

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**”ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE  
BIOMATERIALES SECRETADOS POR CEPAS TRANSFORMADAS  
DE *Saccharomyces cerevisiae*”**

TESIS  
QUE PRESENTA:

**LEOBARDO OTTMAR PALMA GALLARDO**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTOR DE LA TESIS: **DR. FERMÍN PÉREZ GUEVARA**

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

AGOSTO, 2018



## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DR. FERMÍN PÉREZ GUEVARA**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México D.F., México.

### **DR. FRÉDÉRIC THALASSO SIRET**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México D.F., México.

### **DR. RICARDO AGUILAR LÓPEZ**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México D.F., México.

### **DRA. ROSA ISELA CARBAJAL DE NOVA**

Departamento de Bioingeniería, UPIBI-IPN, México D.F., México.



## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el financiamiento del **Proyecto CONACYT Ciencia Básica 2014-01 (236285)** y del **Proyecto CONACYT Fronteras de la Ciencia 2015-1 (016)**, así como por otorgarme la **Beca de Maestría del CONACYT (613327)**.

Al **Dr. Fermín Pérez Guevara** por apoyarme, escucharme, comprenderme, corregirme, dirigirme, guiarme, financiarme, brindarme y conseguirme un lugar donde desarrollar un proyecto de maestría en mis áreas de interés y durante mi formación como IBT., M. en C. y futuro investigador. Así como por ser un líder durante el desarrollo experimental y escrito de esta tesis, seminarios, tutoriales y presentación en un congreso internacional.

A mis padres, el **M.C. Leobardo Palma Cortes** y a la **Nutr. Miriam Senorina Gallardo Mena**, mi hermana **Miriam Yaxkin Palma Gallardo**, por apoyarme durante mi desarrollo tanto académico como al desarrollar el presente trabajo experimental y escrito, además de brindarme experiencias inolvidables durante sus visitas. A mi pareja la **Dra. Elizabeth Selene Gómez Acata** por apoyarme y brindarme apoyo moral e intelectual y compañía durante mi formación como M. en C. y en la redacción de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, el **M. en C. Joel Alba Flores**, al **Técnico en Investigación Luis Francisco Flores Velazco**, al **Dr. Gurusamy Muniasamy** y a la **M. en C. Aracely Flores** por su apoyo, paciencia, enseñanza, guía y consejos durante el aprendizaje de las técnicas y desarrollo experimental para la elaboración de este proyecto, seminarios de investigación, mi formación como M. en C. y la redacción de la tesis.

A mis sinodales la **Dra. Rosa Isela Carvajal de Nova**, el **Dr. Frédéric Thalasso Siret** y el **Dr. Ricardo Aguilar López**, por sus consejos, aportes, sugerencias, revisiones y discusiones para integrar mis conocimientos durante el desarrollo experimental y escrito de este trabajo, así como para mi formación como M. en C.

A la IBT. **Mónica Paola Lozada Cruz** por su apoyo, compañía y amistad, durante mi formación como IBT. y M. en C, así como a mis compañeros de maestría el **IBT. Luis Eddy Castro**, la **IQ. Sara Luz Vera García**, el **IBT. Víctor German Rodríguez García** y el **IBT. Pablo Morales Rico**, por su amistad y compañía durante mi formación como M. en C.

Al **CINVESTAV-IPN** por brindarme un lugar donde elaborar el proyecto, así como una educación competitiva y una formación como futuro investigador.

A **UPIBI-IPN**, mi Alma Mater, por brindarme una educación y formación como profesionalista de calidad.

“La gente ama lo que la ciencia les brinda, pero no las preguntas que la ciencia hace”

**Mr. Ryzuki, Frankenweenie.**

“Un alma sana reside en un cuerpo sano y una mente sana”.

**Maka Albarn, Soul Eater.**

“A veces la ciencia es más arte... que ciencia”.

**Rick Sánchez, Rick & Morty.**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	3
1.1 Propiedades de los PHAs.....	5
1.2 Aplicaciones de los PHAs y NPs-PHA.....	6
1.3 Producción y obtención de NPs-PHAs a nivel laboratorio .....	7
2. Síntesis de PHAs mediante organismos transformados.....	8
2.1 Organismos procariontes transformados para la síntesis de PHAs .....	8
2.2 Organismos eucariontes transformados para sintetizar PHAs.....	9
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio para la producción de PHAs .....	9
2.3.1 Sistema de secreción de proteínas mediante vesículas en <i>S. cerevisiae</i> .....	10
2.3.2 Síntesis de (R)-HA-CoA en el citosol de <i>S. cerevisiae</i> .....	11
3. Modelo de la síntesis y secreción de NPs-PHAs mediante cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	12
3.1 Proteínas recombinantes para la síntesis de NPS-PHAs en <i>S. cerevisiae</i> .....	13
3.2 Proceso Bottom-up para la síntesis de NPs-PHAs en <i>S. cerevisiae</i> .....	14
ANTECEDENTES.....	16
1. Producción de PHAs mediante <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2. Expresión de una proteína quimérica anclada a la superficie de una vesícula de <i>S. cerevisiae</i> .....	17

