |

Underlined nucleotides indicated restriction enzymes sites

*TAAGGAGGT* Shine-Dalgarno consensus sequence is indicated in italic letter and **ATG** start codon in bold letter.

It is worth to notice that PHA content disturbs cells turbidimetry, so the optical density gives mixed information about cell growth plus PHA accumulation and can only be used to determine the growth rates in absence of PHA. Growth rates have been calculated based on OD<sub>630</sub> growth curves slope ( $h^{-1}$ ) during the exponential growth period.

#### *Construction of P. putida KT2440 deletion mutants*

Standard molecular biology techniques were performed as previously described (Sambrook and Russell, 2001). The *glpR* and *hexR* genes, as well as the genomic region *phaC1ZC2*, were inactivated by allelic exchange homologous recombination using the mobilizable plasmid pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994). The PCR primer pairs used for these constructions and the PCR fragments sizes originated are listed in Table 5; KT2440 genome was used as DNA template. PCR products were purified with the High Pure PCR product Purification Kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) Each pair of two fragments were digested with the appropriate restriction enzymes (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) and ligated using T4 DNA ligase (USB Corp., Affymetrix, Cleveland, OH, USA), resulting in the corresponding deleted version of each gene or genomic region. DNA fragments were purified with GeneClean Turbo kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). These deleted genes were cloned into the corresponding unique sites of pK18*mobsacB* plasmid to yield the different plasmids listed in Table 4. Plasmid isolation was performed using High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) and cloned inserts were confirmed by DNA sequencing by Secugen S.L. (Madrid, Spain). The resultant plasmids were used to deliver the different mutations to the host chromosome of each strain via homologous recombination. Triparental mating

### Resultados: Capítulo 3

was performed following protocol described by Herrero *et al.* (1990), using *E. coli* DH10B as donor strain, *E. coli* HB101 pRK600 as helper strain and *P. putida* KT2440 (Table 4) as recipient strain. The strains resulted of this first recombination event were confirmed by PCR and the selected colonies were grown in LB during 6 hours and then plated on M63 10 mM citrate selective plates supplemented with 5% sucrose. Transconjugants sucrose resistant and kanamycin sensible were isolated and the second crossover event was confirmed by PCR. The resultant mutant strains were listed in Table 4.

#### *Identification of transposon integration site in P. putida KTH2 strain*

*P. putida* KTH2 genomic DNA was extracted using a standard procedure (Sambrook and Russell, 2001) and digested with *NotI* restriction enzyme (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). The resulted fragments were cloned into *NotI* unique site of pUC18Not plasmid (Herrero *et al.*, 1990), transformed in *E. coli* DH10B competent cells and plated on LB plates supplemented with ampicillin (pUC18Not plasmid selection marker) and kanamycin. Kanamycin resistant transconjugants imply that the fragment cloned into pUC18Not plasmid carries kanamycin resistance transposon fragment flanking the genomic region in which transposon where integrated. Plasmid isolation of the resultant pUC18Not derivative was performed using High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) and cloned insert sequence was analyzed by DNA sequencing by Secugen S.L. (Madrid, Spain). Transposon integration site in *P. putida* KTH2 strain was identified disrupting *aceA* (PP\_4116) gene.

*P. putida KTH2 aceA gene complementation*

The *aceA* coding sequence was amplified by PCR using *aceA*-5' and *aceA*-3' oligonucleotides listed in Table 5 and KT2442 genome as DNA template. The amplified DNA fragment was digested with *Hind*III and *Xba*I enzymes (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) and then inserted into pIZ1016 vector (Moreno-Ruiz *et al.*, 2003). The resulting pIZaceA recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH10B and then transferred by triparental mating (Herrero *et al.* 1990) to *P. putida* KT2442 and KTH2 strains.

*Biomass calculation*

It should be notice that PHA content disturbs cells turbidimetry, so the optical density cannot be used to estimate growth rates in terms of viable cells or biomass. Biomass concentrations, expressed in grams per litre, were determined gravimetrically. Briefly, culture medium (40 ml) was centrifuged for 30 min at 3800 *g* and 4°C (centrifuge Sigma 3-18K, Osterode am Harz, Germany). Cell pellets were freeze-dried for 24 h in a VirTis Benchtop K Freeze Dryer (SP Industries, Gardiner, NY) and weighed.

*GC analysis for PHA content determinations*

PHA monomer composition and cellular PHA content were determined by GC of the methanolysed polyester. Methanolysis was carried out by suspending 5–10 mg of lyophilized cells in 2 ml of chloroform and 2 ml of methanol containing 15% sulphuric acid and 0.5 mg/ml of 3-methylbenzoic acid (internal standard), followed by an incubation at 100°C for 4 h. After cooling, 1 ml of demineralised water was added and the organic phase containing the methyl esters was analysed by GC (Lageveen *et al.*, 1988; de Eugenio *et al.*, 2010a). A standard curve from 0.5 to 2mg of PHA (Biopolis S.L., Valencia, Spain) was used to interpolate sample data.

*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) enzymatic assay*

GAPDH enzymatic assay has been slightly modified from Pancholi and Fischetti (1992). Briefly, cells of *P. putida* strains were harvested by centrifugation (40ml culture) after 6 and 22 hours of culture and resuspended in GAPDH assay buffer pH 8.6 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, 40 mM triethanolamine) plus 0.2 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cell debris was removed by 15 min centrifugation at 4°C and 14000 g (centrifuge Sigma 1-15K, Osterode am Harz, Germany) and the clear supernatant was used as crude extract. The protein concentration was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as a standard. GAPDH activity was assayed at 30°C by following NADH formation spectrophotometrically at 340 nm. The assay mixture contained GAPDH assay buffer supplemented with 2 mM cysteine (Tiwari and Campbell, 1969), 1 mM NAD, 2 mM glyceraldehyde 3-phosphate and 0.5 mg of protein extract.

*Real Time quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) assay*

*P. putida* strains were cultivated overnight in LB medium, washed, resuspended in 0.1N M63 medium at 0.3 OD<sub>600</sub> and incubated at 30°C in shaking flasks (250 rpm) during 3 h with the correspondent substrate/s. After the incubation time aliquots of 50 ml were harvested by centrifugation at 4°C in tubes precooled on dry ice and quickly stored at -80 °C. The RNA samples were purified by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany). After proving the absence of contaminating DNA by polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription reactions for synthesis of total cDNA were carried out with 1 µg of RNA, 0.5 mM dNTPs, 200 U of SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 2.5 µM of random hexamers as

primers, in the buffer recommended by the manufacturer. Samples were initially heated at 65°C for 5 min and then incubated at 42°C for 2 h, terminated by incubation at 70°C for 15 min. The cDNA obtained was purified using GeneClean Turbo kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) and the concentration was measured using a NanoPhotometer™ Pearl (Implen, Munich, Germany). For the analysis of the transcripts levels target cDNAs (0.5 and 5 ng) and reference samples were amplified three times in separate PCR with 0.2 µM each of target primers and using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Berkeley, California, USA) in a iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Berkeley, California, USA). Target primers are listed in Table 5. Samples were initially denatured by heating at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification (95°C, 30 s; test annealing temperature, 56°C, 30 s; elongation and signal acquisition, 72°C, 30 s). For quantification of the fluorescence values, a calibration curve was made using dilution series from  $5 \cdot 10^{-7}$  to 5 ng of *P. putida* KT2442 genomic DNA sample. cDNAs from the experimental samples were amplified using amounts within the linear range of the standard curve. After the PCR a melting curve was generated to confirm the amplification of a single product. Results were normalized relative to those obtained for the *rpoN* gene, as its expression is known to remain relatively constant throughout growth phase in both *E. coli* and *P. putida* (Jishage *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2006; Yuste *et al.*, 2006). qRT-PCR analyses were performed with RNA samples obtained from three independent biological replicas under identical conditions. A multifactorial analysis of variance (ANOVA) has been performed using Statgraphics software package (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) showing a statistical significance between the four condition analyzed ( $p = 0.0078$ ).

### Acknowledgments

We are greatly indebted to Dr. Eduardo Diaz for helpful discussions. We thank the technical works of A. Valencia and F. de la Peña. This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and CSIC (BIO2010-21049 and 201120E092), and by the European Union Grant (NMP2-CT-2007-026515). Isabel F. Escapa is a recipient of CSIC-I3P predoctoral fellowship.

### References

Aparicio ML, Ruiz-Amil M, Vicente M, Cánovas JL (1971) The role of phosphoglycerate kinase in the metabolism of *Pseudomonas putida*. FEBS Lett 14 (5):326-328.

Applebee MK, Joyce AR, Conrad TM, Pettigrew DW, Pálsson BØ (2011) Functional and metabolic effects of adaptive glycerol kinase (GLPK) mutants in *Escherichia coli*. J Biol Chem 286 (26):23150-23159.

Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA (2005) Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. Biomacromolecules 6 (4):2106-2112.

Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene 16 (1-3):237-247.

Bertani G (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. J Bacteriol 186 (3):595-600.

Blevins WT, Feary TW, Phibbs PV (1975) 6-Phosphogluconate dehydratase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 121 (3):942-949.

Bormann EJ, Roth M (1999) The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. Biotechnol Lett 21 (12):1059-1063.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Browne P, Barret M, O'Gara F, Morrissey JP (2010) Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* 10 (1):300.

Castilho LR, Mitchell Da, Freire DMG (2009) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 100 (23):5996-6009.

Cavaleiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem* 44 (5):509-515.

Cuskey SM, Phibbs PV (1985) Chromosomal mapping of mutations affecting glycerol and glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* 162 (3):872-880.

Chen GQ (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev* 38 (8):2434-2446.

da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27 (1):30-39.

Daddaoua A, Krell T, Ramos JL (2009) Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and Entner-Doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *J Biol Chem* 284 (32):21360-21368.

de Almeida A, Giordano AM, Nikel PI, Pettinari MJ (2010) Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 76 (6):2036-2040.

de Eugenio LI, Escapa IF, Morales V, Dinjaski N, Galán B, García JL, Prieto MA (2010a) The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ Microbiol* 12 (1):207-221.

de Eugenio LI, Galán B, Escapa IF, Maestro B, Sanz JM, García JL, Prieto MA (2010b) The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environ Microbiol* 12 (6):1591-1603.

### Resultados: Capítulo 3

de Riel JK, Paulus H (1978) Subunit dissociation in the allosteric regulation of glycerol kinase from *Escherichia coli*. 1. Kinetic evidence. *Biochemistry* 17 (24):5134-5140.

del Castillo T, Duque E, Ramos JL (2008) A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *J Bacteriol* 190 (7):2331-2339.

Elbahloul Y, Steinbüchel A (2009) Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process. *Appl Environ Microbiol* 75 (3):643-651.

Escapa IF, Morales V, Martino VP, Pollet E, Averous L, García JL, Prieto MA (2011) Disruption of beta-oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (5):1583-1598.

Follonier S, Panke S, Zinn M (2011) A reduction in growth rate of *Pseudomonas putida* KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate. *Microb Cell Fact* 10 (1):25.

Fonseca MP (2011) Búsqueda y caracterización de nuevos factores implicados en represión catabólica en *Pseudomonas putida*. Ph.D. thesis, Universidad Autónoma, Madrid.

Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12):7458-7462.

Gao X, Chen JC, Wu Q, Chen GQ (2011) Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 22:1-7.

Gomez JGC, Méndez BS, Nikel PI, Pettinari MJ, Prieto MA, Silva LF (2012) Making green polymers even greener: Towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products. In: Petre M (ed) *Advances in Applied Biotechnology*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 41-62.

Heath HE, Gaudy ET (1978) Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 136 (2):638-646.

Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172 (11):6557-6567

Huijberts GN, Eggink G, de Waard P, Huisman GW, Witholt B (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* 58 (2):536-544.

Ibrahim MHA, Steinbüchel A (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl Environ Microbiol* 75 (19):6222-6231.

Ibrahim MHA, Steinbüchel A (2010) *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. *J Appl Microbiol* 108 (1):214-225.

Jishage M, Iwata A, Ueda S, Ishihama A (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol* 178 (18):5447-5451.

Johnson DT, Taconi KA (2009) The glycerin glut : Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26 (4):338-348.

Kawata Y, Aiba SI (2010) Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 (1):175-177.

Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the *TOL* plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* 233 (1-2):293-301.

Kim J, Jeon CO, Park W (2008) Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 154 (Pt 12):3905-3916.

Kornberg HL (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 99 (1):1-11.

Kornberg HL, Krebs HA (1957) Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle. *Nature* 179 (4568):988-991.

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl Environ Microbiol* 54 (12):2924-2932.

Lenz RW, Kim YB, Fuller RC (1992) Production of unusual bacterial polyesters by

### Resultados: Capítulo 3

*Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. FEMS Microbiol Lett 103 (2-4):207-214.

Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER (2003) Bioplastics from microorganisms. Curr Opin Microbiol 6 (3):251-260.

Madison LL, Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev 63 (1):21-53.

Mahishi LH, Tripathi G, Rawal SK (2003) Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. Microbiol Res 158 (1):19-27.

Martínez V, García P, García JL, Prieto MA (2011) Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. Microb Biotechnol 4 (4):533-547.

McCowen SM, Phibbs PV, Feary TW (1981) Glycerol catabolism in wild-type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Microbiol 5 (3):191-196.

Moldes C, Garcia P, Garcia JL, Prieto MA (2004) In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. Appl Environ Microbiol 70 (6):3205-3212.

Morales G, Ugidos A, Rojo F (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. Environ Microbiol 8 (10):1764-1774.

Moreno-Ruiz E, Hernández MJ, Martínez-Pérez O, Santero E (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. J Bacteriol 185 (6):2026-2030.

Moreno R, Martínez-Gomariz M, Yuste L, Gil C, Rojo F (2009) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. Proteomics 9 (11):2910-2928.

Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol 4 (12):799-808.

Nikel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA, Méndez BS (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. Appl Microbiol Biotechnol 77 (6):1337-1343.

Novotny MJ, Frederickson WL, Waygood EB, Saier MH (1985) Allosteric regulation of

glycerol kinase by enzyme III<sub>glc</sub> of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 162 (2):810-816.

Pachauri N, He B (2006) Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. Paper presented at the Encontro Internacional Anual da American Society of Agricultural and Biological Engineers, University of Idaho, Moscow.

Pancholi V, Fischetti VA (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. J Exp Med 176 (2):415-426.

Prieto MA, de Eugenio LI, Galán B, Luengo JM, Witholt B (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In: Ramos JL, Filloux A (eds) *Pseudomonas: a Model System in Biology*, vol V. *Pseudomonas* vol V. Springer, Berlin, Germany, pp 397-428.

Prieto MA, Díaz E, García JL (1996) Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. J Bacteriol 178 (1):111-120.

Reddy SV, Thirumala M, Mahmood SK (2009) A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. J Ind Microbiol Biotechnol 36 (6):837-843.

Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat Rev Microbiol 8 (8):578-592.

Rojo F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. FEMS Microbiol Rev 34 (5):658-684.

Saharan K, Sarma MVRK, Roesti AS, Prakash A, Johri BN, Aragno M, Bisaria VS, Sahai V, Conditions AB (2010) Cell Growth and Metabolites Produced by Fluorescent *Pseudomonas* R62 in Modified Chemically Defined Medium. World Academy of Science, Engineering and Technology:867-871.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene 145 (1):69-73.

### Resultados: Capítulo 3

Schweizer HP, Jump R, Po C (1997) Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion facilitator (*glpF*) and glycerol kinase (*glpK*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 143:1287-1297.

Schweizer HP, Po C (1994) Cloning and nucleotide sequence of the *glpD* gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176 (8):2184-2193.

Schweizer HP, Po C (1996) Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. *J Bacteriol* 178 (17):5215-5221.

Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MGE, Reis MAM (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 81 (4):615-628.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia Ta, Marmer WN (2006) Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (6):783-789.

Sun Z, Ramsay JA, Guay M, Ramsay BA (2007) Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol* 75 (3):475-485.

Tiwari NP, Campbell JJ (1969) Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochim Biophys Acta* 192 (3):395-401.

Velázquez F, Pflüger K, Cases I, de Eugenio LI, de Lorenzo V (2007) The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 189 (12):4529-4533.

Vicente M, Cánovas JL (1973) Regulation of the glucolytic enzymes in *Pseudomonas putida*. *Arch Mikrobiol* 93 (1):53-64.

Wang Q, Nomura CT (2010) Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *J Biosci Bioeng* 110 (6):653-659.

Williams SG, Greenwood JA, Jones CW (1994) The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 140 (11):2961-2969.

Yuste L, Hervás AB, Canosa I, Tobes R, Jiménez JI, Nogales J, Pérez-Pérez MM, Santero E, Díaz E, Ramos JL, de Lorenzo V, Rojo F (2006) Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* 8 (1):165-177.

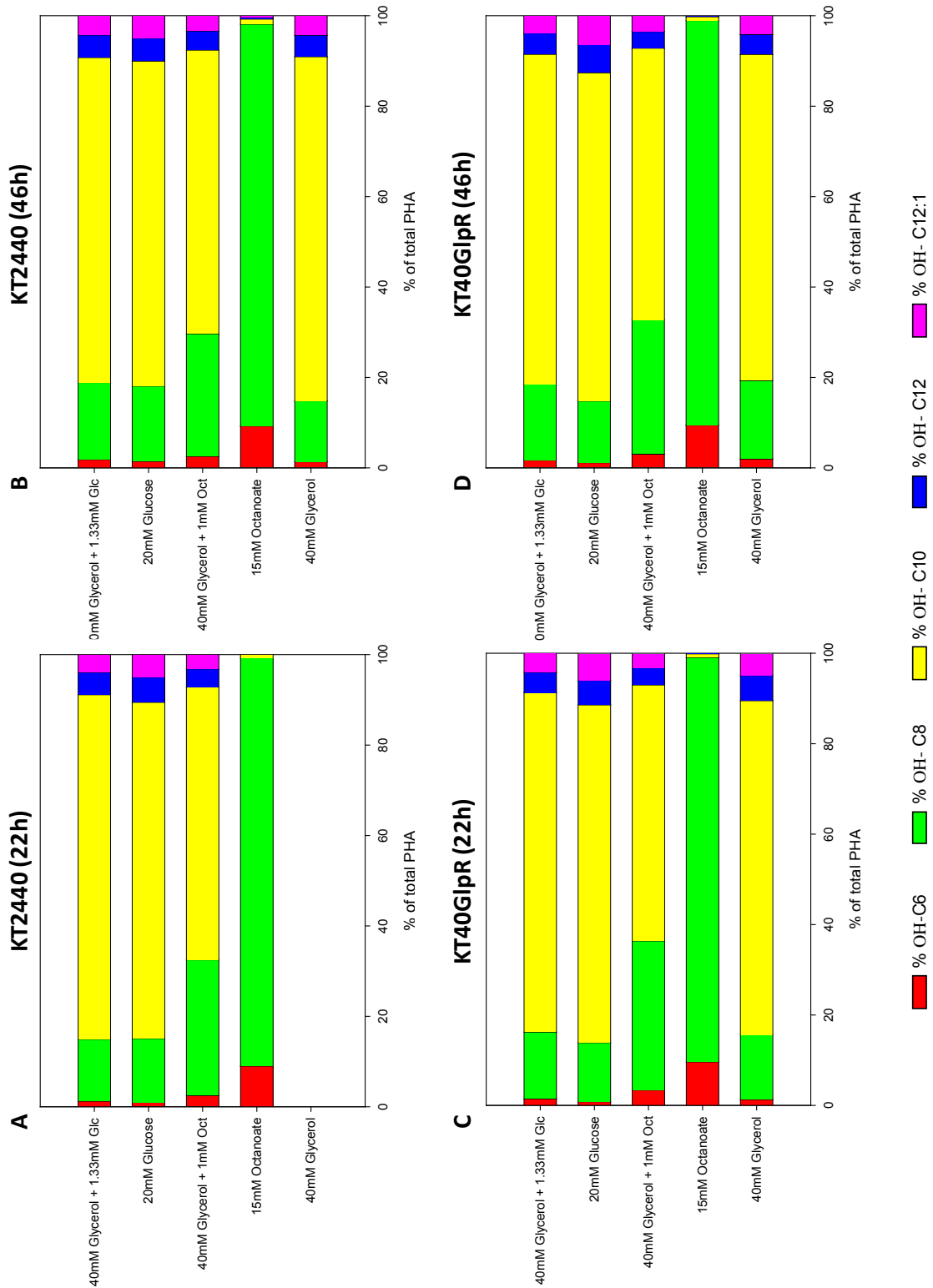
Zeng G, Ye S, Larson TJ (1996) Repressor for the *sn*-glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: primary structure and identification of the DNA-binding domain. *J Bacteriol* 178 (24):7080-7089.

Zinn M, Witholt B, Egli T (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Delivery Rev* 53 (1):5-21.

Zwaig N, Kistler WS, Lin EC (1970) Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 102 (3):753-759.

Zwaig N, Lin EC (1966) Feedback inhibition of glycerol kinase, a catabolic enzyme in *Escherichia coli*. *Science (New York, NY)* 153 (3737):755-757.

Supporting information



**Figure S1.** Monomer composition of PHA polymer accumulated by *P. putida* KT2440 (panels A and B) and KT40GIpR (panels C and D) cultures analyzed in Figure 5B and 8B. Media of three independent flask culture experiments are shown with standard deviations of <10%. OH-C6, 3-hydroxyhexanoate; OH-C8, 3-hydroxyoctanoate; OH-C10, 3-hydroxydecanoate; OH-C12, 3-hydroxydodecanoate; OH-C12:1, 3-hydroxy-5-cis-dodecenoate.

## **IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA**



A continuación se presenta una discusión global que trata de integrar las conclusiones alcanzadas en cada uno de los tres capítulos que componen esta Tesis Doctoral. No se pretende discutir en profundidad cada uno de los resultados individuales, puesto que esto ha sido el objeto de las discusiones desarrolladas de manera independiente en cada artículo presentado. El objetivo de esta sección es, por lo tanto, integrar todos los argumentos ya expuestos para obtener una visión global del impacto del metabolismo de PHA sobre la fisiología de *P. putida*. Así mismo, se analizan en su conjunto las posibles aplicaciones biotecnológicas de los conocimientos adquiridos en esta Tesis Doctoral.

## **1. Importancia fisiológica de los PHA: El ciclo del PHA juega un papel crucial en el metabolismo de *P. putida* KT2440**

---

### **1.1. El ciclo metabólico del PHA es capaz de controlar el flujo celular de carbono y energía**

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la interrelación entre el metabolismo específico de los PHA y las rutas del metabolismo central en *P. putida* KT2440. El análisis que el impacto de la producción de este tipo de biopolímeros tiene sobre los flujos metabólicos y la expresión génica ha permitido demostrar que el PHA juega un papel crucial en el mantenimiento del balance celular del carbono y la energía en las bacterias que lo producen de forma natural (Capítulo 1).

De manera tradicional se ha considerado que los PHA desempeñan un papel fisiológico clave como polímeros de reserva de carbono y energía (149, 151, 189). Desde los primeros estudios bioquímicos, realizados en microorganismos productores de PHB, se observó que la acumulación de este tipo de reservas celulares supone un sumidero (*sink*) de poder reductor para la bacteria (45, 222, 226). Como ya se ha indicado al hablar de la regulación de la producción de PHB, los niveles de NAD(P)H o el ratio NAD(P)H/NAD(P) estimulan la síntesis de PHB; posiblemente vía una inhibición de la actividad citrato sintasa del CAT, que favorece la canalización del acetyl-CoA y del poder reductor hacia la síntesis de PHB (92).

Estas observaciones han sido recientemente corroboradas al analizar mediante transcriptómica y proteómica el efecto de la acumulación de PHB sobre el metabolismo central de *R. eutropha* (13, 176, 193). De manera análoga, en *P. putida* se ha propuesto que los ratios de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD coordinan el destino de los (R)-HA-CoA hacia la formación de PHA, o hacia otras rutas metabólicas, en función de la demanda celular (49, 209) (Anexo 2). Tomando estos estudios como punto de partida, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado el papel de la síntesis y degradación del PHA en *P. putida* como un ciclo metabólico amortiguador capaz de canalizar el flujo de carbono y energía dentro de la célula en respuesta a cambios ambientales (Capítulo 1). Mediante análisis de flujos metabólicos y transcriptómica se ha analizado el impacto fisiológico que supone eliminar el ciclo del PHA en condiciones óptimas de producción de dicho biopolímero, esto es, en exceso de una fuente de carbono preferente para la síntesis de PHA como el ácido octanoico y bajas concentraciones de nitrógeno. Ante esta situación, un mutante de *P. putida* KT2442 incapaz de producir PHA produce una mayor cantidad de acetil-CoA, que no puede derivar hacia la formación de nueva biomasa, y que es canalizado hacia el CAT y el ciclo del glioxilato (Fig. 3 del Capítulo 1). Al perder la capacidad para producir PHA *P. putida* redirecciona su metabolismo, lo cual implica un malgaste del carbono y de la energía, que no se acumulan en forma de reserva en el polímero. Cuando los microorganismos son sometidos a una limitación en un nutriente esencial que restringe el aumento de la biomasa, pero están en una situación altamente energética, pueden disipar energía a través de reacciones anabólicas y catabólicas antagonistas funcionando a la vez denominadas ciclos fútiles (217). Se ha señalado que un uso eficiente de los recursos por parte de los organismos puede implicar un aparente derroche (*spillage*) de energía que, en realidad, puede tener una función fisiológica esencial (217-218). En estos estudios se ha propuesto que el uso de ciclos fútiles permitiría mantener a las células metabólicamente activas, de forma que pudieran adaptarse mejor ante cambios ambientales. Este derroche energético podría responder también a estrategias de supervivencia en nichos altamente competitivos, con el propósito de impedir el acceso a las fuentes de carbono por parte de otros microorganismos. Finalmente, este tipo de mecanismos

pueden suponer una válvula de escape para evitar la acumulación de intermediarios metabólicos potencialmente tóxicos. Ante una situación de desbalance nutricional C/N el ciclo del PHA actúa como un ciclo fútil, ya que el paso catalizado por la ACS1 es dependiente de ATP (Fig. 3). Sin embargo, un mutante incapaz de producir PHA parece disipar el exceso de energía gracias a un mayor ratio de respiración (producción de CO<sub>2</sub> y consumo de oxígeno) (Capítulo 1). También hay que tener en cuenta que las células emplean parte de la energía en procesos de mantenimiento celular que no van asociados a un aumento de la biomasa celular, pero que implican un gasto energético (218). Por lo tanto parte de la energía extra generada en el mutante *phaC1*<sup>-</sup> podría emplearse en los cambios morfológicos observados en dicha cepa, consistentes en una redistribución de la biomasa libre de PHA (peso seco total menos peso seco correspondiente al PHA acumulado) que da lugar a un mayor número de bacterias de un tamaño considerablemente menor (49) (Anexo 2).

A la luz de estos resultados se propone que el metabolismo del PHA juega un papel fundamental como ciclo metabólico amortiguador capaz de equilibrar el estado energético de las células coordinando, en función de la disponibilidad nutricional, procesos fisiológicos clave como: la acumulación de reservas, la producción de biomasa, la división celular, el mantenimiento celular, y la disipación del exceso de energía.

