



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LAS RUTAS METABÓLICAS Y
SECUENCIAS GÉNICAS ASOCIADAS A LA BIOSÍNTESIS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS EN BACTERIAS DEL GÉNERO *RALSTONIA SPP.*
DE ORIGEN TROPICAL**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniero en Biotecnología*

AUTORES:

NATHAEL MAURICIO CUEVA ORTIZ
FERNANDO ARIEL TORRES ZURITA

TUTORA:

PhD. ELIANA ROCIO NOPE VARGAS

GUAYAQUIL - ECUADOR

2026

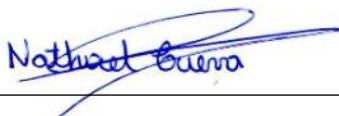
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, **Nathael Mauricio Cueva Ortiz** con documento de identificación N° 0929656882 y **Fernando Ariel Torres Zurita** con documento de identificación N° 0930515283; manifestamos que:

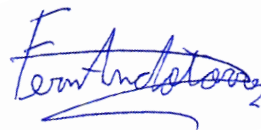
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



Nathael Mauricio Cueva Ortiz
CI: 0929656882



Fernando Ariel Torres Zurita
CI: 0930515283

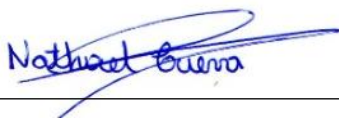
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Nathael Mauricio Cueva Ortiz** con documento de identificación N° 0929656882 y **Fernando Ariel Torres Zurita** con documento de identificación N° 0930515283, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo Experimental: **REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LAS RUTAS METABÓLICAS Y SECUENCIAS GÉNICAS ASOCIADAS A LA BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN BACTERIAS DEL GÉNERO *RALSTONIA SPP.* DE ORIGEN TROPICAL**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

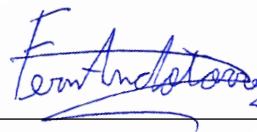
Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



Nathael Mauricio Cueva Ortiz

CI: 0929656882



Fernando Ariel Torres Zurita

CI: 0930515283

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Eliana Rocio Nope Vargas** con documento de identificación N° 0967660259, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LAS RUTAS METABÓLICAS Y SECUENCIAS GÉNICAS ASOCIADAS A LA BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN BACTERIAS DEL GÉNERO *RALSTONIA SPP.* DE ORIGEN TROPICAL**, realizado por **Nathael Mauricio Cueva Ortiz** con documento de identificación N° 0929656882 y **Fernando Ariel Torres Zurita** con documento de identificación N° 0930515283, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



Eliana Rocio Nope Vargas

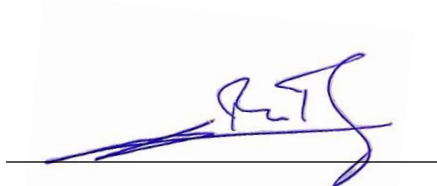
CI: 0967660259

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Carlos Antonio Riera Ruiz** con documento de identificación N° 0916170699, docente investigador del Centro de Investigaciones del Ecuador CIBE, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LAS RUTAS METABÓLICAS Y SECUENCIAS GÉNICAS ASOCIADAS A LA BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN BACTERIAS DEL GÉNERO *RALSTONIA SPP.* DE ORIGEN TROPICAL**, realizado por Nathael Mauricio Cueva Ortiz con documento de identificación N° 0929656882 y Fernando Ariel Torres Zurita con documento de identificación N° 0930515283, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



Carlos Antonio Riera Ruiz

CI: 0916170699

Dedicatoria Nathael Cueva

Dedico esta tesis a mis padres, Miguel y Jessica, quienes han sido el pilar fundamental de mi formación académica y personal. Gracias por la educación que me brindaron, por su apoyo constante en cada etapa de mis estudios y por sus consejos, que me guiaron y sostuvieron a lo largo de este camino.

De manera especial, dedico este trabajo a mis tíos, Jorge y Pedro, por el apoyo permanente que me brindaron durante mi formación. Su interés, cercanía y consejos oportunos fueron un respaldo importante en los momentos de duda y esfuerzo.

Asimismo, dedico esta tesis a mis amigos, por las risas compartidas, por su compañía a lo largo de la carrera y por estar presentes tanto en los momentos de exigencia académica como en los de descanso, haciendo más llevadero este proceso.

De manera muy especial, dedico este trabajo a la memoria de Emilia, una gran compañera, amiga y una mujer extraordinaria. Su amistad dejó una huella profunda en mi vida y me enseñó el valor del diálogo auténtico, la sencillez y la importancia de ser genuino. Aunque su ausencia se siente, su recuerdo y su cariño continúan acompañándome.

Dedicatoria Fernando Torres

Con todo mi cariño, dedico este trabajo a mi familia y amistades, por convertirse en mi sostén en cada paso, gracias por creer en mí incluso cuando el camino se hizo difícil.

A mi mamá María Fernanda Zurita, por ser el principal pilar en mi vida, gracias acompañarme en todo este trayecto y estar para mí en cada momento que necesite, las noches, las charlas y sobre todo tu amor incondicional. Gracias por más que madre ser una amiga para mí y apreciar todo el sacrificio que has realizado por tenerme aquí con ustedes.

A mi papá Fernando Gabriel Torres, por ser un vivo ejemplo de sacrificio y amor, gracias por aconsejarme en base a tu experiencia y ayudar a formar al hombre que soy hoy en día. Gracias por tu paciencia y dedicación hacia tu familia.

A mis abuelitos, Fernando Torres, por ser un segundo padre para mí, gracias por enseñarme todo lo necesario para desempeñarme en la vida, y Alicia Ballen, por encaminarme a tener a la familia por delante, gracias por el constante apoyo que recibo de ti. Gracias por todo lo que bonito que han formado juntos y enseñarme a ser un buen ser humano.

A mi hermanito, Ismael Torres, por ser aquel que ha devuelto la chispa de alegría a nuestra familia, espero verte crecer para ver la clase de persona en que te convertirás, que estaré ahí para ti e instruirte en como desempeñarte en la vida.

A mis grupo de amigos Dawns, gracias por todas las cálidas risas, salidas y consejos que he recibido de parte suya, créanme que los he llegado a considerar una segunda familia.

Para mis demás familiares, amigos que conocí en línea, compañeros de pasantías, amigos de la universidad, los que no se encuentran físicamente conmigo y una persona muy especial que día a día me motiva a ser mejor. Los llevo y considero en mi corazón por todo lo que me han enseñado, gracias por darse un tiempo en su vida y poder compartirlo conmigo.

Agradecimientos Nathael Cueva

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología por el respaldo institucional y los recursos brindados para el desarrollo de este trabajo de titulación. Valoro el acompañamiento académico recibido a lo largo de mi formación profesional, así como los espacios de aprendizaje que la universidad promueve para fortalecer la disciplina, el pensamiento crítico y el rigor científico, elementos fundamentales para culminar esta etapa con responsabilidad y compromiso.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutora, PhD. Eliana Rocío Nope Vargas, por su acompañamiento constante durante todo el proceso de investigación. Su orientación en la organización del documento y en la toma de decisiones clave permitió estructurar adecuadamente el trabajo, fortalecer su enfoque y mantener un avance sostenido. Destaco su exigencia académica, claridad profesional y cercanía humana, cualidades que hicieron de su guía un apoyo integral, especialmente en los momentos más complejos del desarrollo del proyecto.

A mi cotutor, PhD. Carlos Antonio Riera Ruiz, agradezco su apoyo durante la etapa bioinformática del estudio. Reconozco su paciencia, disposición para compartir conocimientos y acompañamiento profesional ante cada ajuste metodológico. Su compromiso con el proyecto se mantuvo incluso después de su salida de la institución, lo cual valoro como una muestra de ética y vocación académica.

Finalmente, agradezco a mi compañero de tesis, Fernando Ariel Torres Zurita, por su constancia, responsabilidad y trabajo colaborativo. Su aporte en la organización de tareas, el intercambio de ideas y el cumplimiento de los avances fue clave para alcanzar el nivel de dedicación con el que se presenta este trabajo.

Agradecimientos Fernando Torres

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología por brindarme el respaldo institucional y las herramientas necesarias para desarrollar este trabajo de titulación. Valoro el acompañamiento académico recibido a lo largo de mi formación y los espacios que la universidad ofrece para crecer con disciplina, criterio científico y sentido humano, lo que hizo posible culminar esta etapa con responsabilidad.

A mi tutora, PhD. Eliana Rocío Nope Vargas, por estar presente en cada momento del proceso, orientándome en la organización del documento y en decisiones clave que permitieron ordenar ideas, fortalecer el enfoque y sostener el avance del trabajo. Agradezco su exigencia y claridad profesional, así como su cercanía y preocupación genuina; además de guía académica, fue un apoyo constante con la calidez de una amiga, especialmente cuando más lo necesitaba.

A mi cotutor, PhD. Carlos Antonio Riera Ruiz, por su apoyo en la etapa bioinformática del proyecto. Agradezco la paciencia con la que me instruyó, su disposición para compartir conocimientos y la forma profesional con la que acompañó cada duda y ajuste metodológico. Incluso cuando le correspondió separarse de la UPS, mantuvo su compromiso y continuó brindando apoyo, lo cual valoro como muestra de ética y vocación.

A mi compañero de tesis, Nathael Mauricio Cueva Ortiz, por su constancia, compromiso y trabajo en equipo durante todo el proceso. Gracias por organizar tareas, compartir ideas, sostener el ritmo de avances y afrontar conmigo los retos de esta etapa. Sin su colaboración y responsabilidad, este proyecto no se presentaría con el nivel de dedicación alcanzado.

Resumen

El desarrollo de alternativas sostenibles para reducir la dependencia de plásticos de origen petroquímico y mitigar la contaminación ambiental ha incrementado el interés por los polihidroxicanoatos (PHA), biopolímeros con capacidad de biodegradación en condiciones naturales y en tiempos relativamente cortos. En este trabajo se presenta una revisión sistemática que integra evidencia sobre rutas metabólicas y secuencias génicas vinculadas a la biosíntesis de PHA en bacterias tropicales del género *Ralstonia spp.*, con énfasis en su proyección para optimización biotecnológica. La búsqueda y selección se efectuó siguiendo PRISMA 2020, mediante la consulta de Scopus, PubMed, ScienceDirect y MDPI, priorizando estudios recientes entre los últimos (2020-2026) y criterios de elegibilidad reproducibles. El análisis bibliométrico evidenció una concentración marcada de investigaciones en torno a *Cupriavidus necator* como organismo modelo, mientras que los reportes enfocados en *Ralstonia* tropical permanecen limitados y dispersos. No obstante, la comparación de rutas resaltó el rol central del sistema PhaA–PhaB–PhaC y la relevancia de enzimas de movilización, y el análisis de homología mostró alta conservación de genes clave como phaA, phaB1, phaC1, phaZ1 y phaZ2, con coberturas e identidades consistentes frente a referencias de *C. necator* H16. Asimismo, los análisis filogenéticos basados en secuencias nucleotídicas y proteicas sugirieron relaciones evolutivas cercanas, compatibles con conservación funcional del sistema pha. En conjunto, la evidencia integrada posiciona a *Ralstonia spp.* tropical como candidata promisoriosa para estudios posteriores, incluyendo priorización de aislamientos, evaluación comparativa de desempeño y estrategias de optimización en el marco de la bioeconomía circular y la sostenibilidad ambiental.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, *Cupriavidus necator*, PHA, modelaje de proteínas, cepas locales.

Abstract

The development of sustainable alternatives to reduce dependence on petrochemical-based plastics and mitigate environmental pollution has increased interest in polyhydroxyalkanoates (PHAs), biopolymers capable of biodegradation under natural conditions within relatively short timeframes. This work presents a systematic review integrating evidence on metabolic pathways and gene sequences involved in PHA biosynthesis in tropical bacteria of the genus *Ralstonia spp.*, with emphasis on their potential for biotechnological optimization. The search and selection were conducted following PRISMA 2020 guidelines by consulting Scopus, PubMed, ScienceDirect, and MDPI, prioritizing recent studies within the last (2020-2026) and reproducible eligibility criteria. Bibliometric analysis revealed a marked concentration of research on *Cupriavidus necator* as the predominant model organism, whereas reports focused on tropical *Ralstonia* remain limited and fragmented. Nevertheless, pathway comparisons highlighted the central role of the PhaA–PhaB–PhaC system and the relevance of mobilization enzymes, and homology analysis showed high conservation of key genes such as phaA, phaB1, phaC1, phaZ1, and phaZ2, with consistent coverage and identity relative to *C. necator* H16 reference sequences. Likewise, phylogenetic analyses based on nucleotide and protein sequences suggested close evolutionary relationships, consistent with functional conservation of the pha system. Overall, the integrated evidence positions tropical *Ralstonia spp.* as a promising candidate for further studies, including the prioritization of isolates, comparative performance assessment, and optimization strategies within the framework for a circular bioeconomy and environmental sustainability.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator*, PHA, protein modeling, local strains.

Índice de contenido

Capítulo I	1
1. Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Justificación.....	7
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	8
1.5. Hipótesis.....	8
Capítulo II	9
2. Marco teórico	9
2.1. Problemática de la contaminación por plásticos derivados del petróleo y necesidad de alternativas	9
2.2. Polihidroxicanoatos (PHA): definición, clasificación y relevancia tecnológica	10
2.3. Importancia de <i>Ralstonia</i> spp. y linajes relacionados en la biosíntesis de PHA	11
2.4. Ruta metabólica y biosíntesis de PHA/PHB: papel de PhaA, PhaB, PhaC y PhaZ	12
2.4.1. Concepto de ruta metabólica aplicada a PHA	12
2.4.2. Biosíntesis “clásica” de PHB desde acetil-CoA (PhaA–PhaB–PhaC).....	12
2.4.3. PhaC (lo que se suele confundir como “PHC”): estructura, clases y mecanismo catalítico	13
2.4.4. PhaZ (lo que se suele confundir como “PHZ”): movilización intracelular y control del rendimiento	14
2.4.5. Rutas alternativas para PHA distintos a PHB: origen de monómeros MC-15	15
2.4.6. “Ruta metabólica eficiente” para PHA: determinantes metabólicos, regulación y estrategias de optimización	15
2.5. Bioinformática, software y análisis.....	16
Capítulo III	18

3. Metodología.....	18
3.1. Estructura metodológica PRISMA 2020.....	18
3.1.1. Definición del problema.....	18
3.1.2. Búsqueda sistemática.....	18
3.1.3. Filtros preliminares.....	19
3.1.4. Criterios por utilizar.....	19
3.1.5. Depuración de artículos.....	19
3.1.6. Análisis bibliométrico.....	20
3.1.7. Gestión de referencias.....	20
3.2. Procedimiento general del análisis bioinformático y comparativo.....	21
3.2.1. Búsqueda y comparación de secuencias.....	21
3.2.2. Alineamiento, anotación funcional, filogenia y análisis estructural.....	22
3.3. Creación del árbol filogenético.....	22
Capítulo IV.....	24
4. Resultados y discusiones.....	24
4.1. Selección de estudios.....	24
4.1.1. Revisión bibliométrica.....	27
4.1.2. Comparativa entre bacterias del género <i>Ralstonia</i> WT.....	29
4.1.3. Comparativa entre bacterias del género <i>Ralstonia</i> genéticamente modificadas.....	31
4.2. Conjunto de genomas analizados.....	33
4.2.1. Ensamblaje genómico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	33
4.2.2. Genes de referencia en <i>Cupriavidus necator</i> H16 y su función.....	34
4.2.3. Resultados de BLAST y alineamientos múltiples.....	35
4.2.4. Gen <i>phaA</i> β -ceto-tiolasa.....	36
4.2.5. Gen <i>phaB1</i> (Acetoacetyl-CoA reductasa).....	37
4.2.6. Gen <i>phaC1</i> (PHA sintasa clase I).....	38
4.2.7. Gen <i>phaZ1</i> (despolimeriza intracelular).....	38
4.2.8. Gen <i>phaZ2</i> (despolimeriza intracelular).....	39
4.2.9. Modelado estructural de proteínas del sistema de biosíntesis del PHA.....	40
4.2.10. Interpretación de los valores RMSD para <i>Pha</i>	40

4.2.11. Interpretación de los valores RMSD para Pha	41
4.2.12. Interpretación de los valores RMSD para PhaC.....	42
4.2.13. Interpretación del gen PhaZ y su comparación con PhaC.....	43
4.3. Árboles filogenéticos recreados	44
4.3.1. Árbol filogenético basado en ADN.....	45
4.3.2. Árbol filogenético basado en proteínas	47
4.3.3. Filogenia de secuencias nucleotídicas PHA para aproximación local vs WT.....	49
4.3.2. Filogenia de proteínas PHA para aproximación local vs WT	51
Capítulo V	53
5. Conclusiones y recomendaciones	53
5.1. Conclusiones	53
5.2. Recomendaciones.....	54
6. Referencias Bibliográficas	55

Abreviaturas

PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Poli(3-hidroxi butirato)
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>C. necator</i>	<i>Cupriavidus necator</i>
SCL	Polímero de cadena corta
MCL	Polímero de cadena media
LCL	Polímero de cadena larga

Simbología en tablas

p/p %	Porcentaje peso/peso de PHA en biomasa seca
g/L	Gramos de PHA por litro
WT	Wild Type, cepa sin modificar
GVL	γ -valerolactona
DCW	Peso seco de la célula
DCM	Masa celular seca
*	Valor calculado/estimado a partir de datos reportados
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
rpm	Revoluciones por minuto
DO	Oxígeno Disuelto