3. NPs-PHAs.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVO .....	20
General.....	20
Específicos .....	20
MATERIALES.....	21
Microorganismos.....	21
Medios de cultivo .....	21
TÉCNICAS .....	22
1. Detección de PHAs por fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia.....	22
1.1 Tinción con Rojo Nilo empleando de cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	22
1.2 Microscopía de fluorescencia .....	22
1.2.1 Toma de fotografías de las muestras teñidas con Rojo Nilo.....	23
1.3 Intensidad de fluorescencia de las muestras teñidas con Rojo Nilo.....	23
2. Detección de NPs Por Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	24
3. Detección de NPs con recubrimiento de NPs de carbono por Microscopia Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM).....	25
3.1 Preparación de la superficie para fijar las muestras .....	25
3.2 Recubrimiento con NPs de carbono .....	25
4. Cuantificación de azúcares reductores (Miller, 1959).....	26
4.1 Preparación del reactivo DNS .....	26
4.2 Curva tipo.....	26



4.3 Preparación de las muestras.....	26
4.4 Preparación de* las muestras para su lectura .....	26
5. Cuantificación de biomasa por peso seco y densidad óptica.....	27
5.1 Peso seco .....	27
5.2 Densidad óptica .....	27
6. Cuantificación de etanol por cromatografía de gases.....	28
6.1 Curva tipo.....	28
6.2 Preparación de las muestras problema .....	28
7. Cuantificación de proteínas por absorbancia .....	29
7.1 Curva estándar.....	29
7.2 Preparación de las muestras problema .....	29
7.3 Preparación de las muestras para su lectura .....	29
8. Cuantificación de PHB Por UV-Vis.....	30
8.1 Preparación de las muestras.....	30
8.2 Curva tipo.....	30
8.3 Lectura de las muestras .....	30
9. Cuantificación y caracterización de PHA por Cromatografía de gases (Propanólisis ácida).....	31
9.1 Preparación de las muestras problema .....	31
9.2 Curva tipo.....	31
9.3 Digestión y lectura de las muestras.....	32