## **1.2. El metabolismo de los PHA está condicionado por la disponibilidad de metabolitos provenientes de las rutas centrales del metabolismo del carbono**

Una vez aclarado que el PHA actúa como piedra angular en el control del flujo de carbono y energía en *P. putida* KT2440, el siguiente punto de interés es entender qué mecanismos controlan la canalización de los intermediarios del metabolismo central hacia la síntesis de PHA (Capítulos 2 y 3). Los (*R*)-HA-CoA sustratos de la polimerasa de PHA provienen en este microorganismo de las rutas de  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* de ácidos grasos (103, 140, 267) (Fig. 3), por lo tanto, la regulación del metabolismo del PHA, así como sus implicaciones fisiológicas, pueden diferir en función de la fuente de carbono empleada. Tradicionalmente se ha considerado que

los PHA son biopolímeros de reserva acumulados por las bacterias cuando existe una situación de desbalance nutricional, por ejemplo una limitación de nitrógeno y un exceso de fuente de carbono (123, 143, 149, 151, 189). Sin embargo, el requerimiento de una limitación nutricional para producir mcl-PHA es dependiente de sustrato en *P. putida* KT2440. En este microorganismo la producción de PHA a partir de fuentes de carbono estructuralmente relacionadas con los PHA, como los ácidos grasos, tiene lugar sin necesidad de una limitación nutricional, aunque se ve favorecida por esta. En cambio, la síntesis de PHA a partir de fuentes de carbono como el gluconato sólo se produce cuando se limita la fuente de nitrógeno (22, 27, 71, 100, 269). *P. putida* KT2440 es capaz de acumular PHA a partir de ácidos grasos a lo largo de la fase exponencial de crecimiento, es decir, la acumulación de biomasa y la producción de PHA tienen lugar simultáneamente (49) (Anexo 2). Por el contrario, cuando se emplea gluconato como sustrato se ha observado que el crecimiento y acumulación del polímero tienen lugar de manera secuencial. Durante la fase exponencial el gluconato se consume rápidamente liberándose 2-cetogluconato al medio hasta que se consume el nitrógeno, a partir de este momento la limitación en nitrógeno permite la acumulación del polímero (71). Hay que señalar que, cuando se emplean ácidos grasos como sustrato los (*R*)-HA-CoA incorporados al PHA provienen de la de la  $\beta$ -oxidación, mientras que cuando el gluconato es la fuente de carbono estos intermediarios proceden de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Por lo tanto, la necesidad o no de una limitación nutricional parece depender de las rutas metabólicas centrales que participan en la síntesis del polímero. La regulación de estas rutas metabólicas, así como de los pasos enzimáticos clave que las conectan con la síntesis de PHA, puede estar condicionada de manera diferente por la disponibilidad de nitrógeno. En Pseudomonados, al igual que en otros grupos bacterianos como las enterobacterias, muchos de los operones regulados por la disponibilidad de nitrógeno son reconocidos por el factor sigma alternativo de la ARN polimerasa RpoN (94, 128). En *P. aeruginosa* PAO1 se ha observado que la acumulación de PHA es dependiente de RpoN tanto en gluconato, como en ácidos grasos (100-101, 252). En cambio en *P. putida* el papel de RpoN parece ser mucho más importante en la síntesis de PHA a partir de gluconato que

cuando la fuente de carbono empleada es un ácido graso (100-101). Asimismo, se ha observado un mayor nivel de transcripción del gen *phaG* (Fig. 8) en *P. putida* KT2440 en condiciones de limitación de nitrógeno (93, 100). La transcripción de los promotores dependientes de RpoN está bajo el control de NtrC, un regulador global que permite la activación de rutas alternativas para la asimilación del nitrógeno en condiciones de limitación de dicho nutriente, a la vez que reprime el catabolismo del carbono (93-94). En condiciones de limitación de nitrógeno se ha observado un mayor transcripción de los genes relacionados con la acumulación de PHA en *P. putida* KT2440 (93). Sin embargo, esta regulación parece ser independiente de NtrC, y no responder directamente ante la señal de limitación en nitrógeno, sino a un elevado ratio C/N.

En esta Tesis Doctoral se ha analizado la interconexión del metabolismo del PHA con las rutas centrales del carbono capaces de aportar monómeros para la síntesis de mcl-PHA a partir de sustratos de diferente naturaleza. Se ha estudiado la capacidad para producir PHA y la composición de los polímeros resultantes en mutantes de *P. putida* KT2440, o su derivado KT2442, afectados en rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos (Capítulo 2) y de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los PHA (Capítulo 3).

En este punto de la discusión merece la pena hacer un inciso para analizar la conveniencia del uso de las estirpes KT2440 y KT2442 de *P. putida* en ensayos de crecimiento y producción a partir de distintas fuentes de carbono. Ya se ha indicado en la Introducción de este trabajo que la cepa *P. putida* KT2442 es un mutante espontáneo de la estirpe KT2440 resistente a rifampicina (4, 74). Se trata de una cepa con un perfil de expresión muy similar al de la cepa silvestre (93), que ha sido ampliamente empleada en estudios de Biología Molecular ya que la resistencia a este antibiótico facilita enormemente su manipulación genética. La estirpe KT2442 de *P. putida* presentan una subunidad beta de la ARN polimerasa alterada, lo cual le confiere la resistencia a rifampicina, pero podría tener otros efectos sobre la fisiología de este microorganismo (84, 109). De hecho, muy recientemente Follonier *et al.* (71) han demostrado que existen diferencias fisiológicas importantes entre las

cepas de *P. putida* KT2440 y KT2442 en función de la fuente de carbono empleada. En este estudio se aprecia una alteración del metabolismo de la estirpe KT2442, respecto a la cepa silvestre, cuando las células crecen en gluconato. Asimismo, se sugiere que la cepa resistente a rifampicina presenta mayores dificultades para hacer frente a una limitación de nitrógeno. Por el contrario, la eficiencia en cuanto a crecimiento y producción de PHA no se ve afectada cuando se emplea ácido octanoico como sustrato (71). Ya que la estirpe KT2442 es un mutante espontáneo de *P. putida* KT2440, y no el resultado de una mutagénesis dirigida (4), esta cepa podría portar otras mutaciones, todavía no identificadas, responsables de su menor eficiencia en el uso de carbohidratos. Por lo tanto, la estirpe de *P. putida* KT2442 podría utilizarse en estudios en los que se empleen ácidos grasos como fuente de carbono, pero se desaconsejaría su uso con otro tipo de sustratos.

Cuando los ácidos grasos son empleados como única fuente de carbono para el crecimiento y producción de mcl-PHA en especies del género *Pseudomonas* la composición monomérica del polímero resultante está estrechamente relacionada con la estructura química del ácido graso utilizado (103, 140). Varios estudios han confirmado el papel de la ruta de  $\beta$ -oxidación como fuente de intermediarios para la síntesis de PHA. En *P. putida* U y *P. putida* CA-3 se ha señalado la importancia del gen *fadD* como una acil-CoA sintasa encargada de la activación de los ácidos grasos para su incorporación a la ruta de la  $\beta$ -oxidación. La mutación de este gen enlentece el catabolismo de ácidos grasos, dificultando la formación de (*R*)-HA-CoA y, por lo tanto, la formación de PHA (22, 81, 106). Además, se ha observado que distintos mutantes de *P. putida* U en los genes *fadAB* de la  $\beta$ -oxidación acumulan una mayor cantidad de PHA y con una proporción monomérica diferente a la de la cepa silvestre (81, 167-168). Estas observaciones, realizadas con ácidos grasos de tipo alifático y aromático, indican que un enlentecimiento de la ruta catabólica de los ácidos grasos conduce a una acumulación de intermediarios (*R*)-HA-CoA que son canalizados hacia la síntesis de PHA. Esta conexión entre el catabolismo de ácidos grasos y el metabolismo de PHA ha sido confirmada recientemente en *P. putida* KT2440 mediante el análisis del fenotipo de distintos mutantes afectados en el metabolismo de ácidos grasos (Fig. 5). En esta bacteria se identificaron inicialmente

dos sets de genes *fadAB*: *fadB* y *fadA* (PP\_2136 y PP\_2137) y *fadBx* y *fadAx* (PP\_2214 y PP\_2215) (39, 147, 170). Estos trabajos han señalado que los genes *fadBA* juegan un papel muy importante en la  $\beta$ -oxidación; su delección no supone un bloqueo total de la ruta de degradación de ácidos grasos, pero sí un enlentecimiento de la misma, lo que conduce a la producción de PHA con una mayor proporción de monómeros con cadenas laterales más largas. Posteriormente se han descrito otros genes homólogos de *fadB* (PP\_2047) y *fadE* (PP\_2048) cuya delección adicional tampoco conduce a un bloqueo total de la  $\beta$ -oxidación (146, 150). En esta Tesis Doctoral se ha analizado la capacidad de un mutante disruptivo del gen *fadB* (*P. putida* KT42FadB) para crecer y producir PHA, tanto a partir de ácidos grasos convencionales, como de sustratos funcionalizados (Capítulo 2). Al igual que en los estudios previos, se ha observado que esta mutación no supone un bloqueo total de la ruta de degradación de ácidos grasos. La cepa de *P. putida* KT42FadB es capaz de acumular más PHA y con mayor proporción de monómeros con cadenas laterales largas que la cepa silvestre. Esto puede deberse a la acumulación de intermediarios (*R*)-HA-CoA con cadenas laterales más largas causado por el enlentecimiento de la  $\beta$ -oxidación, o al diferente grado de afinidad de las distintas isoenzimas del complejo FadAB en función de la naturaleza/longitud de los sustratos empleados.

El estudio transcripcional comparado de las cepas de *P. putida* KT2442 y KT42C1, empleando ácido octanoico como fuente de carbono, (Tabla 3, Capítulo 1) reveló niveles de expresión similares en los genes *fad* entre estas dos cepas, sugiriendo que la expresión de dichos genes es independiente de la acumulación de PHA. Por lo tanto *P. putida* no precisa una activación extra de los genes de la  $\beta$ -oxidación para producir PHA a partir de ácidos grasos. Sin embargo, si la ruta de  $\beta$ -oxidación se ve artificialmente enlentecida (p. ej., en un mutante *fadB*<sup>-</sup>) se produce una acumulación de (*R*)-HA-CoA que son canalizados hacia el polímero de PHA (Capítulo 2). Por lo tanto, la polimerasa de PHA es capaz de adaptar su actividad en función del nivel de metabolitos disponibles en la ruta de la  $\beta$ -oxidación. Esta observación, unida a la de que la expresión de los genes *pha* se ven inducida cuando se usan ácidos grasos como sustratos respecto a cuando se emplea glucosa,

permitiría reforzar la teoría de que el ligando del regulador transcripcional PhaD, principal activador del *cluster pha*, sea un intermediario generado durante el catabolismo de los ácidos grasos (50) (Anexo 3). Gracias a la construcción y posterior análisis de un modelo estructural en 3D de la proteína reguladora PhaD se ha propuesto que el inductor de PhaD sería un intermediario metabólico activado con CoA, muy probablemente generado durante el catabolismo de los ácidos grasos. Esto podría sugerir una regulación coordinada entre el metabolismo de PHA y la ruta de  $\beta$ -oxidación y explicaría por qué deben añadirse precursores convencionales de los PHA, como los ácidos grasos de cadena media, como co-sustratos cuando se pretende mejorar el crecimiento y la producción de PHA a partir de fuentes de carbono no preferenciales para *P. putida* KT2440, como el ácido 6-acetilthiohexanoico (6-ATH) (Capítulo 2) o el glicerol (Capítulo 3).

Otra reflexión que puede extraerse de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en lo referente a la coordinación entre el metabolismo de PHA y el catabolismo de los ácidos grasos, está relacionada con la capacidad de *P. putida* KT2440 para acumular PHA a partir de ácidos grasos de manera acoplada al crecimiento. Empleando un modelo exponencial de crecimiento, y por medio de análisis de multirregresión, se ha establecido, en células creciendo con un bajo contenido en nitrógeno y usando ácido octanoico como única fuente de carbono, un pseudoestado estacionario (*pseudo steady-state*) en el que los ratios de consumo de nutrientes y producción de biomasa y PHA permanecen constantes (Tabla 1 y Fig. S1 del Capítulo 1). *P. putida* KT2440 es capaz de canalizar parte de los intermediarios de la  $\beta$ -oxidación hacia la síntesis de PHA sin que su ratio crecimiento, en términos de biomasa libre de PHA, se vea afectado. Sin embargo, cuando el catabolismo de ácidos grasos se ve alterado por medio de una mutación en el gen *fadB* se produce un desacoplamiento entre los procesos de crecimiento y acumulación de PHA, siendo necesario someter a las células de *P. putida* KT42FadB a un sistema de cultivo en dos fases para alcanzar un mayor rendimiento (Capítulo 2).

Por lo tanto, si entendemos el metabolismo de los PHA como una rama de la ruta de  $\beta$ -oxidación, resulta interesante analizar si la regulación del catabolismo de

los ácidos grasos está conectada también con la del metabolismo de estos biopolímeros. La regulación de la  $\beta$ -oxidación en Pseudomonados ha sido analizada experimentalmente en la especie patógena humana *P. aeruginosa*. En esta especie son tres los hipotéticos operones (*fadAB1*, *fadAB4*, y *fadBA5*) que se han propuesto como codificantes de las enzimas del complejo FadAB (117, 239). Tanto el operón *fadBA5* como otros genes de la  $\beta$ -oxidación (*fadE*) parecen estar bajo el control de PsrA, un regulador transcripcional de la familia TetR que controla de manera negativa la expresión de su propio gen en esta y otras especies de *Pseudomonas* (32, 117-118, 129, 131). Además, en *P. aeruginosa* se ha señalado la importancia de PsrA en la regulación global de la transcripción, a través de la activación del factor sigma alternativo de la polimerasa de ARN RpoS (129-131, 235). El factor sigma RpoS participa en proteobacterias en la expresión de genes de fase estacionaria y de genes relacionados con respuestas a estrés (38, 196, 242). En *P. putida* KT2440 se han identificado motivos de unión para la proteína PsrA en las regiones promotoras de varias ORF, incluyendo en genes relacionados con el catabolismo de ácidos grasos (*fadBA* y *fadH*) y en *rpoS* (120). Además, en distintas cepas de *P. putida* se ha sugerido la implicación de RpoS en el control del metabolismo de PHA, favoreciendo su despolimerización en la fase estacionaria e incrementando así la supervivencia y la tolerancia al estrés (195, 216). En resumen, la conexión entre el regulador global del catabolismo de ácidos grasos PsrA, el factor sigma RpoS, el sistema GacS/GacA y los genes *pha*, evidencia el vínculo existente entre la  $\beta$ -oxidación y el metabolismo de PHA. Aunque los (R)-HA-CoA sustratos para la síntesis de los PHA pueden provenir tanto de la  $\beta$ -oxidación como de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, la regulación coordinada entre el metabolismo de PHA y el catabolismo de ácidos grasos sugiere que la ruta de la  $\beta$ -oxidación es la ruta anaplerótica preferencial capaz de aportar monómeros para la síntesis de PHA.

### **1.3. Influencia de los reguladores globales del metabolismo del carbono sobre la producción de PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente con los PHA**

Una vez discutida la interrelación entre la  $\beta$ -oxidación y el metabolismo de PHA, cabe preguntarse cuáles son los mecanismos que conducen a la formación de los PHA cuando el sustrato empleado por los microorganismos no es un ácido graso. Ya se ha señalado que, en este caso, la composición monomérica del polímero resultante no guarda una relación estructural con la fuente de carbono utilizada. Huijberts *et al.* (103) observaron que la composición monomérica del PHA sintetizado en *P. putida* a partir de glucosa o glicerol, es similar, en longitud de cadena y distribución de las insaturaciones, a la de los ácidos grasos de la membrana lipídica de la bacteria. Estos experimentos sugirieron que la formación de PHA a partir de fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos está conectada con la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Por lo tanto, la regulación del catabolismo de estas fuentes de carbono va a condicionar la acumulación de metabolitos que puedan ser recanalizados hacia la síntesis de PHA desde la ruta biosintética de los ácidos grasos.

Actualmente, el glicerol se emplea como un sustrato preferencial en procesos de fermentación microbiana, ya que se trata de un subproducto generado en grandes cantidades en la industria del biodiésel (82, 172, 237). Por este motivo en esta Tesis Doctoral el glicerol ha sido elegido como fuente de carbono (distinta de los ácidos grasos) para la producción de PHA. Además, el glicerol permite la obtención de un elevado rendimiento en términos de biomasa en *P. putida* KT2440 (Tabla 1 del Capítulo 3). Por lo tanto, uno de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral es estudiar la conexión entre el catabolismo del glicerol y la síntesis de PHA en *P. putida* KT2440 (Capítulo 3). La velocidad de crecimiento de *P. putida* KT2440 cuando el glicerol es empleado como única fuente de carbono es muy lenta, ya que las células presentan una fase de retardo al inicio del crecimiento (fase *lag*) muy larga (261, 269). Por medio de estrategias de co-metabolismo con fuentes de carbono que son metabolizadas de manera eficaz por este microorganismo (ácido

octanoico y glucosa) se ha logrado mejorar el crecimiento y la producción del PHA en *P. putida* KT2440. Hay que señalar que, aunque tanto el ácido octanoico como la glucosa son capaces de inducir el crecimiento en glicerol, sólo el ácido octanoico es capaz de estimular a la vez la producción de una mayor cantidad de PHA. El hecho de que el PHA producido en estas condiciones de co-metabolismo entre glicerol y pequeñas dosis de ácido octanoico presente una mayor proporción de monómeros de tipo 3-hidroxi octanoato (C8) (Fig. S1 del Capítulo 3), confirma los resultados anteriores vinculando un mayor flujo de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación con una mayor acumulación de biopolímero (Capítulos 1 y 2). Por otro lado, se han realizado mutaciones en puntos clave del metabolismo del glicerol que demuestran que el regulador transcripcional GlpR es capaz de reprimir el catabolismo del glicerol, y que esta represión es responsable de la fase de latencia observada al inicio del crecimiento cuando el glicerol se usa como única fuente de carbono (Fig. 7 y 8 del Capítulo 3). Además, la inactivación de *glpR*, no sólo conduce a un consumo más rápido del glicerol, sino que permite una mayor acumulación de PHA, probablemente al incrementarse la disponibilidad de intermediarios metabólicos canalizados, a través de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, hacia la producción del biopolímero. A pesar de que GlpR se ha identificado como el regulador principal del catabolismo del glicerol en *P. putida*, el metabolismo de este compuesto parece implicar un sistema muy complejo en el que intervienen varios mecanismos, incluida una ruta ED funcional (90).

El metabolismo de los PHA está intrínsecamente relacionado con el flujo de carbono entre las distintas rutas catabólicas y anabólicas y con la situación global energética de la célula. No es de extrañar, por lo tanto, que los sistemas de regulación global que controlan respuestas como el estrés, factores de virulencia, motilidad, metabolismo secundario o represión catabólica, estén implicados también en la regulación del metabolismo de los PHA. La represión catabólica es un complejo sistema de regulación que permite a las bacterias emplear una fuente de carbono preferente de entre una mezcla de posibles sustratos y que en Pseudomonados implica a la proteína Crc, a la oxidasa terminal Cyo y al sistema PEP-PTS (213). Recientemente Browne *et al.* (14) han identificado motivos de unión

para la proteína Crc en los ARNm de genes del *cluster pha*, sugiriendo una posible función reguladora de Crc en la integración del metabolismo del carbono y nitrógeno con la producción de sustancias como el PHA o los ramnolípidos. Se ha señalado, a su vez, la importancia de Crc en el control de la ruta ED, ya que varios genes de esta ruta, incluido *gap-1*, presentan una mayor expresión en un mutante *crc*<sup>-</sup> de *P. putida* KT2440 (159). Además, Browne *et al.* (14) identificaron también motivos de unión para Crc aguas arriba de los genes *glpF*, *oprB-1* y *gap-1*. Aunque esta observación sugiere la implicación de Crc en el control del crecimiento de *P. putida* KT2440 en glicerol, dicho mutante *crc*<sup>-</sup> no presenta un acortamiento de la fase *lag* del crecimiento bajo las condiciones de cultivo ensayadas en este trabajo (Fig. 6 del Capítulo 3). El sistema PTS también podría influir en el metabolismo del glicerol en *P. putida* KT2440, ya que algunas mutaciones en este sistema retrasan aún más la fase de latencia en glicerol, hasta unas 60 horas, o la adelantan ligeramente (261). Además, las proteínas PtsP, PtsO y PtsN parecen controlar la acumulación del polímero en función del ratio C/N sentido (261). Otro regulador global que podría estar implicado en la conexión entre el metabolismo del glicerol y la síntesis del PHA es NtrC. Hervás *et al.* (93) observan una inducción de los genes *glpF*, *glpD* y *gap-1* en un mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *P. putida* KT2440; sugiriendo que NtrC reprime el metabolismo del glicerol en condiciones de limitación de nitrógeno.

En resumen, además de la regulación específica del *cluster pha* mediada por el regulador PhaD (50) (Anexo 3), en el metabolismo del PHA pueden estar implicados otros reguladores, específicos y globales, como HexR, PsrA, Crc, el sistema PTS, NtrC, los factores sigma RpoS y RpoN o el sistema GacS/GacA. Aunque aún no se ha esclarecido completamente el papel de todos estos reguladores, parece claro que su actividad puede condicionar los niveles celulares de ciertos intermediarios metabólicos, y en última instancia, su canalización hacia la síntesis de PHA, bien sea a través de la  $\beta$ -oxidación (Capítulos 1 y 2) o de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Capítulo 3).

## 2. Aplicaciones biotecnológicas: Desarrollo de nuevas cepas de *P. putida* KT2440 modificadas genéticamente para la producción eficiente de PHA funcionalizados

Los PHA son biopolímeros de gran interés a nivel industrial, médico, farmacéutico, agrícola y medioambiental (33, 35, 79, 151, 179, 194, 258, 283). La implantación en el mercado de los PHA, y de los bioplásticos en general, se ha visto favorecida por la progresiva equiparación de los costes de producción con los de los plásticos convencionales, y por las políticas medioambientales adoptadas por los distintos gobiernos a favor del desarrollo de alternativas a los plásticos derivados de la industria petroquímica (16, 35, 250). En la producción industrial de PHA los costes se ven condicionados principalmente por la fuente de carbono empleada, el proceso de fermentación, y la extracción y purificación del polímero (62, 133, 246). Hay que tener en cuenta que el proceso de escalado, desde la selección y desarrollo de las cepas adecuadas, pasando por la optimización de los cultivos en matraz y en plantas piloto, hasta llegar a las condiciones óptimas de producción industrial, implica una elevada inversión en concepto de investigación y desarrollo (35). Las investigaciones realizadas a lo largo de los últimos años han abordado el abaratamiento de los costes en la producción de PHA a través de diferentes aproximaciones: (i) empleo de fuentes de carbono más baratas, preferentemente residuos industriales (12, 82, 133); (ii) mejora de los ratios de crecimiento y producción de PHA, bien sea por medio de nuevas cepas manipuladas genéticamente (incluyendo el uso de sistemas heterólogos) (36, 112), o mediante la manipulación de los parámetros físico-químicos que afectan al proceso de fermentación (31, 61, 72, 102); y (iii) desarrollo de sistemas alternativos de recuperación y purificación del polímero resultante (51, 154). Por otro lado, el desarrollo industrial de estos biopolímeros también se ha visto impulsado por medio de la obtención de nuevos PHA, con propiedades y aplicaciones diferentes, que dan lugar a materiales con un valor añadido respecto a los plásticos convencionales.

El análisis del crecimiento y producción de PHA en *P. putida* a partir de distintas fuentes de carbono, así como el estudio del metabolismo de los PHA por

medio de aproximaciones transcripcionales y de análisis de flujos metabólicos (Capítulo 1), ha permitido diseñar cepas mutantes y estrategias de cultivo de gran interés para la producción de PHA y de monómeros quirales. En primer lugar, se ha construido una cepa de *P. putida* KT2440 capaz de producir biomasa y PHA de manera eficaz a partir de glicerol, un residuo de la producción del biodiésel, y por lo tanto una fuente de carbono barata (Capítulo 3). Por otro lado, se han desarrollado estrategias de cultivo y diseñado nuevas cepas, que pueden ser aplicadas para producir PHA funcionalizados con un alto valor añadido, lo cual relativiza el coste de producción en relación al precio final del producto obtenido (Capítulos 2 y 3). En resumen, los resultados alcanzados en esta Tesis Doctoral suponen un importante avance para la producción de los PHA a nivel industrial y han permitido el desarrollo de dos patentes: en la patente PCT/ES2011/070654 (licenciada por Biopolis S.L.) se describe la producción de una nueva familia de PHA con grupos tioéster en la cadena lateral denominados PHACOS; mientras que la patente P201131846 hace referencia a la mejora de la producción de PHA a partir de glicerol utilizando la cepa de *P. putida* KT40GlpR.

### **2.1. Empleo de sustratos de bajo coste para la producción de PHA en cepas de *P. putida***

Como ya se ha indicado, la selección de fuentes de carbono apropiadas para la producción de PHA a escala industrial tiene un gran impacto sobre el coste final del proceso. El empleo de residuos o subproductos generados en la industria, principalmente agrícola, alimentaria y de síntesis de biofuel, como sustratos para la síntesis de PHA resulta doblemente interesante (82, 133, 237). Por un lado, se abarata el coste de producción de los PHA, haciéndolos más competitivos frente a los plásticos convencionales. Y por otro, se aporta una solución medioambientalmente sostenible para la eliminación de dichos residuos industriales. En este sentido, se ha propuesto la incorporación de la síntesis de PHA dentro de las propias líneas de producción existentes (164). Al integrar la industria agrícola y alimentaria con la producción de biocombustibles y otros productos de elevado valor añadido, como los PHA, se abaratan los costes de transporte y

acumulación de los sub-productos intermediarios generados (133). Son varios los compuestos de bajo coste que se han propuesto como precursores para la síntesis de PHA, entre otros: sueros lácteos generados durante la producción de queso y caseína, harina de huesos y grasas animales derivados de la industria cárnica, melazas generadas como subproductos en la síntesis de azúcares, alpechines procedentes de la producción del aceite de oliva, restos lignocelulósicos de diferentes cultivos, y residuos ricos en glicerol, denominados GLP (*glycerol liquid phase*), originados en la producción de biodiésel (82, 133, 237).

En esta Tesis Doctoral se ha profundizado sobre el uso del glicerol como fuente de carbono precursora para el crecimiento y producción de PHA en *P. putida* KT2440 (Capítulo 3). Gomez *et al.* (82) señalan que, el hecho de que los átomos de carbono presentes en las moléculas de glicerol estén más reducidos que en la glucosa o la lactosa, sitúa a las células que emplean glicerol como sustrato en un estado fisiológico más reducido, lo cual favorece la síntesis del polímero. Esta teoría señala una vez más el importante papel del PHA como sumidero de poder reductor en la célula, relacionando el metabolismo del PHA con el equilibrio energético celular (Capítulo 1). Son varias las especies microbianas capaces de producir PHA a partir de glicerol, o incluso a partir de GLP no purificado (40, 133). Se ha analizado el papel del glicerol como sustrato en varias cepas de *Pseudomonas* (2, 103, 237), así como en otros microorganismos productores naturales de PHA (11, 25, 108, 119, 132, 199). A su vez, el glicerol se ha empleado como sustrato para la síntesis de PHA en cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para expresar los genes *pha* (153, 162).

Sin embargo, el uso industrial del glicerol como fuente de carbono en *P. putida* se ve limitado por la presencia de una fase de latencia muy larga al inicio del cultivo (261). Por lo tanto uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la optimización de la producción de PHA en *P. putida* usando glicerol como sustrato (Capítulo 3). Se ha demostrado que esta fase *lag* puede ser sustancialmente reducida mediante el uso de estrategias de co-metabolismo con distintas fuentes de carbono inductoras. Asimismo, se ha desarrollado una cepa mutante derivada de *P. putida* KT2440 (*P. putida* KT40GlpR) capaz de emplear el glicerol de manera eficaz

para la producción de biomasa y PHA, sin necesidad de añadir inductores adicionales al medio de cultivo. En este estudio se ha logrado acortar el tiempo de crecimiento, lo que supone una evidente ventaja a nivel de escalado industrial, pero además, el rendimiento final en cuanto a acumulación de PHA también se ha visto incrementado (Capítulo 3). Finalmente, hay que señalar que el uso de esta nueva cepa de *P. putida* no se restringe únicamente a la producción de PHA, sino que posteriores modificaciones de esta estirpe por medio de técnicas de Ingeniería Genética permitirían emplear el glicerol en procesos biotecnológicos de producción de otros compuestos de interés.