Índice de figuras

Figura 1. Un ciclo cerrado de producción de PHA a partir de materias primas residuales.....	3
Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la vía metabólica de la producción de PHB junto con su estructura química.	13
Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA 2020 establecido para revisiones sistemáticas de literaturas e inclusión de artículos	26
Figura 4. Red bibliométrica de coocurrencia de palabras clave (VOSviewer) del conjunto de artículos analizados.....	28
Figura 5. Alineamiento del modelo de la proteína phaA mediante el software PyMol y su diferencia catalítica.....	40
Figura 6. Alineamiento del modelo de la proteína phaB mediante el software PyMol y su diferencia catalítica... ..	41
Figura 7. Alineamiento del modelo de la proteína phaC mediante el software PyMol y su diferencia catalítica	42
Figura 8. Árbol filogenético en base al Maximun-Likelihood, aplicando un Bootstrap de 100, para el análisis de ADN a partir de la de las secuencias nucleótidas, creado con el software MEGA 12, usando al gen phaC1-CP00979, de Burkholderia dolosa como un outgroup root.	45
Figura 9. Árbol filogenético en base al Maximun-Likelihood, aplicando un Bootstrap de 100, para el análisis de poteinas a partir de las secuencias de aminoácidos, creado con el software MEGA 12, usando al gen phaC1-CP00979, de Burkholderia dolosa como un outgroup root.	47

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de microorganismos productores de PHA.....	4
Tabla 2. Estrategias novedosas para la producción de PHA	5
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión	19
Tabla 4. Términos y filtros de las búsquedas en las bases de datos seleccionadas	25
Tabla 5. Comparativa de rendimientos de PHA en bacterias del género <i>Ralstonia</i>	30
Tabla 6. Comparativa de rendimientos de PHA en bacterias del género <i>Ralstonia</i> modificadas genéticamente.	32
Tabla 7. Ensamblajes <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizados	34
Tabla 8. Genes de PHA en <i>C. necator</i> H16	35
Tabla 9. Resultados preliminares Blast por GI y Genes PHA.....	36
Tabla 10. Tabla de valores RMSD	40

Capítulo I

1. Antecedentes

1.1. Introducción

En el transcurso de las últimas décadas, se ha registrado un incremento sostenido en la producción de materiales sintéticos derivados del petróleo, los cuales han reemplazado progresivamente a materiales convencionales como la madera, el vidrio y diversas aleaciones metálicas. Este desplazamiento se atribuye principalmente a sus ventajas económicas y tecnológicas, entre las que se incluyen bajos costos de producción, elevada durabilidad, resistencia a la corrosión y alta escalabilidad industrial (Getino et al., 2024). Sin embargo, este crecimiento acelerado ha generado una creciente preocupación ambiental, dado que desde 2010 la producción mundial de plásticos ha aumentado de manera constante, pasando de aproximadamente 265 millones de toneladas a 367 millones de toneladas en 2020, lo que representa un incremento cercano al 40% (Acharjee et al., 2023). Se estima que para el año 2030 la producción global podría alcanzar valores cercanos a los 500 millones de toneladas, de las cuales únicamente alrededor del 7% es recuperado y reciclado. El resto se acumula como residuo en ecosistemas terrestres y marinos, donde se ha reportado una densidad aproximada de hasta 6 millones de fragmentos plásticos por kilómetro cuadrado (R. Kumar et al., 2024).

Esta problemática se vio significativamente agravada durante la pandemia de COVID-19, periodo en el cual la demanda de productos plásticos se incrementó de forma abrupta debido al uso masivo de equipos de protección personal. Se estima que, solo en 2020, alrededor de 1,56 billones de mascarillas fueron desechadas de manera inadecuada, contaminando océanos y otros ecosistemas naturales (Vicente et al., 2023). Frente a este escenario, surge una necesidad urgente de desarrollar alternativas sostenibles que permitan reducir la dependencia de los plásticos de origen petroquímico. En este contexto, los polihidroxicanoatos (PHA) han despertado un interés considerable como sustitutos potenciales, debido a su menor impacto

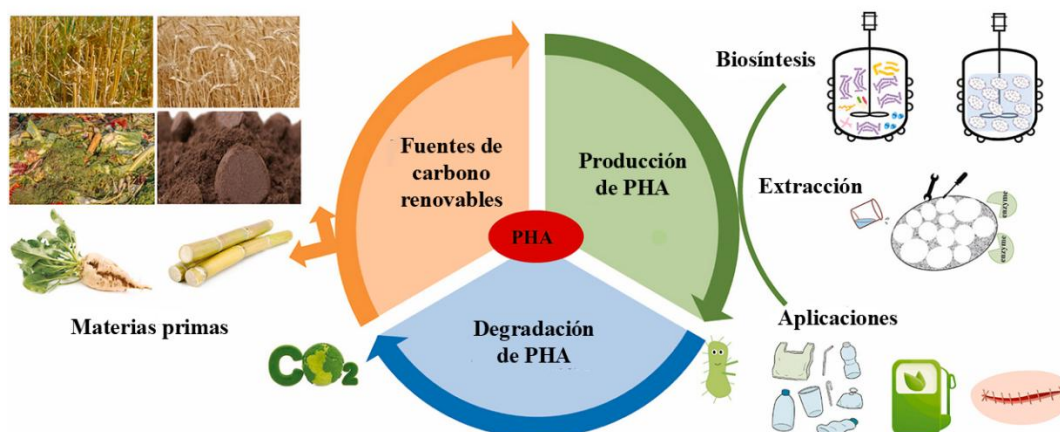
ambiental y a un conjunto de propiedades que los posicionan como competidores viables frente a los polímeros convencionales (Muigano et al., 2025).

Los PHA constituyen una familia de biopolíesteres intracelulares sintetizados por diversos microorganismos y han cobrado relevancia por su potencial para sustituir plásticos derivados del petróleo. Estos biopolímeros destacan por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y por presentar propiedades térmicas y mecánicas comparables a las del polipropileno (PP) y el polietileno (PE) (Trakunjae et al., 2022). Desde el punto de vista biológico, los PHA actúan como macromoléculas de almacenamiento de carbono y energía, cuya síntesis ocurre cuando los microorganismos son expuestos a condiciones de exceso de fuente carbonada y limitación de otros nutrientes esenciales, como nitrógeno, fósforo o componentes necesarios para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Zhila, Sapozhnikova, Kiselev, Vasiliev, Nemtsev, Shishatskaya, Volova, et al., 2021).

Entre los microorganismos productores de PHA, los procariotas principalmente las bacterias y, en menor medida, las arqueas han sido ampliamente estudiados. Estos organismos pueden utilizar una amplia variedad de sustratos ricos en carbono, tradicionalmente representados por polisacáridos como almidón o celulosa; otras especies bacterianas han demostrado la capacidad de metabolizar fuentes alternativas de carbono provenientes de residuos agroindustriales, los cuales son considerados como desechos (Zhou et al., 2023). Residuos generados por las industrias azucareras, agroalimentaria y láctea, bagazos de frutas y hortalizas, materiales lignocelulósicos, aceites usados, subproductos del biodiésel e incluso aguas residuales han sido evaluados como materias primas viables para la producción de PHA (González-Rojo et al., 2024). Este enfoque permite establecer un modelo de economía circular, en el cual los residuos son valorizados para la obtención de biopolímeros biodegradables que, al finalizar su ciclo de vida, pueden ser mineralizados en procesos naturales o biológicos,

liberando dióxido de carbono que puede ser reutilizado por sistemas vegetales, cerrando así el ciclo del carbono (Mahato et al., 2023), como se observa en la **Figura 1**.

Figura 1. Un ciclo cerrado de producción de PHA a partir de materias primas residuales (Zhou et al., 2023).



Nota: Elaborado por los autores, 2026

Dentro de los microorganismos productores de PHA, las bacterias han sido las más investigadas, consolidándose ciertos modelos biológicos para su estudio y aplicación industrial. Entre ellas, destacan *Ralstonia eutropha* también conocida como *Cupriavidus necator*, particularmente la cepa *C. necator* H16 (Morlino et al., 2023) siendo el microorganismo modelo para la producción de PHA. Bacterias del género de *Bacillus* (Bacha et al., 2023; Kankonkar & Khandeparker, 2022) y de *Pseudomonas* (Kacanski et al., 2023; Rebocho et al., 2020), cuentan con la capacidad para formar este biopolímero, las cuales han demostrado altos rendimientos y versatilidad metabólica bajo diferentes condiciones de cultivo. En la **Tabla 1** se resume algunos ejemplos de organismos productores de PHA, recopilando el tipo de sustrato utilizado, el porcentaje formado y el tipo de PHA que producen.

Tabla 1. Ejemplos de microorganismos productores de PHA

Microorganismo	Sustrato	Tipo de PHA	Contenido (%)	Rendimiento (g/L)	Referencia
<i>Bacillus</i> sp. CM27	Glucosa	PHB	37.69	0.53	(Kankonkar & Khandeparker, 2022)
<i>Vibrio alginolyticus</i> LHF01	Glicerol	P(3HB)	60.97	5.08 g/L	(Li et al., 2021)
<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	Residuos de alimento	PHBV	43–57	-	(Wang & Zhang, 2021)
<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504	Extracto de pulpa de manzana	mcl-PHA	30	1.20	(Rebocho et al., 2020)
<i>Pseudomonas citronellolis</i> DSMZ 50332	Ácido acético	mcl-PHA	24.89	3.79	(Kacanski et al., 2023)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain OM81	Glucosa	PHB	30.2	0.14	(Bacha et al., 2023)
<i>Alcaligenes faecalis</i> UMTKB-7	Glucosa	mcl-PHA	61.1	-	(Alsaadi et al., 2022)
<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	Bagazo de caña	PHB	28	0.30	(Hassan et al., 2025)
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> USMAHM13	Brea de glicerina	P(3HB-co-4HB)	34	4.45	(Amarajothi et al., 2025)

Nota: Elaborado por los autores, 2026

La literatura muestra bacterias consolidadas, que son elegidas entre las mejores cepas que se mencionan en sus artículos, excluyendo a bacterias del género *Ralstonia*. Gracias al impacto generado por la investigación y producción del PHA, han surgido alternativas novedosas para la producción del biopolímero, no solo el utilizar las bacterias por individual con sustratos considerados desechos, sino investigaciones pioneras en usos de combinación de microorganismos (Rodrigues et al., 2024; Sun et al., 2025), sustratos poco convencionales (Pillot et al., 2022; Sun et al., 2025), de los cuales en su mayoría, no se tiene mucha información acerca de sus rendimientos reales, pero es de importancia mencionarlos para entender la situación en la que se encuentra la producción de PHA.

Tabla 2. Estrategias novedosas para la producción de PHA

Microorganismo	Sustrato	Tipo de PHA	Contenido (%)	Rendimiento (g/L)	Referencia
<i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1	CO ₂ , electro síntesis en biocátodo	P(3HB)	-	0.0293	(Pillot et al., 2022)
<i>Pseudomonas putida</i> EM42	MC M9 Ácido levulínico (LA) + glucosa	P(3HV-co-4HV)	25	1.2	(Cha et al., 2020)
Comunidad microbiana mixta	Desechos de tomates	P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	66.8	-	(Rodrigues et al., 2024)
<i>Jeongeupia</i> USM3	sp. Gluconato de sodio	P(3HB)	24	-	(Zain et al., 2020)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Octanoato de sodio 15 mM	scl-PHA	44.90	0.30	(Manoli et al., 2023)
<i>Pseudomonas umsongensis</i> GO16	Ácido octanoico + ácido butírico	Mix de mcl-scl	51	-	(Cerrone et al., 2023)
Microbioma de cianobacterias	CO ₂	PHBV	10.7	-	(Sun et al., 2025)

Nota: Elaborado por los autores, 2026

El incremento sostenido en la producción de plásticos derivados del petróleo ha generado una problemática ambiental de escala global, impulsando la búsqueda de materiales alternativos que sean sostenibles, biodegradables y compatibles.

1.2. Planteamiento del problema

El incremento sostenido en la producción de plásticos derivados del petróleo ha generado una problemática ambiental de escala global, impulsando la búsqueda de materiales alternativos que sean sostenibles, biodegradables y compatibles con los principios de la economía circular. Los PHA han emergido como una de las alternativas más prometedoras debido a sus propiedades fisicoquímicas y su origen biológico. A pesar del creciente interés como principal uso en la creación de materiales biodegradables, su adopción a escala industrial continúa condicionada por factores como el costo de producción, el proceso de extracción del biopolímero y la disponibilidad de materias primas adecuadas.

No obstante, más allá de estas limitantes, la comprensión de los determinantes biológicos que regulan la biosíntesis del PHA ha sido poco estudiada. En la literatura científica, la evidencia disponible sobre estos procesos se encuentra dispersa y reportada bajo diversos

enfoques experimentales, que, si bien es algo alentador para la difusión de información, esto dificulta que exista una evaluación integrada del potencial competitivo de estos biopolímeros al no consolidar una metodología principal y optimizarla hasta lograr su mayor potencial.

Para bacterias del género *Ralstonia*, incluyendo aquellas reportadas bajo la denominación *Cupriavidus necator*, considerada por ser una denominación que los autores utilizan para referirse a la bacteria *Ralstonia eutropha*, la información relacionada con las rutas metabólicas implicadas, las proteínas involucradas y las secuencias génicas asociadas a la biosíntesis de PHA no se presenta de manera homogénea ni descrita para hacer modelos replicables. El enfoque de los estudios se centra en describir la cepa utilizada, el tipo de biopolímero producido y el rendimiento obtenido, sin integrar de forma sistemática la fórmula de producción que se ha empleado para su obtención. Esta situación se acentúa en el caso de cepas de origen tropical, cuyos reportes son aún más limitados y aislados.

Esta fragmentación del conocimiento dificulta el identificar, qué condiciones experimentales se asocian con mejores desempeños productivos y qué vacíos persisten en la caracterización del potencial biosintético de las bacterias tropicales del género *Ralstonia*. En consecuencia, el problema central de esta investigación radica en la ausencia de una comparativa estructurada que reúna la evidencia científica disponible los componentes génicos y proteicos involucrados en la biosíntesis de PHA en *Ralstonia* de origen tropical, lo cual limita la comprensión del estado actual del conocimiento y ver el potencial que pueden tener cepas promisoras con potencial de optimización biotecnológica, por lo tanto, esta revisión científica puede ayudar a futuras investigaciones.

1.3. Justificación

La presente revisión sistemática busca analizar las rutas metabólicas asociadas a la producción de PHA, así como, la funcionalidad de las proteínas involucradas en la biosíntesis de PHA en bacterias tropicales promisorias, con énfasis en el género *Ralstonia spp.*. Este interés surge en el contexto de una creciente preocupación por el impacto ambiental de los plásticos derivados del petróleo, problemática que ha impulsado a la búsqueda de biopolímeros biodegradables y sostenibles capaces de contribuir a la reducción de la contaminación y al desarrollo de alternativas más responsables.

La elección del tema se sustenta en la relevancia biotecnológica de los PHA como biopolímeros microbianos con potencial de aplicación en diversos sectores, así como la necesidad de comprender con mayor claridad los procesos biológicos que determinan su síntesis. En este sentido, el presente estudio recopila información científica sobre rutas metabólicas, proteínas y condiciones asociadas a la producción de PHA en *Ralstonia spp.* y bacterias tropicales, permitiendo identificar tendencias, enfoques metodológicos recurrentes y criterios de comparación utilizados en la literatura. Prefiriendo abordar las bacterias tropicales debido a su diversidad y adaptación a condiciones ambientales particulares, lo que puede reflejarse en características metabólicas de interés para estrategias de optimización biotecnológica.

Como aporte de novedad, esta investigación se orienta a reunir y sistematizar información específica sobre el género *Ralstonia* y su relación con la biosíntesis de PHA, integrando hallazgos que suelen encontrarse dispersos en distintos estudios científico. Para ello, la revisión sistemática se empleará como herramienta metodológica que permita identificar, seleccionar y sintetizar de manera rigurosa los trabajos disponibles, fortaleciendo la base científica para comprender el potencial de estas bacterias y apoyar el avance hacia una bioeconomía circular y sustentable mediante el uso responsable de recursos naturales.

1.4. Objetivos

1.4.1. *Objetivo general*

Revisar sistemáticamente las rutas metabólicas y las secuencias génicas involucradas en la biosíntesis de polihidroxicanoatos en bacterias del género *Ralstonia spp.* de origen tropical.

1.4.2. *Objetivos específicos*

1. Recopilar información científica de las rutas metabólicas de la biosíntesis de polihidroxicanoatos en bacterias del género *Ralstonia spp.* mediante la metodología de PRISMA 2020.
2. Analizar las secuencias génicas de la biosíntesis de polihidroxicanoatos evaluando su conservación, variabilidad estructural y posibles implicaciones en la eficiencia de síntesis del biopolímero mediante la plataforma biotecnológica NCBI.
3. Reconstruir un árbol filogenético con los resultados de la comparación metabólica en las bacterias del género *Ralstonia spp.* promisorias mediante el software MEGA 12

1.5. Hipótesis

Las bacterias tropicales del género *Ralstonia*, presentan una divergencia evolutiva que les da la capacidad para producir PHA.

Capítulo II

2. Marco teórico

2.1. Problemática de la contaminación por plásticos derivados del petróleo y necesidad de alternativas

La producción y el consumo de plásticos derivados del petróleo han crecido por su bajo costo, versatilidad y resistencia; sin embargo, esa misma durabilidad favorece su persistencia ambiental cuando el material se convierte en residuo. Como resultado, se acumula en ecosistemas terrestres y marinos, con impactos ecológicos y económicos que se expresan a nivel mundial (Ibrahim et al., 2025). Un indicador crítico de esta problemática es incremento anual hacia el océano: se ha reportado que aproximadamente 1.7 millones de toneladas de residuos plásticos ingresan cada año a ambientes marinos, lo que evidencia los problemas estructurales en prevención, recolección y disposición (Ibrahim et al., 2025).