10. Lisis Mecánica .....	33
10.1 Preparación de las muestras.....	33
10. 2 Operación del equipo .....	33
11. Decantación por succión .....	34
11.1 Operación del equipo .....	34
METODOS .....	35
Etapa 0. Inóculo y fermentación a nivel Matraz.....	35
Etapa 1. Recuperación y detección.....	36
Etapa 2. Determinación y Cuantificación.....	36
NPs-PHAs Intracelulares.....	36
NPs-PHAs Extracelulares .....	38
Etapa 3. Comparación .....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
Detección y Determinación de partículas intracelulares de PHA .....	40
Detección y Determinación de partículas extracelulares .....	44
Comparación y análisis global de los resultados .....	49
CONCLUSIONES .....	50
PERSPECTIVAS A FUTURO .....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE LOS PHAS.....	3
FIGURA 2. SISTEMA DE TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL EXTERIOR POR MEDIO DE VESÍCULAS Y LOCALIZACIÓN DE LAS SNARE.....	10
FIGURA 3. METABOLISMO PRINCIPAL DE S. CEREVISIAE CUANDO CRECE A PARTIR DE GLUCOSA.....	11
FIGURA 4. MODELO PARA LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE S. CEREVISIAE RECOMBINANTE.....	12
FIGURA 5. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN DE NPS INTRACELULARES.....	37
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN DE NPS EXTRACELULARES.....	38
FIGURA 7. FOTOGRAFÍAS DE LAS CEPAS DE S. CEREVISIAE (A Y D ES WT, B Y E ES J26, C Y F ES J27) EN MICROSCOPIA ÓPTICA (HILERA SUPERIOR) Y CON UNA TINCIÓN CON ROJO NILO EN MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (HILERA INFERIOR).....	40
FIGURA 8. FOTOGRAFÍAS DE LAS CEPAS DE S. CEREVISIAE (A Y D ES WT, B Y E ES J26 Y C Y F ES J27) DESPUÉS DE REALIZAR LA LISIS CELULAR, EN MICROSCOPIA ÓPTICA (HILERA SUPERIOR) Y CON UNA TINCIÓN CON ROJO NILO EN MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (HILERA INFERIOR). ....	41
FIGURA 9. CROMATOGRAMAS PARA DETERMINAR LA COMPOSICIÓN DE LAS PARTÍCULAS INTRACELULARES DE LAS CEPAS DE S. CEREVISIAE (A Y D ES WT, B Y E ES J26 Y C Y F ES J27) AL TÉRMINO DE LA CINÉTICA (CORRIENTE CG B) Y AL SOBRENADANTE DESPUÉS DE REALIZAR LA LISIS CELULAR (CORRIENTE CG S) DESPUÉS DE REALIZARLES LA DIGESTIÓN CON PROPANOL ÁCIDO.....	43
FIGURA 10. FOTOGRAFÍAS TOMADAS MEDIANTE FE-SEM DE LAS CEPAS DE S. CEREVISIAE (A ES WT, B ES J26 Y C ES J27) Y DE SUS MEDIOS DE CULTIVO AL TÉRMINO DE LA FERMENTACIÓN (D ES WT, E ES J26 Y F ES J27), EN CÍRCULOS NEGROS SE RESALTAN LAS PARTÍCULAS ENCONTRADAS.....	44
FIGURA 11. CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES 2 (A), 7(B), 10 (C) Y 20 (D) DEL MEDIO DE CULTIVO AGOTADOS DE J27, EN UN RECTÁNGULO ROJO SE MUESTRA LA SEÑAL CORRESPONDIENTE AL PROPIL-HB.....	45
FIGURA 12. CROMATOGRAMAS DEL MEDIO DE CULTIVO INICIAL (A) Y DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS AGOTADOS DE LAS CEPAS DE S. CEREVISIAE WT (B), J26 (C) Y J27 (D), EN UN RECTÁNGULO ROJO SE MUESTRA LA SEÑAL CORRESPONDIENTE AL PROPIL-HV. ....	46
FIGURA 13. DLS DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS AGOTADOS (A ES WT, B ES J26, C ES J27) Y AL FILTRAR CON 0.22 μM (C ES WT, D ES J26 Y E ES J27).....	47
FIGURA 14. DLS DE LOS MEDIOS AGOTADOS (WT ES A J26 ES D Y J27ES G), CON EL PRIMER LAVADO (WT ES B, J26 ES E Y J27 ES H), CON EL SEGUNDO LAVADO (WT ES C, J26 ES F Y J27 ES I) .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN DE LOS RADICALES EN LOS MONÓMEROS DE PHAS A PARTIR DE SUSTRATOS CON SEIS CARBONOS. ....	4
TABLA 2. VARIACIÓN DE ALGUNAS DE LAS PROPIEDADES TERMOQUÍMICAS DEL PHB Y OTROS COPOLÍMEROS. DATOS OBTENIDOS DE CHEN AND WU (2005). ....	6
TABLA 3. DIFERENCIAS EN LAS CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	13
TABLA 4. CEPAS DE S. CEREVISIAE QUE SE HAN EMPLEADO PARA LA SÍNTESIS DE PHAS.....	16
TABLA 5. TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE NPS-PHAS MEDIANTE PROCESOS TOP-DOWN. ....	18
TABLA 6. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS A NIVEL MATRAZ.....	21
TABLA 7 DILUCIÓN DE BSA PARA LA CURVA ESTÁNDAR. ....	29
TABLA 8. DILUCIONES PARA CURVA TIPO DE PHB POR UV-VIS.....	30
TABLA 9. DILUCIONES PARA CURVA TIPO DE PHB POR CROMATOGRFÍA DE GASES. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Palabra</b>	<b>Abreviatura</b>
(R)-Hidroxiacil-Coenzima A	(R)-HA-Coa
(R)	Radical
Cepa Silvestre	Wt
Coenzima A	CoA
Cromatografía de Gases	CG
Cromatografía Líquida de Alta Presión	HLPC
Dispersión de Luz Dinámica	DLS
Dominio Transmembranal	DTM
Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier	FTIR
Hidroxibutirato	HB
Hidroxivalerato	HV
Microscopia Electrónica de Barrido de Emisión de Campo	FE-SEM
Nanopartículas	NPs
Nanopartículas de Polihidroxialcanoatos	NPs-PHAs
Polihidroxialcanoatos	PHA
Polihidroxibutirato	PHB
Polihidroxibutirato-hexanoato	PHBHHx
Polihidroxibutirato-valerato	PHBV
Polihidroxivalerato	PHV
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Ultravioleta	UV



## RESUMEN

El presente trabajo contribuye al estudio de la biosíntesis, localización y estandarización de la recuperación, detección y determinación de la composición de nanomateriales de biopolímeros en forma de Nanopartículas de Polihidroxicanoatos (NPs-PHA), las cuales fueron sintetizadas por la polimerización de monómeros mediante levaduras recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este estudio se emplearon tres cepas de *S. cerevisiae*, dos transformadas y la cepa nativa ATCC9763. Ambas cepas recombinantes, mediante sus plásmidos y la inducción con zeocina, expresan proteínas quiméricas en la superficie de la membrana de sus vesículas de secreción. Estas proteínas les confieren a las cepas la capacidad de polimerizar metabolitos de tipo (R)-hidroxil Coenzima A en la superficie de sus vesículas y de esta forma pueden sintetizar polihidroxicanoatos (PHAs). Las cepas recombinantes se emplearon para la síntesis NPs-PHA, mientras que la cepa nativa se utilizó como control negativo ya que esta levadura no produce PHAs de forma natural, ni bajo condiciones de inducción.

Para contribuir al estudio de la síntesis de nanopartículas (NPs), se desarrollaron diferentes protocolos para la recuperación y determinación (cualitativa, debido a la precisión de los equipos y técnicas probadas) de las NPs tanto intracelularmente como extracelularmente y se comparan los resultados de ambas cepas contra la cepa nativa.