### **2.2. Producción eficiente de PHA funcionalizados en cepas de *P. putida***

Se ha señalado que una manera de rentabilizar la producción de PHA es desarrollar polímeros con un alto valor añadido. Hoy en día la industria, y sobre todo la biomedicina, demandan nuevos materiales que han de ser diseñados a medida para satisfacer necesidades concretas a nivel de arquitectura química, propiedades físicas, y características de la superficie del polímero (35). El campo de la Microbiología nos brinda las herramientas de Ingeniería Genética necesarias para la producción de polímeros de reserva diseñados a medida (107). Como ya se ha indicado, algunas bacterias son capaces de polimerizar de manera natural (*R*)-HA-CoA con diversos grupos funcionales a partir de ácidos grasos que presentan dichas modificaciones en su estructura (122, 145, 169, 241) (Fig. 2). Las propiedades estructurales y físico-químicas de estos biopolímeros funcionalizados los posiciona como excelentes candidatos para el desarrollo de una nueva generación de biomateriales a través de ulteriores modificaciones químicas (89, 204).

En 1992 Lenz *et al.* (145) recopilaron información sobre una gran variedad de compuestos orgánicos que *P. oleovorans* es capaz de emplear para promover, bien su crecimiento celular, la producción de PHA, o ambos procesos a la vez. Algunos de los compuestos analizados en este estudio podían dar lugar a monómeros con cadenas laterales potencialmente susceptibles de ser modificadas químicamente. Sin embargo, su uso como única fuente de carbono no permitía alcanzar un buen

rendimiento final del cultivo en términos, tanto de biomasa, como de producción del polímero. Por este motivo la mayoría de los PHA con grupos funcionales obtenidos por síntesis bacteriana se han conseguido aplicando estrategias de incorporación secuencial de varios sustratos (*sequential feeding*), o bien mediante co-metabolismo con más de un precursor a la vez (*co-feeding*) (5, 58, 85, 88, 145). Como ya se ha discutido al hablar de la interconexión entre la  $\beta$ -oxidación y el metabolismo de PHA, es probable que el efecto inductor ejercido por precursores convencionales de los PHA sobre el crecimiento y la producción de PHA a partir de sustratos no preferenciales esté mediado por PhaD, el regulador transcripcional del *cluster pha* (50) (Anexo 3). En esta Tesis Doctoral se ha aplicado esta estrategia de co-metabolismo para la incorporación de un nuevo tipo de unidades funcionales en los PHA empleando un mutante disruptivo del gen *fadB* (*P. putida* KT42FadB). El uso del ácido 6-ATH como precursor funcionalizado y del ácido decanoico como co-sustrato, ha permitido desarrollar una nueva familia de polímeros bacterianos (PHACOS) que presentan grupos tioéster en la cadena lateral (Capítulo 2). A su vez, el hecho de que el metabolismo del PHA implique un ciclo continuo de síntesis y degradación del polímero permite modificar la composición monomérica de los PHA por medio de la incorporación secuencial de sustratos. El cultivo en dos fases permite el crecimiento y acumulación de biomasa en un medio rico, seguido de una segunda fase en la que la composición final del polímero puede ser modulada en función de la fuente de carbono empleada. De esta forma se ha obtenido una familia de PHA funcionalizados con composiciones monoméricas diferentes, empleando la misma cepa y las mismas fuentes de carbono (Capítulo 2). Asimismo, se ha visto en qué medida influye la incorporación de monómeros con grupos tioéster, en diferente proporción, sobre propiedades físico-químicas como el peso molecular, la temperatura de transición vítrea y de fusión y las propiedades mecánicas del polímero resultante (Capítulo 2).

Los PHA funcionalizados no sólo se obtienen a partir de ácidos grasos que porten dichas funcionalizaciones en su estructura, sino que también es posible obtenerlos a partir de fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas con los ácidos grasos. Los mcl-PHA producidos a través de la síntesis *de novo* de ácidos

grasos incorporan de manera natural monómeros insaturados (p. ej., (*R*)-3-hidroxi-5-*cis*-dodecenoato) en el polímero final con independencia de la fuente de carbono empleada (87, 103, 251). La incorporación de insaturaciones en las cadenas laterales del PHA permite la funcionalización *in situ* por medio posteriores modificaciones químicas del polímero (225). Por lo tanto, la cepa *P. putida* KT40GlpR permite abaratar la producción de los mcl-PHA funcionalizados al emplear como fuente de carbono un residuo industrial de bajo coste, al mismo tiempo que revaloriza el producto final gracias a la incorporación de insaturaciones en su estructura (Capítulo 3).

## **V. CONCLUSIONES**



Las principales conclusiones alcanzadas a lo largo de esta Tesis Doctoral son:

- El metabolismo del PHA es un ciclo metabólico amortiguador que juega un papel crucial en el mantenimiento del balance celular del carbono y la energía.
- La supresión de la capacidad para producir PHA (mutante *phaC1<sup>-</sup>* de *P. putida* KT2442) implica una modificación de los niveles de expresión de múltiples genes y enzimas relacionados con el metabolismo central del carbono.
- La producción de PHA supone una ventaja fisiológica para *P. putida* y su eliminación conlleva una recanalización de los flujos celulares del carbono y la energía hacia diversos procesos celulares, implicando un aumento de la tasa de respiración.
- La regulación coordinada entre el metabolismo de los PHA y el catabolismo de los ácidos grasos sugiere que la  $\beta$ -oxidación es la ruta anaplerótica preferencial capaz de aportar monómeros para la síntesis de PHA.
- El co-metabolismo con ácidos grasos permite emplear fuentes de carbono que por sí solas (6-ATH y glicerol) no son catabolizadas de manera eficaz para el crecimiento y producción de PHA en esta bacteria.
- La incorporación secuencial de sustratos permite modular la composición monomérica del polímero resultante, lo que da lugar a poliésteres bacterianos con distintas propiedades físico-químicas.
- La producción de PHA a partir de fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas con los PHA implica un complejo sistema de regulación coordinado con la regulación específica y global del metabolismo central del carbono.
- La inactivación del represor transcripcional GlpR permite a *P. putida* KT2440 emplear el glicerol como precursor óptimo para el crecimiento y producción de PHA.

- Gracias a las nuevas cepas bacterianas y estrategias de cultivo desarrolladas, se ha logrado un mayor rendimiento en la producción de PHA con insaturaciones en la cadena lateral empleando glicerol como sustrato.
- El diseño de nuevas cepas bacterianas derivadas de *P. putida*, en combinación con las estrategias de cultivo citadas, también ha permitido el desarrollo de una nueva familia de PHA funcionalizados (denominados PHACOS) con grupos tioéster en la cadena lateral.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- 1 **Arias, S., Sandoval, A., Arcos, M., Canedo, L. M., Maestro, B., Sanz, J. M., Naharro, G., y Luengo, J. M. (2008).** Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies. *Microb. Biotechnol.* 1:170-176.
- 2 **Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., y Foglia, T. A. (2005).** Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules* 6:2106-2112.
- 3 **Babel, W., Ackermann, J. U., y Breuer, U. (2001).** Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71:125-157.
- 4 **Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J., y Timmis, K. N. (1981).** Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16:237-247.
- 5 **Bear, M. M., Leboucher-Durand, M. A., Langlois, V., Lenz, R. W., Goodwin, S., y Guérin, P. (1997).** Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side chains. *React. Funct. Polym.* 34:65-77.
- 6 **Best, E. A., y Knauf, V. C. (1993).** Organization and nucleotide sequences of the genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase protein of *Pseudomonas aeruginosa* acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Bacteriol.* 175:6881-6889.
- 7 **Binstock, J. F., Pramanik, A., y Schulz, H. (1977).** Isolation of a multi-enzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:492-495.
- 8 **Black, P. N. (1991).** Primary sequence of the *Escherichia coli fadL* gene encoding an outer membrane protein required for long-chain fatty acid transport. *J. Bacteriol.* 173:435-442.
- 9 **Black, P. N., DiRusso, C. C., Metzger, A. K., y Heimert, T. L. (1992).** Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J. Biol. Chem.* 267:25513-25520.
- 10 **Black, P. N., y DiRusso, C. C. (1994).** Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1210:123-145.
- 11 **Bormann, E. J., y Roth, M. (1999).** The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnol. Lett* 21:1059-1063.
- 12 **Braunegg, G., Lefebvre, G., y Genser, K. F. (1998).** Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65:127-161.
- 13 **Brigham, C. J., Budde, C. F., Holder, J. W., Zeng, Q., Mahan, A. E., Rha, C., y Sinskey, A. J. (2010).** Elucidation of  $\beta$ -oxidation pathways in *Ralstonia*

- eutropha* H16 by examination of global gene expression. J. Bacteriol. 192:5454-5464.
- 14 **Browne, P., Barret, M., O'Gara, F., y Morrissey, J. P. (2010).** Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. BMC Microbiol. 10:300.
- 15 **Budde, C. F., Mahan, A. E., Lu, J., Rha, C., y Sinskey, A. J. (2010).** Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. J. Bacteriol. 192:5319-5328.
- 16 **Byrom, D. (1987).** Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. Trends Biotechnol. 5:246-250.
- 17 **Campbell, J. W., y Cronan, J. E., Jr. (2001).** Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. Annu. Rev. Microbiol. 55:305-332.
- 18 **Campbell, J. W., y Cronan, J. E., Jr. (2002).** The enigmatic *Escherichia coli* *fadE* gene is *yafH*. J. Bacteriol. 184:3759-3764.
- 19 **Campbell, J. W., Morgan-Kiss, R. M., y Cronan, J. E., Jr. (2003).** A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic  $\beta$ -oxidation pathway. Mol. Microbiol. 47:793-805.
- 20 **Campisano, A., Overhage, J., y Rehm, B. H. (2008).** The polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes are differentially regulated in planktonic- and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biotechnol. 133:442-452.
- 21 **Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J., García, J. L., y Díaz, E. (2009).** Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73:71-133.
- 22 **Carnicero, D., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L. M., Schleissner, C., y Luengo, J. M. (1997).** Octanoic acid uptake in *Pseudomonas putida* U. FEMS Microbiol. Lett. 149:51-58.
- 23 **Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., y Espín, G. (2000).** The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 182:2624-2628.
- 24 **Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., y Okon, Y. (2010).** Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates, p. 39-61. In Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer Berlin / Heidelberg.
- 25 **Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C., y da Fonseca, M. M. R. (2009).** Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Process. Biochem. 44:509-515.
- 26 **Cevallos, M. A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y., y Mora, J. (1996).** Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. J. Bacteriol. 178:1646-1654.

- 27 **Ciesielski, S., Mozejko, J., y Przybytek, G. (2010).** The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:511-520.
- 28 **Clarke, P. H. (1982).** The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48:105-130.
- 29 **Cronan, J. E., y Rock, C. O. (1996).** Biosynthesis of membrane lipids, p. 612–636. *In* C., Neidhardt F., R., Curtis III, L, Ingraham J., C., Lin E. C., B., Low K., B., Magasanik, S., Reznikoff W., M., Riley, M., Schaechter, y E., Umbarger H. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Washington.
- 30 **Cuskey, S. M., y Phibbs, P. V. (1985).** Chromosomal mapping of mutations affecting glycerol and glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 162:872-880.
- 31 **Chanprateep, S., Kikuya, K., Shimizu, H., y Shioya, S. (2002).** Model predictive controller for biodegradable polyhydroxyalkanoate production in fed-batch culture. *J. Biotechnol.* 95:157-169.
- 32 **Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., y Chatterjee, A. K. (2007).** PsaA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3684-3694.
- 33 **Chen, G. Q., y Wu, Q. (2005).** The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:6565-6578.
- 34 **Chen, G. Q., y Wu, Q. (2005).** Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:592-599.
- 35 **Chen, G. Q. (2009).** A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38:2434-2446.
- 36 **Chen, G. Q. (2010).** Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates, p. 17-37. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer Berlin / Heidelberg.
- 37 **Chen, J. Y., Liu, T., Zheng, Z., Chen, J. C., y Chen, G. Q. (2004).** Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:231-237.
- 38 **Chiang, S. M., y Schellhorn, H. E. (2010).** Evolution of the RpoS regulon: origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. *J. Mol. Evol.* 70:557-571.
- 39 **Chung, A., Liu, Q., Ouyang, S. P., Wu, Q., y Chen, G. Q. (2009).** Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by *pha* operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring *tesB* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:513-519.

- 40 **da Silva, G. P., Mack, M., y Contiero, J. (2009).** Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27:30-39.
- 41 **Daddaoua, A., Krell, T., y Ramos, J. L. (2009).** Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and Entner-Doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *J. Biol. Chem.* 284:21360-21368.
- 42 **Daddaoua, A., Krell, T., Alfonso, C., Morel, B., y Ramos, J. L. (2010).** Compartmentalized glucose metabolism in *Pseudomonas putida* is controlled by the PtxS repressor. *J. Bacteriol.* 192:4357-4366.
- 43 **Davis, R., Chandrashekar, A., y Shamala, T. R. (2008).** Role of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratases of *Pseudomonas* sp. in the production of polyhydroxyalkanoates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93:285-296.
- 44 **Dawes, E. A., y Senior, P. J. (1973).** The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10:135-266.
- 45 **Dawes, J. B. (1986).** Microbial energy reserve compounds, p. 145-165. *In* Dawes, E.A (ed.), *Tertiary level biology microbial energetics*. Blackie, London.
- 46 **de Eugenio, L. I., García, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Román, J. S., García, J. L., y Prieto, M. A. (2007).** Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chem.* 282:4951-4962.
- 47 **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. *Eng. Life Sci.* 8:260-267.
- 48 **de Eugenio, L. I. (2009).** Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- 49 **de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J. L., y Prieto, M. A. (2010).** The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ. Microbiol.* 12:207-221.
- 50 **de Eugenio, L. I., Galán, B., Escapa, I. F., Maestro, B., Sanz, J. M., García, J. L., y Prieto, M. A. (2010).** The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environ. Microbiol.* 12:1591-1603.

- 51 **de Koning, G. J. M., y Witholt, B. (1997).** A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* Part 1: Solubilization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 17:7-13.
- 52 **de Roo, G., Ren, Q., Witholt, B., y Kessler, B. (2000).** Development of an improved in vitro activity assay for medium chain length PHA polymerases based on CoenzymeA release measurements. *J. Microbiol. Methods* 41:1-8.
- 53 **Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E. M., y Verstraete, W. (2001).** Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.* 3:649-657.
- 54 **del Castillo, T., Ramos, J. L., Rodríguez-Herva, J. J., Fuhrer, T., Sauer, U., y Duque, E. (2007).** Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J. Bacteriol.* 189:5142-5152.
- 55 **del Castillo, T., Duque, E., y Ramos, J. L. (2008).** A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *J. Bacteriol.* 190:2331-2339.
- 56 **Deutscher, J., Francke, C., y Postma, P. W. (2006).** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:939-1031.
- 57 **Díaz, E., y Prieto, M. A. (2000).** Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:467-475.
- 58 **Doi, Y., y Abe, C. (1990).** Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- $\omega$ -chloroalkanoates. *Macromolecules* 23:3705-3707.
- 59 **dos Santos, V. A. P. M., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M., y Timmis, K. N. (2004).** Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 6:1264-1286.
- 60 **Durham, D. R., y Phibbs, P. V., Jr. (1982).** Fractionation and characterization of the phosphoenolpyruvate: fructose 1-phosphotransferase system from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 149:534-541.
- 61 **Durner, R., Zinn, M., Witholt, B., y Egli, T. (2001).** Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 72:278-288.
- 62 **Elbahloul, Y., y Steinbüchel, A. (2009).** Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:643-651.
- 63 **Emeruwa, A. C., y Hawirko, R. Z. (1973).** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* 116:989-993.

- 64 **Erb, R. W., Eichner, C. A., Wagner-Dobler, I., y Timmis, K. N. (1997).** Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nat. Biotechnol.* 15:378-382.
- 65 **Escapa, I. F. (2008).** Estudio de las bases moleculares de la regulación del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida* KT2442. Diploma de Estudios Avanzados (DEA). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- 66 **Federal Register (1982).** Certified host–vector systems. Appendix E, 47:17197. United States National Institutes of Health.
- 67 **Feng, Y., y Cronan, J. E. (2009).** A new member of the *Escherichia coli* *fad* regulon: transcriptional regulation of *fadM* (*ybaW*). *J. Bacteriol.* 191:6320-6328.
- 68 **Feng, Y., y Cronan, J. E. (2010).** Overlapping repressor binding sites result in additive regulation of *Escherichia coli* FadH by FadR and ArcA. *J. Bacteriol.* 192:4289-4299.
- 69 **Fiedler, S., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. (2000).** PhaG-mediated synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2117-2124.
- 70 **Fiedler, S., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. (2002).** The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.* 178:149-160.
- 71 **Follonier, S., Panke, S., y Zinn, M. (2011).** A reduction in growth rate of *Pseudomonas putida* KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate. *Microb. Cell Fact.* 10:25.
- 72 **Follonier, S., Henes, B., Panke, S., y Zinn, M. (2012).** Putting cells under pressure: a simple and efficient way to enhance the productivity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in processes with *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnol. Bioeng.* 109:451-461.
- 73 **Foster, L. J., Stuart, E. S., Tehrani, A., Lenz, R. W., y Fuller, R. C. (1996).** Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 19:177-183.
- 74 **Franklin, F. C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., y Timmis, K. N. (1981).** Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWVO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:7458-7462.
- 75 **Fuhrer, T., Fischer, E., y Sauer, U. (2005).** Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* 187:1581-1590.

- 76 **Fukui, T., Shiomi, N., y Doi, Y. (1998).** Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 180:667-673.
- 77 **Fukui, T., Yokomizo, S., Kobayashi, G., y Doi, Y. (1999).** Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (*R*)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:69-75.
- 78 **Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L., y Prieto, M. A. (2011).** Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Mol. Microbiol.* 79:402-418.
- 79 **Gao, X., Chen, J. C., Wu, Q., y Chen, G. Q. (2011).** Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:1-7.
- 80 **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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:1975-1988.
- 81 **García, B., Olivera, E. R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Canedo, L. M., Prieto, M. A., García, J. L., Martínez, M., y Luengo, J. M. (1999).** Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source: Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon. *J. Biol. Chem.* 274:29228-29241.
- 82 **Gomez, J. G. C., Méndez, B. S., Nikel, P. I., Pettinari, M. J., Prieto, M. A., y Silva, L. F. (2012).** Making green polymers even greener: Towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products, p. 41-62. *In* Petre, Marian (ed.), *Advances in Applied Biotechnology*. InTech, Rijeka, Croatia.
- 83 **Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., y Rehm, B. H. (2009).** Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* 10:660-669.
- 84 **Hartmann, G., Honikel, K. O., Knusel, F., y Nuesch, J. (1967).** The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta* 145:843-844.
- 85 **Hartmann, R., Hany, R., Witholt, B., y Zinn, M. (2010).** Simultaneous biosynthesis of two copolymers in *Pseudomonas putida* GPO1 using a two-stage continuous culture system. *Biomacromolecules* 11:1488-1493.
- 86 **Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L., y Dawes, E. A. (1988).** The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 52:259-264.

- 87 **Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F., y Dawes, E. A. (1990).** Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3354-3359.
- 88 **Hazer, B., Lenz, R. W., y Fuller, R. C. (1994).** Biosynthesis of methyl-branched poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate)s by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* 27:45-49.
- 89 **Hazer, B., y Steinbüchel, A. (2007).** Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1-12.
- 90 **Heath, H. E., y Gaudy, E. T. (1978).** Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 136:638-646.
- 91 **Heath, R. J., y Rock, C. O. (1996).** Roles of the FabA and FabZ  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271:27795-27801.
- 92 **Henderson, R. A., y Jones, C. W. (1997).** Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Arch. Microbiol.* 168:486-492.
- 93 **Hervás, A. B., Canosa, I., y Santero, E. (2008).** Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.* 190:416-420.
- 94 **Hervás, A. B., Canosa, I., Little, R., Dixon, R., y Santero, E. (2009).** NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 191:6123-6135.
- 95 **Hoang, T. T., y Schweizer, H. P. (1997).** Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *J. Bacteriol.* 179:5326-5332.
- 96 **Hoang, T. T., y Schweizer, H. P. (1999).** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* 181:5489-5497.
- 97 **Hoang, T. T., Sullivan, S. A., Cusick, J. K., y Schweizer, H. P. (2002).**  $\beta$ -ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology* 148:3849-3856.
- 98 **Hoffmann, N., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. (2000).** Homologous functional expression of cryptic *phaG* from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:665-670.

- 99 **Hoffmann, N., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. (2000).** The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:253-259.
- 100 **Hoffmann, N., y Rehm, B. H. (2004).** Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237:1-7.
- 101 **Hoffmann, N., y Rehm, B. H. (2005).** Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads. *Biotechnol. Lett.* 27:279-282.
- 102 **Hong, K., Chen, G. Q., Yu, P. H., Zhang, G., Liu, Y., y Chua, H. (2000).** Effect of C:N molar ratio on monomer composition of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas mendocina* 0806 and *Pseudomonas pseudoalkaligenus* YS1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86:971-980.
- 103 **Huijberts, G. N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G. W., y Witholt, B. (1992).** *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:536-544.
- 104 **Huisman, G. W., de Leeuw, O., Eggink, G., y Witholt, B. (1989).** Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1949-1954.
- 105 **Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., y Witholt, B. (1991).** Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* 266:2191-2198.
- 106 **Hume, A. R., Nikodinovic-Runic, J., y O'Connor, K. E. (2009).** FadD from *Pseudomonas putida* CA-3 is a true long-chain fatty acyl coenzyme A synthetase that activates phenylalkanoic and alkanolic acids. *J. Bacteriol.* 191:7554-7565.
- 107 **Hunter, P. (2010).** Can bacteria save the planet? *EMBO Rep.* 11:266-269.
- 108 **Ibrahim, M. H. A., y Steinbüchel, A. (2010).** *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. *J. Appl. Microbiol.* 108:214-225.
- 109 **Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., y Kivisaar, M. (2010).** Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutat. Res.* 683:106-114.
- 110 **Jendrossek, D., y Handrick, R. (2002).** Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:403-432.
- 111 **Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., y Díaz, E. (2002).** Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4:824-841.

- 112 Jung, Y., Lee, S., y Tam, T. (2010).** Towards systems metabolic engineering of PHA producers, p. 63-84. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer Berlin / Heidelberg.
- 113 Kadouri, D., Jurkevitch, E., y Okon, Y. (2003).** Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3244-3250.
- 114 Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., y Castro-Sowinski, S. (2005).** Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit. Rev. Microbiol.* 31:55-67.
- 115 Kalia, V. C., Lal, S., y Cheema, S. (2007).** Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer. *Gene* 389:19-26.
- 116 Kameda, K., y Nunn, W. D. (1981).** Purification and characterization of acyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256:5702-5707.
- 117 Kang, Y., Nguyen, D. T., Son, M. S., y Hoang, T. T. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5*  $\beta$ -oxidation operon. *Microbiology* 154:1584-1598.
- 118 Kang, Y., Lunin, V. V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M. J., y Hoang, T. T. (2009).** The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 73:120-136.
- 119 Kawata, Y., y Aiba, S. I. (2010).** Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:175-177.
- 120 Kazakov, A. E., Rodionov, D. A., Alm, E., Arkin, A. P., Dubchak, I., y Gelfand, M. S. (2009).** Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J. Bacteriol.* 191:52-64.
- 121 Kessler, B., y Witholt, B. (2001).** Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* 86:97-104.
- 122 Kim, D. Y., Kim, Y. B., y Rhee, Y. H. (2000).** Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28:23-29.
- 123 Kim, G. J., Lee, I. Y., Yoon, S. C., Shin, Y. C., y Park, Y. H. (1997).** Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate. *Enzyme Microb. Technol.* 20:500-505.
- 124 Kim, J., Jeon, C. O., y Park, W. (2008).** Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 154:3905-3916.

- 125 **Kim, O., Gross, R. A., Hammar, W. J., y Newmark, R. A. (1996).** Microbial synthesis of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) containing fluorinated side-chain substituents. *Macromolecules* 29:4572-4581.
- 126 **Kim, Y. B., Rhee, Y. H., Han, S.-H., Heo, G. S., y Kim, J. S. (1996).** Poly-3-hydroxyalkanoates produced from *Pseudomonas oleovorans* grown with  $\omega$ -phenoxyalkanoates. *Macromolecules* 29:3432-3435.
- 127 **Klinke, S., de Roo, G., Witholt, B., y Kessler, B. (2000).** Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3705-3710.
- 128 **Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J. L., y Timmis, K. N. (1989).** Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* 171:4326-4333.
- 129 **Kojic, M., y Venturi, V. (2001).** Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J. Bacteriol.* 183:3712-3720.
- 130 **Kojic, M., Aguilar, C., y Venturi, V. (2002).** TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J. Bacteriol.* 184:2324-2330.
- 131 **Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., y Venturi, V. (2005).** Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 246:175-181.
- 132 **Koller, M., Bona, R., Hermann, C., Horvat, P., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P., y Braunegg, G. (2005).** Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Wautersia eutropha* by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates. *Biocatal. Biotransform.* 23:329-337.
- 133 **Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., y Braunegg, G. (2010).** Microbial PHA production from waste raw materials, p. 85-119. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer Berlin / Heidelberg.
- 134 **Kornberg, H. L., y Krebs, H. A. (1957).** Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* 179:988-991.
- 135 **Kornberg, H. L. (1966).** The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 99:1-11.
- 136 **Kraak, M. N., Smits, T. H., Kessler, B., y Witholt, B. (1997).** Polymerase C1 levels and poly(*R*-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* 179:4985-4991.
- 137 **Krebs, H. A., y Johnson, W. A. (1937).** The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4:148-156.
- 138 **Kundig, W., Ghosh, S., y Roseman, S. (1964).** Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in novel phospho-transferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52:1067-1074.