La situación se agrava porque los macroplásticos se fragmentan en microplásticos, incrementando su dispersión e interacción con biota y contaminantes. Revisiones describen que la contaminación plástica implica efectos ecológicos y económicos, y que el problema se mantiene por la persistencia del material, pese a los esfuerzos tecnológicos y de gestión, una proporción limitada de residuos se recupera efectivamente, manteniéndose volúmenes importantes en vertederos o dispersos en el ambiente (Hadri et al., 2025).

En este contexto, los biopolímeros generados por microorganismos se consideran alternativas en aplicaciones específicas donde el impacto ambiental es frecuente. Entre ellos, los PHA destacan por su origen biológico y por la posibilidad de ajustar su composición según rutas metabólicas y genes involucrados en el proceso; por ello, el análisis de rutas y secuencias génicas asociadas a PHA en bacterias del género *Ralstonia* spp. constituye un enfoque

pertinente para sustentar el potencial biosintético desde evidencia molecular y metabólica (Getino et al., 2024).

2.2. Polihidroxicanoatos (PHA): definición, clasificación y relevancia tecnológica

Los PHA son poliésteres intracelulares que muchas bacterias sintetizan como reserva de carbono y energía, principalmente cuando existe exceso de carbono y limitación de nutrientes como nitrógeno o fósforo. En condiciones de desbalance, el microorganismo redirige parte del carbono disponible hacia la formación de gránulos de PHA, lo que permite sobrevivir a periodos de escasez y, en bioprocesos, facilita a inducir acumulación del polímero (Getino et al., 2024).

Dentro de la familia PHA, el PHB (poli(3-hidroxi butirato)) es el ejemplo más estudiado y suele emplearse como referencia para describir la ruta biosintética “principal” desde acetyl-CoA. No obstante, PHA no se limita a PHB: existen PHA de cadena corta (SCL) y de cadena media (MCL), además de copolímeros, lo que influye en propiedades mecánicas y térmicas. Esta diversidad depende en gran medida del origen metabólico de los monómeros CoA-activados y de la especificidad de la enzima polimerizante (PhaC), por lo que caracterizar genes y rutas es esencial para anticipar el tipo de polímero que puede producir una cepa (Getino et al., 2024; Zher Neoh et al., 2022).

Por ende, es necesario diferenciar polímeros de componentes biosintéticos: PHA/PHB son productos; en cambio, PhaC y PhaZ son proteínas codificadas por genes del sistema PHA que determinan, respectivamente, la síntesis y la degradación intracelular del polímero (Vital-Vilchis & Karunakaran, 2024). Esta distinción es clave porque el potencial productor se sustenta en la presencia y funcionalidad de estas proteínas, además de la disponibilidad metabólica de precursores y cofactores.

2.3. Importancia de *Ralstonia* spp. y linajes relacionados en la biosíntesis de PHA

El género *Ralstonia* incluye bacterias Gram negativas con una gran capacidad para sintetizar PHA, especialmente en condiciones de desequilibrio nutricional. El organismo modelo más utilizado en la investigación de PHA es *Cupriavidus necator* (anteriormente conocido como *Ralstonia eutropha*), que ha sido estudiado ampliamente debido a su capacidad para acumular grandes cantidades de PHA en forma de PHB bajo condiciones controladas. Estas bacterias tienen la capacidad de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono, lo que les permite producir PHA a partir de materiales renovables o incluso residuos industriales, lo que hace que su producción sea más sostenible y económicamente viable (Morlino et al., 2023).

La producción de PHA se ha desarrollado ampliamente en bacterias con alta capacidad de acumulación y versatilidad metabólica. En ese marco, linajes cercanos a *Ralstonia* spp. han sido centrales para comprender mecanismos de síntesis, regulación y estrategias de optimización. Revisiones recientes sobre plataformas modelo u organismos plataforma relacionadas con este grupo destacan la flexibilidad de sustratos, la elevada acumulación intracelular, el análisis metabólico y del modelamiento para guiar mejoras en producción (Morlino et al., 2023).

El rendimiento de PHA depende simultáneamente de la presencia, funcionalidad de genes PHA y de la capacidad del metabolismo central para suministrar precursores y poder reductor. Por ello, la evaluación del potencial productor requiere integrar secuencias génicas, rutas metabólicas asociadas y condiciones fisiológicas que favorezcan acumulación, más que limitarse a reportes aislados de producción (Getino et al., 2024; Morlino et al., 2023).

En el caso de cepas de origen tropical, la pertinencia científica aumenta al considerar que pueden existir presiones ambientales particulares (temperatura, disponibilidad de sustratos,

estrés osmótico o nutricional) que se reflejen en variación genética o metabólica. Por lo tanto, compara las rutas y secuencias de genes asociados a PHA en *Ralstonia spp.* tropicales permite identificar patrones de conservación o divergencia en componentes clave como phaC y phaZ, con implicaciones para productividad y estabilidad del biopolímero (Getino et al., 2024).

2.4. Ruta metabólica y biosíntesis de PHA/PHB: papel de PhaA, PhaB, PhaC y PhaZ

2.4.1. Concepto de ruta metabólica aplicada a PHA

Una ruta metabólica puede definirse como una secuencia organizada de reacciones enzimáticas en donde se transforma el sustrato en productos mediante intermediarios, conectando el metabolismo central con funciones específicas. En PHA, la ruta no se limita a un conjunto aislado de genes pha: depende de cómo el carbono ingresa al metabolismo (glucólisis, ciclo TCA, vías anapleróticas) y de cómo se generan precursores (acil-CoA) y cofactores un ejemplo de esto es NADPH necesarios para convertir intermediarios en monómeros polimerizables (Morlino et al., 2023). Así, la biosíntesis de PHA debe entenderse como una extensión del metabolismo de carbono, activada y regulada según la ruta metabólica empleada (Getino et al., 2024)

2.4.2. Biosíntesis “clásica” de PHB desde acetil-CoA (PhaA–PhaB–PhaC)

La biosíntesis de PHB (un PHA de cadena corta) suele describirse como la vía “principal” porque parte de un nodo central: acetil-CoA (Ilustración 2). En términos generales, el flujo comprende de al menos tres etapas principales:

1. Condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetyl-CoA (catalizada por PhaA, β -ceto-tiolasa).
2. Reducción de acetoacetyl-CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA (catalizada por PhaB, acetoacetyl-CoA reductasa), etapa que consume poder reductor (típicamente NADPH).

3. Polimerización de monómeros CoA-activados para formar el polímero (catalizada por PhaC, PHA sintasa) (Getino et al., 2024).

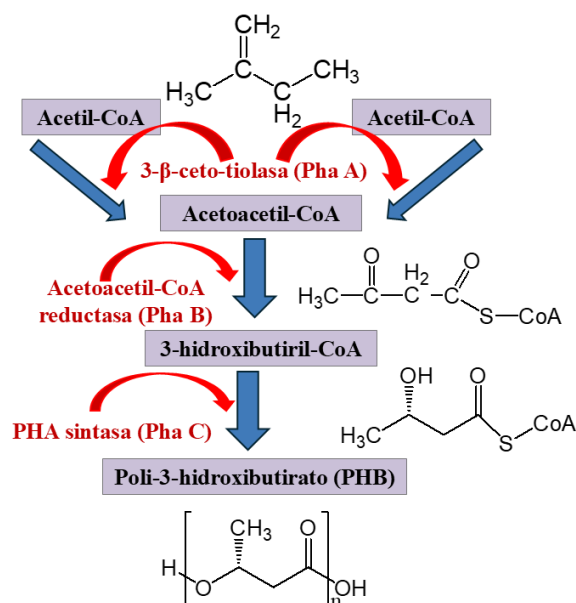


Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la vía metabólica de la producción de PHB junto con su estructura química (Acharjee et al., 2023). Modificado por los autores.

Nota: Modificado por los autores

La síntesis de PHB no depende únicamente de la presencia de los genes *phaA*, *phaB* y *phaC*, sino que requiere un contexto metabólico favorable que asegure un suministro adecuado de acetil-CoA y un equilibrio apropiado de cofactores reductores como el NADPH. Por ello, las rutas que generan NADPH se convierten en factores decisivos para maximizar la acumulación de este biopolímero, especialmente en condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de carbono, donde la célula canaliza su metabolismo para el almacenamiento de carbono en forma de PHB.

2.4.3. *PhaC* (lo que se suele confundir como “PHC”): estructura, clases y mecanismo catalítico

PhaC es la enzima clave porque realiza el paso irreversible que convierte monómeros activados (3-hidroxiacil-CoA) en una cadena polimérica. La evidencia estructural y de revisión

describe que PhaC presenta una arquitectura tipo hidrolasa α/β y que su sitio activo incluye una tríada catalítica conservada Cys–His–Asp (Chek et al., 2017), esencial para formar un intermediario acil-enzima y permitir la elongación de la cadena polimérica (Zher Neoh et al., 2022). Además, las PHA sintasas se clasifican en cuatro clases según composición subunitaria y especificidad: clases I y II (una sola subunidad PhaC), clase III (PhaC + PhaE) y clase IV (PhaC + PhaR). Esta clasificación se utiliza para inferir tendencias de producción (SCL vs MCL) y para comparar funcionalmente secuencias de phaC entre cepas, lo que es especialmente útil para relacionar la variación genética con potencial biosintético (Zher Neoh et al., 2022).

El PhaC no solo determina “si se produce PHA”, sino también qué tan amplia puede ser la gama de monómeros incorporados. Revisiones señalan que diferencias entre sintasas influyen en el rango de sustratos aceptados y en propiedades del polímero resultante, lo que demuestra la necesidad de analizar secuencias de phaC en *Ralstonia spp.* para interpretar capacidad potencial y variabilidad funcional (Zher Neoh et al., 2022).

2.4.4. PhaZ (lo que se suele confundir como “PHZ”): movilización intracelular y control del rendimiento

Desde la perspectiva de análisis génico, identificar phaZ y evaluar su localización con genes pha, presencia de variantes, motivos funcionales, modo que PhaZ corresponde a despolimerasas intracelulares que participan en la movilización del PHA almacenado, cuando el microorganismo requiere recuperar carbono y energía (Zhou et al., 2023). Estudios realizados por Eugenio y colaboradores, muestran que phaZ codifica despolimerasas localizadas en asociación a gránulos de PHA y que su actividad genera productos de hidrólisis (monómeros u oligómeros de 3-hidroxiácidos), facilitando su reutilización metabólica (Eugenio et al., 2007; Gao et al., 2001). Esta función es crucial para interpretar rendimiento: una cepa puede tener alta

capacidad biosintética, pero si la movilización se activa durante el proceso, el contenido final de polímero puede disminuir.

En el caso de rutas orientadas a PHB, una revisión específica sobre fermentación de *C. necator* (plataforma modelo) describe que la despolimerasa phaZ rompe enlaces del polímero y genera 3-hidroxiacetil-CoA, integrándose al metabolismo celular cuando cambian las condiciones (Zhang et al., 2022).

2.4.5. Rutas alternativas para PHA distintos a PHB: origen de monómeros MCL

Cuando se sintetizan PHA de cadena media (MCL) o copolímeros, los monómeros 3-hidroxiacetil-CoA suelen originarse de rutas como β -oxidación y/o síntesis de ácidos grasos, más que del flujo directo desde acetil-CoA hacia 3HB-CoA. En estos casos, la especificidad de PhaC es determinante para incorporar monómeros más largos, lo cual modifica propiedades del material y complejiza la interpretación metabólica (Elazzazy et al., 2024; Vital-Vilchis & Karunakaran, 2024).

2.4.6. “Ruta metabólica eficiente” para PHA: determinantes metabólicos, regulación y estrategias de optimización

En producción de PHA, la eficiencia se entiende como la capacidad de convertir carbono disponible en polímero con pérdidas mínimas durante el proceso, manteniendo estabilidad del almacenamiento y buen desempeño fisiológico. A nivel bioquímico, una ruta eficiente sostiene (i) un pool adecuado de monómeros CoA-activados, (ii) suficiente poder reductor (NADPH) para reacciones clave (como PhaB en PHB) y (iii) una polimerización efectiva mediada por PhaC (Getino et al., 2024; Morlino et al., 2023).

A nivel fisiológico, la eficiencia se vincula con el estado nutricional: la acumulación de PHA se favorece típicamente cuando existe exceso de carbono y limitación de nutrientes,

escenario en el cual la célula dirige flujos hacia almacenamiento. En organismos modelos asociados a este campo, se describe que el control de condiciones de cultivo por condiciones como, relación carbono y nitrógeno, la disponibilidad de oxígeno y la estrategia de alimentación modula el equilibrio entre crecimiento y acumulación, y puede influir en el grado de movilización posterior del polímero (Zhang et al., 2022).

En términos de ingeniería y optimización, revisiones recientes destacan que la mejora de producción en bacterias modelo se apoya en estrategias de ingeniería metabólica que ajustan flujos y reducen “fugas” hacia rutas competidoras, además de intervenir genes que influyen en acumulación y movilización. Un enfoque recurrente en la literatura es comprender y modelar la red metabólica para permitir identificar cuellos de botella y proponer intervenciones con mayor probabilidad de éxito (Morlino et al., 2023). Asimismo, revisiones enfocadas en estrategias metabólicas para incrementar PHB y copolímeros resaltan la relación entre flexibilidad de sustratos, acumulación intracelular y la expresión génica, lo que denota la necesidad de estudiar genes y rutas en linajes relacionados con *Ralstonia spp.* (Hectors et al., 2025).

En consecuencia, la “ruta eficiente” no se reduce a un único gen por lo que se interpreta como procesos continuos donde (i) PhaC determina la capacidad y selectividad de polimerización, (ii) el metabolismo central sostiene precursores y NADPH, y (iii) PhaZ y la regulación del gránulo condicionan la estabilidad del almacenamiento (De Eugenio et al., 2007; Getino et al., 2024).

2.5. Bioinformática, software y análisis.

La bioinformática integra métodos computacionales para analizar secuencias de ADN y proteínas con el fin de identificar genes, inferir función y establecer relaciones evolutivas, lo cual resulta esencial para estudiar la biosíntesis de PHA en *Ralstonia spp.* En este contexto, la

bioinformática permite detectar y comparar genes clave del sistema pha (por ejemplo, phaA, phaB, phaC y phaZ), evaluar su conservación y asociarlos con rutas metabólicas que suministran precursores y cofactores para la síntesis del biopolímero (Getino et al., 2024; Morlino et al., 2023).

Las secuencias se manejan habitualmente en formato FASTA, que estandariza el almacenamiento y el intercambio de datos, y constituye la entrada típica para herramientas de comparación (Pearson & Lipman, 1988). El primer paso para identificar genes candidatos suele ser el uso de BLAST, una herramienta de alineamiento local basada en similitud que compara una secuencia “consulta” contra bases de datos para recuperar homólogos; sus resultados se interpretan principalmente mediante E-value (probabilidad de coincidencia por azar), % identidad y cobertura (porción de la secuencia alineada) (Altschul et al., 1990). En genes funcionales como phaC (PHA sintasa), se considera importante exigir simultáneamente bajo E-value, alta cobertura y conservación de regiones clave, ya que coincidencias parciales pueden inducir anotaciones erróneas.

Posteriormente, se emplean alineamientos múltiples (MSA) para comparar varias secuencias del mismo gen, identificar regiones conservadas, detectar variación y preparar datos para análisis evolutivo. Un método clásico ampliamente citado es Clustal W, diseñado para mejorar la sensibilidad del alineamiento progresivo (Thompson et al., 1994). Con base en estos alineamientos, el análisis filogenético permite organizar secuencias en un marco evolutivo y respaldar comparaciones entre variantes de genes pha en *Ralstonia spp.*, usando programas como MEGA y enfoques de máxima verosimilitud, usualmente con evaluación de soporte (bootstrap) (S. Kumar et al., 2024; Stamatakis, 2014). En conjunto, estas herramientas permiten sostener con evidencia la relación entre secuencias génicas, rutas metabólicas y potencial biosintético de PHA en cepas de *Ralstonia spp.*

Capítulo III

3. Metodología

3.1. Estructura metodológica PRISMA 2020

Para la presente investigación se basará en las directrices establecidas en la metodología PRISMA 2020 (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) aquella que tiene como finalidad mejorar la claridad y transparencia en las revisiones sistemáticas, mediante rigurosos procesos de búsqueda y selección de información utilizando literatura científica fiable (Page et al., 2021).

3.1.1. Definición del problema

La tendencia en el uso de alternativas sostenibles a los derivados del petróleo es una realidad, en el cual los PHA están ganando terreno en el campo investigativo a nivel global, sin embargo, esta curva se ve limitada en regiones de Latinoamérica (Ascencio-Galván et al., 2024), más en específico en Ecuador, donde no se tiene un microorganismo plataforma o característico con la posibilidad producir este biopolímero con certeza. Esta revisión proporcionará información acerca de bacterias con posibilidad de producir PHA y ver qué condiciones permiten lograr dar los mejores rendimientos.

3.1.2. Búsqueda sistemática

El proceso de búsqueda de la literatura científica para la revisión sistemática se realizará mediante las bases de datos de Scopus, Pubmed, ScienceDirect, y MDPI, seleccionadas por el amplio alcance de información que contienen. La correcta combinación de los operadores booleanos permitirá obtener una cantidad importante de estudios encasillados a nuestra investigación, como base se utilizó la combinación de ((PHA) AND (Ralstonia) AND (biosynthesis) AND (genes)), el cual se ira adecuando para los distintos motores de búsqueda que las bases manejan.