Mediante los resultados del presente trabajo se demostró que; la PHA sintasa II en la proteína quimérica es funcional y polimeriza PHAs, la composición de las NPs-PHAs sintetizadas (acumuladas y secretadas) por ambos organismos recombinantes a partir de glucosa es similar, la expresión de proteínas quiméricas funcionales ancladas a vesículas de secreción de proteínas en levaduras se puede dar empleando cualesquiera de los dos dominios de anclaje SNARE-1 y SNARE-2, la viabilidad del modelo de síntesis de NPs-PHAs intracelulares vía Bottom-up y su secreción mediante organismos eucariontes que emplean una enzima recombinante inmovilizada en la superficie de sus vesículas de secreción.

## ABSTRACT

This work contributes to the study of the biosynthesis, localization and standardization of the recovery, detection and composition's determination of nano-biopolymers like Polyanhydroxyalkanoate Nanoparticles, which were intracellularly synthesized by a recombinant yeast of *Saccharomyces cerevisiae*.

This study used three strains of *S. cerevisiae*, two transformed and the native strain ATCC9763. Both recombinant strains, through their plasmids and under zeocin induction, express chimeric proteins at their secretory vesicles' membrane surface. These proteins allow the strains to polymerize metabolites such as (R)-hydroxyacyl-Coenzyme A at their vesicles surface, then they can synthesize polyhydroxyalkanoates (PHAs). Recombinant strains were used for PHA-nanoparticles synthesis, meanwhile the native strain was used as a negative control because this yeast does not produce PHAs naturally, either under induction conditions.

After biopolymer-based nanoparticles (NPs) synthesis, different protocols for their recovery and determination (qualitative, due to the accuracy of the equipment and techniques tested) of NPs both intracellularly and extracellularly were developed and the results of both strains compared against the native strain.

According to our results it was demonstrated that; PHA synthase II in the chimeric protein is functional and polymerizes PHAs, the composition of the PHAs NPs synthesized (accumulated and secreted) by both recombinant organisms from glucose is similar, so it is viable the expression of functional chimeric proteins anchored to secretory vesicles in yeast using either of the two SNARE-1 and SNARE-2 domains, the viability of the synthesis model of intracellular PHAs NPs by Bottom-up process and its secretion by eukaryotic organisms that employ a recombinant enzymes immobilized on their secretory vesicles surface.



# INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros son polímeros sintetizados mediante la acción de un organismo, al igual que los polímeros no biológicos, se conforman por unidades estructurales llamadas monómeros enlazadas covalentemente hasta formar estructuras complejas con un elevado peso molecular. Algunos biopolímeros tienen ramificaciones (Chandra and Rustgi, 1998; Kolybaba *et al.*, 2003; Avérous and Pollet, 2012).

Los biopolímeros se clasifican con base en la unidad monomérica que los conforma; algunos ejemplos de biopolímeros son: las proteínas formadas por aminoácidos, los polisacáridos formados por azúcares, los ácidos nucleicos, los politerpenos formados por terpenoides y los poliésteres como los polihidroxicanoatos (PHAs) (Chandra and Rustgi, 1998; Kolybaba *et al.*, 2003; Avérous and Pollet, 2012).

## 1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)

Los PHAs son poliésteres lineales, la unidad monomérica que los conforma son (R)-hidroxiácidos [(R)-HA] (Chandra and Rustgi, 1998; Novak, 2015). En la naturaleza su síntesis es biológica, mediante microorganismos procariontes que emplean enzimas de tipo PHA sintasas (Bugnicourt *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2014; Kalia, 2016). Estas enzimas polimerizan el grupo carboxilo (COOH) de un metabolito de tipo (R)-Hidroxiacil-Coenzima A [(R)-HA-CoA] con el grupo hidroxilo (-OH) de otro metabolito del mismo tipo, liberando H<sub>2</sub>O y Coenzima A (CoA) durante la polimerización y generando enlaces de tipo éster entre los monómeros de la cadena (Figura 1) (Peters, Becher and Rehm, 2007; Bugnicourt *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2014; Kalia, 2016).

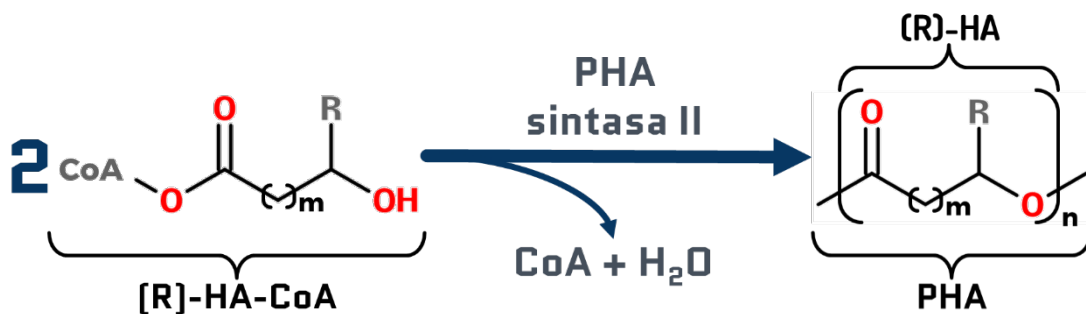


Figura 1. Síntesis y estructura de los PHAs.