- 139 Kutchma, A. J., Hoang, T. T., y Schweizer, H. P. (1999).** Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD). *J. Bacteriol.* 181:5498-5504.
- 140 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2924-2932.
- 141 Langenbach, S., Rehm, B. H., y Steinbuchel, A. (1997).** Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 150:303-309.
- 142 Lawrence, A. G., Schoenheit, J., He, A., Tian, J., Liu, P., Stubbe, J., y Sinskey, A. J. (2005).** Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:663-672.
- 143 Lee, S. Y., Wong, H. H., Choi, J., Lee, S. H., Lee, S. C., y Han, C. S. (2000).** Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. *Biotechnol. Bioeng.* 68:466-470.
- 144 Lemoigne, M. (1926).** Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acid  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8:770-782.
- 145 Lenz, R. W., Kim, Y. B., y Fuller, R. C. (1992).** Production of unusual bacterial polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 103:207-214.
- 146 Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. R., y Chen, G. Q. (2011).** Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 13:11-17.
- 147 Liu, W., y Chen, G. Q. (2007).** Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with high 3-hydroxytetradecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1153-1159.
- 148 Lodwig, E. M., Leonard, M., Marroqui, S., Wheeler, T. R., Findlay, K., Downie, J. A., y Poole, P. S. (2005).** Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:67-74.
- 149 Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., y Olivera, E. R. (2003).** Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:251-260.
- 150 Ma, L., Zhang, H., Liu, Q., Chen, J., Zhang, J., y Chen, G. Q. (2009).** Production of two monomer structures containing medium-chain-length

- polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation-impaired mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Bioresour. Technol.* 100:4891-4894.
- 151 **Madison, L. L., y Huisman, G. W. (1999).** Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:21-53.
- 152 **Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H., y Yamane, T. (1999).** Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 181:2914-2921.
- 153 **Mahishi, L. H., Tripathi, G., y Rawal, S. K. (2003).** Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.* 158:19-27.
- 154 **Martínez, V., García, P., García, J. L., y Prieto, M. A. (2011).** Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb. Biotechnol.* 4:533-547.
- 155 **Matin, A., Veldhuis, C., Stegeman, V., y Veenhuis, M. (1979).** Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J. Gen. Microbiol.* 112:349-355.
- 156 **McCowen, S. M., Phibbs, P. V., y Feary, T. W. (1981).** Glycerol catabolism in wild-type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 5:191-196.
- 157 **Moldes, C., García, P., García, J. L., y Prieto, M. A. (2004).** In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3205-3212.
- 158 **Moldes, C., Farinós, G. P., de Eugenio, L. I., García, P., García, J. L., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Castañera, P., y Prieto, M. A. (2006).** New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:88-93.
- 159 **Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C., y Rojo, F. (2009).** The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* 9:2910-2928.
- 160 **Morgan-Kiss, R. M., y Cronan, J. E. (2004).** The *Escherichia coli* *fadK* (*ydiD*) gene encodes an anaerobically regulated short chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 279:37324-37333.
- 161 **Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J.,**

- Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. A., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tummeler, B., y Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4:799-808.
- 162 **Nikel, P. I., Pettinari, M. J., Galvagno, M. A., y Méndez, B. S. (2008).** Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:1337-1343.
- 163 **Nogales, J., Palsson, B. O., y Thiele, I. (2008).** A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Syst Biol* 2:79.
- 164 **Nonato, R. V., Mantelatto, P. E., y Rossell, C. E. (2001).** Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:1-5.
- 165 **Oeding, V., y Schlegel, H. G. (1973).**  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134:239-248.
- 166 **Okon, Y., y Itzigsohn, R. (1992).** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 103:131-139.
- 167 **Olivera, E. R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M. A., Canedo, L., Dirusso, C. C., Naharro, G., y Luengo, J. M. (2001).** Two different pathways are involved in the  $\beta$ -oxidation of *n*-alkanoic and *n*-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39:863-874.
- 168 **Olivera, E. R., Carnicero, D., Jodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G. A., Gallardo, A., Román, J. S., García, J. L., Naharro, G., y Luengo, J. M. (2001).** Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
- 169 **Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., y Luengo, J. (2010).** Unusual PHA biosynthesis, p. 133-186. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer, Berlin / Heidelberg.
- 170 **Ouyang, S. P., Luo, R. C., Chen, S. S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q., y Chen, G. Q. (2007).** Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules* 8:2504-2511.
- 171 **Overath, P., Pauli, G., y Schairer, H. U. (1969).** Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur. J. Biochem.* 7:559-574.
- 172 **Pachauri, N., y He, B. (2006).** Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. , *Encontro*

- Internacional Anual da American Society of Agricultural and Biological Engineers, University of Idaho, Moscow, USA.
- 173 Park, J. S., y Lee, Y. H. (1996).** Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production. *J. Ferment. Bioeng.* 81:197-205.
- 174 Park, S. J., Park, J. P., y Lee, S. Y. (2002).** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiol. Lett.* 214:217-222.
- 175 Peoples, O. P., y Sinskey, a. J. (1989).** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* 264:15298-15303.
- 176 Peplinski, K., Ehrenreich, A., Doring, C., Bomeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C., y Steinbüchel, A. (2010).** Genome-wide transcriptome analyses of the "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology* 156:2136-2152.
- 177 Petruschka, L., Adolf, K., Burchhardt, G., Dervedde, J., Jurgensen, J., y Herrmann, H. (2002).** Analysis of the *zwf-pgl-eda*-operon in *Pseudomonas putida* strains H and KT2440. *FEMS Microbiol. Lett.* 215:89-95.
- 178 Pham, T. H., Webb, J. S., y Rehm, B. H. (2004).** The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150:3405-3413.
- 179 Philip, S. E., Keshavarz, T., y Roy, I. (2007).** Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 247:233-247.
- 180 Pieper-Fürst, U., Madkour, M. H., Mayer, F., y Steinbüchel, A. (1995).** Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *J. Bacteriol.* 177:2513-2523.
- 181 Poehlein, A., Kusian, B., Friedrich, B., Daniel, R., y Bowien, B. (2011).** Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. *J. Bacteriol.* 193:5017.
- 182 Postma, P. W., Lengeler, J. W., y Jacobson, G. R. (1993).** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594.
- 183 Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., y Steinbüchel, A. (2002).** Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148:2413-2426.

- 184 Povolo, S., Tombolini, R., Morea, A., Anderson, A. J., Casella, S., y Nuti, M. P. (1994).** Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Can. J. Microbiol.* 40:823-829.
- 185 Pramanik, A., Pawar, S., Antonian, E., y Schulz, H. (1979).** Five different enzymatic activities are associated with the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 137:469-473.
- 186 Pries, A., Priefert, H., Kruger, N., y Steinbüchel, A. (1991).** Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:5843-5853.
- 187 Prieto, M. A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., y Kessler, B. (1999).** PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* 181:858-868.
- 188 Prieto, M. A., Kellerhals, M. B., Bozzato, G. B., Radnovic, D., Witholt, B., y Kessler, B. (1999).** Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3265-3271.
- 189 Prieto, M. A., de Eugenio, L. I., Galán, B., Luengo, J. M., y Witholt, B. (2007).** Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates, p. 397-428. *In* Ramos, J.L. y Filloux, A. (ed.), *Pseudomonas: a model system in biology*, vol. V. Springer, Berlin, Germany.
- 190 Puchalka, J., Oberhardt, M. A., Godinho, M., Bielecka, A., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Papin, J. A., y Martins dos Santos, V. A. (2008).** Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput. Biol.* 4:e1000210.
- 191 Qi, Q., Rehm, B. H., y Steinbüchel, A. (1997).** Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:155-162.
- 192 Qi, Q., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. (1998).** Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 167:89-94.
- 193 Raberg, M., Peplinski, K., Heiss, S., Ehrenreich, A., Voigt, B., Doring, C., Bomeke, M., Hecker, M., y Steinbüchel, A. (2011).** Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G+1 with regard to glucose utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2058-2070.
- 194 Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., y Roy, I. (2011).** Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng., R* 72:29-47.

- 195 **Raiger-lustman, L. J., y Ruiz, J. A. (2008).** The alternative sigma factor,  $\sigma^S$ , affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol. Lett. 284:218-224.
- 196 **Ramos-González, M. I., y Molin, S. (1998).** Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bacteriol. 180:3421-3431.
- 197 **Ramos, J. L., Wasserfallen, A., Rose, K., y Timmis, K. N. (1987).** Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. Science 235:593-596.
- 198 **Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., y Tobes, R. (2005).** The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69:326-356.
- 199 **Reddy, S. V., Thirumala, M., y Mahmood, S. K. (2009).** A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:837-843.
- 200 **Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernández, D. U., Strompl, C., Moore, E. R. B., y Timmis, K. N. (2002).** Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. Environ. Microbiol. 4:912-915.
- 201 **Rehm, B. H., Kruger, N., y Steinbüchel, A. (1998).** A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. J. Biol. Chem. 273:24044-24051.
- 202 **Rehm, B. H. (2003).** Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Biochem. J 376:15-33.
- 203 **Rehm, B. H. (2006).** Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. Biotechnol. Lett 28:207-213.
- 204 **Rehm, B. H. (2010).** Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat. Rev. Microbiol. 8:578-592.
- 205 **Ren, Q., Sierro, N., Kellerhals, M., Kessler, B., y Witholt, B. (2000).** Properties of engineered poly-3-hydroxyalkanoates produced in recombinant *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol. 66:1311-1320.
- 206 **Ren, Q., Sierro, N., Witholt, B., y Kessler, B. (2000).** FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182:2978-2981.
- 207 **Ren, Q., de Roo, G., van Beilen, J. B., Zinn, M., Kessler, B., y Witholt, B. (2005).** Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase synthesis and in vitro activity in recombinant *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:286-292.

- 208 **Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H., y Zinn, M. (2005).** Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules* 6:2290-2298.
- 209 **Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., y Thöny-Meyer, L. (2009).** Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* 10:916-922.
- 210 **Ren, Q., De Roo, G., Witholt, B., Zinn, M., y Thöny-Meyer, L. (2010).** Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U. *BMC Microbiol.* 10:9-9.
- 211 **Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K. H., Knackmuss, H. J., y Timmis, K. N. (1987).** Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 238:1395-1398.
- 212 **Rojo, F. (2009).** Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 11:2477-2490.
- 213 **Rojo, F. (2010).** Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:658-684.
- 214 **Rothermich, M. M., Guerrero, R., Lenz, R. W., y Goodwin, S. (2000).** Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4279-4291.
- 215 **Ruiz, J. A., López, N. I., Fernández, R. O., y Méndez, B. S. (2001).** Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:225-230.
- 216 **Ruiz, J. A., López, N. I., y Méndez, B. S. (2004).** *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the Polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr. Microbiol.* 48:396-400.
- 217 **Russell, J. B., y Cook, G. M. (1995).** Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59:48-62.
- 218 **Russell, J. B. (2007).** The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13:1-11.
- 219 **Ruth, K., de Roo, G., Egli, T., y Ren, Q. (2008).** Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. *Biomacromolecules* 9:1652-1659.
- 220 **Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E. R., y Luengo, J. M. (2007).** Genetic and ultrastructural analysis of different mutants of *Pseudomonas putida* affected in the poly-3-hydroxy-*n*-alkanoate gene cluster. *Environ. Microbiol.* 9:737-751.

- 221 **Sato, S., Kanazawa, H., y Tsuge, T. (2011).** Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:951-959.
- 222 **Schlegel, H. G., y Gottschalk, G. (1962).** Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese. *Angew. Chem.* 74:342-347.
- 223 **Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., y Witholt, B. (2001).** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258-268.
- 224 **Scholz, C., Wolk, S., Lenz, R. W., y Fuller, R. C. (1994).** Growth and polyester production by *Pseudomonas oleovorans* on branched octanoic acid substrates. *Macromolecules* 27:6358-6362.
- 225 **Scholz, C. (2010).** Perspectives to produce positively or negatively charged polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- 226 **Schubert, P., Steinbüchel, A., y Schlegel, H. G. (1988).** Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:5837-5847.
- 227 **Schulz, H. (1991).** Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1081:109-120.
- 228 **Schweizer, H. P., y Po, C. (1994).** Cloning and nucleotide sequence of the *glpD* gene encoding *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176:2184-2193.
- 229 **Schweizer, H. P., y Po, C. (1996).** Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. *J. Bacteriol.* 178:5215-5221.
- 230 **Schweizer, H. P., Jump, R., y Po, C. (1997).** Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion facilitator (*glpF*) and glycerol kinase (*glpK*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 143:1287-1297.
- 231 **Schweizer, H. P. (2004).** Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in pseudomonads, p. 83-109. *In* Ramos, J. L. (ed.), *Pseudomonas: biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism*, vol. III. Springer, Berlin, Germany.
- 232 **Segura, D., Cruz, T., y Espin, G. (2003).** Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* 179:437-443.
- 233 **Senior, P. J., y Dawes, E. A. (1973).** The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J* 134:225-238.
- 234 **Serafim, L. S., Lemos, P. C., Albuquerque, M. G. E., y Reis, M. A. M. (2008).** Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:615-628.

- 235 Shen, D. K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., y Toussaint, B. (2006).** PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74:1121-1129.
- 236 Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., y Jackson, R. W. (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:652-680.
- 237 Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Foglia, T. a., y Marmer, W. N. (2006).** Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:783-789.
- 238 Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Licciardello, G., y Catara, V. (2008).** Genetic organization of *pha* gene locus affects *phaC* expression, poly(hydroxyalkanoate) composition and granule morphology in *Pseudomonas corrugata*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:111-120.
- 239 Son, M. S., Matthews, W. J., Jr., Kang, Y., Nguyen, D. T., y Hoang, T. T. (2007).** In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 75:5313-5324.
- 240 Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A., y Valentin, H. E. (1995).** Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41 Suppl 1:94-105.
- 241 Steinbüchel, A., y Valentin, H. E. (1995).** Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128:219-228.
- 242 Stockwell, V. O., y Loper, J. E. (2005).** The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Microbiology* 151:3001-3009.
- 243 Stuart, E. S., Foster, L. J., Lenz, R. W., y Fuller, R. C. (1996).** Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. *Int. J. Biol. Macromol.* 19:171-176.
- 244 Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A. J., Lawrence, A. G., y Liu, P. (2005).** Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annu. Rev. Biochem* 74:433-480.
- 245 Sudesh, K., Abe, H., y Doi, Y. (2000).** Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25:1503-1555.
- 246 Sun, Z., Ramsay, J., Guay, M., y Ramsay, B. (2007).** Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:475-485.
- 247 Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., y Shah, S. (2007).** Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol. Adv.* 25:148-175.

- 248 **Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., y Doi, Y. (1999).** Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 176:183-190.
- 249 **Tal, S., y Okon, Y. (1985).** Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31:608-613.
- 250 **Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., y Swan, S. H. (2009).** Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364:2153-2166.
- 251 **Timm, A., y Steinbüchel, A. (1990).** Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3360-3367.
- 252 **Timm, A., y Steinbüchel, A. (1992).** Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* 209:15-30.
- 253 **Timm, A., Wiese, S., y Steinbüchel, A. (1994).** A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:669-675.
- 254 **Timmis, K. N., Steffan, R. J., y Unterman, R. (1994).** Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:525-557.
- 255 **Timmis, K. N. (2002).** *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* 4:779-781.
- 256 **Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A., y Doi, Y. (2000).** Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:193-198.
- 257 **Tsuge, T., Taguchi, K., Seiichi, T., y Doi, Y. (2003).** Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* 31:195-205.
- 258 **Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., y Roy, I. (2006).** Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert. Rev. Med. Devices* 3:853-868.
- 259 **Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., y Roy, I. (2007).** Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:1-17.

- 260 **van den Berg, B., Black, P. N., Clemons, W. M., Jr., y Rapoport, T. A. (2004).** Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL. *Science* 304:1506-1509.
- 261 **Velázquez, F., Pflüger, K., Cases, I., de Eugenio, L. I., y de Lorenzo, V. (2007).** The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 189:4529-4533.
- 262 **Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., Geyer, R., White, D. C., y Guerrero, R. (2007).** Monitoring diel variations of physiological status and bacterial diversity in an estuarine microbial mat: an integrated biomarker analysis. *Microb. Ecol.* 54:523-531.
- 263 **Vo, M. T., Lee, K. W., Kim, T. K., y Lee, Y. H. (2007).** Utilization of *fadA* knockout mutant *Pseudomonas putida* for overproduction of medium chain-length-polyhydroxyalkanoate. *Biotechnol. Lett* 29:1915-1920.
- 264 **Vo, M. T., Lee, K. W., Jung, Y. M., y Lee, Y. H. (2008).** Comparative effect of overexpressed *phaJ* and *fabG* genes supplementing (*R*)-3-hydroxyalkanoate monomer units on biosynthesis of mcl-polyhydroxyalkanoate in *Pseudomonas putida* KCTC1639. *J. Biosci. Bioeng.* 106:95-98.
- 265 **Wackett, L. P. (2003).** *Pseudomonas putida* - a versatile biocatalyst. *Nat Biotech* 21:136-138.
- 266 **Walsh, U. F., Morrissey, J. P., y O'Gara, F. (2001).** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:289-295.
- 267 **Wallen, L. L., y Rohwedder, W. K. (1974).** Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoate from activated-sludge. *Environ. Sci. Technol.* 8:576-579.
- 268 **Wang, C., Sheng, X., Equi, R. C., Trainer, M. A., Charles, T. C., y Sobral, B. W. (2007).** Influence of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins (PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 189:9050-9056.
- 269 **Wang, Q., y Nomura, C. T. (2010).** Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *J. Biosci. Bioeng.* 110:653-659.
- 270 **Wang, Q., Tappel, R. C., Zhu, C., y Nomura, C. T. (2012).** Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:519-527.
- 271 **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*. *J. Bacteriol.* 177:2425-2435.
- 272 **Williams, S. G., Greenwood, J. A., y Jones, C. W. (1994).** The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 140:2961-2969.

- 273 **Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J. L., y van der Lelie, D. (2011).** Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:299-323.
- 274 **Wylie, J. L., Bernegger-Egli, C., O'Neil, J. D., y Worobec, E. A. (1993).** Biophysical characterization of OprB, a glucose-inducible porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:547-556.
- 275 **Xu, Y., Heath, R. J., Li, Z., Rock, C. O., y White, S. W. (2001).** The FadR.DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276:17373-17379.
- 276 **York, G. M., Stubbe, J., y Sinskey, A. J. (2002).** The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J. Bacteriol.* 184:59-66.
- 277 **Yuan, M. Q., Shi, Z. Y., Wei, X. X., Wu, Q., Chen, S. F., y Chen, G. Q. (2008).** Microbial production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by recombinant *Pseudomonas putida* KT2442 harboring genes *fadL*, *fadD* and *phaZ*. *FEMS Microbiol. Lett.* 283:167-175.
- 278 **Zhang, H., Wang, P., y Qi, Q. (2006).** Molecular effect of FadD on the regulation and metabolism of fatty acid in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:249-253.
- 279 **Zhang, Y. M., Zhu, K., Frank, M. W., y Rock, C. O. (2007).** A *Pseudomonas aeruginosa* transcription factor that senses fatty acid structure. *Mol. Microbiol.* 66:622-632.
- 280 **Zheng, L. Z., Li, Z., Tian, H. L., Li, M., y Chen, G. Q. (2005).** Molecular cloning and functional analysis of (*R*)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:299-307.
- 281 **Zheng, Z., Chen, J. C., Tian, H. L., Bei, F. F., y Chen, G. Q. (2005).** Specific identification of (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP: CoA transacylase gene from *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains by polymerase chain reaction. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 21:19-24.
- 282 **Zhu, K., Choi, K. H., Schweizer, H. P., Rock, C. O., y Zhang, Y. M. (2006).** Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 60:260-273.
- 283 **Zinn, M., Witholt, B., y Egli, T. (2001).** Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 53:5-21.
- 284 **<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>**



## **ANEXOS**



**1. Diploma de Estudios Avanzados: Estudio de las bases moleculares de la regulación del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida* KT2442**

---



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA**  
**MOLECULAR**

**DIPLOMA DE ESTUDIOS AVANZADOS**

**Isabel Fernández Escapa**

Directora de la Tesis:

**Dra. María Auxiliadora Prieto Jiménez**

Investigador Científico

**Departamento de Microbiología Molecular**  
**Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)**  
**Madrid, 2008**



# ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>183</b> |
| 1. LOS POLIHIDROXIALCANOATOS .....  | 183        |
| 2. REGULACIÓN DEL <i>CLUSTER PHA</i> EN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....                                     | 184        |
| 3. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....   | 186        |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>187</b> |
| 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS .....  | 187        |
| 2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> .....  | 188        |
| 3. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN .....   | 189        |
| 4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA.....   | 189        |
| Aislamiento de DNA plasmídico.....  | 189        |
| Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).....                          | 189        |
| Secuenciación de DNA.....   | 190        |
| 5. MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....  | 190        |
| 6. TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DE LA PRODUCCIÓN DE PHA.....                                | 191        |
| 6.1. Turbidimetría.....   | 191        |
| 6.2. Recuento de viables .....  | 192        |
| 6.3. Microscopía óptica de contraste de fase .....  | 192        |
| 6.4. Cromatografía de gases (GC) .....  | 192        |
| 6.5. Citometría de flujo.....   | 192        |
| 7. EXTRACCIÓN DE GRÁNULOS DE PHA .....  | 193        |
| 8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE).....  | 193        |
| 9. ENSAYO DE ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA.....   | 194        |
| <b>III. RESULTADOS .....</b>  | <b>195</b> |
| 1. PERFILES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PHA .....  | 195        |
| 1.1. Turbidimetría.....   | 195        |
| 1.2. Recuento de viables .....  | 196        |
| 1.3. Cromatografía de gases (GC) .....  | 197        |
| 1.4. Citometría de flujo.....   | 198        |
| 1.5. Correlación entre los datos de GC y citometría de flujo.....   | 199        |
| 2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL A NIVEL ESPECÍFICO.....   | 200        |
| 2.1. Identificación de las secuencias promotoras del <i>cluster pha</i> .....                               | 200        |
| 2.2. Estudio de la inducción de los promotores del <i>cluster pha</i> en distintas fuentes de carbono ..... | 202        |
| 2.3. Papel de la proteína reguladora PhaD .....   | 204        |
| 2.4. Estudio del promotor <i>Pi</i> en <i>E. coli</i> .....   | 205        |

|  |            |
|--|------------|
| 3. REGULACIÓN ENZIMÁTICA .....   | 206        |
| 3.1. Crecimiento de <i>P. putida</i> en distintas fuentes de carbono .....             | 206        |
| Efecto inductor del Octanoico sobre el crecimiento y producción de PHA .....           | 207        |
| Efecto inductor de otras fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de PHA.. | 208        |
| 3.2. Influencia de los genes <i>fadAB</i> sobre la producción de PHA .....             | 209        |
| Cultivo en medio sólido.....   | 210        |
| Cultivos en medio líquido en una única fase.....                                       | 210        |
| Cultivos en medio líquido en dos fases .....   | 211        |
| <b>IV. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>212</b> |
| <b>V. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>216</b> |
| <b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>217</b> |

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1. Los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de fuente de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Madison y Huisman, 1999). Las bacterias los sintetizan a partir de fuentes renovables como la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales (Luengo *et al.*, 2003). El PHA se descubrió en 1926 (Lemoigne, 1926) pero no se ha implantado hasta ahora en el mercado debido a su alto coste comparado con el menor coste de la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales no contaminantes (Gavrilescu, 2004).

El PHA es un biopolíéster constituido por monómeros de ácidos 3-hidroxicanoicos, con un peso molecular que varía entre 50-1000 kDa. Su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero un carácter quiral. El biopolíéster está formado únicamente por la forma enantiomérica *R* de los hidroxicanoatos (RHA) (Prieto *et al.*, 1999b) donde la longitud de la cadena lateral permite clasificar los PHA en scl-PHA (cadenas de 3 a 5 carbonos), ó mcl-PHA (cadenas 6 a 14 carbonos). Los mcl-PHA producidos por el género *Pseudomonas* están compuestos mayoritariamente por monómeros de ácido hidroxiocanoico, pero también se pueden encontrar en menor porcentaje una gran diversidad de monómeros que contienen como sustituyentes grupos aromáticos, alifáticos, insaturados, saturados, con ramificaciones, etc. (Steinbüchel and Valentin, 1995; García *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2007). Esto es debido principalmente a la gran diversidad metabólica que caracteriza a estos microorganismos ya que pueden transformar una gran variedad de sustratos en intermediarios 3-hidroxicanoicos mediante la ruta de  $\beta$ -oxidación y de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Se sabe que la composición del polímero depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria productora (Durner *et al.*, 2001, Jung *et al.*, 2001). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de los polímeros varían según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Madison y Huisman, 1999; Kessler, *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 monómeros diferentes en PHAs bacterianos (Steinbüchel y Valentin, 1995; Sudesh *et al.*, 2000), y que el biopolímero después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, como a su entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Hany *et al.*, 2004), es fácil imaginar la gran diversidad de bioplásticos diferentes que se pueden generar mediante

la combinación de todos estos procesos. Es importante resaltar que los PHAs también pueden ser útiles para aplicaciones biomédicas como biomateriales (Zinn *et al.*, 2001).

Los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo (PSG) rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 2007). Hasta el momento se han definido tres clases de GAPs en bacterias: i) las PHA sintetasas, que llevan a cabo la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las fasinas que generalmente son el componente principal de las GAPs y tienen una función estructural y en algunos casos reguladora (Prieto *et al.*, 1999a; Moldes *et al.*, 2004).

## 2. Regulación del *cluster pha* en *Pseudomonas putida*

El *cluster* de genes responsable de la síntesis de mcl-PHA en *P. putida* KT2442 (Figura 1), uno de los organismos más utilizados en biotecnología medioambiental (Nelson *et al.*, 2002), contiene dos genes que codifican las polimerasas PhaC1 y PhaC2, responsables de la síntesis del bioplástico (Madison y Huisman, 1999; Prieto *et al.*, 2007). Entre estos dos genes se localiza el gen *phaZ*, que codifica una despolimerasa responsable de la hidrólisis intracelular del polímero (de Eugenio *et al.*, 2007). También forman parte de este conjunto génico el gen *phaD*, cuya función dentro del *cluster pha* se desconoce hasta el momento, pero que es similar a los genes que actúan como reguladores transcripcionales de la familia TetR, y los genes *phaF* y *phal* que codifican las fasinas (Prieto *et al.*, 1999a; Moldes *et al.*, 2004 y 2006). Dado el interés desde el punto de vista industrial y medioambiental que conlleva la producción sostenible del PHA, en los últimos 25 años se ha invertido mucho esfuerzo en el estudio de la producción de este polímero en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y al estudio de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis del PHA incluyendo las sintetasas (Luengo, 2003; Madison y Huisman, 1999; Rehm 2003; Prieto *et al.*, 2007). Sin embargo, se sabe muy poco sobre los sistemas que regulan la transcripción de estos genes (Kessler y Witholt, 2001; Hoffmann y Rehm, 2004).

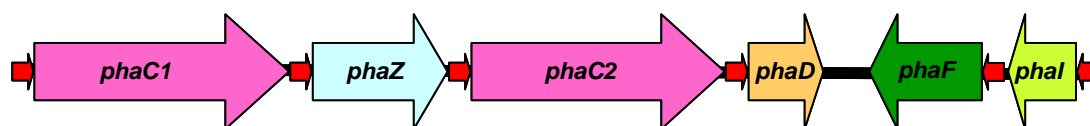
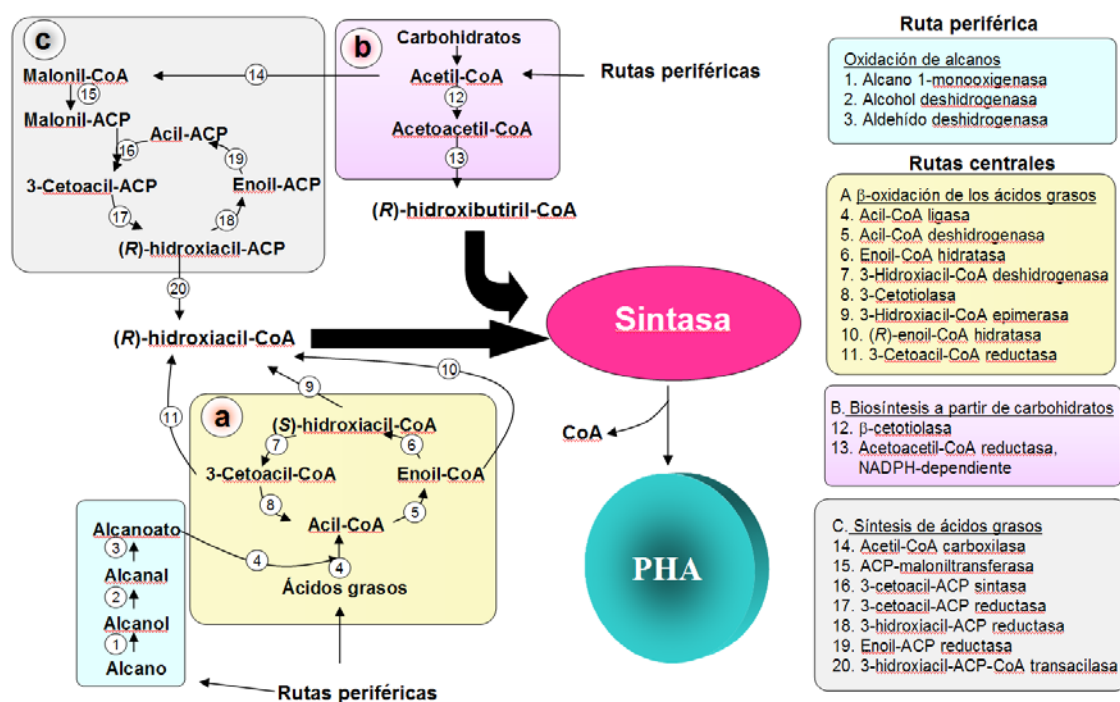


Figura 1. *Cluster pha* de *P. putida*, consistente en 4 ORFs que se transcriben en la misma dirección: genes *phaC1* y *phaC2*, codifican dos PHA sintetasas; gen *phaZ*, codifica una despolimerasa; y el gen *phaD*, que codifica para una proteína de la familia TetR de reguladores transcripcionales. En la dirección opuesta se encuentran los dos genes que codifican para las fasinas (*phaF* and *phal*), las proteínas estructurales del gránulo.