3.1.3. Filtros preliminares

De los estudios recopilados se utilizarán filtros preliminares para ir segregando los artículos que se considerarán para la revisión, acotando los resultados de los estudios publicados desde enero del 2020 hasta la fecha de corte de enero de 2026. Aquellas investigaciones de libre acceso, sin restricciones ocasionadas por muros de pagos, que dificulten la obtención de la información, los artículos que se encuentren en el idioma de inglés y español, luego se seguirán con los criterios mencionados en la **Tabla 3**.

3.1.4. Criterios por utilizar

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Estudios que trabajen con bacterias del género <i>Ralstonia</i> o <i>Cupriavidus necator</i> .	No corresponde al género <i>Ralstonia</i> o <i>Cupriavidus necator</i> como un productor principal.
Estudios que aborden la biosíntesis de PHA y tengan clara su ruta metabólica.	Enfoque ligado a usos como material biomédico o aplicación directa.
Estudios originales con capacidad de reproducibilidad de resultados.	Información insuficiente para evaluar su relevancia e impacto.

Nota: Elaborado por los autores, 2026

3.1.5. Depuración de artículos

Para el proceso del cribado de artículos en base a títulos y resumen, se utilizará el software Rayyan.ai, que es una plataforma colaborativa de investigación impulsada por inteligencia artificial, que es utilizada para la selección y etiquetado de los artículos, permite acelerar el proceso de las revisiones sistemáticas y de literatura con herramientas inteligentes de cribado y gestión (González-Fernández et al., 2025). Con este software se podrá clasificar de mejor manera los artículos rescatados del primer filtro, permitiendo clasificar aquellos que coincidan con nuestros criterios de inclusión y exclusión, con la característica que permite eliminar artículos duplicados al comparar diferencias claves de manera manual, segregando y

registrando según su posterior utilidad, lo que permitirá mantener una mejor trazabilidad de la información.

3.1.6. Análisis bibliométrico

De los estudios extraídos de la filtración preliminar, serán utilizados para el análisis bibliométrico mediante el software VOSviewer, esta herramienta permite analizar patrones de coocurrencia entre las palabras claves, términos frecuentes y de relevancia agrupando los temas en clusters, complementando la revisión sistemática al identificar tendencias en los conceptos.

Una problemática común al consultar información de distintas bases de datos radica en que no se pueden analizar todos los documentos al mismo tiempo, al generar diferentes tipos de formatos de lectura (.Ris, .Bib, .CSV) que manejan los motores de búsqueda, limitando los artículos que se pueden trabajar y excluyendo posibles términos que no se encuentren en un mismo formato. Como solución ante esta problemática se empleará Zotero, un software de gestión de referencias de código abierto, que permite la gestión y unificación de artículos científicos (Morgan, 2024). Con este software se pueden agrupar todos los distintos formatos de almacenamiento de datos, exportando como un solo formato. .Ris exportable, el formato legible por el software VOSviewer, siendo la solución que permite ejecutar el análisis bibliométrico.

3.1.7. Gestión de referencias

Para la gestión general de las referencias que se consideraran para la revisión, se utilizará el software Mendeley, gestor principal para recolectar las citas de los artículos ya leídos y emplearlos en la revisión, ajustando al formato de citación actual APA 7ma edición, minimizando errores por citación manual.

3.2. Procedimiento general del análisis bioinformático y comparativo

Con el fin de caracterizar y comparar los componentes asociados a la biosíntesis de PHA, se aplicará un flujo metodológico secuencial basado en recuperación de secuencias, evaluación de homología, alineamientos múltiples, anotación funcional estructural. Esta estructura permitirá integrar evidencia de bases de datos especializadas y herramientas computacionales para contrastar el organismo modelo *Cupriavidus necator* con bacterias tropicales del género *Ralstonia spp.*, garantizando criterios de selección reproducibles y una interpretación biológica coherente.

3.2.1. Búsqueda y comparación de secuencias

Las herramientas bioinformáticas conformarán la base para el análisis de secuencias génicas y proteicas asociadas a la biosíntesis de PHA, con énfasis en enzimas clave del sistema PhaA, PhaB y PhaC. Para ello, se realizará la recuperación de secuencias desde bases de datos especializadas como NCBI, UniProt y KEGG y se establecerá como microorganismo de referencia a *Cupriavidus necator*, dado su amplio respaldo como productor de PHA y la disponibilidad de información sobre ruta metabólica y componentes enzimáticos. Las búsquedas de homología se depurarán priorizando alineamientos con el uso de BLAST verificando que se incluyan consultas de alta cobertura “Query cover” y alto porcentaje de identidad “%ID”, ya que estos parámetros reflejan una correspondencia amplia del segmento comparado y una mayor similitud a nivel de secuencia, lo cual aumenta la confianza en la equivalencia funcional. Adicionalmente, se considerará el E-value cercano a cero como criterio de significancia estadística del alineamiento, debido a que indica una baja probabilidad de coincidencias por azar.

3.2.2. Alineamiento, anotación funcional, filogenia y análisis estructural.

Posteriormente, las secuencias seleccionadas serán sometidas a alineamientos múltiples y control de consistencia mediante herramientas como MEGA 12 y plataformas especializadas como T-Coffee, con el fin de evaluar conservación, variaciones y regiones informativas. Para apoyar la caracterización funcional, se emplearán recursos de anotación y mapeo metabólico con KEGG que permitan contextualizar las secuencias dentro de rutas asociadas a síntesis y movilización del biopolímero. En paralelo, el análisis estructural se respaldará en la consulta de estructuras disponibles en RCSB-PDB y, cuando corresponda, en modelado por homología utilizando SWISS-MODEL, con visualización y exploración de características estructurales mediante PyMOL. Este flujo permitirá integrar evidencia de secuencia, contexto metabólico, relación evolutiva y estructura para comparar el organismo modelo con bacterias tropicales del género *Ralstonia* spp.

3.3. Creación del árbol filogenético

Los genomas de *Ralstonia* spp., serán minados usando como query las secuencias de los genes involucrados en la biosíntesis de PHA en el repertorio de enzimas involucradas en la biosíntesis del PHA *Cupriavidus necator*, con la finalidad de encontrar homólogos de genes involucrados en la síntesis de PHA en cepas de *Ralstonia* spp., mediante el programa BLASTp, se realizará el análisis filogenético comenzando por alineación de las secuencias con el programa MAFFT, para detectar aquellas regiones conservadas o variaciones en residuos aminoacídicos. Para agregar relevancia a la investigación se examinará los dominios, motivos funcionales y estructurales con el programa InterPro. Para la construcción del árbol filogenético se utilizará la web PhyML la cual ayudará a inferir posibles relaciones filogenéticas entre las bacterias.

Con las secuencias ya obtenidas y descargadas en el formato FASTA, se deberá asegurar que exista una correspondencia entre sus respectivas proteínas. A partir de aquí se podrá ejecutar el análisis filogenético, iniciando por ver si las secuencias rescatadas se evidencian en las bacterias tropicales mediante el programa BLASTp. Una vez confirmado que las proteínas existen dentro de su genoma, se alineará las secuencias con el programa MAFFT, para detectar aquellas regiones conservadas o variaciones en residuos aminoacídicos. Para agregar relevancia a la investigación se examinará los dominios motivos funcionales y estructurales con el programa InterPro. Para la construcción del árbol filogenético se utilizará tentativamente el software MEGA12, los cuales ayudarán a inferir posibles relaciones filogenéticas entre las bacterias (Höhler et al., 2022) esto agilizará la comprensión entre las divergencias evolutivas y observar la capacidad biosintética de las bacterias promisorias tropicales, así como comprender su divergencia evolutiva y la capacidad biosintética de cada una.

Capítulo IV

4. Resultados y discusiones

4.1. Selección de estudios

Los estudios incluidos en esta investigación se seleccionaron a partir de literatura científica relacionada con las rutas metabólicas y secuencias génicas involucradas en la biosíntesis de PHA en bacterias del género *Ralstonia spp.* de origen tropical. Para asegurar un proceso reproducible y transparente, la revisión sistemática se desarrolló siguiendo las directrices de PRISMA 2020.

La búsqueda se realizó en las bases de datos Scopus, PubMed, ScienceDirect y MDPI, complementando con una exploración adicional en Google Scholar y trabajos de titulación nacionales para identificar posibles registros relevantes no indexados en las anteriores. Se consideraron publicaciones desde enero de 2020 hasta la fecha de corte establecida (enero de 2026). Para la recuperación de estudios se empleó una estrategia con operadores booleanos centrada en los términos “polyhydroxyalkanoate-PHA”, “*Ralstonia-Cupriavidus necator-Ralstonia eutropha*” y componentes vinculados a biosíntesis, rutas metabólicas, genes y enzimas del sistema PHA (p. ej., phaA, phaB, phaC, phaZ), la cual fue adaptada según los criterios que delimitan cada motor de búsqueda.

Tabla 4. Términos y filtros de las búsquedas en las bases de datos seleccionadas

Base de dato	Combinaciones utilizadas	Filtros utilizados	Cantidad de resultados
Scopus	(polyhydroxyalkanoate OR PHA) AND (Ralstonia OR "Cupriavidus necator" OR "Ralstonia eutropha") AND (biosynthesis OR pathway OR "metabolic pathway" OR "metabolic engineering" OR gene OR protein OR enzyme) AND (phaA OR phaB OR phaC OR phaP OR PhaR OR phaZ OR synthase OR depolymerase)	Español, Inglés	3,421
		2020-2026	1,461
PubMed	(polyhydroxyalkanoate OR PHA) AND (Ralstonia OR "Cupriavidus necator" OR "Ralstonia eutropha") AND (biosynthesis OR pathway OR "metabolic pathway" OR "metabolic engineering" OR gene OR protein OR enzyme) AND (phaA OR phaB OR phaC OR phaP OR PHAR OR phaZ OR synthase OR depolymerase)	Español, Inglés	279
		2020-2026	51
ScienceDirect	polyhydroxyalkanoate AND (Ralstonia OR "Cupriavidus necator" OR "Ralstonia eutropha") AND (biosynthesis OR "metabolic pathway" OR gene) AND (phaC OR phaZ)	Español, Inglés	730
		2020-2026	419
MDPI	(polyhydroxyalkanoate OR PHA) AND (Ralstonia OR "Cupriavidus necator") AND (biosynthesis OR metabolic pathway OR gene)	Español, Inglés	89
		2020-2026	73

Nota: Elaborado por los autores, 2026

En la fase inicial se obtuvieron 4.519 registros en total, correspondientes 3.421 en Scopus, 279 en PubMed, 730 en ScienceDirect y 89 en MDPI. Posteriormente, al aplicar el filtro preliminar sin cribar, de enero del 2020 hasta enero del 2026 se redujo el conjunto a 2,004 registros, correspondientes 1.461 en Scopus, 51 en PubMed, 419 en ScienceDirect y 73 en MDPI.

A partir de la aplicación inicial de filtros, fechas de corte, archivos sin acceso completo, se procedió con el cribado conforme a PRISMA 2020, como se ve en la **Figura 3**.

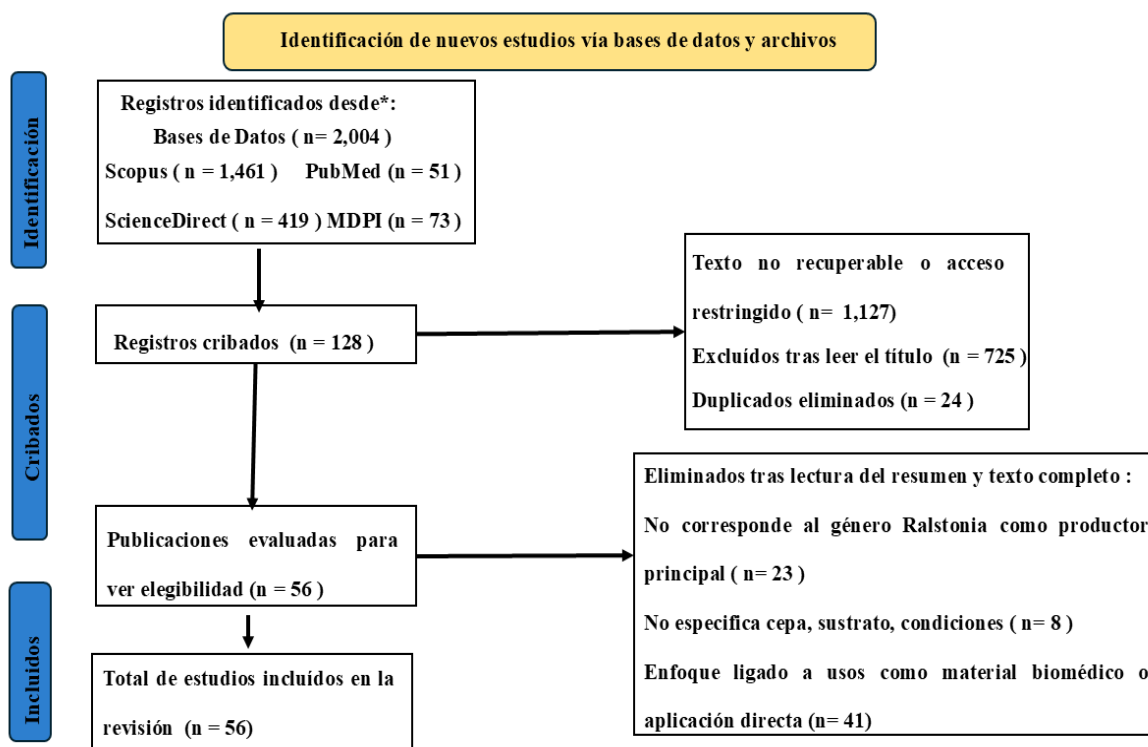


Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA 2020 establecido para revisiones sistemáticas de literaturas e inclusión de artículos. Modificado de (Page et al., 2021).

Nota: Elaborado por los autores, 2026

Se obtuvo una revisión con artículos altamente selectivos, si bien la temática principal se encuentra en los términos de “PHA” y “*Ralstonia*”, esta información se encuentra, en su mayoría dispersada, no siguiendo un orden para ser integrada, no todas las investigaciones coincidieron con los criterios preliminares de búsqueda, teniendo una pérdida grande de artículos por no tener el libre acceso que se pedía, eliminando 1,127 artículos. Se traslado los artículos filtrados al software Rayyan.ai, con el cual se agilizó la lectura de títulos y permitió segreggar documentos con mayor facilidad al clasificarlos con etiquetas y asignarle un posterior uso en las investigación, eliminando 725 artículos. El software de Rayyan.ai tiene incorporado una función para gestionar los archivos duplicados, comparando entre la información de las bases de datos obtenido, para elegir el de mejor característica, eliminando 24 artículos.

Se inició el proceso del cribado con 128 artículos de base, para leer su resumen y texto completo, acción que se facilitó gracias a la función de asignar etiquetas y filtros que tiene el software de Rayyan.ai, para esto se aplicaron 3 criterios de exclusión principales siendo aquellos que no correspondan al género *Ralstonia* como productor principal, se eliminaron 23 artículos; que no incluyan las condiciones para replicarlo, concentraciones de sustrato o cepa general utilizada, se eliminaron 8 artículos; el criterio de mayor peso fue que se excluyan artículos donde la temática principal no sea la producción de PHA, sino que este más ligada a las revisiones en el ámbito biomédico como material sustitutorio en ese campo, por no ser el foco de la revisión, en el que eliminaron 41 artículos. Teniendo 56 artículos listos para la elegibilidad que posteriormente se utilizaron en la propia revisión.

4.1.1. Revisión bibliométrica

Se realizó el análisis del mapa de términos generado por el software VOSviewer, se evaluaron los 807 artículos obtenidos de la filtración preliminar, con ejecución de los operadores booleanos especificados en la **Tabla 4.**, cortes en las fechas y los que no se tiene acceso público, de las bases de datos de Scopus, PubMed, ScienceDirect y MDPI, la unificación de los formatos por individual se logró con el software de Zotero. Para los resultados visualizados en el mapa se incluyeron las coocurrencia encontradas en los campos de títulos y resúmenes, no ignorando etiquetas de resumen estructurado, se aplicó un conteo completo entre las ocurrencias de cada documento, con un mínimo de “28” ocurrencias para ser permitida, dejando a 217 de 18332 términos que cumplieron con el umbral. Se eliminó algunos términos relacionados a bacterias ajenas a *Ralstonia eutropha* y *Cupriavidus Necator*, como fue el caso de “*E. coli*”, “*Escherichia coli*”, “*Bacillus*”, términos o abreviaciones de pesajes y palabras sin relación como “*vv w*”, “*inf*”, “*g l*”, “*kda*”, y finalmente se excluyeron palabras relacionadas a estudios que solo ocasionaban ruido entre los nodos como “revisión”, “artículo”, “estudio”. Se

4.1.2. Comparativa entre bacterias del género *Ralstonia* WT

De los estudios evaluados de cepas del complejo *Cupriavidus necator* / *Ralstonia eutropha* no modificadas genéticamente, de acuerdo con la **Tabla 5**, se reportaron las cepas utilizadas, el tipo de sustrato empleado, la metodología con las condiciones y parámetros utilizados en los estudios, el contenido intracelular de PHA y la concentración final, como final se colocó el tipo de polímero y/o copolímero sintetizado.

Tabla 5. Comparativa de rendimientos de PHA en bacterias del género *Ralstonia*.