Estos biopolímeros se producen y acumulan intracelularmente en forma de microgránulos (Bugnicourt *et al.*, 2014; Kalia, 2016), en microorganismos procariontes cuando se encuentran en condiciones limitantes de fósforo o nitrógeno, pero con carbono en exceso (Ojumu, Yu and Solomon, 2004; Chandra Kalia, 2016; Li, Yang and Loh, 2016), es decir que, son sintetizados como material de almacenamiento de carbono y energía bajo condiciones de estrés para el microorganismo (Gumel, Annuar and Chisti, 2013; Gumel, Annuar and Heidelberg, 2014; Tan *et al.*, 2014).

Tabla 1. Composición de los radicales en los monómeros de PHAs a partir de sustratos con seis carbonos.

PHAs	Momeros	# de Carbonos	Radical (R)
PHB	3-HB 4-HB	4	- CH <sub>3</sub> - H
PHV	3-HV 4-HV 5-HV	5	- CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub> - H
PHBV	3 y 4 -HB y 3, 4 y 5 -HV	4 y 5	- CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub> - H

**PHB: Polihidroxibutirato**

**PHV: Polihidroxivalerato**

**PHBV: Polihidroxibutirato-valerato**

Existe una gran variedad de PHAs debido a que cualquier cadena carbonada o sustituyente puede ser el radical (R) (Ward and O'Connor, 2005; Jutz and Böker, 2011). Los PHAs se nombran acorde con la cantidad de carbonos que presenta su monómero (Bugnicourt *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2014; Kalia, 2016) (Tabla 1) y se clasifican tomando en cuenta si en su cadena poseen uno o más tipos de monómeros diferentes; cuando sólo presentan un tipo se denominan homopolímeros o monopolímeros y si presentan más de uno se llaman

heteropolímeros o copolímeros (Chandra and Rustgi, 1998; Tan *et al.*, 2014; Novak *et al.*, 2015) (Tabla 1).

De los diferentes PHAs que existen el más abundante, naturalmente producido por microorganismos, es el homopolímero polihidroxibutirato (PHB), mientras que en cuanto a copolímeros lo es el polihidroxibutirato-valerato (PHBV) (Tan *et al.*, 2014; Novak *et al.*, 2015; Kalia, 2016) (Tabla 1).

### **1.1 PROPIEDADES DE LOS PHAs**

Entre las propiedades que poseen los PHAs, independientemente del radical (R) de sus unidades monoméricas están, la insolubilidad en agua debido a que no son polares (Steinbüchel and Valentin, 1995; Peters, Becher and Rehm, 2007) y la biocompatibilidad debido a que no generan una respuesta inmune (Shi, 2009; Jutz and Böker, 2011; Kwon *et al.*, 2014).

Adicionalmente, acorde con la composición del radical (R) de sus monómeros, las propiedades termoquímicas de los homopolímeros y copolímeros de PHAs varían (Tabla 2). Esto ha permitido que, mediante estrategias de ingeniería de polímeros y métodos biotecnológicos, sus propiedades se modifiquen para favorecer sus aplicaciones (Sudesh, Abe and Doi, 2000; Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Jutz and Böker, 2011; Kalia, 2016).

Algunas de las propiedades de los de PHAs que se modifican, mediante la inserción de la cadenas carbonadas más largas al radical (R) o de un mayor número de monómeros de diferente longitud en los copolímeros, son, su biocompatibilidad, es decir que atraviesen membranas de tejidos animales sin ser detectados (Chen and Wu, 2005; Shrivastav, Kim and Kim, 2013), biodegradabilidad aumentando o disminuyendo el tiempo en que se degradan al ser expuestas al medio ambiente o acción biológica (Jendrosseck, Schirmer and Schlegel, 1996; Ojumu, Yu and Solomon, 2004; García *et al.*, 2013; Shrivastav, Kim and Kim, 2013) o termoelasticidad mediante la ampliación de la diferencia entre las temperaturas de fusión y degradación (Chen and Wu, 2005), entre otras de sus propiedades termoquímicas (Tabla 2) (Chen and Wu, 2005).

Tabla 2. Variación de algunas de las propiedades termoquímicas del PHB y otros copolímeros. Datos obtenidos de Chen and Wu (2005).

<b>PHAs</b>	<b>Temperatura de cristalización [°C]</b>	<b>Resistencia a la tracción [MPa]</b>	<b>Elongación a la ruptura [%]</b>
<b>PHB</b>	177	43	5
<b>PHBV (10%)</b>	150	25	20
<b>PHBV (20%)</b>	135	20	100
<b>PHBHHx (10%)</b>	127	21	400
<b>PHBHHx (17%)</b>	120	20	850

**PHB: Polihidroxibutirato**

**PHBV (10%): Polihidroxibutirato (90%) - valerato (10%)**

**PHBV (20%): Polihidroxibutirato (80%) - valerato (20%)**

**PHBHHx (10%): Polihidroxibutirato (90%) - hexanoato (10%)**

**PHBHHx (17%): Polihidroxibutirato (83%) - hexanoato (17%)**

## 1.2 APLICACIONES DE LOS PHAs Y NPs-PHA

Actualmente existen múltiples aplicaciones potenciales de las partículas de polímeros y más recientemente de las nanopartículas de biopolímeros. Estas nuevas aplicaciones se deben a que las NPs presentan una elevada relación área superficial / volumen en comparación con micro y macropartículas (Bugnicourt *et al.*, 2014; Bouza *et al.*, 2016; Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016), lo que les permite encontrarse suspendidas o flotando en medios líquidos (Shi, 2009; Singh, 2016; Umesh *et al.*, 2017).