La regulación de la producción de PHA en microorganismos es muy compleja ya que no sólo están implicados los genes responsables de la síntesis y degradación del polímero sino que el sistema de producción de los sustratos de la polimerasa está interrelacionado con el metabolismo general de la bacteria (Figura 2), que es el que surte de hidroxiacidos susceptibles de ser metabolizados. Se sabe por ahora que la regulación de este proceso depende, por una parte de una regulación de tipo enzimático, ejercida por las proteínas que catalizan la formación de monómeros, y por otro, de la regulación de la expresión génica, tanto de los genes *pha* como de los genes de las rutas metabólicas centrales implicadas en este proceso. Además, hay que tener en cuenta que, como ocurre en otras rutas metabólicas de bacterias, la actividad de los promotores no sólo depende de lo que se denomina regulación específica, mediada por la interacción de un regulador específico de la ruta con el promotor en respuesta a una señal dada, sino que también depende en gran manera de mecanismos de regulación a nivel global que relacionan la actividad de promotores individuales con el metabolismo y el estado energético de la célula (Díaz y Prieto, 2000).



**Figura 2. Esquema de las rutas metabólicas para la producción de PHA en microorganismos.**

Hasta el momento, los principales estudios respecto a la regulación de la transcripción de los genes *pha* en *Pseudomonas* se han realizado en *Pseudomonas oleovorans* GPo1 y han tratado de analizar el papel de la proteína reguladora *phaD* (Klinke *et al.*, 2000) así como el de las *fasinas* (Prieto *et al.*, 1999a).

Klinke *et al.* (2000) construyeron un mutante *phaD*<sup>-</sup> en *Pseudomonas oleovorans* GPo1 y observaron una producción de PHA de menos de un 20% de la analizada en la cepa *wild type*.

Describieron también una reducción del tamaño de los gránulos y una disminución en su número; esto se relacionaría con una alteración en los patrones de expresión de las proteínas asociadas al gránulo, ya que la proteína Phal no se encuentra presente en los gránulos aislados del mutante *phaD*<sup>-</sup>. Por lo tanto, proponen que la proteína PhaD jugaría un papel fundamental en la estabilización de los gránulos de forma indirecta a través de un mecanismo de regulación que implicaría a la proteína Phal.

En cuanto a la proteína PhaF, del análisis de su secuencia de aminoácidos se deduce que está estructurada en dos dominios: el extremo N-terminal, que presenta un 57% de similitud con la secuencia de aminoácidos completa de la fasina Phal (15,4 kDa), es donde reside el dominio de unión al gránulo de PHA (Prieto *et al.* 1999a, Moldes *et al.*, 2004 y 2006) y la región C-terminal que contiene un dominio de unión a DNA similar al de las histonas H1 de organismos eucariotas. Aunque hasta el momento no se ha demostrado la capacidad de unión a DNA de la proteína PhaF, se sabe que ejerce un papel represor de la transcripción de su propio gen *phaF* y del gen *phal* (Prieto *et al.*, 1999a). El hecho de que contenga un dominio específico del metabolismo de PHA (dominio N-terminal) y un dominio característico de reguladores globales de la transcripción como son las histonas, es decir un mecanismo de regulación mixto entre la regulación de tipo específico y global, hace que este sistema constituya un proceso muy peculiar para controlar la expresión génica.

### 3. Objetivos del trabajo

Este trabajo se plantea como objetivo principal el estudio de la regulación de la producción de PHA en *Pseudomonas putida* KT2442. Este objetivo se desarrollará según los siguientes subobjetivos:

- Estudio del sistema de regulación específica de la transcripción de los genes *pha*. Se estudiará la organización de las unidades transcripcionales del *cluster pha* en *P. putida* KT2442 así como el papel de la proteína reguladora PhaD
- Efecto de la regulación enzimática del metabolismo global de la bacteria sobre la producción de PHA en *P. putida* KT2442. Se tratarán de caracterizar los factores fisiológicos que determinan la expresión de los genes *pha* así como la influencia de la disponibilidad de metabolitos, provenientes de las distintas rutas metabólicas, sobre la producción de PHA.

Este trabajo forma parte de mi tesis doctoral en la que se profundizará en estos aspectos así como en la regulación global de la transcripción por medio de *DNA-Arrays*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla 1 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

| Especie          | Cepa                              | Genotipo/Fenotipo relevante  | Referencia                                    |
|------------------|-----------------------------------|--|---|
| <i>E. coli</i>   | CC118λ-pir                        | Δ( <i>ara-leu</i> ), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> λ <i>pir</i>  | Herrero <i>et al.</i> , 1990                  |
| <i>E. coli</i>   | DH5α                              | F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>argF-lac</i> )U169, <i>deoR</i> φ80d <i>lac</i> , Δ( <i>lacZ</i> )M15 | Sambrook y Rusell, 2001                       |
| <i>E. coli</i>   | DH10B                             | F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80d <i>lacZ</i> ΔM15<br>Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697<br><i>galU galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL endA1 nupG</i>  | Life Technologies                             |
| <i>E. coli</i>   | HB101                             | <i>supE44 ara14 galK2 leuB lacY1</i> Δ( <i>gpt-proA</i> )62<br><i>rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13</i> Δ( <i>mcrC-mrr</i> ) <i>hsdS20</i><br>(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) Sm <sup>r</sup>   | Sambrook y Rusell, 2001                       |
| <i>E. coli</i>   | MC4100                            | <i>araD139</i> ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL150 relA1 flbB5301</i><br><i>deoC1 ptsF25 rbsR</i>   | Casadaban, 1976                               |
| <i>P. putida</i> | KT2442                            | <i>hsdMR</i>   | Nelson <i>et al.</i> , 2002                   |
| <i>P. putida</i> | KT2442C <sub>1</sub> <sup>-</sup> | KT2442 Δ <i>phaC</i> <sub>1</sub> ::pUTminiTn5Km   | de Eugenio L.I.<br>(Pendiente de publicación) |
| <i>P. putida</i> | KT2442D <sup>-</sup>              | KT2442 Δ <i>phaD</i> ::pK18 <i>mob</i>   | Galan B. (Pendiente de publicación)           |
| <i>P. putida</i> | KT2442FadB                        | KT2442 Δ <i>fadB</i> ::pK18 <i>mob</i>   | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pC1                         | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pc</i> <sub>1</sub> :: <i>lacZ</i>   | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pC2                         | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pc</i> <sub>2</sub> :: <i>lacZ</i>   | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pZ                          | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pz</i> :: <i>lacZ</i>  | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pD                          | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pd</i> :: <i>lacZ</i>  | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pF                          | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pf</i> :: <i>lacZ</i>  | Este trabajo                                  |
| <i>P. putida</i> | KT2442pI                          | KT2442 portadora en el cromosoma de la fusión<br><i>Pi</i> :: <i>lacZ</i>  | Este trabajo                                  |

Durante cortos períodos de tiempo (menos de un mes) las cepas se conservaron a 4°C en placas de medio LB o de medio mínimo con sus correspondientes antibióticos. Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 25% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

Las características más relevantes de los plásmidos empleados en este trabajo se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

| Plásmido     | Genotipo/Fenotipo  | Referencia                       |
|--------------|--|----------------------------------|
| pUJ9         | Ap <sup>r</sup> , plásmido auxiliar para la construcción de fusiones traduccionales <i>promotor:lacZ</i>   | de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990  |
| pUJC1        | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pc<sub>1</sub></i>  | Este trabajo                     |
| pUJC2        | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pc<sub>2</sub></i>  | Este trabajo                     |
| pUJZ         | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pz</i>  | Este trabajo                     |
| pUJD         | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pd</i>  | Este trabajo                     |
| pUJF         | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pf</i>  | Este trabajo                     |
| pUJI         | Plásmido derivado de pUJ9 con el promotor <i>Pi</i>  | Este trabajo                     |
| pUTminiTn5Km | Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>oriVR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , plásmido para la inserción de fragmentos de ADN en cromosoma, portador del minitransposón miniTn5Km1 | de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990  |
| pUTC1        | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pc<sub>1</sub>::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pUTC2        | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pc<sub>2</sub>::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pUTZ         | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pz::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pUTD         | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pd::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pUTF         | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pf::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pUTI         | Derivado de pUTminiTn5Km <i>Pi::lacZ</i>   | Este trabajo                     |
| pIZ1016      | Gm <sup>r</sup> , <i>oriPBBR1MCS Mob<sup>+</sup> lacZα</i> , vector de clonación de bajo número de copias  | Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003 |
| pIZD         | Derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>phaD</i>  | Este trabajo                     |
| pK18mob      | Km <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>Mob<sup>+</sup></i> , <i>lacZα</i> , vector suicida utilizado para las disrupciones insercionales mediante recombinación homóloga   | Schäfer <i>et al.</i> , 1994     |
| pK18FadB1    | Derivado de pK18mob que contiene un fragmento de 707pb del gen <i>fadB</i> con una orientación opuesta al promotor <i>Plac</i>   | Este trabajo                     |
| pK18FadB2    | Derivado de pK18mob que contiene un fragmento de 707pb del gen <i>fadB</i> con la misma orientación que el promotor <i>Plac</i>  | Este trabajo                     |

## 2. Transformación de células de *E. coli*

Las técnicas empleadas en la preparación de células competentes y transformación de estas fueron los métodos de RbCl y choque térmico (Sambrook y Russell, 2001) y el de electroporación (Wirth *et al.*, 1989) usando un equipo Gene Pulser Pulse Controller de Bio-Rad.

### 3. Transferencia de plásmidos por conjugación

Los plásmidos se movilizaron por conjugación triparental, empleando la cepa auxiliar HB101 (pRK600), y según el método descrito por de Lorenzo y Timmis, (1994). Los transconjugantes fueron seleccionados en LB o medio mínimo con citrato 20mM como fuente de carbono y con los correspondientes antibióticos.

### 4. Técnicas de manipulación de DNA

La manipulación del DNA así como otras técnicas de Biología Molecular fueron aplicadas esencialmente como ha sido descrito por Sambrook y Russell, (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por Amersham, Pharmacia y New England Biolabs y la T4 DNA ligasa fue adquirida de Amersham. Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las instrucciones de las respectivas casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa de bajo punto de fusión, usando el kit *GeneClean™* (BIO 101 Inc.) o el kit "*High Pure™ PCR Product Purification Kit™*" (Roche).

#### Aislamiento de DNA plasmídico.

La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante el método *High Pure™ Plasmid Purification Kit* (Roche) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

#### Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).

Para llevar a cabo la amplificación se empleó un equipo *Mastercycler™* personal (Eppendorf) y las enzimas *DNA polimerasa* y *Pfu DNA polimerasa* (Biotools) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. Los productos amplificados se purificaron utilizando *GeneClean™ Turbo Kit* (BIO 101) o, en el caso de un solo producto amplificado, el *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche). En la Tabla 3 se resumen los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys.

**Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos. Aparecen subrayadas las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción.**

| Número | Nombre             | Secuencia                          |
|--------|--------------------|------------------------------------|
| 1      | pC <sub>1</sub> 5' | TTTGAATT <u>CGGCCTGCGGGGTTAGAG</u> |
| 2      | pC <sub>1</sub> 3' | CGGGGATCCATCTACGACGCTCCGTTGT       |
| 3      | pC <sub>2</sub> 5' | TTTGAATT <u>CCCCGTTGATCCCCG</u>    |
| 4      | pC <sub>2</sub> 3' | CGCGGATCCATGGCAACTCCCTCGTC         |
| 5      | pZ5'               | TTTGAATT <u>CGACCCGGTGGCCTGGC</u>  |
| 6      | pZ3'               | CGCGGATCCATGCACGTGACTCTTG          |

|    |             |  |
|----|-------------|--|
| 7  | pD5'        | CCGGAATTCGCCACGTATCTGGTCAGCTTGC                  |
| 8  | pD3'        | CGCGGATCCATCCAGTCAGCAGCTCATCGG                   |
| 9  | pF5'        | CCGGAATTC <del>CC</del> CAGCTTGACGAAGTCGGTGA     |
| 10 | pF3'        | CGCGGATCCATCCTGCTCTCCTTATGGTTTGTG                |
| 11 | pI5'        | CCGGAATTCGCCAGAAAATGCCTGAGAAGCTC                 |
| 12 | pI3'        | CGCGGATCCATGCTGTGTACCTCATGCTC                    |
| 13 | phaD5'      | CCCAAGCTTATGAAAACCCGCGATCGTATCC                  |
| 14 | phaD3'      | CTAGTCTAGACTACCCCTCCAGGTA <del>CTT</del> CACTGCC |
| 15 | FadBpK18 5' | TCCCCCGGGAAAAGCTCAAGCTCAATGCCAT                  |
| 16 | FadBpK18 3' | TCCCCCGGGTGAAGAAGTGCATGCC                        |

### Secuenciación de DNA.

La secuenciación fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación de ADN de la empresa Secugen.

## 5. Medio y condiciones de cultivo

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* y *P. putida* fue Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russel, 2001).

El medio mínimo empleado fue medio M63 y su variante limitada en nitrógeno M63 0,1N:

- Medio M63: 13.6 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /litro, 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /litro, 0.5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /litro, ajustado a pH 7.0 con KOH).
- Medio M63 0,1N: Igual que el medio M63 pero con un 10% de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Este medio se suplementó con  $\text{SO}_4\text{Mg}$  (1mM final) más una solución de elementos traza (Goodies 1000X: 2,78 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,98 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 2,81 g  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,47 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,17 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,29 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; disuelto en HCl 1N hasta alcanzar un volumen de 1l).

A partir de cultivos en medio sólido LB-agar se tomaron colonias aisladas que se emplearon para realizar preinóculos en LB (más los antibióticos correspondientes). Los preinóculos se incubaron *overnigth* y posteriormente se recogieron por centrifugación (20' 2500rpm), se lavaron con solución salina y se emplearon para realizar los correspondientes inóculos. Salvo que se indique lo contrario los inóculos se realizan a una  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,3.

Las células de *E. coli* se incubaron a 37°C y las de *P. putida* a 30°C, en ambos casos en un agitador orbital a 250 rpm. Para cultivos en medio sólido, el medio se suplementó con agar al 1,5 % (p/v).

Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y una atmósfera de presión.

Las fuentes de carbono empleadas se resumen en la Tabla 4. La concentración a la que se suministra cada fuente de carbono se determina en función del número de carbonos por molécula que presente cada una de ellas. Se establecen dos situaciones de trabajo en función de la concentración de la fuente de carbono empleada: situación apropiada para el crecimiento y situación de exceso de nutrientes (doble concentración de la fuente de carbono).

**Tabla 4. Fuentes de carbono empleadas en el trabajo.**

| <b>COMPUESTO</b>    | <b>nº carbonos</b> | <b>Concentración estándar para cultivo (mM)</b> | <b>Concentración en situación de exceso de nutrientes (mM)</b> |
|---------------------|--------------------|---|--|
| Glicerol            | 3                  | 20,00   | 40,00  |
| Glucosa             | 6                  | 10,00   | 20,00  |
| Fructosa            | 6                  | 10,00   | 20,00  |
| Octanoico/Caprílico | 8                  | 7,50  | 15,00  |
| Decanoico/Cáprico   | 10                 | 6,00  | 12,00  |
| Succínico           | 4                  | 15,00   | 30,00  |
| Cítrico             | 6                  | 10,00   | 20,00  |

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en agua, excepto el cloranfenicol y la rifampicina que se disolvieron en etanol 100% y en DMSO 100%, respectivamente. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración y se mantuvieron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican a continuación:

- Ampicilina (Ap).....100 µg/ml
- Kanamicina (Km).....50 µg/ml
- Gentamicina (Gm)..... 10 µg/ml
- Cloranfenicol (Cm).....34 µg/ml
- Rifampicina (Rf)..... 50 µg/ml

Otros compuestos empleados y sus correspondientes concentraciones finales fueron

- IPTG.....0,2 mM
- X-Gal.....0,08 mM
- Tiamina.....1 µg/ml

## **6. Técnicas de monitorización del crecimiento y de la producción de PHA**

### **6.1. Turbidimetría**

El crecimiento de los cultivos en medio líquido fue monitorizado por turbidimetría a 600 nm (DO<sub>600</sub>) empleando un espectrofotómetro UV-Visible mini1240 (Shimadzu).

Hay que reseñar que en los cultivos de *P. putida* en condiciones de producción de PHA la monitorización de la turbidimetría no es un reflejo directo del número de células. En estos casos el valor de  $DO_{600}$  es un parámetro complejo que hace relación al número de células y a la cantidad de PHA que poseen.

### **6.2. Recuento de viables**

Para conocer el número de células vivas en un cultivo se realizaron ensayos de recuento de viables. Para ello se realizaron diluciones seriadas del cultivo en solución salina 0,85% y se plaquearon en placas de LB-agar. Se realizaron recuentos de placa entera o por sectores de aquellas diluciones en las que se obtenían colonias suficientemente aisladas.

### **6.3. Microscopía óptica de contraste de fase**

La producción de gránulos se comprobó mediante visualización de los mismos por microscopía óptica en contraste de fase en un microscopio Nikon HFX-DX. Las muestras se preparaban directamente en fresco sin ningún tipo de tinción.

### **6.4. Cromatografía de gases (GC)**

El contenido de PHA se determinó usando el método descrito por Lageveen *et al.* (1988), según el cual se introducen en un tubo Pyrex de 12 ml de 2 a 3 mg de cultivo liofilizado, 2 ml de metanol con 15% de  $H_2SO_4$  y 2 ml de cloroformo con 0,1 g/l de metil-benzoato (patrón interno). El tubo se cierra herméticamente con tapa de teflón y se sumerge en un baño de aceite a 100°C durante 140 min para que tenga lugar la metanolisis ácida del PHA. Posteriormente, las muestras se introducen en hielo, se añade 1ml de agua desionizada, se agita vigorosamente y se elimina la fase acuosa. Esta extracción de fase acuosa se realiza 3 veces. Por último, la fase orgánica se deshidrata con la adición de  $Na_2SO_4$  (producto sólido). La fase orgánica obtenida se analiza en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer AutoSystem GC, equipado con un detector de ionización de llama y una columna SPB1 Supelco (20m x 0,25mm d.i. x 0,22 $\mu$ m). El volumen inyectado en el cromatógrafo de gases es  $\mu$ l. Además de las muestras, se realiza el mismo procedimiento con cantidades conocidas de PHA puro como patrón y control interno del proceso de metanolisis. Las condiciones del GC fueron:

- Horno: temperatura inicial 60°C durante 2 min y rampa de análisis de 15°C/min hasta 220°C.
- Inyector = detector = 300°C

### **6.5. Citometría de flujo**

Como parte de este trabajo se ha puesto a punto un método de cuantificación del porcentaje de PHA basado en citometría de flujo adaptado de Tyo *et al.* (2006). Este método se basa en la capacidad del cromóforo *Nile Red* de unirse al PHA debido a su elevada hidrofobicidad y emitir fluorescencia.

Se ha empleado un citómetro Coulter EPICS XL con una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 575nm. En cada muestra se han analizado 5000 eventos (número de células que pasan por el lector del citómetro) a un flujo no superior a 1500 eventos/s.

El umbral de intensidad de fluorescencia de las células positivas se estableció empleando el mutante de *P. putida* KT2442C<sub>1</sub><sup>-</sup>, el cual se fijó como control negativo.

Para monitorizar la producción de PHA mediante esta técnica se recolectaron muestras de los cultivos a analizar en distintos momentos de la curva de crecimiento y se guardaron para su posterior análisis por citometría. Para conservar las muestras se tomaron de 2 a 10ml de cultivo (en función del estado del crecimiento) y se lavaron con solución salina, finalmente se resuspendieron en un pequeño volumen (50-100µl) de glicerol al 50% en H<sub>2</sub>O y se congelaron a -80°C. En el momento de su análisis las muestras se diluyeron en H<sub>2</sub>O hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2 y se añadieron 3µl de *Nile Red* (1mg/ml en DMSO) por ml de muestra.

## 7. Extracción de gránulos de PHA

Tras 24h de crecimiento en medio apropiado para la producción de PHA (M63 0,1N Oct 15mM) las células se recogieron por centrifugación a 6000×g a 4°C. Se lavaron con solución salina y se resuspendieron en Tris HCl 15 mM, pH8. A continuación se rompieron por presión en French-Press (Aminco) a 20.000 psi. Tras centrifugar a 10000xg a 4°C durante 15' se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en Tris HCl 15 mM, pH8. A continuación se centrifugó a 10000xg durante 1h el extracto crudo sobre un volumen igual de glicerol al 55% (Stuart *et al.*, 1998; Moldes *et al.*, 2004). Tras esta centrifugación se recoge con pipeta Pasteur la banda blanca que aparece en la interfase de los dos líquidos y esta fracción se somete a varios lavados con Tris HCl 15 mM, pH8.

## 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración del 12,5 %. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol (0,005 %)). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 100 V, utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,8 glicina 192 mM y SDS 0,1 %. Las proteínas de los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250, según se describe en Swank y Munkres (1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular: [Miosina (200 KDa), β-galactosidasa (166,2 KDa), fosforilasa B (97,4 KDa), BSA (66,2 KDa),

ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina (21,5 KDa), lisozima 14,4 KDa) y aprotinina (6,5 KDa)] se adquirieron de Bio-Rad.

## **9. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa.**

Para el ensayo se emplearon células cultivadas en LB a 30 °C a distintos tiempos de cultivo. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se analizó permeabilizando las células según el método descrito por Miller (1972), y las unidades (U) de actividad enzimática (Unidades Miller) que se presentan en este trabajo han sido calculadas teniendo en cuenta la corrección por el número de células.

## III. RESULTADOS

Los experimentos realizados a lo largo de este estudio se estructuran en tres bloques:

- **Perfiles de crecimiento y producción de PHA:** Supone un punto de partida para estudiar el crecimiento y acumulación de PHA en *P. putida* KT2442. Se describen las técnicas puestas a punto para el estudio de dichos parámetros.
- **Regulación transcripcional a nivel específico:** Se tratan de analizar las unidades transcripcionales del *cluster pha* y el papel de la proteína reguladora PhaD.
- **Regulación enzimática:** Se analiza el efecto del metabolismo global de la bacteria sobre la disponibilidad de metabolitos que puedan incorporarse a la síntesis de PHA.

### 1. Perfiles de crecimiento y producción de PHA

Como punto de partida para el estudio de la regulación de la producción de PHA en *P. putida* KT2442 se ha monitorizado el perfil de crecimiento y producción de PHA de dicha cepa en condiciones óptimas de producción de PHA (medio M63 0,1N Oct 15mM). Para analizar el efecto de la producción de PHA sobre los diversos parámetros valorados se han comparado dichos perfiles con los observados en la cepa *P. putida* KT2442C<sub>1</sub><sup>-</sup>; considerada en el estudio como control negativo.

#### 1.1. Turbidimetría

La primera aproximación para estudiar las diferencias entre la cepa *wild type* KT244 y el mutante en el gen que codifica para la polimerasa *phaC1* se realizó midiendo la DO<sub>600</sub> a lo largo de su crecimiento en medio mínimo limitado en nitrógeno y con un exceso de fuente de carbono (Oct 15mM).

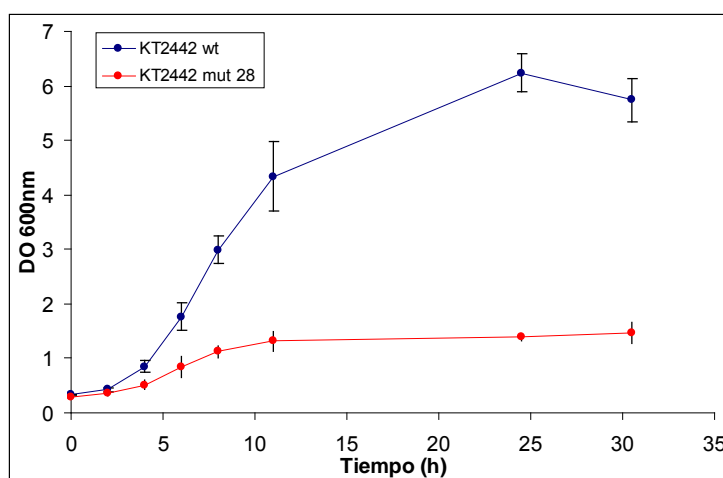


Figura 3. DO<sub>600</sub> de *P. putida* KT2442 y KT2442C<sub>1</sub><sup>-</sup> frente al tiempo en M63 0,1N Oct 15mM.

En la Figura 3 podemos apreciar una marcada diferencia entre las dos cepas, alcanzándose una  $DO_{600}$  unas 5 veces mayor en la cepa *wild type* que en el mutante  $KT2442C_1^-$ .

La  $DO_{600}$  nos permite hacernos una idea inicial del perfil de crecimiento y producción de PHA de la cepa estudiada, pero hay que tener en cuenta que se trata de un parámetro complejo que se ve afectado no sólo por el número de células presentes en el cultivo, sino por la cantidad de polímero acumulado por cada una de ellas.

## 1.2. Recuento de viables

Para analizar si las diferencias observadas entre las dos cepas por turbidimetría se debían únicamente a una mayor acumulación de PHA por parte de la cepa  $KT2442$ , o si el cultivo alcanzaba dicha  $DO_{600}$  al haber un mayor número de células, se realizaron estudios de recuento de viables (Figura 4).

En medio limitado en nitrógeno y con octanoico 15mM como fuente de carbono se aprecia un mayor número de células viables (en torno a un orden de magnitud) en la cepa  $KT2442C_1^-$  respecto a la cepa *wild type*. A las 175h se suplementó el medio con nitrógeno para ajustarlo a una concentración final de 2 g de  $(NH_4)_2SO_4$  por litro. Al pasar a una situación de no limitación de nitrógeno el número de células/ml en el cultivo de *P. putida*  $KT2442$  se equiparó con las del mutante *phaC1*. El cultivo se siguió a lo largo del tiempo durante más de un mes (se tomaron alícuotas hasta que se agotó el volumen de los matraces) sin que las células perdiesen su viabilidad.

