

## ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS POLIHIDROXIBUTIRATO DEPOLIMERASAS PhbZ2 Y PhbZ3, Y LA PHASINA PhbP3 DE *Azotobacter vinelandii*: DETERMINACIÓN DE SU FUNCIÓN BIOLÓGICA Y ACTIVIDAD *IN VITRO*.

Holjes Salgado-Lugo<sup>1</sup>, Jessica Ruiz-Escobedo<sup>1</sup>, Marlén Hernández-Miranda<sup>1</sup>, Andrea Moyao-Mejía<sup>1</sup>, Josefina Guzman-Aparicio<sup>1</sup>, Soledad Moreno-Leon<sup>1</sup>, Carlos Peña<sup>2</sup>, Guadalupe Espín<sup>1</sup>, Daniel Segura<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología Molecular, <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210 México, E-mail: daniel@ibt.unam.mx.

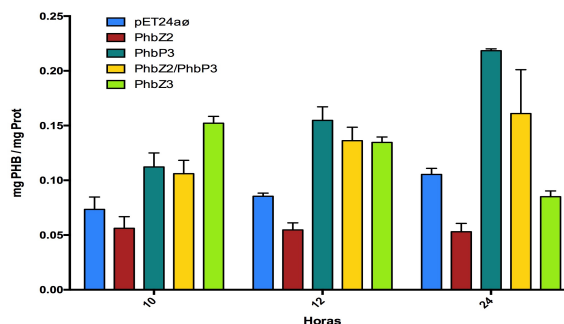
*Palabras clave: bioplástico, biodegradable, depolimerasas.*

**Introducción.** El polihidroxitirato (PHB) es un biopolímero que es producido por *Azotobacter vinelandii* y otras bacterias, además de acumularse intracelularmente como reserva de carbono y energía (1). Actualmente se conoce el proceso de síntesis de PHB y su regulación en muchos organismos; sin embargo, hay poca información sobre las proteínas (PHB depolimerasas, PhbZ) encargadas de la depolimerización o movilización del PHB almacenado. Estas enzimas degradan el PHB mediante hidrólisis para la obtención de energía y carbono para la bacteria. Además, las propiedades del PHB como material plástico se modifican al alterar su peso molecular, y este se ve afectado por el balance entre los procesos de síntesis y degradación del biopolímero (2). En *A. vinelandii*, se han identificado 6 genes que codifican para posibles PHB depolimerasas. Una de ellas, PhbZ1, se localizó asociada al gránulo de PHB y se demostró que tiene actividad de depolimerización. En la mutante *phbZ1* se observó una mayor acumulación de PHB con muy alto peso molecular (3). El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar bioquímicamente dos posibles depolimerasas adicionales (PhbZ2 y PhbZ3) y una proteína de función desconocida que se encuentra asociada al gránulo (phasina, PhbP3), cuyo gen se encuentra río abajo de la PHB depolimerasa PhbZ2 formando un operón.

**Metodología.** Se construyeron mutantes en las que se inactivaron los genes de las PHB depolimerasas *phbZ2* y *phbZ3* y de la phasina *phbP3* y una mutante doble para *phbZ2-phbP3*. Se analizó su producción (acumulación) y movilización de PHB en medio Burk-Glucosa, donde ocurre el fenómeno de movilización de PHB en la cepa silvestre. Adicionalmente, se clonaron los genes *phbZ2*, *phbZ3* y *phbP3* para su expresión en un vector pET24a con *tag* de Histidinas (6-his) en el extremo C-terminal en *E. coli*, se purificaron las proteínas recombinantes correspondientes en condiciones desnaturizantes y con columna de Ni<sup>2+</sup> y se estudiaron las actividades de depolimerización *in vitro* sobre diferentes sustratos de PHB. También se realizaron ensayos de actividad de degradación de PHB *in vivo*, en una cepa caracterizada para expresar los genes biosintéticos (phbBAC) de PHB,

junto con los genes *phbZ2*, *phbZ3* y *phbP3* para analizar el efecto en acumulación-movilización del polímero.

**Resultados.** Los resultados demuestran una mayor acumulación de PHB en las mutantes PhbZ2 y PhbZ3 *versus* la cepa silvestre. En contraste, la mutante PhbP3, presentó una acumulación de PHB menor. En el sistema heterólogo de producción-movilización de PHB se observó que la expresión de las proteínas PhbZ2 y PhbZ3 ocasiona una degradación PHB en *E. coli*, mientras que la expresión de la phasina PhbP3 aumenta la acumulación del polímero (**Fig. 1**).



**Fig. 1 Acumulación específica de PHB en *E. coli*.** El sistema se evaluó en un fondo de *E. coli* BL21 con un vector que contiene las enzimas de síntesis de PHB (phbBAC).

Las proteínas recombinantes PhbZ2 y PhbZ3 evaluadas *in vitro* demostraron actividad de depolimerasas con sustrato PHB artificial (de origen de *A. vinelandii*).

**Conclusiones.** Demostramos que PhbZ2 y PhbZ3 funcionan como depolimerasas en *A. vinelandii*, y en *E. coli*, como sistema de sobreexpresión, complemento los resultados observados en *A. vinelandii*. Las Proteínas recombinantes también son funcionales en un sistema *in vitro*, midiendo su actividad con nPHB.

**Agradecimientos.** Este trabajo se realizó con apoyo del CONACyT, proyecto 255158 y del PAPIIT DGAPA-UNAM, Proyecto IG200219.

### Bibliografía.

1. Segura, D., Espín G. 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 414-418.
2. Millán, M., et al. 2017. *J Biotechnol.* 10(259): 50-55.
3. Adaya, L et al. 2018. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 2693-2707.