Debido a que las propiedades de los PHAs se pueden modificar, recientemente se ha explorado su uso en forma de NPs en áreas como: la biomedicina para el desarrollo de, matrices para crecer tejidos, suturas, tornillos; la entrega de medicamentos (Chen and Wu, 2005; Jutz and Böker, 2011; Huth, 2015; Zhang *et al.*, 2018); las tecnologías de alimentos para el desarrollo de membranas y matrices (Bouza *et al.*, 2016); la farmacéutica para la nano encapsulación y nano emulsión de compuestos activos (Rey, 2012; Joye and McClements, 2014; Li and Loh, 2017); la ingeniería de polímeros para el desarrollo de matrices, compositos y dendrímeros (Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016).

### **1.3 PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE NPs-PHAS A NIVEL LABORATORIO**

Las aplicaciones anteriormente mencionadas han fomentado al desarrollo y estudio de estrategias para la producción de NPs de biopolímeros. Actualmente existen dos estrategias físico-químicas para sintetizar NPs, la primera se denomina Top-Down, consiste en fragmentar un macro material hasta llevarlo a un tamaño nano; la segunda se conoce como Bottom-Up, consiste en la polimerización o agregación de monómeros hasta lograr el tamaño nano (Shi, 2009; Sahayaraj and Rajesh, 2011; Brayner and Fiévet, 2013). En ambas estrategias ya que se adquirieron las NPs se les da su aplicación final.

Las estrategias Top-Down para producir NPs de polímeros y biopolímeros emplean técnicas como la sonicación y ultra sonicación, la nano y micro emulsificación, la nanoprecipitación o la lisis mecánica, entre otras (Shi, 2009; Joye and McClements, 2014; Kwon *et al.*, 2014; Arroyo-Maya and McClements, 2015; Huth, 2015).

Para las estrategias Bottom-Up, sus técnicas de síntesis consisten en polimerizar monómeros o permitir el arreglo o acoplamiento de estructuras, sin embargo, la mayor limitante durante su producción, son las dificultades para controlar el tamaño de las NPs (Joye and McClements, 2014; Bouza *et al.*, 2016).

## **2. SÍNTESIS DE PHAS MEDIANTE ORGANISMOS TRANSFORMADOS**

Otro reto en la producción de PHAs mediante organismos biológicos es que éstos posean propiedades termoquímicas diferentes, lo cual se logra mediante la inserción de diferentes monómeros a los copolímeros de PHAs (Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Tan *et al.*, 2014; Novak *et al.*, 2015; Kalia, 2016). Para sintetizar los copolímeros de PHAs se han generado cepas transformadas, capaces de sintetizar copolímeros que posean una mayor cantidad y variedad de monómeros, con cadenas carbonadas más largas (Bugnicourt *et al.*, 2014; Gumel, Annuar and Heidelberg, 2014; Tan *et al.*, 2014; Novak *et al.*, 2015; Kalia, 2016; Li, Yang and Loh, 2016).

### **2.1 ORGANISMOS PROCARIONTES TRANSFORMADOS PARA LA SÍNTESIS DE PHAS**

Para crear nuevos copolímeros de PHAs, se han empleado diversas estrategias en organismos procariontes las cuales consisten principalmente en sobre expresar o inducir enzimas y cambiar las fuentes de carbono (Bugnicourt *et al.*, 2014; Gumel, Annuar and Heidelberg, 2014; Tan *et al.*, 2014; Koller and Rodríguez-Contreras, 2015; Novak *et al.*, 2015; Kalia, 2016).

En procariontes se han diseñado cepas que, son super productoras de PHAs mediante la sobreexpresión y/o delección de enzimas o modificando los criterios de alimentación y cinética de crecimiento mediante el uso de herramientas matemáticas y bioinformáticas (Peters, Becher and Rehm, 2007; Atlić *et al.*, 2011; Novak *et al.*, 2015), incorporan radicales con cadenas largas de 6, 8, 10 y 12 carbonos al modificar la fuente de carbono y sobreexpresar enzimas (Wu, Sheu and Lee, 2003; Simon-Colin *et al.*, 2012; Gumel, Annuar and Heidelberg, 2014; Novak *et al.*, 2015), incorporen radicales con estructuras no lineales al cambiar la fuente de carbono (Ward and O'Connor, 2005; Shrivastav, Kim and Kim, 2013).

## **2.2 ORGANISMOS EUCARIONTES TRASFORMADOS PARA SINTETIZAR PHAS**

Recientemente se han empleado organismos eucariontes para la producción de PHAs, con el objeto de estudiar los mecanismos de síntesis, la afinidad enzimática y probar nuevos mecanismos para incorporar diferentes monómeros en las cadenas (Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Tan *et al.*, 2014).