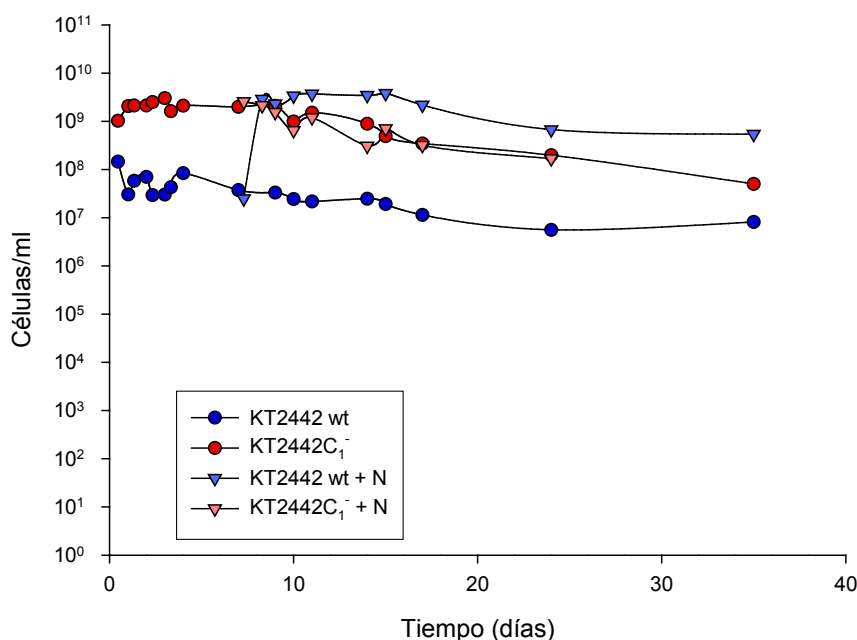


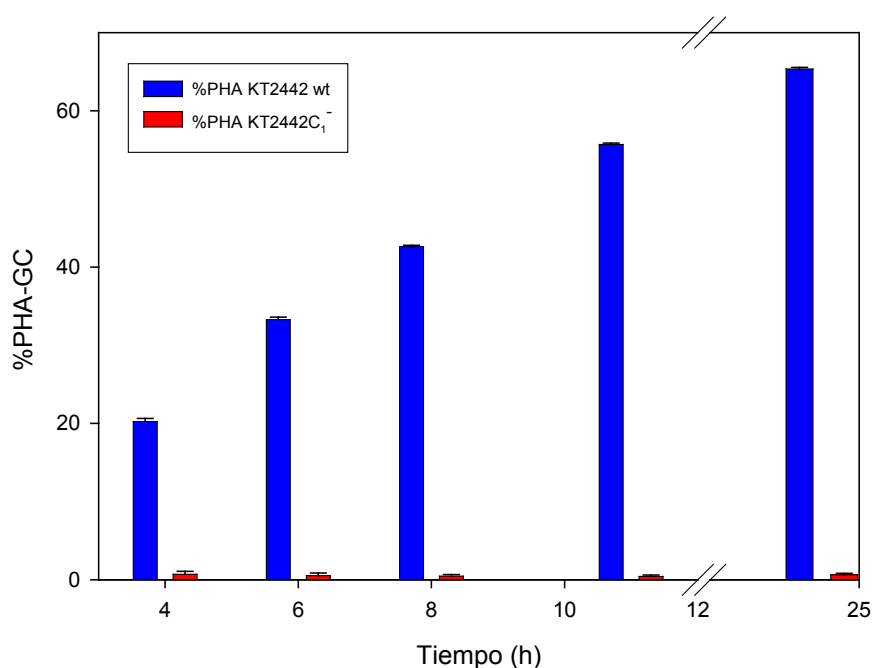
Figura 4. Número de células/ml de *P. putida*  $KT2442$  y  $KT2442C_1^-$  frente al tiempo en M63 0,1N Oct 15mM (○ en la gráfica). A las 175h se suplementa el medio con nitrógeno hasta equiparlo al medio M63 (△ en la gráfica).

El recuento de viables nos permite estudiar el número de células por ml de cultivo y analizar su variación en los distintos mutantes. En estos experimentos se establecerían dos situaciones en cuanto a la masa celular alcanzada por el cultivo:

- Bajo número de células: Situación de producción de PHA, las células invierten parte de su materia y energía en producir PHA.
- Elevado número de células: Situación de no acumulación del PHA, tanto en el mutante *phaC1* como en la cepa *wild type* al pasar a unas condiciones del medio donde no se favorece la acumulación de PHA (sin limitación de nitrógeno). Las células invierten toda su materia y energía en crecimiento.

### 1.3. Cromatografía de gases (GC)

Mediante cromatografía de gases se aprecia que de *P. putida* KT2442 creciendo en M63 0,1N y con octanoico 15mM como fuente de carbono es capaz de acumular algo más de un 60% de PHA (Figura 5) En el mutante *phaC1* se producen niveles basales de PHA que no alcanzan el 1%, por lo tanto lo emplearemos como mutante negativo para la producción de PHA en futuros experimentos.



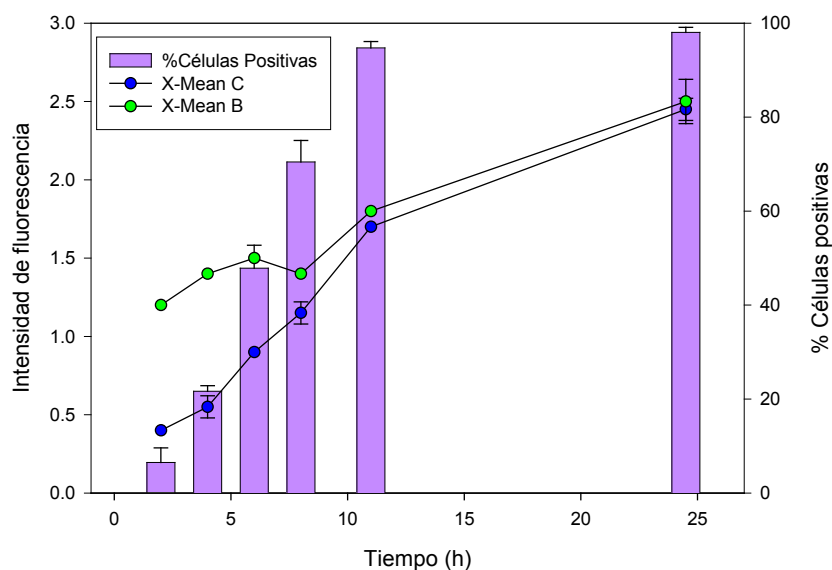
**Figura 5. Porcentaje de PHA respecto al peso seco analizado por cromatografía de gases en *P. putida* KT2442 y KT2442C<sub>1</sub><sup>-</sup> frente al tiempo en M63 0,1N Oct 15mM.**

La cromatografía de gases es la técnica de referencia (Lageveen *et al.*, 1988) que nos permite cuantificar el porcentaje de polímero acumulado por *P. putida* respecto al peso seco en las distintas condiciones de cultivo así como en los posibles mutantes en los que se vea afectada la síntesis de PHA. De esta forma establecemos que *P. putida* KT2442 en condiciones óptimas de producción de PHA (M63 0,1N Oct 15mM) es capaz de acumular en torno a un 60% de PHA.

### 1.4. Citometría de flujo

La cromatografía de gases nos permite establecer la cantidad de biopolímero acumulado por un cultivo de *P. putida*, pero se trata de una técnica muy tediosa. Con la intención de desarrollar técnicas alternativas a la cromatografía de gases se han realizado ensayos fluorimétricos basados en la capacidad del colorante *Nile Red* para unirse al polihidroxibutirato y PHA en diversos microorganismos (Degelau *et al.*, 1995; Vidal-Mas *et al.*, 2001; Tyo *et al.*, 2006). En este estudio se pretende poner a punto la cuantificación del contenido en PHA en *P. putida* mediante citometría de flujo con *Nile Red* como colorante.

En la Figura 6 se resumen los datos relativos a la cantidad de PHA presente en la muestra obtenidos por citometría de flujo para un cultivo de *P. putida* KT2442 creciendo en medio M63 0,1N Oct 15mM. El porcentaje de células positivas indica las células que superan un determinado umbral de intensidad de fluorescencia, dicho umbral se ha establecido empleando la cepa KT2442C<sub>1</sub> como control negativo. Se observa como tras 24h de cultivo aproximadamente el 100% de las células son positivas, es decir tienen PHA. En cuanto a los valores relativos de intensidad de fluorescencia, se observa como se incrementan también a medida que avanza el tiempo de cultivo.

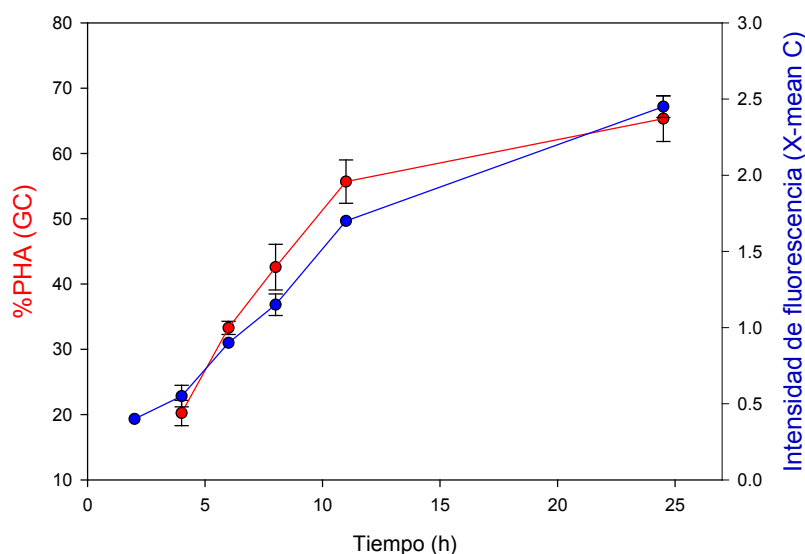


**Figura 6. Datos de citometría de flujo de un cultivo de *P. putida* KT2442 en M63 0,1N Oct 15mM. X-Mean C: Intensidad de fluorescencia de todas las células de la muestra. X-Mean B: Intensidad de fluorescencia de las células positivas.**

Por medio de la citometría de flujo podemos analizar de forma rápida y sencilla el contenido en PHA de un cultivo de *P. putida* KT2442. Además nos permite establecer el número de células del cultivo que han acumulado PHA, es decir, que sobrepasan un determinado umbral de fluorescencia. Esta técnica nos ofrece valores relativos de intensidad de fluorescencia, tanto de la muestra completa como de las células positivas del cultivo, pero no nos indica valores reales de % de PHA. Por lo tanto es necesario correlacionar los datos obtenidos con los valores de % de PHA valorados por cromatografía de gases.

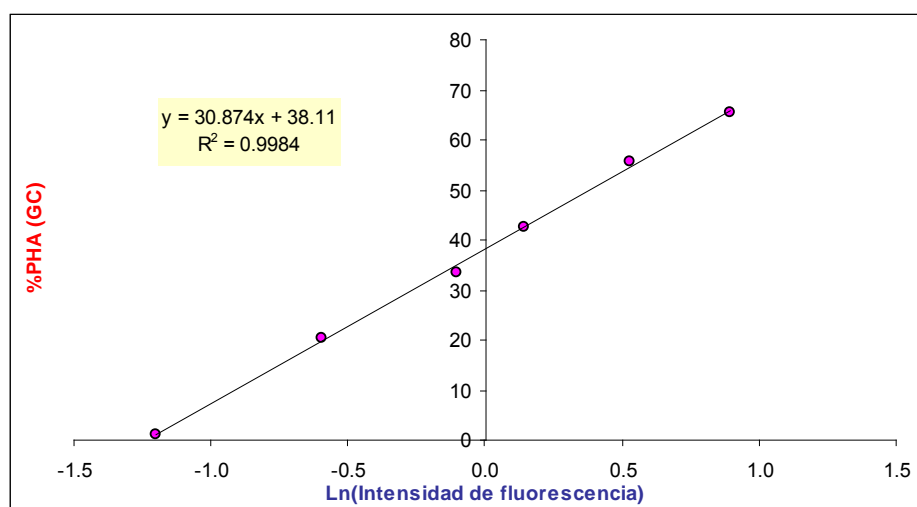
### 1.5. Correlación entre los datos de GC y citometría de flujo

Con el fin de emplear la citometría de flujo para cuantificar de forma simple el porcentaje de PHA celular se compararon los datos obtenidos mediante dicha técnica y los datos de GC.



**Figura 7. %PHA (GC) e intensidad de fluorescencia relativa (X-Mean C) frente al tiempo en un cultivo de *P. putida* KT2442 en M63 0,1N Oct 15mM.**

Si se representan el porcentaje de PHA (GC) y la intensidad de fluorescencia total del cultivo (X-Mean C) frente al tiempo se aprecian perfiles similares (Figura 7). Hemos realizado un ajuste entre los datos aportados por ambas técnicas para ver si los valores relativos de intensidad de fluorescencia obtenidos mediante citometría de flujo pueden traducirse en concentraciones de PHA celular. Se observa una relación exponencial entre ambos parámetros con un ajuste  $R^2=0,99$  al representar el porcentaje de PHA frente al logaritmo neperiano de la intensidad de fluorescencia (Figura 8). La ecuación obtenida nos permite extrapolar los datos relativos aportados por la citometría a valores de % de PHA celular.



**Figura 8. Correlación entre %PHA (GC) y Ln de la intensidad de fluorescencia relativa (X-Mean C) en un cultivo de *P. putida* KT2442 en M63 0,1N Oct 15mM.**

La relación exponencial observada entre los datos aportados por el GC y por la citometría de flujo nos permite emplear la citometría como método alternativo para cuantificar el polímero producido en cultivos de *P. putida*. Hay que tener en cuenta que la técnica es más precisa a concentraciones altas de PHA, puesto que a valores bajos pequeñas variaciones en el valor de intensidad de fluorescencia se traducen en alteraciones significativas en el contenido en PHA.

Por lo tanto para analizar el perfil de crecimiento y producción de PHA en cultivos de *P. putida* podemos emplear el valor de DO<sub>600</sub> para hacernos una idea del perfil global del cultivo, pero es necesario cuantificar el %PHA para diferenciar entre crecimiento y producción de biopolímero. Para dicha cuantificación la cromatografía de gases sigue siendo la técnica más precisa, recomendándose el uso del citómetro cuando la concentración de PHA esperada sea mayor del 20-30%.

## 2. Regulación transcripcional a nivel específico

### 2.1. Identificación de las secuencias promotoras del *cluster pha*

Varios estudios previos han tratado de definir el número de unidades transcripcionales presentes en el *cluster pha* en especies del género *Pseudomonas*. En *P. oleovorans* GPO1 se han identificado al menos dos secuencias promotoras, ambas situadas en la zona 5' del gen *phaC1* (Huisman *et al.*, 1991; van der Leij y Witholt, 1995). Sin embargo no está claro si los transcritos generados desde esta zona promotora implican sólo al gen *phaC1*, o si por el contrario se cotranscriben los genes *phaC1*, *phaZ*, *phaC2* y *phaD*. Prieto *et al.* (1999) detectan al menos los transcritos correspondientes a *phaC1* y *phaC1Z*, así mismo Huisman *et al.* (1991) proponen la existencia de dos terminadores de la transcripción en la zona 3' de los genes *phaZ* y *phaD*. Respecto a los genes que codifican para las fasinias se han definido dos promotores en la zona 5' de los genes *phal* y *phaF* que permitirían respectivamente la expresión de los transcritos *phalF* y *phaF* (Prieto *et al.*, 1999).

Por otro lado en *P. putida* U se han identificado seis regiones promotoras (*phaC1*, *phaZ*, *phaC2*, *phaD*, *phal* y *phaF*), controlando la expresión de cada uno de los genes del cluster (Sandoval *et al.*, 2007).

Para identificar las secuencias promotoras del *cluster pha* se clonaron las regiones situadas a 5' del codón de inicio de cada uno de los genes que forman esta agrupación génica. Mediante PCR y empleando los oligos 1-12 de la Tabla 3 se amplificaron los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias promotoras. Empleando las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* se digirieron dichos fragmentos así como el plásmido pUJ9 y las correspondientes ligaciones se transformaron en la cepa DH10B. Los clones resultantes se analizaron mediante secuenciación.

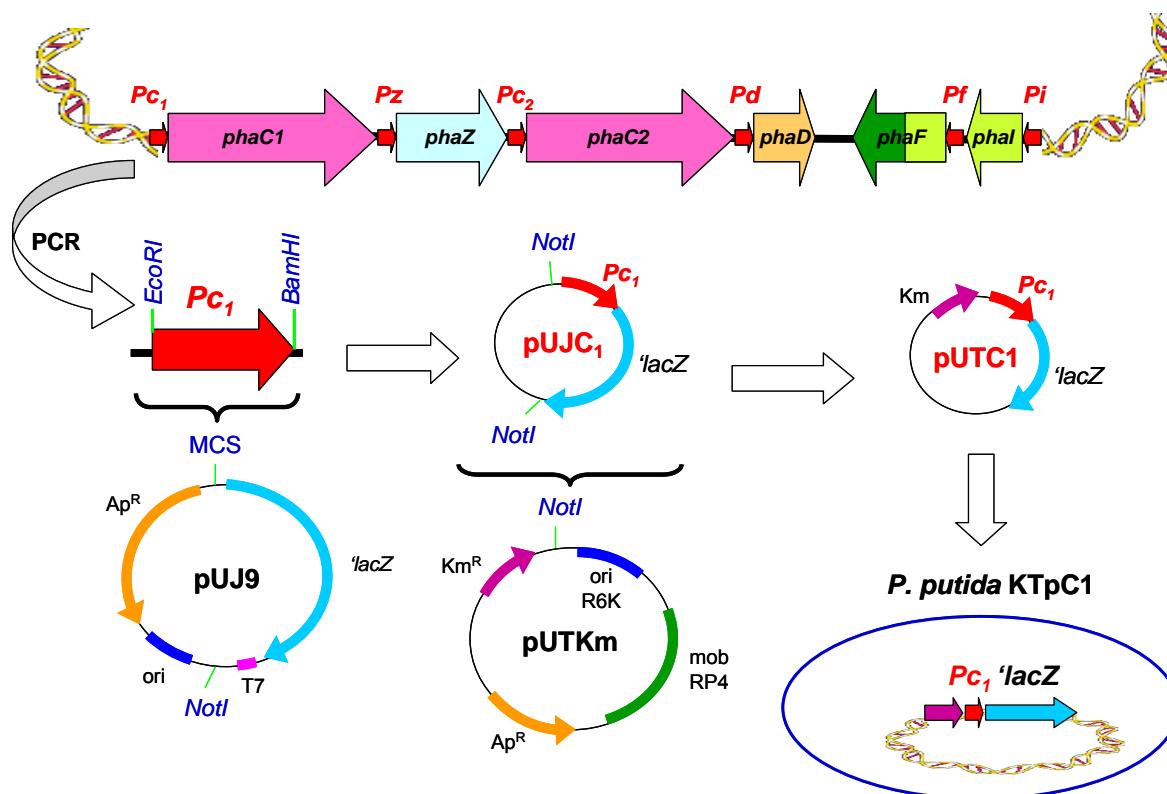













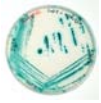
Figura 9. Esquema de la construcción de las cepas de *P. putida* portadoras de las fusiones traducciónales *promotor::lacZ* en monocopia. Ejemplo para el promotor  $Pc_1$ . Las posibles regiones promotoras se indican con flechas rojas ( $Pc_1$ ,  $Pz$ ,  $Pc_2$ ,  $Pd$ ,  $Pf$  y  $Pi$ ).

Se realizó una subclonación de las fusiones traducciónales *promotor::lacZ* al plásmido pUTminiTn5-Km mediante digestión con *NotI* y las posteriores ligaciones y transformaciones en la cepa CC118 $\lambda$ -pir. Los plásmidos derivados del pUTminiTn5-Km obtenidos se introdujeron en la cepa *P. putida* KT2442 mediante conjugación triparental. Por un proceso de transposición se produce la integración al azar de las fusiones traducciónales en el cromosoma de la cepa receptora. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR.

El análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas de *P. putida* portadoras de las fusiones traducciónales *promotor::lacZ* se ha realizado de manera semicuantitativa en medio sólido por la imposibilidad de llevar a cabo el ensayo cuantitativo en medio líquido propuesto por Miller (1972). En *P. putida* KT2442 la acumulación de PHA impide correlacionar la medida de  $DO_{600}$  con el número de células del cultivo (Figura 3), por lo tanto no puede emplearse la  $DO_{600}$  en el cálculo de las Unidades Miller. Por este motivo se ha optado por analizar de forma semicuantitativa la actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio sólido.

Con el fin de poner de manifiesto la actividad promotora de las secuencias fusionadas al gen trazador *lacZ* se analizó de forma semicuantitativa la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas obtenidas empleando como fuentes de carbono citrato y octanoico. De esta forma se pretende comparar la activación de los genes del *cluster pha* entre una situación de baja producción de PHA (citrato) y otra de elevada producción del biopolímero (octanoico).

Las diferentes construcciones se cultivaron en medio sólido M63 con citrato 10mM u octanoico 7,5mM suplementado con X-Gal 0,08mM para analizar (aparición de color azul) la actividad promotora de las distintas regiones estudiadas. En la Figura 10 podemos observar como todas las regiones analizadas muestran en mayor o menor medida actividad promotora y respuesta a la inducción por octanoico; siendo los promotores de los genes *phal* y *phaF* los que presentan una mayor actividad.

| Promotor          | Citrato   | Octanoato   |
|-------------------|---|---|
| <b><i>Pc1</i></b> |    |    |
| <b><i>Pz</i></b>  |    |    |
| <b><i>Pc2</i></b> |    |    |
| <b><i>Pd</i></b>  |    |    |
| <b><i>Pf</i></b>  |  |  |
| <b><i>Pi</i></b>  |  |  |

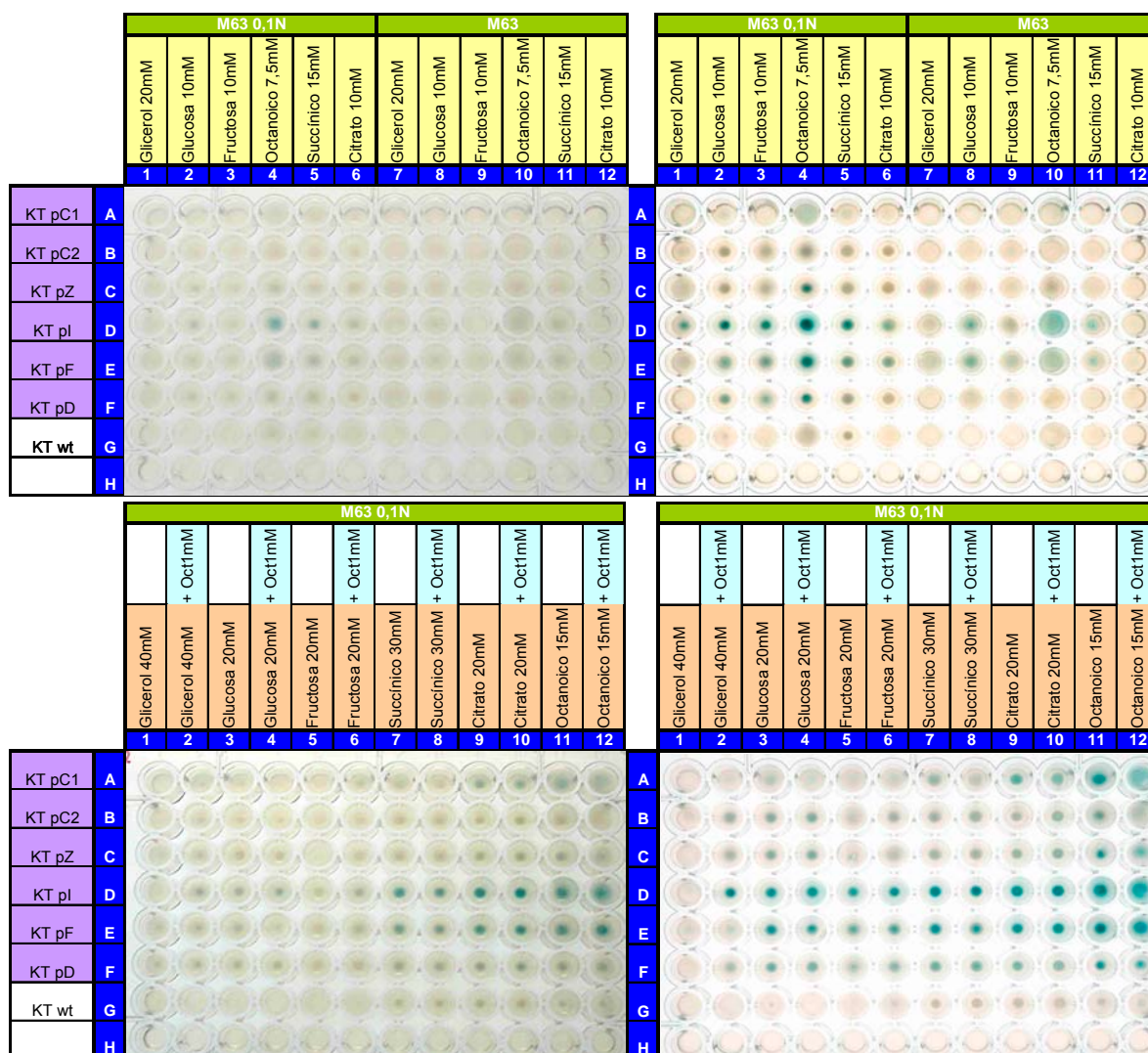
**Figura 10. Análisis semicuantitativo de la actividad de los promotores del *cluster pha* en medio M63 empleando citrato 10mM y octanoico 7,5mM como fuentes de carbono.**

Estos ensayos semicuantitativos nos han permitido identificar, al menos, seis unidades transcripcionales dentro del *cluster pha* en *P. putida* KT2442. Por otro lado podemos ver como estos promotores son capaces de responder ante situaciones fisiológicas como la presencia de diferentes fuentes de carbono.

## **2.2. Estudio de la inducción de los promotores del *cluster pha* en distintas fuentes de carbono**

Con el fin de comparar de forma rápida y sencilla la expresión de los distintos promotores en diferentes condiciones de cultivo se trató de miniaturizar el ensayo  $\beta$ -galactosidasa empleado para identificar las diferentes unidades transcripcionales (Figura 11). El uso de placas de 96 pocillos permite comparar en un mismo experimento una gran variedad de condiciones de cultivo en los distintos promotores. El análisis semicuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa supone una aproximación rápida y muy visual al estudio de la actividad de los promotores identificados.

Cada pocillo se completó con 200µl de medio mínimo con agar al 1,5% en presencia de X-Gal. Las distintas cepas de *P. putida* KT2442 con las fusiones *promotor::lacZ* en monocopia se cultivaron hasta una DO<sub>600</sub> de 0.2 y a continuación 20µl de estos cultivos se depositaron sobre los pocillos con el medio solidificado. La actividad promotora se valoró observando la aparición de color azul en los pocillos en distintas condiciones de cultivo: fuente de carbono, limitación de nutrientes, acción de inductores.



**Figura 11. Análisis semicuantitativo de la actividad de los promotores del *cluster pha* en distintas condiciones de cultivo. En la parte izquierda se observa la apariencia de la placa multipocillo a las 30h de cultivo y a la derecha tras 48h.**

Gracias a esta técnica se ha puesto de manifiesto que la expresión de los promotores es mayor en condiciones de limitación de nitrógeno, óptimas para la producción de PHA. Además se aprecia una mayor inducción de los promotores cuando se suplementan con octanoico (1mM) las distintas fuentes de carbono analizadas. En todas las condiciones analizadas los promotores *Pi* y *Pf* presentan una mayor actividad, lo que está de acuerdo con el hecho de que las fasinas son las proteínas mayoritarias en la superficie del gránulo de PHA.

### 2.3. Papel de la proteína reguladora PhaD

La proteína reguladora PhaD ha sido identificada en *P. oleovorans* GPo1 como un regulador clave en el metabolismo de los PHA (Klinke *et al.*, 2000), por lo tanto se ha tratado de estudiar su papel en *P. putida* KT2442. Como una aproximación inicial se comparó la producción de PHA de *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT2442D<sup>-</sup> (mutante *phaD*<sup>-</sup>) mediante microscopía óptica (Figura 12). Se observa más biopolímero en la cepa *wild type* que en el mutante, poniéndose de manifiesto el papel de la proteína PhaD en la producción de PHA.