Microorganismo	ID de cepa	Sustrato	Metodología	Contenido (p/p %)	Rendimiento (g/L)	Tipo de PHA	Referencia
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	VKP M B-10646	Fructosa o butirato de sodio + GVL	Cultivo batch en medio mineral de Schlegel; acumulación por limitación de nutrientes y exceso de C. Dosificación del sustrato a las 24, 48 y 72 h, manteniendo 1.5–2.0 g/L por realimentación.	80 ± 2%	*6.6	P (3HB-co-3HV-co-4HV)	(Zhila et al., 2022)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	IBP/S FU-1	Aceite de palma	Batch en matraz 0.5 L, medio mineral de Schlegel; agitación 200 rpm, 30 °C; cultivo reportado a 72 h para comparar sustratos; cuantificación por DCW y PHA.	80%	6.6	P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	(Zhila et al., 2021)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	USM AHM13	Glicerina + 1,4-butanodiol	Medio en MSM, 30 °C, 200 rpm, 72 h; combinación de fuentes de C como cosustrato para inducir incorporación de 4HB.	49 ± 1%	2.93 ± 0.12	P(3HB-co-4HB)	(Zhila et al., 2021)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	H 16 DSM 428	Aceite vegetal	Biorreactor batch de 5 L; medio mineral; 30 °C, pH 7.0, 1 vvm, agitación 600 rpm; acumulación por limitación de N con exceso de carbono lipídico; tiempo total 72 h; cuantificación por DCW.	72–76 %	7.2	PHB	(Oh et al., 2024)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	USM AA2-4	Ácido oleico + (NH ₄) ₂ SO ₄	Matraz con medio MSM; optimizado con C/N 30, K ₂ HPO ₄ 6.1 g/L, 32 °C, a 200 rpm por 66 h.	60.8%	7.6	P(3HB)	(Zhila et al., 2021)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	VKP M B-10646	Ácidos grasos saturados	Cultivo batch en medio mineral de Schlegel, NH ₄ Cl 0.7 g/L como limitante de N tras 25–35 h, se usó aerobiosis, 30 °C, matraces 0.5 L; seguimiento cada 24 h; tiempo total 72 h.	79%	7	P(3HB)	(Zhila et al., 2022)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	VKP M B-10646	Aceite de pescado residual	Cultivo batch en matraz 0.5 L, medio mineral Schlegel. Proceso en dos etapas: 25–35 h con NH ₄ Cl 0.5 g/L y luego sin N hasta completar 72 h.	72%	3.3	P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	(Zhila et al., 2023)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	H16 WT	Aguas residuales agroindustriales fermentadas (VFAs)	Biorreactor de 2L; medio SM; 30 °C, 1 vvm, DO 20%; pH controlado. Optimización por fed-batch alimentación 8–32 h y control para evitar acumulación/de VFAs.	85%	16	P(3HB)	(Hernández-Herreros et al., 2025)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	A-04	Extracto crudo acuoso de piña	Cultivo en matraz 500 mL con 100 mL, 30 °C, 200 rpm, hasta 96 h, sin detoxificación con suplemento mineral	60%	7.8	P(3HB-co-4HB)	(Sukruansuan & Napathorn, 2018)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	BM3-1	Fructosa + aceite vegetal	Fed-batch en fermentador 5 L (2 L trabajo): pH 6.5, 30 °C; N: urea 0.2%. A las 18 h alimentan aceite (6.9 g/L) y detienen al suministrar 300 g de aceite. Cosecha ~115 h.	76%	11.1	P(3HB)	(Shin et al., 2024)

Nota: Elaborado por los autores, 2026

La relación entre la capacidad de acumulación y la producción volumétrica, son factores que se encuentran relacionados con el sustrato inicial que se utilice, viendo como con el tipo de sustrato convencional de azúcares; usando fructosa junto al precursor γ -valerolactona, producen 82% con rendimiento de 6.6 g/L (Zhila et al., 2022); usando extracto crudo acuoso de piña, producen 60% con rendimiento de 7.7 g/L (Sukruansuwan & Napathorn, 2018); por parte de los sustratos lipídicos; usando aceite de palma, producen 80% con rendimiento de 6.6 g/L (Zhila et al., 2021); usando ácidos grasos saturados, producen 76% con rendimiento de 11.1 g/L (Zhila et al., 2022); tiende a favorecer a una producción y acumulación estables con porcentajes altos en relación acumulación-rendimiento; los sustratos alternativos obtenidos de residuos agroindustriales como el aceite de pescado residual, producen 72% con rendimiento de 3.3 g/L (Zhila et al., 2023); de aguas residuales se obtiene VFAs, producen 85% con rendimiento de 16 g/L (Hernández-Herreros et al., 2025); tienen altos porcentajes en acumulación pero variables en cuanto a rendimiento. A rasgos breves se ve que los sustratos convencionales son tienen menor sesgo de variabilidad, algo relevante en escalados y producción industrial, pero los residuos al ser de menor costo operativo carecen de una estabilidad que los vuelve relevantes por su potencial de valorización económica y sostenibilidad ambiental.

4.1.3. Comparativa entre bacterias del género *Ralstonia* genéticamente modificadas

De los estudios evaluados de cepas del complejo *Cupriavidus necator* / *Ralstonia eutropha* que han recibido un tipo de mejora genética, en la supresión o sobreexpresión de un gen, de acuerdo con la **Tabla 6**, se reportaron las cepas utilizadas, el tipo de sustrato empleado, la metodología con las condiciones y parámetros utilizados en los estudios, el contenido intracelular de PHA y la concentración final, como final se colocó el tipo de polímero y/o copolímero sintetizado.

Tabla 6. Comparativa de rendimientos de PHA en bacterias del género *Ralstonia* modificadas genéticamente.

Microorganismo	ID de cepa	Sustrato	Metodología	Contenido (p/p %)	Rendimiento (g/L)	Tipo de PHA	Referencia
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	H16 DSM 428	Fructosa	Cultivo batch en medio mineral; sobreexpresión de phaP y genes reguladores (phaR/phaQ), induciendo mayor formación de gránulos de PHB. Acumulación bajo exceso de carbono y limitación de nutrientes; análisis de biomasa y PHB tras 72 h.	89.1 ± 1.8%	* 7.3	PHB	(Tang et al., 2022)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	DSM 428 MF01 ΔB1/p BBP- ccr _{MeJ} 4a- emd	mezcla gaseosa H ₂ /O ₂ /C O ₂	Cultivo autotrófico en matraz con medio mineral; sulfato de amonio = 1.0 g/L; intercambio gaseoso cada 12 h; muestreo a 120 h; se reporta DCM y PHA.	64.6 ± 8.1%	* 7.3	PHBHHx	(Tanaka et al., 2021)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	Re213 3/pCB 81	Aceite de tung	Biorreactor batch de 400 mL con medio optimizado; 30 °C, pH 6.8 ± 0.1, aire 5 vvm, 400 rpm, 96 h; cuantificación por DCW y PHA	20.4%	1.09	P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	(Lee et al., 2021)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	1F2	Fructosa	Cultivo heterótrofo en matraz de 500 mL con 100 mL medio MS, 30 °C, 130 rpm, 72 h; mantenimiento de plásmidos con antibióticos. Expresan phaC de <i>A. caviae</i> mutante (phaC_Ac_NSDG) + sobreexpresión bktB y expresión heteróloga kivid (<i>L. lactis</i>) + padA (<i>E. coli</i>).	55.9 ± 1.8%	0.9 ± 0.1	P(3HB-co-3HV-co-3H4MV)	(Wang et al., 2024)
<i>C. necator</i> / <i>R. eutropha</i>	DSM 545	Aceite de café	Biorreactor batch de 3 L, 72 h, T 30 ± 2 °C, pH 7.0 ± 0.1; aire 1.0 vvm; DO > 30% ajustando agitación 600–800 rpm.	89.6 ± 2.6%	8.0 ± 0.3	P(3HB-co-3HV)	(Ingram & Winterburn, 2021)

Nota: Elaborado por los autores, 2026

La relación entre la capacidad de acumulación y la producción volumétrica, son factores que se encuentran relacionados con el sustrato inicial que se utilice, así como con las cepas de *Ralstonia* que no han recibido mejoras, se puede observar cómo con sustratos convencionales, usando fructosa, producen 90.9% con rendimiento de 7.3 g/L (Tang et al., 2022); y con aceite de café producen 92.2% con rendimiento de 8.03 g/L (Ingram & Winterburn, 2021); obtienen una proporción de producción y acumulación mucho mayor, viendo como el uso de estrategias de modificación genética y el modo metabólico utilizado, eleva los contenidos de PHA

producidos. Al ser cepas modificadas, se trabajan con la idea de usar sustratos más comunes, usando aceite de tung, producen 20.4% con rendimiento de 1.09 g/L (Lee et al., 2021); valor demasiado bajo, demostrando que sustratos como azúcares y lípidos tienden a una mayor acumulación y diversidad estructural de PHAs.

4.2. Conjunto de genomas analizados

Este capítulo presenta de manera integrada los resultados derivados de la minería genómica, las búsquedas de homología mediante BLAST, los alineamientos múltiples realizados con MAFFT y los análisis filogenéticos construidos con PhyML, tomando como marco de referencia el conjunto de genes asociados a PHA descrito en *Cupriavidus necator* H16 (AM260479.1). La discusión de los resultados se estructura en apartados temáticos, de modo que cada análisis se vincula con su interpretación biológica y con su importancia en el contexto de la biosíntesis de PHA en linajes tropicales de *Ralstonia spp.*

4.2.1. Ensamblaje genómico de *Ralstonia solanacearum*

Se analizaron siete ensamblajes genómicos correspondientes a *Ralstonia solanacearum* provenientes de Ecuador, los cuales fueron seleccionados bajo criterios estrictos de trazabilidad genómica, considerando tanto los identificadores GI como los códigos de ensamblaje (Assembly). Esta estrategia permitió garantizar la consistencia entre las secuencias analizadas y su origen, así como la reproducibilidad de los análisis posteriores.

Todos los ensamblajes evaluados presentaron resultados positivos en las búsquedas de homología mediante BLAST frente a genes asociados al sistema de biosíntesis de polihidroxialcanoatos (PHA), lo que sugiere que estos genomas conservan, en mayor o menor medida, componentes clave de esta ruta metabólica. No se registraron ensamblajes sin coincidencias significativas, lo que indica una distribución relativamente homogénea del sistema PHA dentro del conjunto de genomas analizados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Ensamblajes *Ralstonia solanacearum* utilizados

Assembly	GI	Estado de BLAST
ASM3969333v1	2734481747	Resultados Obtenidos
ASM3969254v1	2734476896	Resultados Obtenidos
ASM4171472v1	2796658750	Resultados Obtenidos
ASM4171471v1	2796655393	Resultados Obtenidos
ASM4171470v1	2796650536	Resultados Obtenidos
ASM4171469v1	2796644150	Resultados Obtenidos
ASM4171468v1	2796665147	Resultados Obtenidos

Nota: Elaborado por los autores, 2026

4.2.2. Genes de referencia en *Cupriavidus necator* H16 y su función

El genoma de *Cupriavidus necator* H16 fue utilizado como organismo modelo para la obtención de secuencias de referencia del sistema PHA, debido a su caracterización exhaustiva y a su reconocida capacidad para producir PHA a nivel industrial. Se seleccionaron genes representativos tanto de la fase de biosíntesis como de la movilización del polímero.

En particular, se incluyeron genes involucrados en la síntesis del monómero precursor, como *phaA* (β -ceto-tiolasa) y *phaB* (reductasas), así como genes responsables de la polimerización (*phaC1* y *phaC2*) y de la degradación intracelular del polímero (*phaZ1* y *phaZ2*). La presencia de múltiples isoenzimas reductasas (*phaB1*, *phaB2* y *phaB3*) y despolimerasas sugiere un sistema metabólicamente flexible, capaz de responder a distintas condiciones fisiológicas y ambientales analizada en la **Tabla 8**.

Estas secuencias fueron empleadas como queries tanto para las búsquedas BLAST como para los alineamientos múltiples, teniendo como referencia para la comparación evolutiva y funcional con los genomas de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 8. Genes de PHA en *C. necator* H16

Gen	Gen ID	Función principal
phaA	H16_A1438	β -ceto-tiolasa: Condensa dos acetil-CoA \rightarrow acetoacetil-CoA
phaB1	H16_A1439	Reductasa: Acetoacetil-CoA \rightarrow (R)-3-hidroxiacil-CoA (NADPH)
phaB2	H16_A2002	Isoenzima reductasa: Variación funcional y regulación
phaB3	H16_A2171	Isoenzima reductasa: redundancia/adaptación
phaC1	H16_A1437	PHA sintasa clase I: Polimeriza 3-hidroxiacil-CoA (preferencia SCL)
phaC2	H16_A2003	PHA sintasa clase II: Amplía rango de monómeros (MCL)
phaZ1	H16_A1150	Despolimerasa intracelular: Movilización de PHA desde gránulos
phaZ2	H16_A2862	Despolimerasa intracelular: Variación en regulación y actividad

Nota: Elaborado por los autores, 2026

4.2.3. Resultados de BLAST y alineamientos múltiples

Para los identificadores GI que arrojaron resultados positivos, se realizaron búsquedas BLAST complementarias y alineamientos múltiples mediante MAFFT. Con base en estos análisis, se expone a continuación un resumen preliminar de las métricas obtenidas y de los principales hallazgos correspondientes a cada gen analizados en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados preliminares Blast por GI y Genes PHA

GI	Genes detectados	Query Cover	E-value	Per. Ident
2734481747	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2734476896	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2796658750	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2796655393	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2796650536	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2796644150	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%
2796665147	phaA	82%	0.0	86.17%
	PhaB1	100%	0.0	87.06%
	PhaC1	83%	0.0	80.22%
	PhaZ1	98%	0.0	85.90%
	PhaZ2	86%	5e-161	76.82%

Nota: Elaborado por los autores, 2026

4.2.4. Gen *phaA* β -ceto-tiolasa

El gen *phaA*, que codifica una β -ceto-tiolasa responsable de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetyl-CoA, fue detectado de manera consistente en los siete ensamblajes genómicos analizados. En todos los casos, se obtuvo un 82 %, lo que indica que una porción sustancial de la secuencia de referencia se encuentra representada en los genomas de *Ralstonia*.

El porcentaje de identidad observado, cercano al 86 %, sugiere una elevada similitud a nivel de aminoácidos entre la β -ceto-tiolasa de *C. necator* H16 y sus homólogos en *Ralstonia*. Este grado de conservación es particularmente relevante, dado que phaA cataliza el primer paso comprometido en la ruta de biosíntesis de PHA. La conservación de esta enzima sugiere que las cepas analizadas poseen la maquinaria necesaria para canalizar intermediarios del metabolismo central del carbono hacia la formación de precursores de PHA.

Adicionalmente, el valor de E-value igual a 0.0 confirma que las coincidencias obtenidas son estadísticamente significativas, descartando la posibilidad de alineamientos fortuitos. En conjunto, estos resultados indican que la función catalítica asociada a phaA probablemente se encuentra preservada en los genomas evaluados.

4.2.5. Gen phaB1 (Acetoacetyl-CoA reductasa)

El gen phaB1, que codifica una reductasa dependiente de NADPH encargada de convertir el acetoacetyl-CoA en (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, mostró los resultados más robustos entre los genes biosintéticos analizados. En los siete ensamblajes, la cobertura de la consulta alcanzó el 100 %, lo que indica que la secuencia de referencia fue alineada en su totalidad con las secuencias homólogas detectadas.

El porcentaje de identidad observado fue aproximadamente del 87 %, lo que refleja una alta conservación estructural y funcional de esta enzima. Dado que phaB1 participa en una etapa clave que determina la disponibilidad del monómero inmediatamente previo a la polimerización, su conservación sugiere que el flujo metabólico hacia la síntesis de PHA podría mantenerse activo bajo condiciones fisiológicas adecuadas.

El valor de E-value igual a 0.0 respalda nuevamente la significancia estadística de los alineamientos. La combinación de cobertura completa, alta identidad y significancia estadística

indica que *phaB1* representa uno de los componentes más conservados del sistema PHA en los genomas de *Ralstonia solanacearum* analizados.

4.2.6. Gen *phaC1* (PHA sintasa clase I)

El gen *phaC1*, que codifica la PHA sintasa de clase I, responsable de la polimerización de monómeros de cadena corta (SCL) en gránulos intracelulares de PHA, fue identificado en todos los ensamblajes analizados. La cobertura de la consulta fue del 83 %, lo que indica que la mayor parte de la secuencia de referencia presenta homología con las secuencias detectadas.

El porcentaje de identidad, cercano al 80 %, fue inferior al observado para *phaA* y *phaB1*, lo que sugiere un mayor grado de variabilidad en esta enzima. Este resultado es consistente con el hecho de que la PHA sintasa suele presentar variaciones estructurales que influyen en la especificidad de sustrato, la longitud del polímero y las propiedades fisicoquímicas del PHA producido.

A pesar de esta variabilidad relativa, los valores de E-value igual a 0.0 indican que las homologías son altamente significativas. En conjunto, estos resultados sugieren que los genomas de *Ralstonia* analizados podrían poseer la capacidad de sintetizar PHA de cadena corta, aunque con posibles diferencias en eficiencia o características del polímero respecto a *C. necator* H16.

4.2.7. Gen *phaZ1* (despolimeriza intracelular)

El gen *phaZ1*, asociado a la degradación intracelular del PHA almacenado en forma de gránulos, presentó una cobertura de la consulta del 98 % en todos los ensamblajes analizados. Este alto nivel de cobertura indica una correspondencia casi completa con la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad observado, superior al 85 %, sugiere una fuerte conservación funcional de esta despolimeriza. La presencia de phaZ1 implica que las bacterias no solo poseen la capacidad de sintetizar PHA, sino también de movilizarlo como fuente de carbono y energía bajo condiciones de limitación nutricional.

El valor de E-value igual a 0.0 indican que las homologías son altamente significativas. La conservación de phaZ1 en todos los genomas analizados indica que el metabolismo del PHA en *Ralstonia solanacearum* probablemente incluye mecanismos eficientes de reciclaje del polímero.