En los organismos eucariontes se emplea una de sus principales diferencias frente a los procariontes como una ventaja para la síntesis de PHAs: su sistema de endomembranas, es decir que se emplean los organelos que poseen los cuales están delimitados por una membrana bifosfolipídica (Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Kalia, 2016). Esta diferencia evolutiva permite a los eucariontes expresar rutas metabólicas que únicamente ocurren en ciertos organelos, donde el flujo de ciertos metabolitos (p.e. (R)-HA-CoA) se ve favorecido (Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001a; Zhang, Carlson and Srienc, 2006).

Los estudios para la síntesis de PHAs en levaduras se han centrado en demostrar y mejorar la producción de PHB y PHBV en el citosol (Abd-El-Haleem, 2009; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Sandström *et al.*, 2015) o en aumentar la longitud de los radicales al sintetizarlos en los peroxisomas, donde ocurre la fragmentación de ácidos grasos mediante la  $\beta$ -oxidación, lo que favorece el flujo de (R)-HA-CoA de cadenas largas (Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001b; Robert *et al.*, 2005; Zhang, Carlson and Srienc, 2006).

## **2.3 *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAS**

Esta levadura se emplea debido a que, es un microorganismo modelo para el estudio de eucariontes, es de fácil transformación y conservación del plásmido (Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001a; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014; Kalia, 2016), su crecimiento es fácil y rápido en medio enriquecidos y minerales (Melchy *et al.*, 2000; Breuer *et al.*, 2002; Ramon-Portugal, Pingaud and Strehaiano, 2004; Kalia, 2016; Palma Gallardo, 2016), su maquinaria metabólica y enzimática han sido y son muy estudiadas y conocidas (Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Christen and Sauer, 2011; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Kajihata *et al.*, 2015), su sistema de endomembranas le permite tener un mecanismo de movilización y secreción de proteínas mediado por vesículas (Bennett

and Scheller, 1993; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014), y puede sintetizar metabolitos de tipo (R)-HA-CoA en su citosol y en peroxisomas (Breuer *et al.*, 2002; Kocharin *et al.*, 2012; Sandström *et al.*, 2015).

### 2.3.1 SISTEMA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE VESÍCULAS EN *S. cerevisiae*

Los organismos eucariontes como las levaduras, de forma natural poseen un sistema de endomembranas, es decir que poseen compartimentos u organelos separados del citosol por una capa bifosfolipídica. Este sistema posee un mecanismo para el transporte intracelular, de un organelo con membrana a otro, o la secreción de materiales (ilustrado en la Figura 2), empleando vesículas (Bennett and Scheller, 1993). Estas vesículas nacen el aparato de Golgi y viajan hasta la membrana correspondiente de cualquier organelo con la que se van a fusionar (Söllner *et al.*, 1993), para dirigir a las vesículas a la membrana objetivo y permitir la fusión se requiere de un sistema proteico de señalización: las Proteínas Receptoras de tipo SNAP (SNARE) (Rothman, 1994).

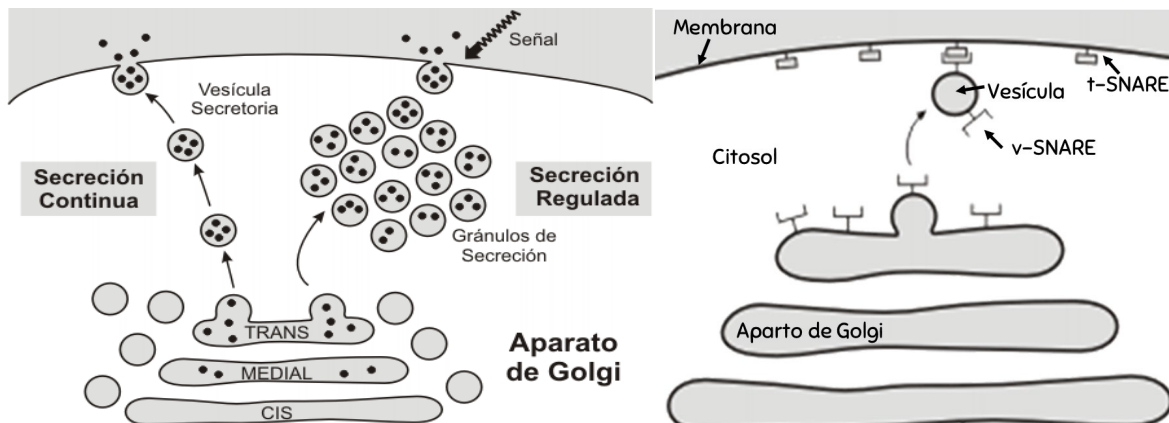


Figura 2. Sistema de transporte de proteínas al exterior por medio de vesículas y localización de las SNARE.

Particularmente las vesículas de secreción de proteínas se fusionan con la membrana plasmática utilizando las proteínas SNARE complementarias v-SNARE (localizadas en las vesículas) y las t-SNARE (situadas en la membrana) (Söllner *et al.*, 1993; Grote *et al.*, 1995), ilustrado en la fig. 2. Cuando se reconoce el conjunto v-SNARE /t-SNARE ocurre una



cascada de acciones proteicas que permiten la fusión de las membranas, liberando el contenido de la vesícula al exterior de la célula (Grote *et al.*, 1995) (Figura 2).