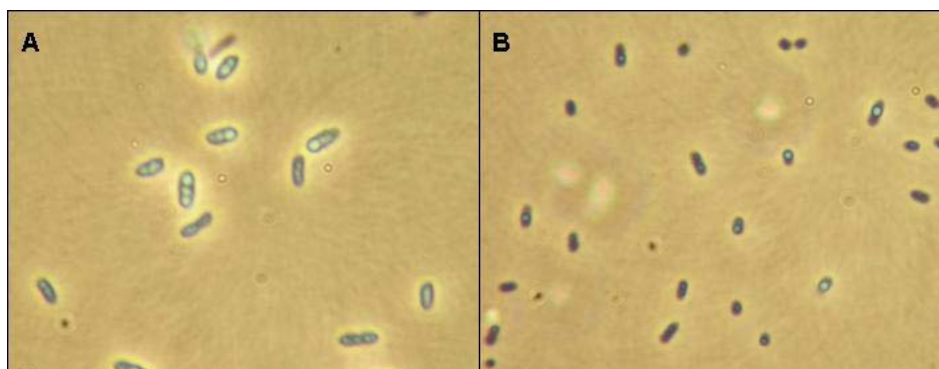


Figura 12. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases (100X) de cultivos creciendo en M63 0,1N Oct 15mM. A) *P. putida* KT2442; B) *P. putida* KT2442D<sup>-</sup>.

Klinke *et al.* (2000) relacionan el papel de la proteína PhaD con el control de la expresión de las fasinas PhaI y PhaF; por lo tanto hemos analizado mediante SDS-PAGE las proteínas presentes en gránulos aislados de *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT2442D<sup>-</sup> (mutante *phaD*<sup>-</sup>). Para completar este estudio el regulador transcripcional PhaD fue clonado en el vector de expresión pIZ1016 empleando los oligos *phaD*5' y *phaD*3' y la dianas de restricción *Hind*III y *Xba*I. El plásmido pIZD resultante se analizó por secuenciación y con él se electroporaron las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT2442D<sup>-</sup>. Los gránulos de PHA extraídos de las cepas resultantes también fueron analizados mediante SDS-PAGE (Figura 13).

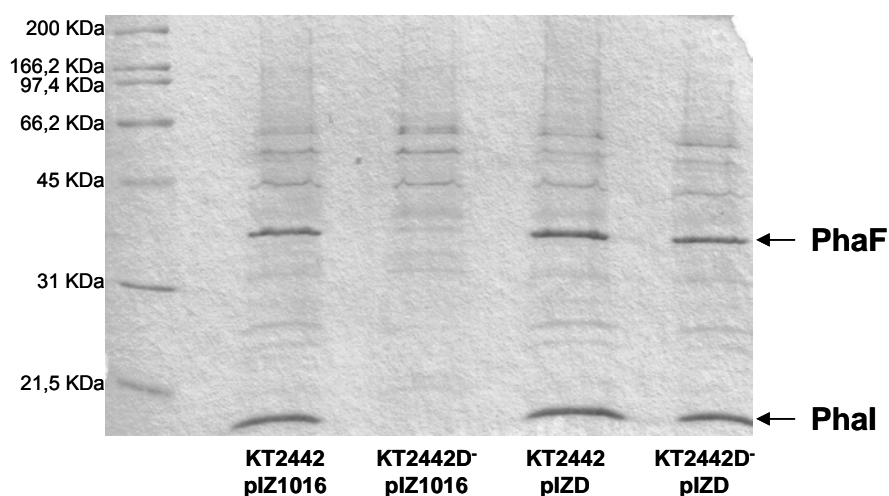


Figura 13. SDS-PAGE de gránulos aislados de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT2442D<sup>-</sup> portando los plásmidos pIZ1016/ pIZD. Las proteínas mayoritarias del gránulo PhaI t PhaF aparecen señaladas con flechas.

En la Figura 13 se aprecia como el patrón de expresión de las proteínas del gránulo de PHA se altera en el mutante *phaD* y como la mutación se complementa cuando introducimos en *trans* el gen *phaD*.

Por lo tanto la proteína PhaD participa en la regulación del metabolismo de PHA afectando, no sólo a la cantidad de polímero acumulado por las células, sino también al tipo de proteínas presentes en la estructura del propio gránulo.

## 2.4. Estudio del promotor *Pi* en *E. coli*

La secuencia promotora del gen *phal* (seleccionada por ser la que muestra una mayor actividad, ver Figuras 10 y 11) se estudió en un sistema heterólogo (*E. coli* MC4100) con la intención de analizar si la regulación de los promotores del *cluster pha* depende únicamente del regulador *phaD* o si está influenciada por algún otro factor presente en las células de *P. putida*.

Los plásmidos pZ1016 y su derivado portador del gen *phaD* (pZD) fueron transferidos por electroporación a la cepa de *E. coli* MC4100. Así mismo se introdujo en estas cepas el plásmido portador de la fusión *Pi::lacZ* (pUJI).

Se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa mediante el ensayo de Miller (1972) en las cepas MC4100 (pUJI, pZ1016) y MC4100 (pUJI, pZD) crecidas en medio LB. Estas condiciones resultaron repetitivas en los diferentes ensayos y mostraron una actividad del promotor *Pi* unas 10.000 veces superior en presencia del regulador PhaD (Figura 14).

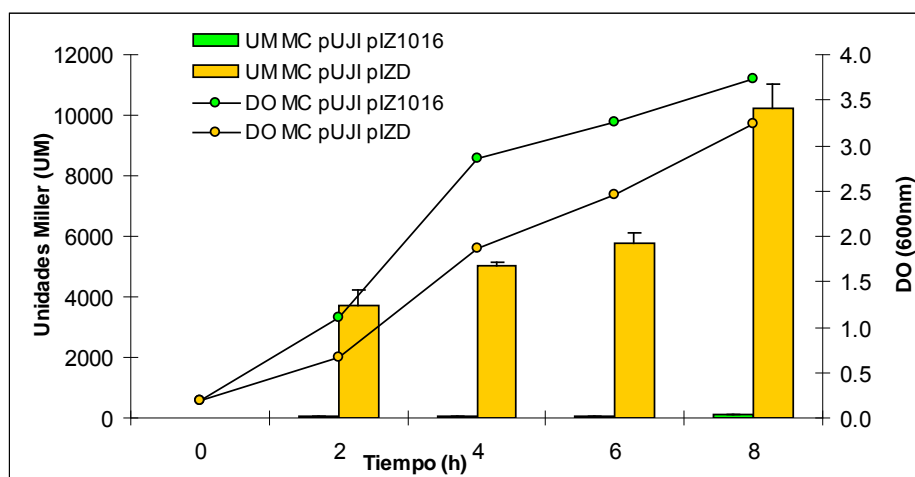


Figura 14. Ensayo  $\beta$ -galactosidasa en las cepas MC4100 portadoras de la fusión traduccional *Pi::lacZ* en presencia y ausencia del regulador PhaD (plásmido pZD). El ensayo se realizó en un cultivo en medio LB a distintos tiempos de crecimiento.

El estudio del promotor *Pi* en *E. coli* MC4100 nos ha permitido confirmar la actividad de dicho promotor, así como remarcar la importancia del regulador PhaD sobre el sistema. Al tratarse de un modelo heterólogo podemos ver que existe una regulación directa por parte de la proteína PhaD sobre la actividad del promotor, independiente de otros factores celulares presentes en *P. putida*.

### 3. Regulación enzimática

#### 3.1. Crecimiento de *P. putida* en distintas fuentes de carbono

Con el fin de estudiar los factores fisiológicos que conducen a la expresión de los genes del *cluster pha* y a la formación de precursores hidroxiacil-CoA mediante rutas metabólicas centrales hemos estudiado el crecimiento de *P. putida* KT2442 empleando distintas fuentes de carbono. Como se resume en la Figura 2 el metabolismo de PHA se surte de intermediarios que provienen de rutas centrales del metabolismo; cuando las células emplean carbohidratos, u otras fuentes de carbono no relacionadas con los ácidos grasos, las metabolizan a Acetil-CoA, sustrato para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. A continuación en el proceso de síntesis *de novo* de ácidos grasos se generan metabolitos que pueden ser derivados a intermediarios hidroxiacil-CoA, sustratos para las sintasas de PHA.

En la Tabla 5 y Figura 15 se observan los perfiles de crecimiento, medidos como  $DO_{600}$  de la cepa *P. putida* KT2442 empleando distintas fuentes de carbono que implican la formación de intermediarios hidroxiacil-CoA a partir de la síntesis *de novo* de ácidos grasos desde Acetil-CoA en medio M63 0,1N. Al emplear octanoico el cultivo alcanza una mayor densidad óptica, puesto que se trata de la fuente de carbono en la que se ha observado un mejor crecimiento y producción de PHA en esta cepa. La densidad óptica alcanzada y la producción de PHA apreciada por microscopía óptica de contraste de fases es menor en las fuentes de carbono que implican la producción de PHA desde la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Además según puede verse en la Figura 15 al emplear glicerol o fructosa como precursores se produce un retraso inicial en el crecimiento.

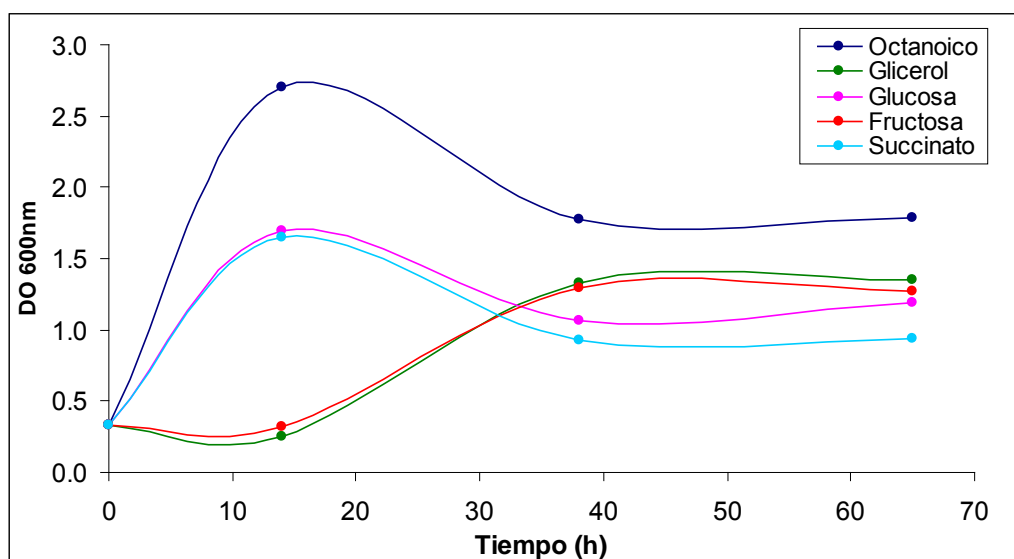


Figura 15. Perfiles de crecimiento ( $DO_{600}$ ) de *P. putida* KT2442 en distintas fuentes de carbono en medio M63 0,1N.

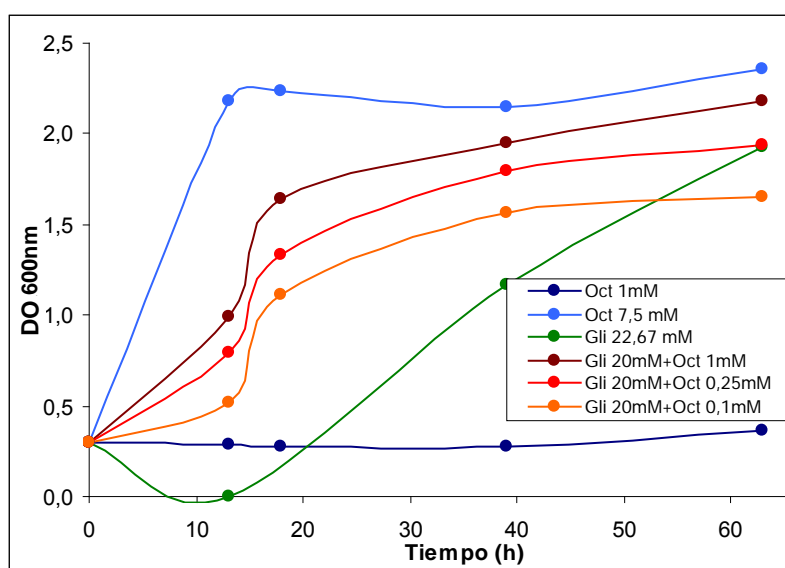
**Tabla 5. DO<sub>600</sub> y apariencia de los gránulos al microscopio en cultivos de *P. putida* KT2442 en distintas fuentes de carbono. - No se ven gránulos; +/- Se aprecian algunos gránulos; + Gránulos bien visibles.**

| Tiempo (h) | DO <sub>600</sub> Octanoico |     | DO <sub>600</sub> Glucosa |     | DO <sub>600</sub> Fructosa |     | DO <sub>600</sub> Succinato |     | DO <sub>600</sub> Glicerol |     |
|------------|-----------------------------|-----|---------------------------|-----|----------------------------|-----|-----------------------------|-----|----------------------------|-----|
|            | 7,5mM                       | PHA | 10mM                      | PHA | 10mM                       | PHA | 15mM                        | PHA | 20mM                       | PHA |
| 0          | 0,336                       |     | 0,336                     |     | 0,336                      |     | 0,336                       |     | 0,336                      |     |
| 14         | 2,700                       | +   | 1,690                     | -/+ | 0,323                      | -   | 1,650                       | -/+ | 0,255                      | -   |
| 38         | 1,770                       | +   | 1,068                     | -/+ | 1,292                      | +   | 0,926                       | -/+ | 1,324                      | +   |
| 65         | 1,790                       | +   | 1,190                     | -/+ | 1,270                      | +   | 0,940                       | -/+ | 1,350                      | +   |

Las distintas fuentes de carbono ensayadas conducen a una menor acumulación de PHA que el octanoico (precursor típico para la síntesis de PHA). Además en el caso de la fructosa y el glicerol se observa un retraso inicial en el crecimiento al emplear estos sustratos como fuente de carbono.

### Efecto inductor del Octanoico sobre el crecimiento y producción de PHA

El glicerol es una materia prima muy interesante desde el punto de vista biotecnológico para la producción de PHA, ya que se trata de un residuo generado en grandes cantidades en la producción de biodiesel. Por lo tanto, tratamos de estudiar como disminuir el retardo inicial en el crecimiento de *P. putida* KT2442 que se produce al emplearlo como fuente de carbono. Para ello estudiamos como variaba el perfil de crecimiento de *P. putida* KT2442 en M63 0,1N consumiéndolo glicerol como fuente de carbono al añadirle pequeñas cantidades de octanoico como inductor (Figura 16). En estas condiciones se aprecia como el retraso inicial del crecimiento en glicerol va disminuyendo, para dar lugar a un perfil de crecimiento similar al observado usando octanoico como sustrato.



**Figura 16. Perfiles de crecimiento de *P. putida* KT2442 en glicerol más distintas concentraciones de octanoico actuando como inductor**

El estudio del perfil de crecimiento y producción de PHA de *P. putida* KT2442 en glicerol resulta muy interesante a nivel biotecnológico por la posibilidad de producir polímeros biodegradables empleando como materia prima residuos industriales. Por otro lado, nos aporta información sobre el efecto de la regulación de las distintas rutas metabólicas sobre la producción de PHA. Hemos visto que el octanoico, a concentraciones que por si solas no permiten la crecimiento (1mM), es capaz de inducir el crecimiento/producción a partir de glicerol. Este efecto inductor del octanoico podría deberse a una regulación específica sobre el metabolismo de PHA o a una modulación global de los flujos metabólicos que conduzca a una mayor disponibilidad de intermediarios hidroxiacil-CoA.

### Efecto inductor de otras fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de PHA

Una vez observada la activación del crecimiento y producción de PHA por parte del octanoico sobre el crecimiento de *P. putida* KT2442 en glicerol procedimos a estudiar el efecto inductor de otras fuentes de carbono (Tabla 6 y Figura 17). Se observa que, si bien el octanoico es el mejor inductor, las otras fuentes de carbono son capaces en mayor o menor medida de actuar como inductoras del crecimiento/producción de PHA respecto al crecimiento usando glicerol como única fuente de carbono.

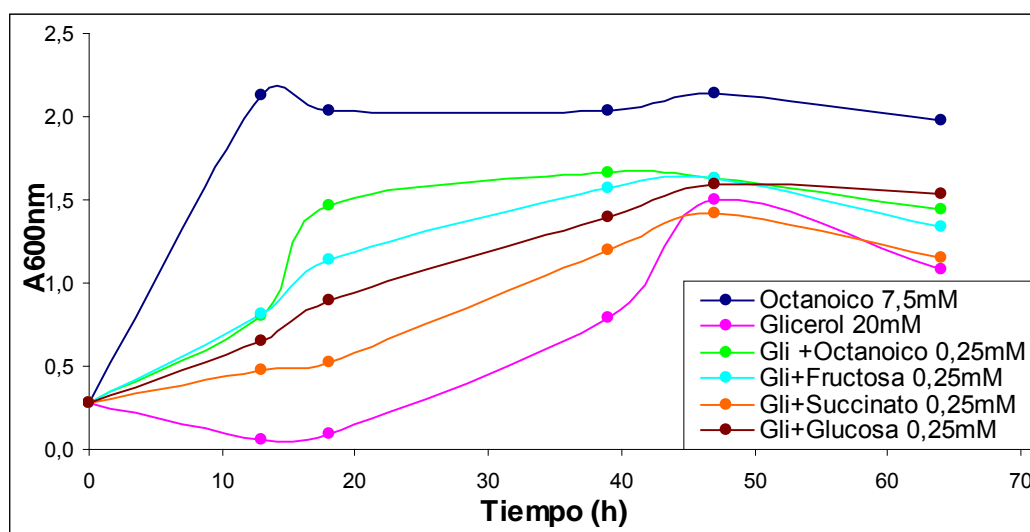


Figura 17. Perfiles de crecimiento de *P. putida* KT2442 en glicerol más distintos inductores.

El hecho de que el efecto inductor observado no sea exclusivo del octanoico, sino que otras fuentes de carbono también sean capaces de reducir el retraso inicial en el crecimiento del cultivo en glicerol, nos indica que no se trata únicamente de una regulación específica en un punto concreto del metabolismo. Se trataría de una activación global de los flujos energéticos/metabólicos de la bacteria que conduciría a una mayor disponibilidad de intermediarios hidroxiacil-CoA para las PHA polimerasas.

**Tabla 6. DO<sub>600</sub> y apariencia de los gránulos al microscopio en cultivos de *P. putida* KT2442 en glicerol 20mM + inductores 0,25mM. - No se ven gránulos; + Gránulos visibles; ++ Muchos gránulos.**

| Tiempo (h) | Octanoico<br>7,5mM | Glicerol<br>20mM | Glicerol +<br>Octanoico | Glicerol +<br>Fructosa | Glicerol +<br>Succinato | Glicerol +<br>Glucosa |
|------------|--------------------|------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 13         | ++                 | -                | +                       | -                      | -                       | -                     |
| 18         | ++                 | -                | +                       | +                      | -                       | -                     |
| 39         | +                  | +                | +                       | +                      | +                       | +                     |
| 47         | +                  | +                | +                       | +                      | +                       | +                     |
| 64         | +                  | +                | +                       | +                      | +                       | +                     |

### 3.2. Influencia de los genes *fadAB* sobre la producción de PHA

Para estudiar el efecto de la regulación enzimática de la  $\beta$ -oxidación sobre la disponibilidad de intermediarios hidroxiacil-CoA (Figura 2) se decidió construir mutantes que afectaran a pasos clave de la  $\beta$ -oxidación. La diana elegida fue el complejo multienzimático FadBA (genes *fadB*: PP\_2136 y *fadA*: PP\_2137 del cromosoma de KT2440) que agrupa las actividades: enoil-CoA hidratasa, 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa, cis-D3-trans-D2-enoil-CoA isomerasa, 3-OH-acil-CoA epimerasa, 3-ketoacyl-CoA tiasa. En concreto se construyó un mutante disruptivo en el gen *fadB*, el cual codifica para la subunidad FadB de dicho complejo enzimático (Figura 18).

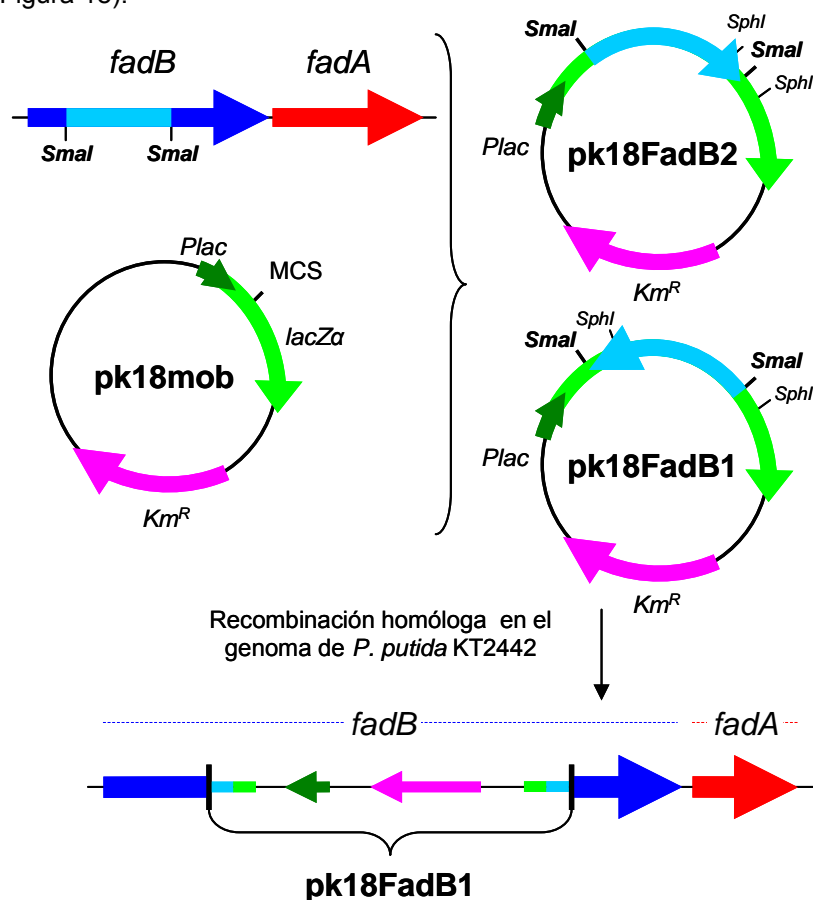


Figura 18. Esquema de la construcción de la cepa *P. putida* KTFadB.

Para la construcción del mutante *P. putida* KT2442FadB se clonó un fragmento interno (707 pares de bases) del gen *fadB* en el plásmido pk18mob empleando los oligonucleótidos FadBpK18 5' y FadBpK18 3' (Tabla 3) y la diana de restricción *Sma*I. Se seleccionaron dos nuevos plásmidos por alfa-complementación que difieren entre sí en la orientación del promotor *Plac* respecto al fragmento interno del gen *fadB*. El plásmido pK18FadB1, que porta al promotor *Plac* con una orientación opuesta a la del fragmento interno al gen *fadB*, fue introducido en la cepa *P. putida* KT2442 mediante conjugación triparental. La correcta inserción del plásmido pK18FadB1 en el gen *fadB* se analizó por PCR.

Se ha comparado la capacidad de producción de PHA de la cepa *Pseudomonas putida* KTFadB respecto a la cepa *wild type* en distintas condiciones de cultivo:

### Cultivo en medio sólido

*P. putida* KTFadB no es capaz de crecer en medio M63 0,1N Oct1 5mM, mientras que la cepa KT2442 crece y produce PHA (Figura 19).



Figura 19. Cultivo en medio sólido M63 0,1N Oct1 5mM de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* KTFadB.

De este resultado se deduce que la mutación en el gen *fadB* altera la  $\beta$ -oxidación de tal forma que impide el crecimiento de *P. putida* en presencia de octanoico como única fuente de carbono.

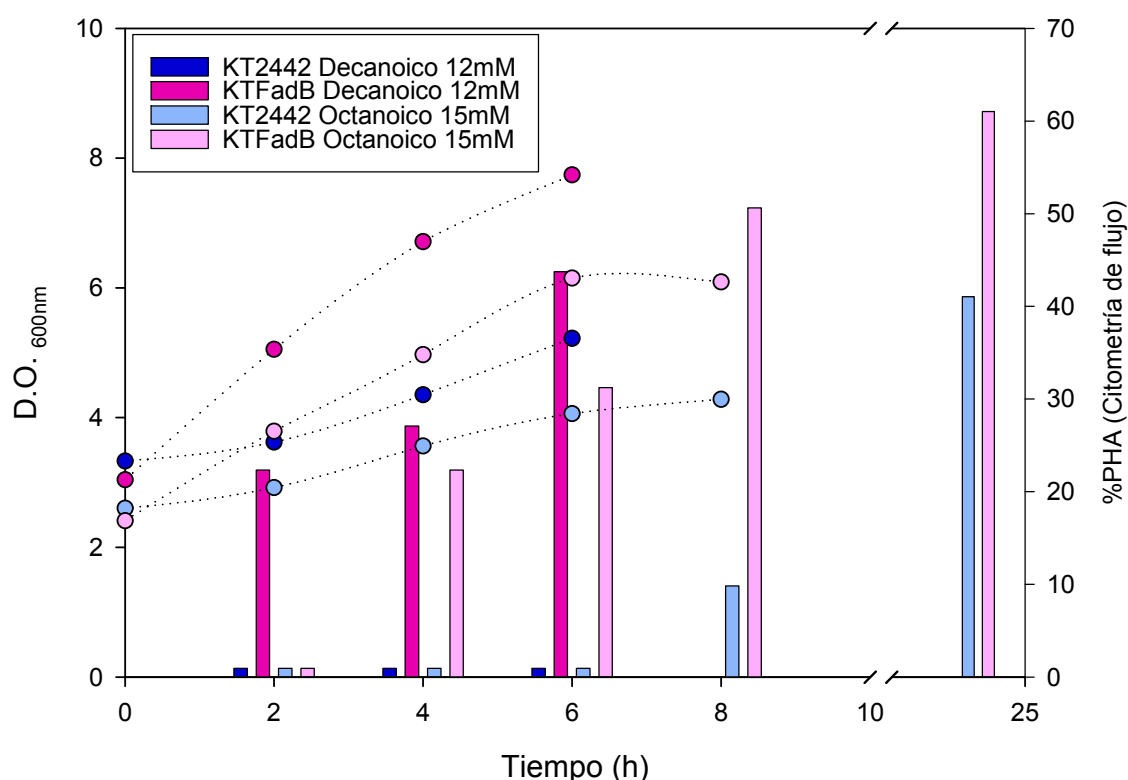
### Cultivos en medio líquido en una única fase

Mediante microscopía óptica se ha analizado la formación de gránulos de PHA en las dos cepas de *P. putida* creciendo en medio líquido (datos no mostrados). Tanto en LB como en M63 Glucosa 10mM o M63 0,1N Succinato 30mM, no hemos visto diferencias entre las cepas KT2442 y KTFadB en cuanto a producción de PHA; hay una baja producción en ambos casos. Además, si se compara la capacidad de inducción del Oct 1mM sobre el crecimiento en Succinato 30mM tampoco se aprecian diferencias; en ambos casos la adicción Oct 1mM incrementa la producción de gránulos de forma similar.

### Cultivos en medio líquido en dos fases

Al no observarse un fenotipo diferencial entre las dos cepas de *P. putida* analizadas nos propusimos realizar cultivos en dos fases: una primera fase de crecimiento y una segunda fase de acumulación de gránulos de PHA. Estudios previos en *P. putida* KT2442 (Ouyang *et al.*, 2007) muestran que un mutante *fadBA*<sup>-</sup> es capaz de crecer y acumular más PHA que la cepa silvestre cuando se crece en un cultivo en dos fases (1ª fase LB, 2ª fase LB+ decanoico o dodecanoico).