4.2.8. Gen phaZ2 (despolimeriza intracelular)

El gen phaZ2 fue igualmente detectado en los siete ensamblajes, con una cobertura del 86 % y valores de identidad cercanos al 77 %. En comparación con phaZ1, estos valores reflejan un mayor grado de variabilidad, lo que podría estar relacionado con diferencias en regulación, especificidad de sustrato o condiciones de expresión.

El E-value de 5×10^{-161} demuestra que las homologías detectadas son altamente significativas desde el punto de vista estadístico. La coexistencia de phaZ1 y phaZ2 en los genomas analizados sugiere un sistema complementario de despolimerización, lo que podría conferir ventajas adaptativas frente a cambios ambientales.

4.2.9. Modelado estructural de proteínas del sistema de biosíntesis del PHA

Tabla 10. Tabla de valores RMSD

Comparación	RMSD	Observación
Model phaA vs 4O9C	10.639	Diferencias significativas; núcleo catalítico conservado, pero con variaciones
Model phaB vs 4N5M	0.077	Superposición casi perfecta; conversión del sitio de unión a Acetil-CoA
Model phaB vs 4N5N	0.194	Alta similitud; conservación del sitio de unión a NADPH
Model phaC vs 5Hz2	0.076	Alta conservación; arquitectura catalítica preservada para la polimerización de PHA

Nota: Elaborado por los autores, 2026

4.2.10. Interpretación de los valores RMSD para Pha

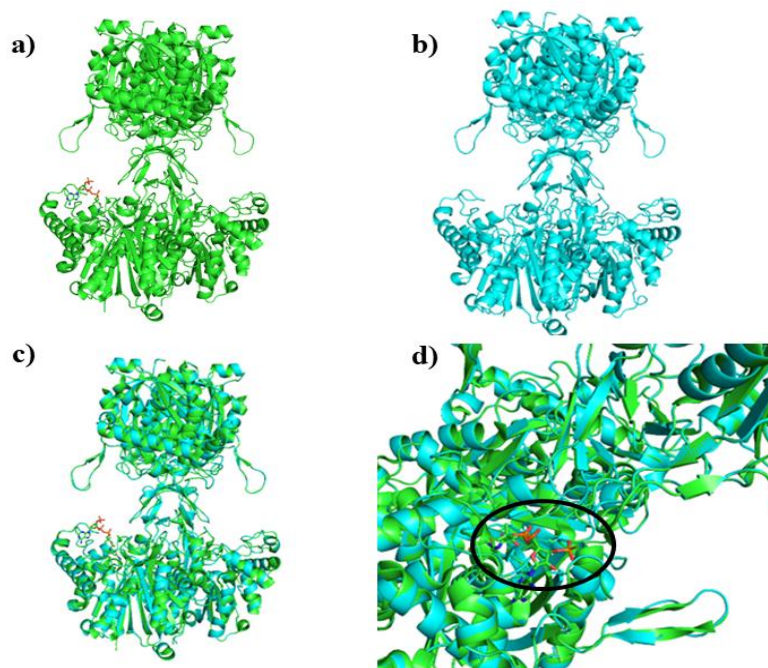


Figura 5. Alineamiento del modelo de la proteína phaA mediante el software PyMol y análisis en sus diferencias catalíticas. (a) Estructura cristalizada de la proteína modelo de phaA (elaborado en SwissModel). (b) Estructura generada de la proteína de *Ralstonia solanacearum* (referencia 4O9C). (c) Alineamiento generado entre ambas proteínas. (d) Sitio activo de las proteínas.

El alineamiento del modelo de la proteína phaA (β -ceto-tiolasa) con la estructura de referencia 4O9C arrojó un valor de RMSD = 10.639. Este valor relativamente alto indica que, aunque el núcleo catalítico de la enzima se conserva, existen diferencias significativas en regiones periféricas de la proteína. Dichas variaciones pueden deberse a divergencias evolutivas entre *Ralstonia solanacearum* y *Cupriavidus necator*, o a la flexibilidad propia de las enzimas que interactúan con metabolitos centrales. La conservación del núcleo catalítico asegura que la proteína mantenga su capacidad de condensar dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetyl-CoA, primer paso en la biosíntesis de PHA.

4.2.11. Interpretación de los valores RMSD para Pha

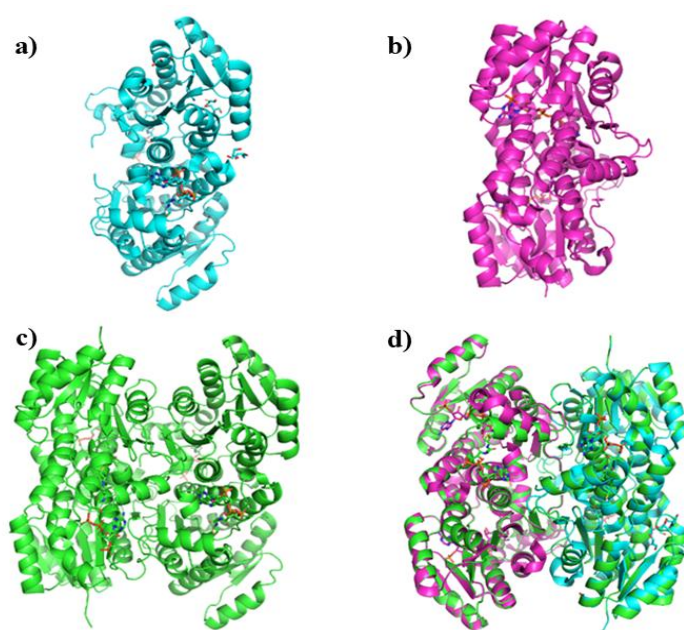


Figura 6. Alineamiento del modelo de la proteína phaB mediante el software PyMol y su análisis en sus diferencias catalíticas. **(a)** Estructura cristalizada generada de la proteína de *Ralstonia eutropha* (referencia 4N5M). **(b)** Estructura cristalizada generada de la proteína de *Ralstonia eutropha* (referencia 4N5n). **(c)** Estructura de la proteína modelo de phaB (elaborado en SwissModel). **(d)** Alineamiento generado entre ambas proteínas y subunidades.

El modelo de la proteína phaB (3-ketoacyl-ACP reductase) mostró una conservación estructural alta al alinearse con las estructuras de referencia 4N5M y 4N5N. Los valores de RMSD fueron 0.077 y 0.194, respectivamente, lo que refleja una similitud tridimensional muy

alta. Estos resultados confirman que la proteína modelada conserva de manera casi idéntica las dos subunidades funcionales: una asociada al cofactor NADPH (4N5N) y otra vinculada al sustrato Acetil-CoA (4N5M). La presencia de estas dos subunidades en el modelo es una representación de la arquitectura cuaternaria de la enzima, que requiere la interacción simultánea con NADPH y Acetil-CoA para catalizar la reducción de acetoacetyl-CoA hacia (R)-3-hidroxiacetyl-CoA. Por lo tanto, se valida la función de la enzima y demuestra que el sistema PHA en *Ralstonia solanacearum* conserva los elementos esenciales para la biosíntesis del polímero.

4.2.12. Interpretación de los valores RMSD para PhaC

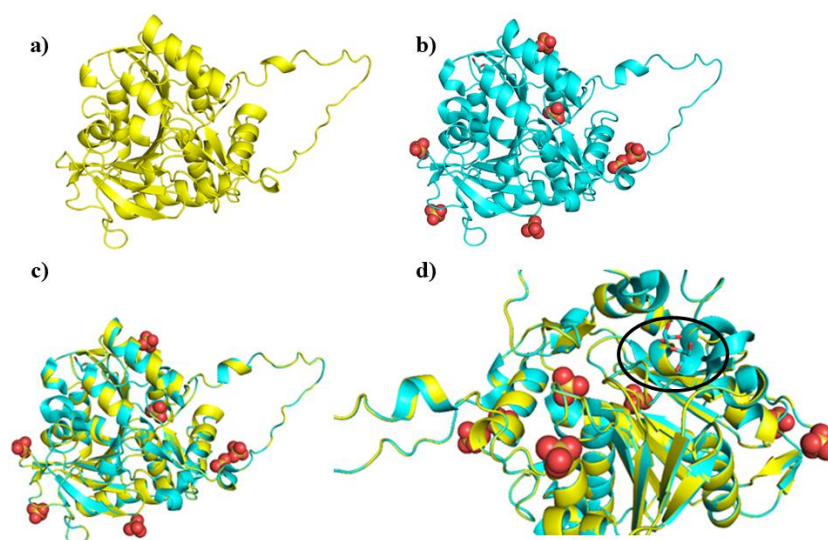


Figura 7. Alineamiento del modelo de la proteína phaC mediante el software PyMol y análisis en sus diferencias catalíticas. (a) Estructura cristalizada de la proteína modelo de phaC (elaborado en SwissModel). (b) Estructura generada de la proteína de *Ralstonia eutropha* (referencia 5HZ2) (c) Alineamiento generado entre ambas proteínas. (d) Sitio activo de las proteínas.

El alineamiento del modelo de la proteína phaC (PHA sintasa clase I) con la estructura de referencia 5HZ2 arrojó un valor de RMSD = 0.076, lo que indica una alta similitud estructural. Este resultado confirma que la enzima modelada conserva la arquitectura catalítica necesaria para polimerizar monómeros de hidroxiacetyl-CoA en gránulos de PHA, las estructuras en formas de átomos de color naranja rodeada de átomos rojos son, moléculas de iones sulfatos.

Aunque el porcentaje de identidad de secuencia fue menor que el observado en phaA y phaB, la conservación estructural sugiere que las diferencias se concentran en regiones periféricas de la especificidad de sustrato o de la eficiencia de polimerización, más que en el núcleo catalítico. Esto permite que las cepas de *Ralstonia solanacearum* produzcan polímeros con propiedades fisicoquímicas distintas a las de *Cupriavidus necator*, lo que representa un potencial biotecnológico relevante.

4.2.13. Interpretación del gen PhaZ y su comparación con PhaC

El gen phaZ en *Ralstonia solanacearum* está anotado como polyhydroxyalkanoate depolymerase, cuya función es degradar los gránulos de PHA intracelulares. Sin embargo, al realizar los alineamientos estructurales, el modelo se comparó con proteínas tipo phaC (PHA sintasa). Esta similitud se explica por varios factores; Tanto phaZ como phaC interactúan con el mismo polímero, compartiendo motivos estructurales conservados. Existe una escasez de estructuras cristalográficas de despolimerasas en bases de datos, lo que obliga a los algoritmos de modelado a utilizar sintasas como plantillas más cercanas. Desde un punto de vista evolutivo, ambas enzimas pertenecen a familias relacionadas de hidrolasas y transferasas, lo que explica la similitud parcial entre ellas.

A pesar de esta similitud estructural, el análisis detallado del modelo de phaZ revela la presencia de residuos catalíticos característicos de enzimas hidrolasas, como la triada Serina, Histidina, Aspartato (Ser-His-Asp). Este motivo catalítico es ampliamente reconocido en enzimas que rompen enlaces éster, y su conservación en el modelo confirma que la proteína cumple efectivamente la función de despolimerasa intracelular. Por lo tanto, aunque la arquitectura general de phaZ se asemeje a la de phaC, su función se diferencia claramente a nivel catalítico y metabólico

4.3. Árboles filogenéticos recreados

Con las secuencias asociadas ya identificadas en la biosíntesis del PHA, en este se analizan los resultados de los árboles filogenéticos reconstruidos, que, desde una perspectiva evolutiva, permita contextualizar la diversidad y relación que tienen las bacterias *Ralstonia solanacearum* del Ecuador, comparado con secuencias de cepas de un distinto género, pero no tiene gran diferencia de manera funcional. El árbol se reconstruyó a partir de secuencias homólogas recuperadas mediante búsquedas en bases de datos especializadas de NCBI, de la cual mediante el uso de BLASTn se eligió una bacteria que cumpla con requisitos de un query cover de 60% y porcentaje de identidad del 70% aproximadamente, siendo la bacteria *Burkholderia dolosa*, que cumplió los requisitos para ser considerada un outgroup root y se visualice mejor las divergencias evolutivas tanto de los genes y proteínas en los respectivos arboles filogenéticos.

4.3.1. Árbol filogenético basado en ADN

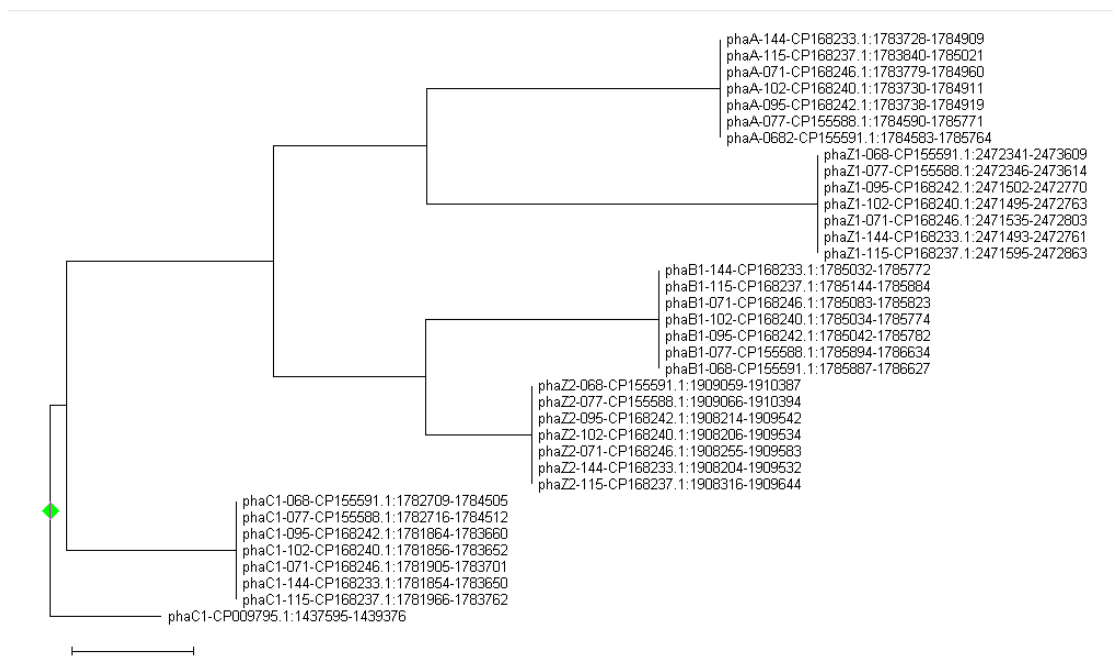


Figura 8. Árbol filogenético en base al Maximun-Likelihood, para el análisis de ADN a partir de la de las secuencias nucleotídicas, creado con el software MEGA 12, usando al gen phaC1-CP00979, de *Burkholderia dolosa* como un outgroup root.

En la **Figura 8** se presenta el árbol filogenético construido a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes asociados a la biosíntesis y movilización de polihidroxicanoatos (PHA). La topología del árbol muestra que los siete ensamblajes genómicos de *Ralstonia solanacearum* se agrupan de manera consistente en un clado compacto y bien definido. La cercanía entre las ramas correspondientes a estos ensamblajes indica un bajo nivel de divergencia genética, lo que sugiere una alta conservación de los genes PHA entre los aislamientos analizados. Este patrón concuerda con los elevados porcentajes de identidad y los valores de significancia estadística obtenidos en los análisis BLAST.

La estructura interna del clado de *Ralstonia solanacearum* se caracteriza por la presencia de ramas cortas y la ausencia de subclados claramente diferenciados, lo que indica que no existen diferencias evolutivas marcadas entre los genomas ecuatorianos para los genes PHA estudiados. Este comportamiento sugiere que dichas secuencias han estado sometidas a

presiones selectivas conservadoras, manteniéndose relativamente estables a lo largo del tiempo debido a su importancia funcional en el metabolismo del carbono y en la adaptación fisiológica de la bacteria.

En la **Figura 8**, *Cupriavidus necator* H16 se posiciona como un clado hermano al grupo de *Ralstonia*, separado por una rama de longitud moderada. Esta cercanía filogenética indica la existencia de un ancestro común para los genes PHA en ambos linajes y valida el uso de *C. necator* como organismo modelo para el estudio comparativo de la biosíntesis de PHA. La separación observada sugiere que, aunque la función general del sistema se conserva, han ocurrido eventos de divergencia genética asociados a procesos de especialización metabólica.

Por otro lado, *Burkholderia dolosa* AU0158 aparece claramente separado del clado de *Ralstonia* y de *C. necator*, ubicándose en una rama más distante dentro del árbol. La mayor longitud de esta rama refleja un mayor grado de divergencia nucleotídica en los genes PHA, lo que indica una evolución más independiente de esta ruta metabólica. Este resultado sugiere que, aunque *B. dolosa* conserva genes homólogos asociados al metabolismo de PHA, estos presentan diferencias sustanciales a nivel de secuencia que podrían estar relacionadas con variaciones en regulación y eficiencia metabólica.

4.3.2. Árbol filogenético basado en proteínas

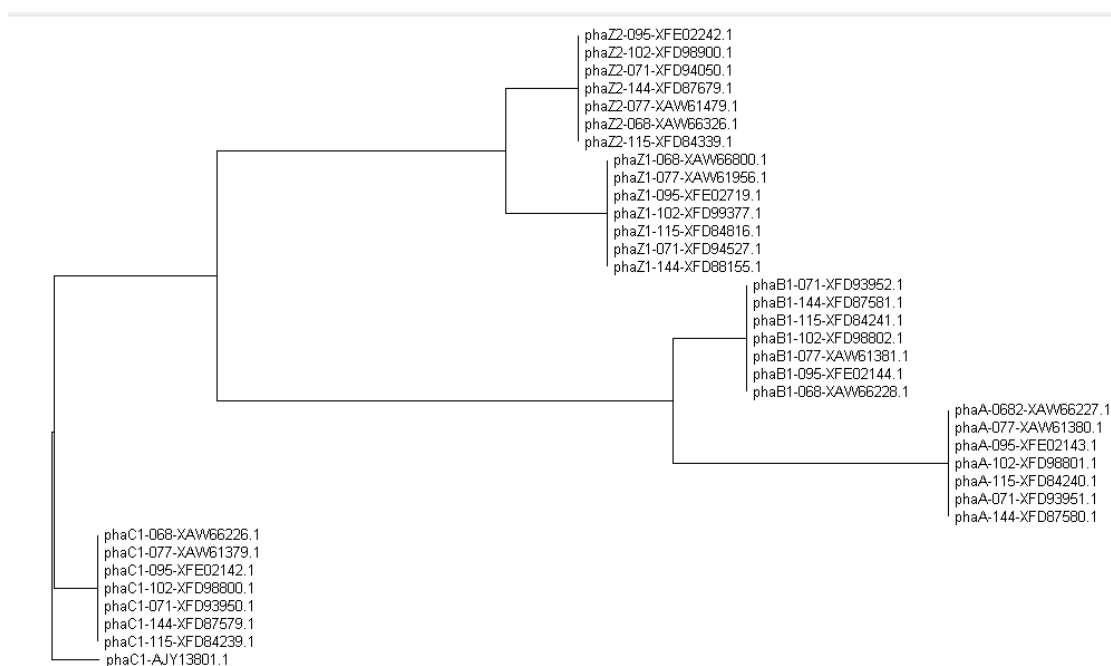


Figura 9. Árbol filogenético en base al Maximun-Likehood, para el análisis de proteínas a partir de las secuencias de aminoácidos, creado con el software MEGA 12, usando al gen phaC1-AJY13801, de *Burkholderia dolosa* como un outgroup root.

La **Figura 9** muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas involucradas en la biosíntesis y degradación de PHA. La topología general del árbol es congruente con la observada en el análisis basado en ADN, aunque presenta ramas relativamente más cortas, lo que indica una mayor conservación a nivel proteico. Las secuencias correspondientes a los siete ensamblajes de *Ralstonia solanacearum* se agrupan nuevamente en un clado compacto, lo que evidencia una elevada similitud estructural entre las enzimas PHA de los distintos genomas analizados.

La estrecha agrupación observada en la **Figura 9** sugiere que los dominios catalíticos y las regiones funcionales esenciales de enzimas clave como PhaA, PhaB1, PhaC1 y PhaZ se encuentran altamente conservados en *Ralstonia solanacearum*. Este patrón indica que, aunque se hayan producido sustituciones nucleotídicas a lo largo de la evolución, muchas de ellas no

han tenido un impacto significativo sobre la estructura ni la función de las proteínas, probablemente como consecuencia de la acción de la selección purificadora.

Las proteínas de *Cupriavidus necator* H16 se ubican en una posición cercana al clado de *Ralstonia* en el árbol proteico, formando una rama independiente pero próxima. Esta disposición sugiere que la función bioquímica del sistema PHA se mantiene ampliamente conservada entre ambos organismos, reforzando el papel de *C. necator* como referencia funcional. Las diferencias observadas podrían estar asociadas a variaciones en la regulación enzimática o en la eficiencia de la polimerización del PHA.

En contraste, las secuencias proteicas correspondientes a *Burkholderia dolosa* AU0158 aparecen agrupadas en una rama más distante en la **Figura 9**, lo que evidencia una mayor divergencia en la composición aminoacídica de sus enzimas PHA. Sin embargo, esta separación es menos pronunciada que la observada en el árbol basado en ADN, lo que sugiere que ciertos motivos y dominios funcionales críticos se han mantenido conservados. Esto indica que las proteínas PHA de *B. dolosa* podrían conservar actividad catalítica básica, aunque con posibles diferencias en cinética enzimática, regulación o especificidad de sustrato.

4.3.3. Filogenia de secuencias nucleotídicas PHA para aproximación local vs WT

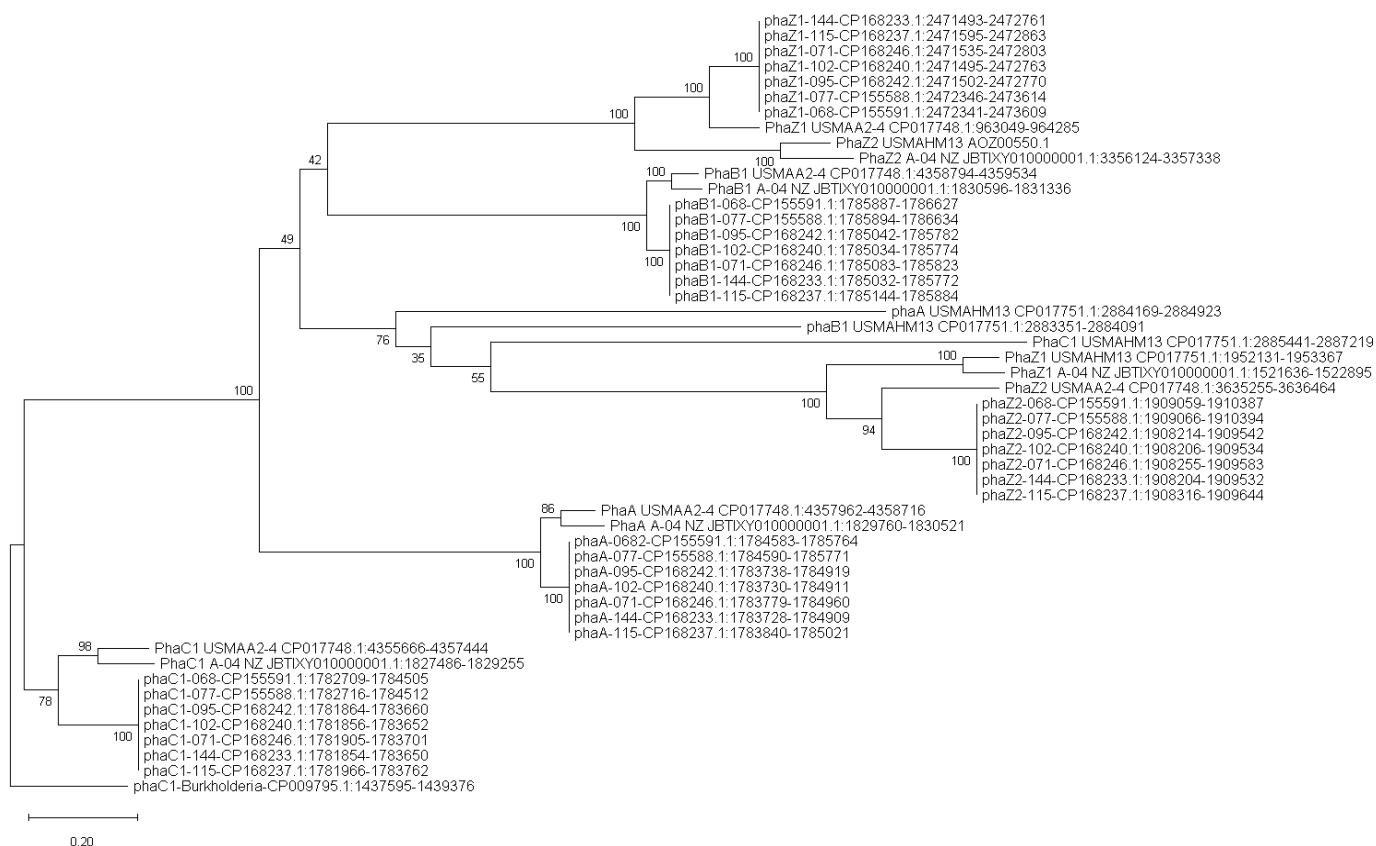


Figura 10. Árbol filogenético reconstruido mediante el método de Maximum Likelihood, con un Bootstrap de 100, a partir de las secuencias nucleotídicas asociadas al sistema PHA, generado en MEGA 12. El árbol fue enraizado utilizando phaC1 de *Burkholderia dolosa* CP009795 como grupo externo outgroup root. Comparando con cepas de *Ralstonia* de rendimientos intermedios.

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a *R. solanacearum* se distribuyeron en clados específicos según el gen, destacándose una baja variabilidad genética dentro de cada agrupamiento. En particular, los clados asociados a phaZ1 y phaZ2 presentan una disposición compacta de las secuencias, con ramas cortas y valores de soporte elevados, lo que indica una elevada similitud a nivel de nucleótidos entre las cepas analizadas y sugiere una conservación significativa de estos genes dentro de la especie.

En el caso del gen phaB1, el árbol revela una diferenciación clara entre las secuencias de *R. solanacearum* y aquellas pertenecientes a las cepas de referencia de *Ralstonia* (*Cupriavidus necator*). Las cepas A-04 y USMAA2-4 se agrupan estrechamente dentro del

linaje externo, mientras que la cepa USMAHM13 se posiciona con una mayor distancia filogenética relativa, lo cual se refleja en una mayor longitud de rama. Este patrón indica diferencias en la composición nucleotídica del gen *phaB1* entre las cepas externas evaluadas.

El análisis del gen *phaA* muestra una organización filogenética similar, con un clado dominante que agrupa exclusivamente a las secuencias de *R. solanacearum* y que está respaldado por altos valores de bootstrap. Las secuencias correspondientes a las cepas externas se separan claramente de este clado, manteniendo una estructura coherente con la divergencia esperada entre especies relacionadas, pero genéticamente diferenciadas.

Para el gen *phaC1*, el árbol evidencia una mayor amplitud en las distancias genéticas, particularmente por la inclusión de la secuencia de *Burkholderia dolosa* AU0158, la cual presenta la mayor divergencia nucleotídica del conjunto analizado. Esta disposición refuerza la utilidad de dicha secuencia como grupo externo y contribuye a una delimitación más precisa de los clados correspondientes a *R. solanacearum* y *R. necator*.

De tal manera, el análisis filogenético basado en ADN muestra la estabilidad genética de los genes del sistema PHA dentro de *Ralstonia solanacearum*, así como una diferenciación consistente respecto a las cepas empleadas como referencia externa.

4.3.2. Filogenia de proteínas PHA para aproximación local vs WT

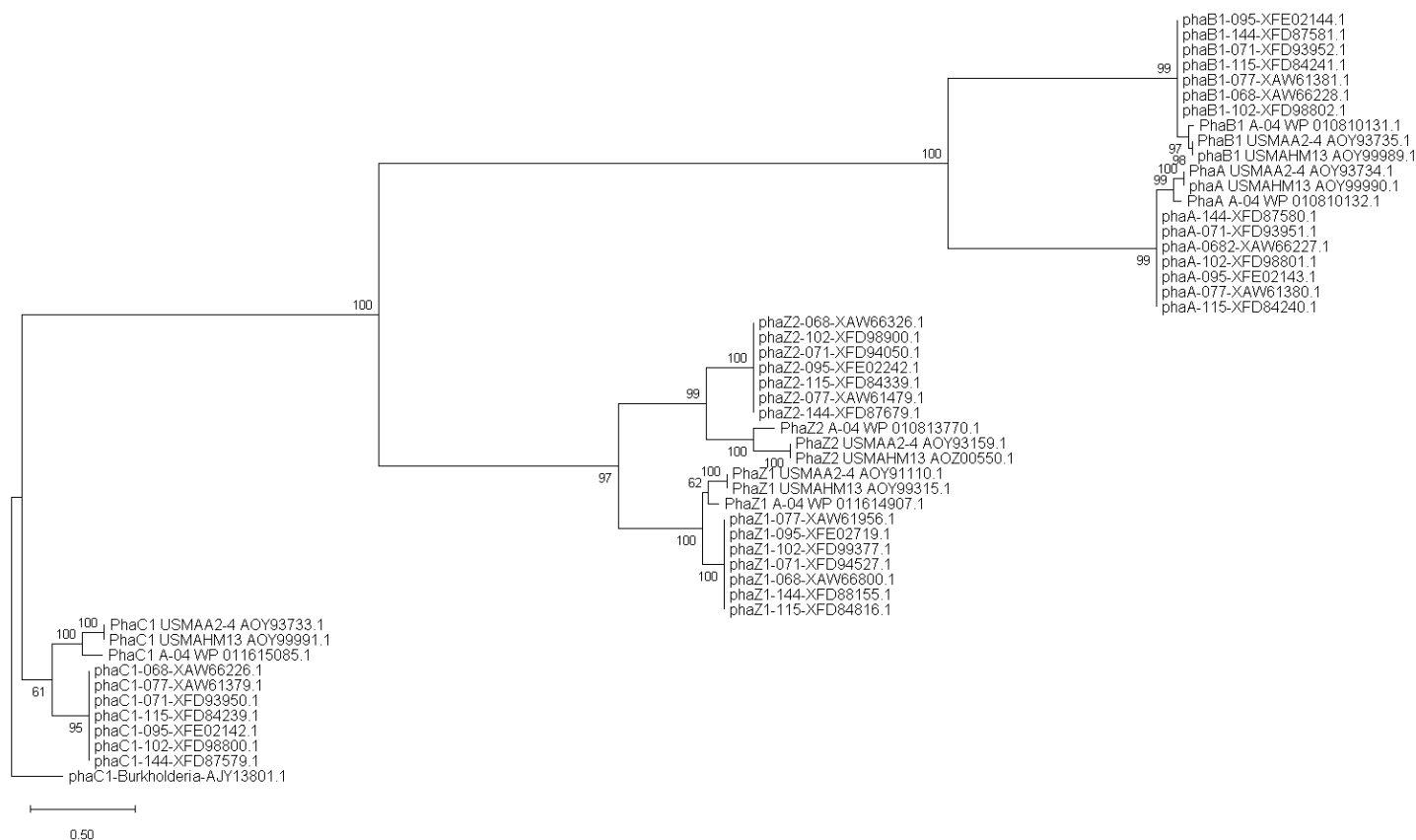


Figura 11. Árbol filogenético reconstruido mediante el método de Maximum Likelihood, con un Bootstrap de 100, a partir de las secuencias de aminoácidos de proteínas asociadas al sistema PHA, generado en MEGA 12. El árbol fue enraizado utilizando phaC1 de *Burkholderia dolosa* AJY13801 como grupo externo outgroup root. Comparando con cepas de *Ralstonia* de rendimientos intermedios.

Las secuencias correspondientes a las cepas de *Ralstonia solanacearum* se agruparon de manera consistente según el tipo de proteína analizada, formando clados con soportes bootstrap generalmente superiores al 95 %, lo que indica una alta conservación evolutiva de los componentes del sistema PHA dentro de esta especie. En particular, las proteínas PhaA y PhaB1 mostraron agrupamientos compactos, con distancias filogenéticas reducidas entre las secuencias, reflejando una fuerte similitud estructural entre las cepas evaluadas.

Los grupos externos utilizados en el análisis correspondieron a cepas de *Ralstonia* (*Cupriavidus necator*) A-04, USMAA2-4 y USMAHM13, así como a *Burkholderia dolosa* AU0158 representada por la proteína PhaC1. Estas secuencias se posicionaron de forma consistente fuera de los clados principales de *R. solanacearum*, cumpliendo adecuadamente su

función como outgroup y permitiendo una correcta enraización del árbol. La separación entre las secuencias de *R. solanacearum* y las cepas externas estuvo respaldada por valores de bootstrap cercanos o iguales al 100 %, evidenciando una divergencia filogenética clara entre los grupos comparados.

Dentro del conjunto de *R. necator*, las cepas A-04 y USMAA2-4, ambas reportadas con rendimientos productivos cercanos al 60 % y 60,02 % respectivamente, mostraron una estrecha relación filogenética entre sus proteínas PhaA, PhaB1, PhaC1, PhaZ1 y PhaZ2, formando subclados. Por otro lado, las secuencias correspondientes a la cepa USMAHM13, asociada a un rendimiento productivo menor del 49 %, se agruparon dentro del mismo linaje general, aunque presentaron ligeras variaciones en la longitud de las ramas, lo que sugiere una mayor divergencia relativa a nivel proteico en comparación con las cepas de mayor rendimiento.

La proteína PhaC1 de *Burkholderia dolosa* AU0158 se posicionó como el elemento filogenéticamente más distante dentro del análisis, separándose tempranamente del resto de las secuencias y mostrando las mayores distancias evolutivas, lo que es consistente con su pertenencia a un género diferente dentro del orden *Burkholderiales*. Este comportamiento refuerza la validez del árbol obtenido y confirma la adecuada selección del outgroup para el análisis comparativo.

En conjunto, el árbol filogenético basado en proteínas del sistema PHA evidencia una clara diferenciación entre *Ralstonia solanacearum* y las cepas utilizadas como referencia externa, así como una alta conservación de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de PHA dentro de cada grupo. Los altos valores de soporte bootstrap observados en los principales nodos confirman la estabilidad de los clados obtenidos.

Capítulo V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

La aplicación de PRISMA 2020 permitió sistematizar la literatura sobre biosíntesis de PHA, evidenciando la predominancia de *Cupriavidus necator* como organismo modelo y la escasez de estudios integrados en *Ralstonia tropical*, confirmando una brecha de conocimiento y la necesidad de consolidar evidencia para futuras investigaciones.

El análisis comparativo de rutas metabólicas mostró que el sistema PhaA–PhaB–PhaC es el núcleo de la síntesis de PHA, cuya eficiencia depende del balance del metabolismo central, la regulación y el almacenamiento intracelular. Por tanto, el rendimiento biosintético responde a una integración funcional y no a un único gen.

El análisis bioinformático indicó alta conservación de phaA, phaB1, phaC1 y phaZ en *Ralstonia tropical*, con similitud respecto a *C. necator* H16, y filogenias que sugieren cercanía evolutiva y conservación funcional del sistema pha. En conjunto, *Ralstonia spp.* emerge como candidata promisoría para optimización biotecnológica.