En este caso los cultivos se mantuvieron 18h en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento (LB) y a continuación las células se recogieron por centrifugación (5' 7000rpm) y se trasladaron a un nuevo medio propicio para la acumulación de PHA (M63 0,1N). En la Figura 20 se aprecia como en estas condiciones la DO<sub>600</sub> y el porcentaje de PHA alcanzado por la cepa KTFadB es mayor que en la cepa *wild type*.



**Figura 20.** Cultivos en dos fases: 1ª fase 18h en LB y 2ª fase en M63 0,1N. Las líneas punteadas indican la DO<sub>600</sub> y las barras el %PHA calculado por citometría de flujo. Se ha comparado el cultivo de las cepas KT2442 y KTFadB empleando decanoico 12mM y octanoico 15mM como precursores de PHA en la segunda fase del cultivo.

La cepa *P. putida* KTFadB creciendo en dos fases permite acumular PHA de forma más rápida. Tras una primera fase de crecimiento, el bloqueo de la  $\beta$ -oxidación permite que los intermediarios metabólicos generados en esta ruta sean desviados de forma más eficaz hacia la síntesis de PHA.

## IV. DISCUSIÓN

---

Este trabajo trata de abordar la regulación del metabolismo de polihidroxialcanoatos en *P. putida* KT2442. Se trata de un tema de estudio muy amplio que implica regulación a varios niveles: regulación transcripcional tanto a nivel global como específica del *cluster pha*, y regulación enzimática relacionada con la disponibilidad de metabolitos para la síntesis de PHA. Por lo tanto este estudio supone una aproximación a algunos de los factores más determinantes de este modelo de regulación.

Los PHAs son una clase compleja de poliésteres de almacenamiento, que se acumulan como inclusiones en el citoplasma, en respuesta a limitaciones en nutrientes inorgánicos, cuando los microorganismos se cultivan en presencia de un exceso de fuente de carbono (Prieto *et al.*, 2007). Por tanto, se asume que los PHAs se acumularían en situaciones de estrés en las que el microorganismo se encuentra ante un desequilibrio entre los nutrientes del medio: por ejemplo limitación de nitrógeno y exceso de fuente de carbono. Como punto de partida en este estudio se ha analizado el perfil de crecimiento de *P. putida* KT2442 en una situación modelo de producción de PHA: limitación de nitrógeno y un exceso de octanoico como fuente de carbono. En la Figura 4 se puede apreciar como en situación de producción de PHA (cepa *wild type*) las células acumulan el exceso de fuente de carbono en forma de gránulos de PHA. Se trataría de un “fenotipo ahorrador” en el que las células acumularían reservas hasta que las condiciones del medio se volviesen más favorables; lo cual se aprecia al suplementar el medio en nitrógeno, pues son capaces de responder aumentando su masa celular. Por el contrario el mutante *phaC1* no acumula PHA y alcanza una mayor masa celular inicialmente, hablaríamos de un “fenotipo derrochador” en el que no hay capacidad de respuesta en caso de que las condiciones ambientales cambiasen.

El estudio del perfil del crecimiento y producción de PHA en *P. putida* KT2442 nos ha permitido también poner a punto las técnicas de monitorización apropiadas para estudiar futuros mutantes y condiciones de cultivo. Concretamente la citometría de flujo es una técnica rápida y sencilla para el análisis del porcentaje de PHA acumulado por las células de un cultivo; aunque la cromatografía de gases es una técnica más precisa cuando el porcentaje de PHA respecto al peso seco es bajo.

Respecto a la regulación transcripcional a nivel específico la construcción de una serie de cepas portando en monocopia las fusiones traduccionales *promotor::lacZ* nos ha permitido determinar que el *cluster pha* de *P. putida* KT2442 está integrado por seis regiones promotoras que controlan la expresión de los genes que codifican para las sintasas (genes *phaC*), la depolimerasa (gen *phaZ*), las fasinias (genes *phaF* y *phaI*) y el regulador transcripcional (gen *phaD*). Estas regiones promotoras muestran unos ratios de expresión diferenciales en función de las condiciones de cultivo como podemos ver en la (Figura 11). Este tipo de sistemas multi-pocillo nos permiten comparar de forma rápida y directa la expresión de los distintos promotores. De esta forma podemos ver que fuentes de carbono como el octanoico

incrementan la expresión de los promotores de esta agrupación génica; siendo mayor la actividad en los promotores que controlan la expresión de los genes que codifican para las fasinas. Por otro lado la expresión de los promotores es menor en fuentes de carbono como la glucosa y el glicerol y en general cuando no se limita la cantidad de nitrógeno en el medio.

Los estudios con el mutante *phaD*- confirman la importancia de la proteína PhaD en la regulación del metabolismo de PHA afectando, no sólo a la cantidad de polímero acumulado por las células, sino también al tipo de proteínas presentes en la estructura del propio gránulo (Figuras 12 y 13). Además el papel regulador de la proteína PhaD se mantiene en el sistema heterólogo *E. coli* (MC4100) sin que sean precisos factores transcripcionales específicos de *P. putida*. No obstante, sigue sin haberse identificado el ligando o ligandos capaces de unirse a PhaD y modular su acción.

En futuros estudios se tratará de analizar la expresión de las fusiones traduccionales *promotor::lacZ* en un sistema monocopia en la cepa *P. putida* KT2442D<sup>-</sup> (mutante *phaD*<sup>-</sup>). De esta forma se analizará el papel de PhaD sobre cada uno de los promotores del *cluster* en distintas condiciones de cultivo.

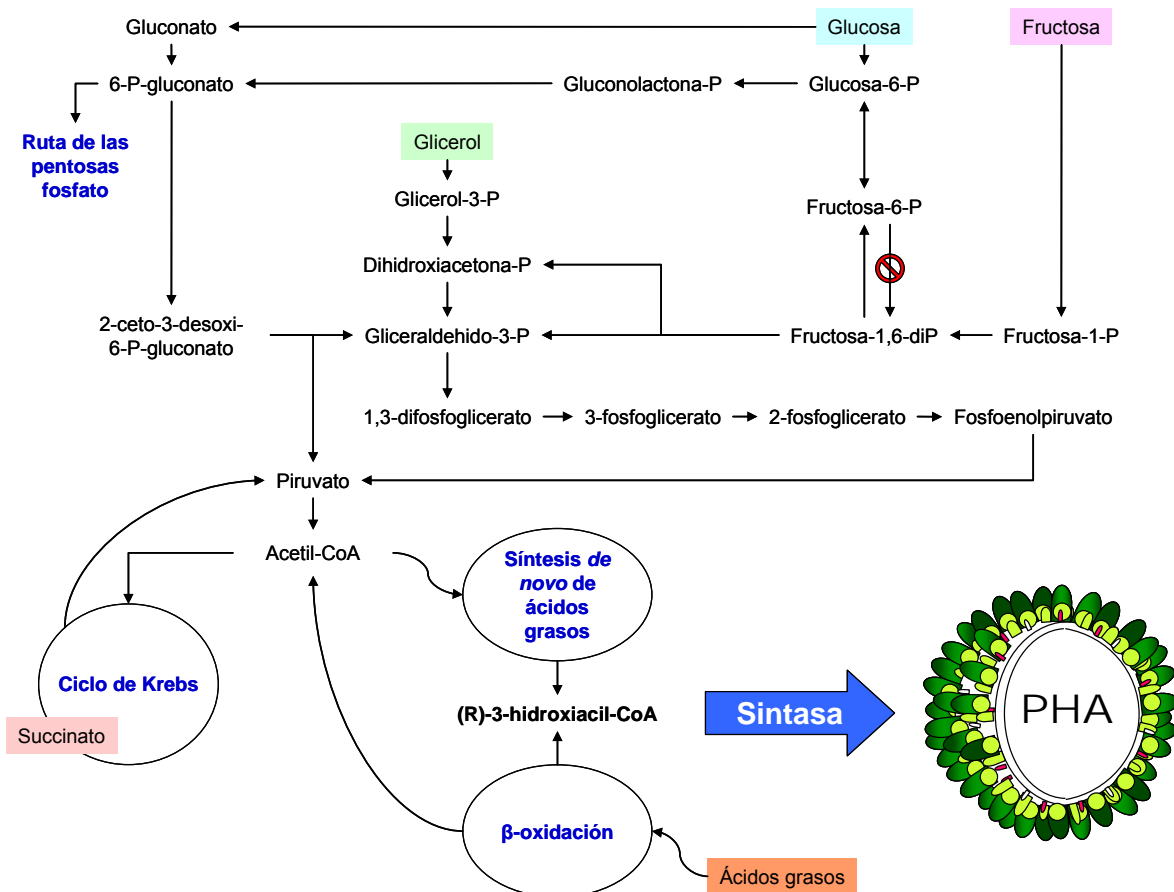


Figura 21. Esquema resumen de las rutas metabólicas para la producción de PHA en microorganismos. Se muestran recuadrados con colores los diversos sustratos empelados en este estudio.

Al hablar de regulación a nivel enzimático hay que tener en cuenta que los monómeros incorporados al gránulo provienen del metabolismo central de la bacteria (Figura 21). Por lo tanto, la regulación de todas estas rutas repercutirá finalmente en la acumulación de PHA.

En las Figuras 15 a 17 podemos observar como al emplear distintas fuentes de carbono diferentes de los ácidos grasos se acumula PHA en mayor o menor proporción. En el caso del glicerol, se produce un retardo inicial en el crecimiento y producción de PHA que puede ser atenuado cuando se añade octanoico a baja concentración. Hay que señalar que la presencia de octanoico 1mM como única fuente de carbono no es suficiente como para permitir el crecimiento del cultivo. Esto nos hace pensar que los perfiles observados al emplear glicerol más octanoico no se deben al efecto sumatorio de emplear ambas fuentes de carbono, sino que existe un verdadero efecto inductor del octanoico sobre el crecimiento con glicerol. El hecho de que este efecto inductor no sea exclusivo del octanoico, sino que otras fuentes de carbono también sean capaces de reducir el retraso inicial en el crecimiento del cultivo en glicerol, nos indica que no se trata únicamente de una regulación específica en un punto concreto del metabolismo. Se trataría de una activación global de los flujos energéticos/metabólicos de la bacteria que conduciría a una mayor disponibilidad de intermediarios hidroxiacil-CoA para las PHA polimerasas.

Por otro lado el objetivo de la construcción de un mutante que afecte a la ruta de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos era ralentizar el consumo de metabolitos por parte de esta ruta. De esta forma se pretende aumentar la concentración citoplasmática de intermediarios disponibles para la síntesis de PHA.

Los genes *fadBA* (PP\_2136 y PP\_2137) no son los únicos genes que codifican para las actividades enzimáticas del complejo proteico FadBA. Olivera *et al.* (2001) identifican al menos dos juegos de genes que codifican para estas actividades catalíticas: el primero de ellos es el analizado en el presente estudio y el segundo corresponde a los genes *fadB2x* y *fadAx* (PP\_2114 y PP\_2115). Según Ouyang *et al.* (2007) esta segunda pareja de genes no juega un papel fundamental en la ruta de beta-oxidación, sin embargo, cuando se mutan los genes *fadBA* el papel de estos segundos pasa a ser esencial y permite que la  $\beta$ -oxidación no quede totalmente bloqueada.

Como se puede apreciar en la Figura 20 los cultivos en dos fases permiten una mayor acumulación de PHA en el mutante *fadB<sup>-</sup>* que en la cepa *wild type*. Sin embargo el porcentaje final de PHA acumulado por dicho mutante cuando en la segunda fase se emplea medio M63 0,1N Oct 15mM es de aproximadamente un 60%, que es el valor alcanzado por la cepa KT2442 en los cultivos en una sola fase en dicho medio. Por lo tanto empleando una fuente de carbono preferencial para la producción de gránulos, como es el octanoico, la cepa KTFadB no permite alcanzar una mayor producción del biopolímero. Sin embargo la alteración de la  $\beta$ -oxidación que presenta este mutante puede ser una herramienta interesante a la hora de estudiar la producción de PHA empleando otras fuentes de carbono que no se incorporan con

tanta facilidad al metabolismo del PHA. La cepa KTFadB permite estudiar la capacidad de producción de PHA y su composición en monómeros empleando como precursores ácidos grasos de distinto número de carbonos, insaturados, ramificados, con sustituciones, etc. para analizar si el uso de los genes alternativos favorece su incorporación al gránulo.

## V. CONCLUSIONES

---

- El perfil de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2442 se ve alterado por la presencia de PHA. En situación de producción de PHA las células invierten parte de su materia y energía en producir PHA, por lo tanto alcanzan una menor masa celular que en situación de no acumulación del biopolímero (mutante *phaC1*-).
- La citometría de flujo es una técnica complementaria a la cromatografía de gases para cuantificar el porcentaje de PHA acumulado en *P. putida* KT2442. Se trata de una técnica más rápida y sencilla que la cromatografía de gases, aunque menos sensible a concentraciones bajas del biopolímero.
- El *cluster pha* de *P. putida* KT2442 está integrado por seis regiones promotoras que controlan la expresión de los genes que codifican para las sintasas (genes *phaC*), la depolimerasa (gen *phaZ*), las fasinas (genes *phaF* y *phaI*) y el regulador transcripcional (gen *phaD*).
- El análisis semicuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en placas multipocillo supone una aproximación rápida y muy visual al estudio de la actividad de los promotores identificados bajo distintas condiciones de cultivo.
- La proteína reguladora PhaD participa en la regulación del metabolismo de PHA afectando, no sólo a la cantidad de polímero acumulado por las células, sino también al tipo de proteínas presentes en la estructura del propio gránulo.
- El crecimiento de *P. putida* KT2442 empleando como fuentes de carbono sustratos que se metabolizan a PHA a través de la síntesis *de novo* de ácidos grasos conduce a una menor acumulación de biopolímero que empleando octanoico como precursor. La adicción de octanoico, y en menor medida de otros sustratos, a bajas concentraciones induce la producción de PHA cuando *P. putida* KT2442 se cultiva en glicerol.
- El bloqueo de la  $\beta$ -oxidación a nivel del complejo multienzimático FadBA (mutante *fadB*) impide el crecimiento de *P. putida* KT2442 en presencia de octanoico como única fuente de carbono. Sin embargo el cultivo en dos fases (crecimiento y producción de PHA) en *P. putida* KTFadB permite una acumulación más rápida de PHA.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

---

- Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 104:541-55.
- de Eugenio, L. I., P. Garcia, J. M. Luengo, J. M. Sanz, J. S. Roman, J. L. Garcia, and M. A. Prieto. 2007. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J Biol Chem* 282:4951-62.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172:6568-72.
- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235:386-405.
- Degelau, A., T. Scheper, J. E. Bailey, and C. Guske. 1995. Fluorometric measurement of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:653-657.
- Diaz, E., and M. A. Prieto. 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 11:467-75.
- Durner, R., M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli. 2001. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnol Bioeng* 72:278-88.
- Garcia, B., E. R. Olivera, B. Minambres, M. Fernandez-Valverde, L. M. Canedo, M. A. Prieto, J. L. Garcia, M. Martinez, and J. M. Luengo. 1999. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon. *J Biol Chem* 274:29228-41.
- Gavrilescu, D. 2004. Solid waste generation in kraft pulp mills. *Environ Eng Manag J* 3:399-404.
- Hany, R., C. Bohlen, T. Geiger, R. Hartmann, J. Kawada, M. Schmid, M. Zinn, and R. H. Marchessault. 2004. Chemical Synthesis of Crystalline Comb Polymers from Olefinic Medium-Chain-Length Poly[3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* 37:385-389.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557-67.
- Hoffmann, N., and B. H. Rehm. 2004. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 237:1-7.

- Huijberts, G. N., G. Eggink, P. de Waard, G. W. Huisman, and B. Witholt. 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* 58:536-44.
- Huisman, G. W., E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra, and B. Witholt. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J Biol Chem* 266:2191-8.
- Jung, K., W. Hazenberg, M. Prieto, and B. Witholt. 2001. Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol Bioeng* 72:19-24.
- Kessler, B., Q. Ren, G. de Roo, M. A. Prieto, and B. Witholt. 2001. Engineering of Biological Systems for the Synthesis of Tailor-made Polyhydroxyalkanoates, a Class of Versatile Polymers. *Chimia* 55:119-122.
- Kessler, B., and B. Witholt. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* 86:97-104.
- Klinke, S., G. de Roo, B. Witholt, and B. Kessler. 2000. Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Appl Environ Microbiol* 66:3705-10.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt. 1988. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl Environ Microbiol* 54:2924-2932.
- Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bull Soc Chim Biol* 8:770-782.
- Luengo, J. M., B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro, and E. R. Olivera. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 6:251-60.
- Madison, L. L., and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21-53.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Moldes, C., G. Farinós, L. de Eugenio, P. García, J. García, F. Ortego, P. Hernández-Crespo, P. Castañera, and M. Prieto. 2006. New tool for spreading proteins to the

environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:88-93.

- Moldes, C., P. Garcia, J. L. Garcia, and M. A. Prieto. 2004. In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl Environ Microbiol* 70:3205-12.
- Moreno-Ruiz, E., M. J. Hernaez, O. Martinez-Perez, and E. Santero. 2003. Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol* 185:2026-30.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouiri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799-808.
- Olivera, E. R., D. Carnicero, R. Jodra, B. Minambres, B. Garcia, G. A. Abraham, A. Gallardo, J. S. Roman, J. L. Garcia, G. Naharro, and J. M. Luengo. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ Microbiol* 3:612-8.
- Ouyang, S. P., R. C. Luo, S. S. Chen, Q. Liu, A. Chung, Q. Wu, and G. Q. Chen. 2007. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules* 8:2504-11.
- Prieto, M. A., B. Buhler, K. Jung, B. Witholt, and B. Kessler. 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J Bacteriol* 181:858-68.
- Prieto, M. A., M. B. Kellerhals, G. B. Bozzato, D. Radnovic, B. Witholt, and B. Kessler. 1999. Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Environ Microbiol* 65:3265-71.
- Prieto, M.A, L.I. de Eugenio, B. Galán, J.M. Luengo and B. Witholt. 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. *In: Pseudomonas: a model System in Biology. Pseudomonas vol. V. (Ed) J.L. Ramos and A. Filloux. Springer. Pp. 397-428.*
- Rehm, B. H. A. 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* 376:15-33.
- Sambrook, J., and D.W. Rusell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sandoval, A., E. Arias-Barrau, M. Arcos, G. Naharro, E. R. Olivera, and J. M. Luengo. 2007. Genetic and ultrastructural analysis of different mutants of *Pseudomonas putida* affected in the poly-3-hydroxy-n-alkanoate gene cluster. *Environ Microbiol* 9:737-51.
- Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- Steinbüchel, A., K. Aerts, W. Babel, C. Föllner, M. Liebergesell, M. H. Madkour, F. Mayer, U. Pieper-Furst, A. Pries, H. E. Valentin, and R. Wieczorek. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can J Microbiol* 41:94-105.
- Steinbüchel, A., and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 128:219-228.
- Stuart, E. S., A. Tehrani, H. E. Valentin, D. Dennis, R. W. Lenz, and R. Clinton Fuller. 1998. Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary. *J Biotechnol* 64:137-144.
- Sudesh, K., H. Abe, and Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25:1503-1555.
- Swank, R. T., and K. D. Munkres. 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 39:462-77.
- Tyo, K. E., H. Zhou, and G. N. Stephanopoulos. 2006. High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* 72:3412-7.
- van der Leij, F.R. and B. Witholt. 1995. Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants: a review. *Can J Microbiol* 41:222-238.
- Vidal-Mas, J., P. Resina, E. Haba, J. Comas, A. Manresa, and J. Vives-Rego. 2001. Rapid flow cytometry--Nile red assessment of PHA cellular content and heterogeneity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCIB 40044) grown in waste frying oil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80:57-63.
- Wirth, R., A. Friesenegger, and S. Fiedler. 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* 216:175-7.
- Zinn, M., B. Witholt, and T. Egli. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* 53:5-21.

**2. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance**

---



# The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance

Laura Isabel de Eugenio, Isabel F. Escapa, Valle Morales, Nina Dinjaski, Beatriz Galán, José Luis García and María A. Prieto\*

Environmental Biology Research Line, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain.

## Summary

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polymers produced by a wide range of bacteria, including Pseudomonads. These polymers are accumulated in the cytoplasm as carbon and energy storage materials when culture conditions are unbalanced and hence, they have been classically considered to act as sinks for carbon and reducing equivalents when nutrients are limited. Bacteria facing carbon excess and nutrient limitation store the extra carbon as PHAs through the PHA polymerase (PhaC). Thereafter, under starvation conditions, PHA depolymerase (PhaZ) degrades PHA and releases *R*-hydroxyalkanoic acids, which can be used as carbon and energy sources. To study the influence of a deficient PHA metabolism in the growth of *Pseudomonas putida* KT2442 we have constructed two mutant strains defective in PHA polymerase (*phaC1*)- and PHA depolymerase (*phaZ*)-coding genes respectively. By using these mutants we have demonstrated that PHAs play a fundamental role in balancing the stored carbon/biomass/number of cells as function of carbon availability, suggesting that PHA metabolism allows *P. putida* to adapt the carbon flux of hydroxyacyl-CoAs to cellular demand. Furthermore, we have established that the coordination of PHA synthesis and mobilization pathways configures a functional PHA turnover cycle in *P. putida* KT2442. Finally, a new strain able to secrete enantiomerically pure *R*-hydroxyalkanoic acids to the culture medium

during cell growth has been engineering by redirecting the PHA cycle to biopolymer hydrolysis.

## Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters accumulated in the cytoplasm as reserve storage granules, which are generally believed to play a role as sinks for carbon and reducing equivalents when other nutrients are limited (Madison and Huisman, 1999; O'Leary *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2007). The most common PHA is the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), considered as the prototype of the short-chain-length PHAs (scl-PHAs) (Madison and Huisman, 1999), whereas medium-chain-length PHA (mcl-PHA), containing monomers from 6 to 14 carbon atoms, is less abundant and often produced by *Pseudomonas* species (Timm and Steinbüchel, 1990; Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). The *pha* gene cluster responsible for PHA metabolism is well conserved among the mcl-PHA Pseudomonads producer strains (Huisman *et al.*, 1991; de Eugenio *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2007) (Fig. 1). It is composed of (i) two synthase (or polymerase)-coding genes (*phaC1* and *phaC2*) involved in PHA synthesis; and (ii) a depolymerase coding-gene (*phaZ*) responsible for PHA mobilization (de Eugenio *et al.*, 2007) and the *phaD* gene encoding a putative transcriptional regulator (Klinke *et al.*, 2000). The *phaF* and *phal* genes are transcribed divergently to the other *pha* genes, and encode the phasins playing regulatory and functional roles (Prieto *et al.*, 1999a; Moldes *et al.*, 2004). PhaC, PhaZ, PhaF and Phal have been so far identified as granule-associated proteins, but very recently, a granule-associated acyl-CoA synthetase that activates the depolymerase products (3-hydroxyalkanoic acids) into the polymerase substrates (3-hydroxyacyl-CoAs thioesters) has been identified in *Pseudomonas putida* GPo1 (Ruth *et al.*, 2008) (Fig. 1).

The PhaZ from *P. putida* KT2442 (PhaZ<sub>KT</sub>), which has been purified and biochemically characterized as the prototype of intracellular mcl-PHA depolymerases (de Eugenio *et al.*, 2007; 2008), remains permanently associated to the PHA granules during PHA-accumulation and PHA-mobilization conditions (de Eugenio *et al.*, 2007),

Received 14 May, 2009; accepted 11 August, 2009. \*For correspondence. E-mail auxi@cib.csic.es; Tel. (+34) 918 373 112; Fax (+34) 915 360 432.

© 2009 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd



**3. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442**

---



# The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442

Laura Isabel de Eugenio,<sup>1\*</sup> Beatriz Galán,<sup>1\*</sup> Isabel F. Escapa,<sup>1</sup> Beatriz Maestro,<sup>2†</sup> Jesús M. Sanz,<sup>2</sup> José Luis García<sup>1</sup> and María A. Prieto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Av. Universidad, s/n. 03202 Elche, Spain.

## Summary

The promoters of the *pha* gene cluster encoding the enzymes involved in the metabolism of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the model strain *Pseudomonas putida* KT2442 have been identified and compared. The *pha* locus is composed by five functional promoters upstream the *phaC1*, *phaZ*, *phaC2*, *phaF* and *phal* genes ( $P_{C1}$ ,  $P_Z$ ,  $P_{C2}$ ,  $P_F$  and  $P_I$ , respectively).  $P_{C1}$  and  $P_I$  are the most active promoters of the *pha* cluster allowing the transcription of *phaC1ZC2D* and *phalF* operons. All promoters with the sole exception of  $P_F$  are carbon source-dependent. Their transcription profiles explain the simultaneous production of PHA depolymerase and synthases to maintain the metabolic balance and PHA turnover. Mutagenesis analyses demonstrated that PhaD, a TetR-like transcriptional regulator, behaves as a carbon source-dependent activator of the *pha* cluster. The *phaD* gene is mainly transcribed as part of the *phaC1ZC2D* transcription unit and controls its own transcription and that of *phalF* operon. The ability of PhaD to bind the  $P_{C1}$  and  $P_I$  promoters was analysed by gel retardation and DNase I footprinting assays, demonstrating that PhaD interacts with a region of 25 bp at  $P_{C1}$  promoter (named OPRc1) and a 29 bp region at  $P_I$  promoter (named OPRi). These operators contain a single binding site formed by two inverted half sites of 6 bp

separated by 8 bp which overlap the corresponding promoter boxes. The 3D model structure of PhaD activator predicts that the true effector might be a CoA-intermediate of fatty acid  $\beta$ -oxidation.

## Introduction

The environmental pollution problems caused by the use of conventional plastics has generated a huge interest in the study of sustainable processes to generate these frequently used products from raw materials of agricultural or urban origins (Gavrilescu and Chisti, 2005). Some of the polyesters most seriously being considered as alternative plastics are the polyhydroxyalkanoates (PHAs). These are biodegradable polymers naturally produced by bacteria as carbon storage granules from renewable resources like glucose, fructose or fatty acids that form part of the vegetal oils (Madison and Huisman, 1999; Dias *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2007). Medium-chain-length PHAs (mcl-PHA), containing 6–14 carbon atoms per monomer, are mainly produced by *Pseudomonas* species (Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Although bacterial fermentation and physicochemical characterization of the polymer have been studied extensively during the past few decades, knowledge on the molecular mechanisms regulating its synthesis and degradation is relatively limited (Prieto *et al.*, 1999; Hoffmann and Rehm, 2004; 2005; Siervo, 2005; Sandoval *et al.*, 2007). This is in part due to the complexity of PHA metabolism, which implies an extremely intricate regulatory system. Thus, PHA synthesis in Pseudomonads comprises: (i) central pathways, such as  $\beta$ -oxidation pathway and fatty acid *de novo* synthesis to convert fatty acid or carbohydrate intermediates, respectively, into different (*R*)-3-hydroxyalkanoyl-CoAs; and (ii) a specific or peripheral pathway encoded by the *pha* cluster including the genes encoding a depolymerase (PhaZ) (de Eugenio *et al.*, 2007; 2008; 2010) and two synthases (PhaC1 and PhaC2) (Huisman *et al.*, 1991), which coordinately with (iii) a granule-associated acyl-CoA-synthetase (Acs1) (Ruth *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009), direct the carbon flux of these central metabolites towards PHA accumulation or hydrolysis as an active response to the carbon and

Received 3 November, 2009; accept 22 January, 2010. \*For correspondence. E-mail auxi@cib.csic.es; Tel. (+34) 918 373 112; Fax (+34) 915 360 432. †Present address: Instituto Universitario de Electroquímica. Universidad de Alicante. 03080- Alicante, Spain. ‡Authors contribute equally to this work.