En conjunto, los hallazgos de esta revisión sistemática posicionan a *Ralstonia spp.* de origen tropical como un grupo bacteriano promisorio para el estudio y desarrollo de procesos de producción de PHA. La integración de evidencia metabólica, génica y filogenética proporciona una base sólida para orientar investigaciones futuras enfocadas en la selección de cepas locales, la optimización metabólica y el desarrollo de alternativas sostenibles frente a los plásticos de origen petroquímico.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda incorporar plataformas de apoyo a revisiones sistemáticas en la etapa de búsqueda, cribado y depuración del corpus, se destaca el uso de herramientas basadas en inteligencias artificiales especialmente para la detección de duplicados, clasificación semiautomática por relevancia, priorización de lecturas y trazabilidad del proceso, algo que fue de mucha ayuda. Este enfoque puede disminuir errores manuales, mejorar la consistencia en los criterios de inclusión/exclusión y optimizar la gestión de grandes volúmenes de artículos.

Se sugiere fortalecer los criterios de anotación y verificación funcional de genes y proteínas asociados a la biosíntesis de PHA, debido a la variabilidad en la nomenclatura reportada por diferentes autores y a la presencia de nombres incompletos o no estandarizados. En este sentido, se recomienda complementar la extracción bibliográfica con verificación por secuencia en homología, dominios conservados y anotaciones cruzadas, a fin de confirmar equivalencias funcionales y reducir ambigüedades durante la comparación.

El incrementar la robustez del análisis comparativo mediante la incorporación de un mayor número de genomas completos de *Ralstonia* de origen local y la actualización constante de repositorios es importante, ya que la limitada disponibilidad de genomas restringe la variabilidad evaluable y, por ende, la profundidad de la comparación. Asimismo, se sugiere priorizar el uso de estructuras experimentales disponibles y reportar explícitamente las limitaciones cuando no existan estructuras cristalizadas para proteínas clave, dado que esta ausencia condiciona el alcance del modelado estructural y su integración con análisis cuantitativos.

6. Referencias Bibliográficas

- Acharjee, S. A., Bharali, P., Gogoi, B., Sorhie, V., Walling, B., & Alemtoshi. (2023). PHA-Based Bioplastic: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. *Water, air, and soil pollution*, 234(1). <https://doi.org/10.1007/S11270-022-06029-2>
- Alsaadi, A., Ganesen, S. S. K., Amelia, T. S. M., Moanis, R., Peeters, E., Vigneswari, S., & Bhubalan, K. (2022). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymer Synthesis by Marine Bacteria of the Malaysian Coral Triangle Region and Mining for PHA Synthase Genes. *Microorganisms*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102057>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amarajothi, A. D., Abdullah, A. A. A., & Ramachandran, H. (2025). Influence of glycerine pitch on the metabolite profiling and enzyme activity in the poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus malaysiensis* USMAHM13. *Malaysian Journal of Microbiology*, 21(1), 61–69. <https://doi.org/10.21161/mjm.230528>
- Ascencio-Galván, M. L., López-Agudelo, V. A., Gómez-Ríos, D., & Ramirez-Malule, H. (2024). A bibliometric landscape of polyhydroxyalkanoates production from low-cost substrates by *Cupriavidus necator* and its perspectives for the Latin American bioeconomy. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 12(2), 48–61. <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.159864>
- Bacha, S., Arous, F., Chouikh, E., Jaouani, A., Gtari, M., Charradi, K., Attia, H., & Ghorbel, D. (2023). Exploring *Bacillus amyloliquefaciens* strain OM81 for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastic using olive mill wastewater. *3 Biotech*, 13(12). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03808-4>
- Cerrone, F., Zhou, B., Mouren, A., Avérous, L., Conroy, S., Simpson, J. C., O'Connor, K. E., & Narancic, T. (2023). *Pseudomonas umsongensis* GO16 as a platform for the in vivo synthesis of short and medium chain length polyhydroxyalkanoate blends. *Bioresource Technology*, 387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129668>
- Cha, D., Ha, H. S., & Lee, S. K. (2020). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of various types of short-chain-length polyhydroxyalkanoates from levulinic acid. *Bioresource Technology*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123332>
- Chek, M. F., Kim, S. Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from

- Chromobacterium sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-05509-4>
- Chek, M. F., Kim, S.-Y., Mori, T., Matsumoto, K., Sato, S., & Hakoshima, T. (2025). Structures of Polyhydroxyalkanoate Synthase PhaC from *Aeromonas caviae*, Producing Biodegradable Plastics. *Angewandte Chemie - International Edition*, 64(26). <https://doi.org/10.1002/anie.202504626>
- De Eugenio, L. I., García, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Román, J. S., García, J. L., & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4951–4962. <https://doi.org/10.1074/JBC.M608119200>
- Elazzazy, A. M., Ali Abd, K., Bataweel, N. M., Mahmoud, M. M., & Baghdadi, A. M. (2024). Microbial Biosynthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) from Waste Cooking Oil. *Polymers*, 16(15). <https://doi.org/10.3390/POLYM16152150/S1>
- Fernando Santacruz. (2025). *Análisis de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) y filogenia del gen phaA de las cepas de Ralstonia solanacearum de Ecuador* [PUCE]. <https://repositorio.puce.edu.ec/handle/123456789/47318>
- Getino, L., Martín, J. L., Chamizo-Ampudia, A., Getino, L., Martín, J. L., & Chamizo-Ampudia, A. (2024). A Review of Polyhydroxyalkanoates: Characterization, Production, and Application from Waste. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, 12(10). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12102028>
- González-Fernández, M.-O., Raposo-Rivas, M., Pérez-Torregrosa, A.-B., & Quadros-Flores, P. (2025). Collaborative AI-Integrated Model for Reviewing Educational Literature. *Computers*, 14(12), 562. <https://doi.org/10.3390/computers14120562>
- González-Rojo, S., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2024). Advances in Microbial Biotechnology for Sustainable Alternatives to Petroleum-Based Plastics: A Comprehensive Review of Polyhydroxyalkanoate Production. *Microorganisms*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12081668>
- Hadri, S. H., Tareen, N., Hassan, A., Naseer, M., Ali, K., & Javed, H. (2025). Alternatives to conventional plastics: Polyhydroxyalkanoates (PHA) from microbial sources and recent approaches – A review. *Process Safety and Environmental Protection*, 195, 106809. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2025.106809>
- Hassan, S., Khudur, L. S., Nahar, K., Dekiwadia, C., & Ball, A. S. (2025). Isolation and Identification of Xylose-Utilising, Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria from

- Sugarcane Bagasse: First Report of PHA Production by Mycolicibacterium Smegmatis. *Journal of Polymers and the Environment*, 33(7), 3144–3157. <https://doi.org/10.1007/s10924-025-03600-w>
- Hectors, W., Delmulle, T., Soetaert, W. K., Hectors, W., Delmulle, T., & Soetaert, W. K. (2025). Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Cupriavidus necator*. *Polymers* 2025, Vol. 17, 17(15). <https://doi.org/10.3390/POLYM17152104>
- Hernández-Herreros, N., Rodriguez, A., Rivero-Buceta, V., Rojas, A., & Prieto, M. A. (2025). Flexible feeding strategy for high-yield PHA bioprocessing in *Cupriavidus necator* H16 from anaerobically fermented industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 434, 132774. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132774>
- Höhler, D., Pfeiffer, W., Ioannidis, V., Stockinger, H., & Stamatakis, A. (2022). RAxML Grove: An empirical phylogenetic tree database. *Bioinformatics*, 38(6), 1741–1742. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab863>
- Ibrahim, N., Rahman, A. M. N. A. A., Shafiq, M. D., Lockman, Z., Jaafar, M., & Kameda, Y. (2025). Microplastic Pollution: Sources, Degradation Mechanisms, Analytical Advances, and Mitigation Strategies for Environmental Sustainability. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 2025 263:1, 263(1), 27-. <https://doi.org/10.1007/S44169-025-00098-0>
- Ingram, H. R., & Winterburn, J. B. (2021). Anabolism of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* DSM 545 from spent coffee grounds oil. *New Biotechnology*, 60, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.08.001>
- Kacanski, M., Stelzer, F., Walsh, M., Kenny, S., O'Connor, K., & Neureiter, M. (2023). Pilot-scale production of mcl-PHA by *Pseudomonas citronellolis* using acetic acid as the sole carbon source. *New Biotechnology*, 78, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.10.003>
- Kankonkar, H. T., & Khandeparker, R. S. (2022). Microplastics a Novel Substratum for Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Producing Bacteria in Aquatic Environments. *Current Microbiology*, 79(9). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02929-y>
- Kim, J., Chang, J. H., Kim, E.-J., & Kim, K.-J. (2014). Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(3), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.150>
- Kumar, R., Lalnundiki, V., Shelare, S. D., Abhishek, G. J., Sharma, S., Sharma, D., Kumar, A., & Abbas, M. (2024). An investigation of the environmental implications of bioplastics: Recent advancements on the development of environmentally friendly

- bioplastics solutions. *Environmental Research*, 244, 117707. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.117707>
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular biology and evolution*, 41(12). <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAE263>
- Lee, H. S., Lee, S. M., Park, S. L., Choi, T.-R., Song, H.-S., Kim, H.-J., Bhatia, S. K., Gurav, R., Kim, Y.-G., Kim, J.-H., Choi, K.-Y., & Yang, Y.-H. (2021). Tung oil-based production of high 3-hydroxyhexanoate-containing terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) using engineered *ralstonia eutropha*. *Polymers*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071084>
- Li, H. F., Wang, M. R., Tian, L. Y., & Li, Z. J. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates (Phas) by *vibrio alginolyticus* strains isolated from salt fields. *Molecules*, 26(20). <https://doi.org/10.3390/molecules26206283>
- Mahato, R. P., Kumar, S., & Singh, P. (2023). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable resources: a review on prospects, challenges and applications. *Archives of microbiology*, 205(5). <https://doi.org/10.1007/S00203-023-03499-8>
- Manoli, M. T., Blanco, F. G., Rivero-Buceta, V., Kniewel, R., Alarcon, S. H., Salgado, S., & Prieto, M. A. (2023). Heterologous constitutive production of short-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2440: the involvement of IbpA inclusion body protein. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1275036/PDF>
- Morgan, D. E. (2024). Zotero as a teaching tool for independent study courses, honors contracts, and undergraduate research mentoring. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 25(3). <https://doi.org/10.1128/jmbe.00132-24>
- Morlino, M. S., Serna García, R., Savio, F., Zampieri, G., Morosinotto, T., Treu, L., & Campanaro, S. (2023). *Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. *Biotechnology Advances*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>
- Muigano, M. N., Mauti, G. O., Anami, S. E., & Onguso, J. M. (2025). Advances and challenges in polyhydroxyalkanoates (PHA) production using *Halomonas* species: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 309, 142850. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2025.142850>
- Oh, S.-J., Shin, Y., Oh, J., Kim, S., Lee, Y., Choi, S., Lim, G., Joo, J.-C., Jeon, J.-M., Yoon, J.-J., Bhatia, S. K., Ahn, J., Kim, H.-T., & Yang, Y.-H. (2024). Strategic Use of Vegetable Oil for Mass Production of 5-Hydroxyvalerate-Containing

Polyhydroxyalkanoate from δ -Valerolactone by Engineered *Cupriavidus necator*. *Polymers*, 16(19). <https://doi.org/10.3390/polym16192773>

- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *Journal of Clinical Epidemiology*, 134, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2021.03.001>
- Pearson, W. R., & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(8), 2444–2448. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.8.2444>
- Pillot, G., Sunny, S., Comes, V., & Kerzenmacher, S. (2022). Optimization of growth and electrosynthesis of PolyHydroxyAlkanoates by the thermophilic bacterium *Kyrpidia spormannii*. *Bioresource Technology Reports*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100949>
- Ranaivoarisoa, T. O., Bai, W., Karthikeyan, R., Steele, H., Silberman, M., Olabode, J., Conners, E. M., Gallagher, B., & Bose, A. (2024). Overexpression of RuBisCO form I and II genes in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 augments polyhydroxyalkanoate production heterotrophically and autotrophically. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(9). <https://doi.org/10.1128/aem.01438-24>
- Rebocho, A. T., Pereira, J. R., Neves, L. A., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C., Freitas, F., & Reis, M. A. M. (2020). Preparation and Characterization of Films Based on a Natural P(3HB)/mcl-PHA Blend Obtained through the Co-culture of *Cupriavidus Necator* and *Pseudomonas Citronellolis* in Apple Pulp Waste. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING7020034>
- Rodrigues, T., Torres, C. V., Freitas, P., Neves, L. A., Carvalheira, M., Reis, M. A. M., & Freitas, F. (2024). Conversion of tomato waste into a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by a mixed microbial community. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(6), 114755. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2024.114755>
- Shin, Y., Kim, H. J., Choi, T.-R., Oh, S. J., Kim, S., Lee, Y., Choi, S., Oh, J., Kim, S. Y., Lee, Y. S., Choi, Y. H., Bhatia, S. K., & Yang, Y.-H. (2024). Identification of Oil-Loving *Cupriavidus necator* BM3-1 for Polyhydroxyalkanoate Production and Assessing Contribution of Exopolysaccharide for Vegetable Oil Utilization. *Polymers*, 16(12), 1639. <https://doi.org/10.3390/polym16121639>

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU033>
- Sukruansuwan, V., & Napathorn, S. C. (2018). Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1207-8>
- Sun, L., García, J., & Gonzalez-Flo, E. (2025). Potential sustained production of polyhydroxyalkanoate copolymers using cyanobacteria microbiomes. *Scientific Reports*, *15*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-12254-6>
- Tanaka, K., Yoshida, K., Orita, I., & Fukui, T. (2021). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-CO-3-hydroxyhexanoate) from CO₂ by a recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioengineering*, *8*(11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110179>
- Tang, R., Peng, X., Weng, C., & Han, Y. (2022). The Overexpression of Phasin and Regulator Genes Promoting the Synthesis of Polyhydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 under Nonstress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.01458-21>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.22.4673>
- Trakunjae, C., Sudesh, K., Neoh, S. Z., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Vaithanomsat, P., Trakunjae, C., Sudesh, K., Neoh, S. Z., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., & Vaithanomsat, P. (2022). Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) Copolymers by a Newly Engineered Strain of *Cupriavidus necator* PHB-4/pBBR_CnPro-phaCRp for Skin Tissue Engineering Application. *Polymers* *2022*, Vol. *14*, *14*(19). <https://doi.org/10.3390/POLYM14194074>
- Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International journal of environmental research and public health*, *20*(4). <https://doi.org/10.3390/IJERPH20042959>
- Vital-Vilchis, I., & Karunakaran, E. (2024). Make it or break it: A review on PHA synthase and depolymerase proteins. *Journal of Polymers and the Environment* *2024* *33*:3, *33*(3), 1267–1291. <https://doi.org/10.1007/S10924-024-03474-4>
- Wang, C.-T., Sivashankari, R. M., Miyahara, Y., & Tsuge, T. (2024). Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production by Recombinant *Ralstonia eutropha*

Strain 1F2 from Fructose or Carbon Dioxide as Sole Carbon Source. *Bioengineering*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/bioengineering11050455>

- Wang, K., & Zhang, R. (2021). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by *haloferax mediterranei* from food waste derived nutrients for biodegradable plastic applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(2), 338–347. <https://doi.org/10.4014/JMB.2008.08057>
- Zain, N. A. A., Ng, L. M., Foong, C. P., Tai, Y. T., Nanthini, J., & Sudesh, K. (2020). Complete Genome Sequence of a Novel Polyhydroxyalkanoate (PHA) Producer, *Jeongeupia* sp. USM3 (JCM 19920) and Characterization of Its PHA Synthases. *Current microbiology*, *77*(3), 500–508. <https://doi.org/10.1007/S00284-019-01852-Z>
- Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T. H., Loh, K. C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2022). A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.946085>
- Zher Neoh, S., Fey Chek, M., Tiang Tan, H., Linares-Pastén, J. A., Nandakumar, A., Hakoshima, T., & Sudesh, K. (2022). Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology*, *4*, 87–101. <https://doi.org/10.1016/J.CRBIOT.2022.01.002>
- Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Y., Kiselev, E. G., Nemtsev, I. V., Lukyanenko, A. V., Shishatskaya, E., & Volova, T. G. (2022). Biosynthesis and Properties of a P(3HB-co-3HV-co-4HV) Produced by *Cupriavidus necator* B-10646. *Polymers*, *14*(19). <https://doi.org/10.3390/polym14194226>
- Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Y., Kiselev, E. G., Shishatskaya, E., & Volova, T. G. (2023). Synthesis and Properties of Polyhydroxyalkanoates on Waste Fish Oil from the Production of Canned Sprats. *Processes*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/pr11072113>
- Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Yu., Kiselev, E. G., Vasiliev, A. D., Nemtsev, I. V., Shishatskaya, E. I., & Volova, T. G. (2021). Properties of Degradable Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Synthesized by a New Strain, *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1, from Various Carbon Sources. *Polymers*, *13*(18), 3142. <https://doi.org/10.3390/polym13183142>
- Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Yu., Kiselev, E. G., Vasiliev, A. D., Nemtsev, I. V., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Yu., Kiselev, E. G., Vasiliev, A. D., Nemtsev, I. V., Shishatskaya, E. I., & Volova, T. G. (2021). Properties of Degradable Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Synthesized by a New

Strain, *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1, from Various Carbon Sources. *Polymers* 2021, Vol. 13, 13(18). <https://doi.org/10.3390/POLYM13183142>

Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G. J. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management*, 341, 118033. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.118033>