### 2.3.2 SÍNTESIS DE (R)-HA-CoA EN EL CITOSOL DE *S. cerevisiae*

Las levaduras como *S. cerevisiae* no sintetizan PHAs de forma natural ni bajo condiciones limitantes de crecimiento debido a que no poseen enzimas de tipo PHA sintasas, en contraste con los microorganismos procariontes que los producen (Bugnicourt *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2014). A pesar de esto, analizando las rutas metabólicas, *S. cerevisiae* cuenta con la maquinaria enzimática necesaria para producir metabolitos de tipo (R)-HA-CoA, los cuales son precursores para la síntesis enzimática de PHAs (Robert *et al.*, 2005; Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Kocharin *et al.*, 2012; Sandström *et al.*, 2015) (Figura 3).

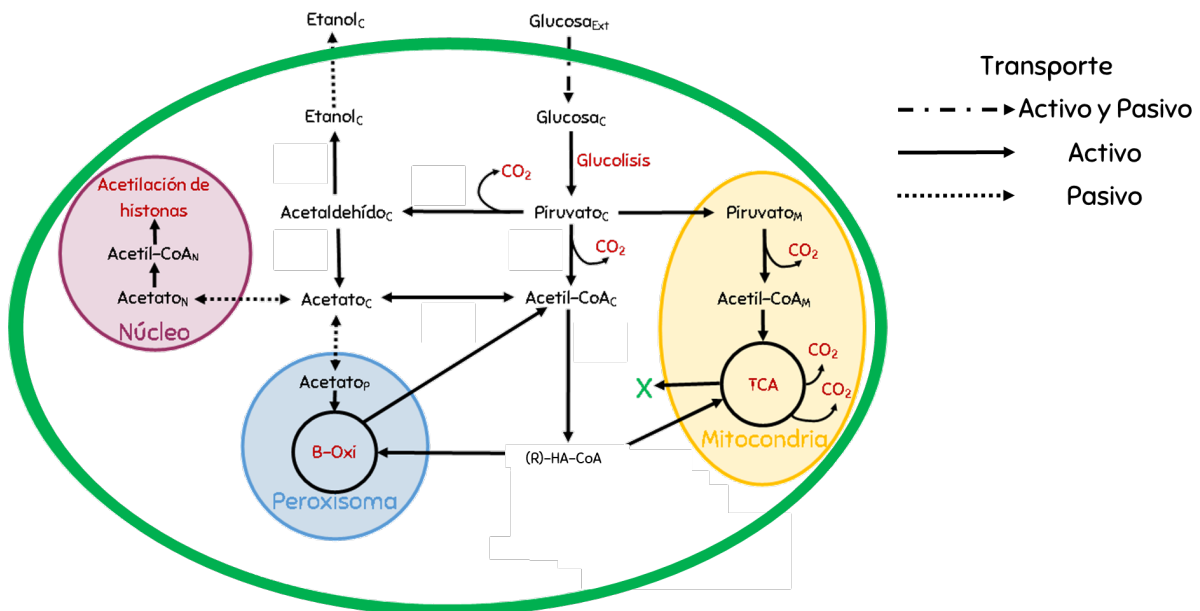


Figura 3. Metabolismo principal de *S. cerevisiae* cuando crece a partir de glucosa.

Como se ilustra en la Figura 3, la síntesis de los metabolitos de tipo (R)-HA-CoA está asociada directamente al crecimiento debido a que éstos se producen después de la glucólisis (Kocharin *et al.*, 2012; Sandström *et al.*, 2015), durante la respiración celular (Breuer *et al.*, 2002; Christen and Sauer, 2011) o durante la síntesis y degradación de ácidos grasos (Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001a; Robert *et al.*, 2005). También podemos observar en la Figura 3 que durante el crecimiento de las levaduras la

síntesis de etanol es activa, lo que se conoce como efecto Crabtree (De Deken, 1966; Pfeiffer and Morley, 2014; Kajihata *et al.*, 2015).

Partiendo de sustratos con un esqueleto de seis carbonos, como la glucosa, durante el crecimiento de la levadura se crean metabolitos como el Hidroxibutiril-CoA y el Hidroxivaleril-CoA en su citosol (Kocharin *et al.*, 2012; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Sandström *et al.*, 2015). De esta forma la levadura tiene el potencial de sintetizar PHAs en el citosol que podrían componerse por monómeros de HB y HV (Kocharin *et al.*, 2012; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Sandström *et al.*, 2015).

### 3. MODELO DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE NPS-PHAS MEDIANTE CEPAS TRANSFORMADAS DE *S. cerevisiae*

Para sintetizar NPs-PHAS por un proceso Bottom-Up, mediante la polimerización de monómeros, en el trabajo de Muniasamy (2014) se generaron dos cepas recombinantes a partir de *S. cerevisiae* ATCC9763, la cepa *S. cerevisiae* J26 y *S. cerevisiae* J27 en adelante J26 y J27 respectivamente, empleando los plásmidos pKmJ26 y pKmJ27 respectivamente como se explica en la Tabla 3.

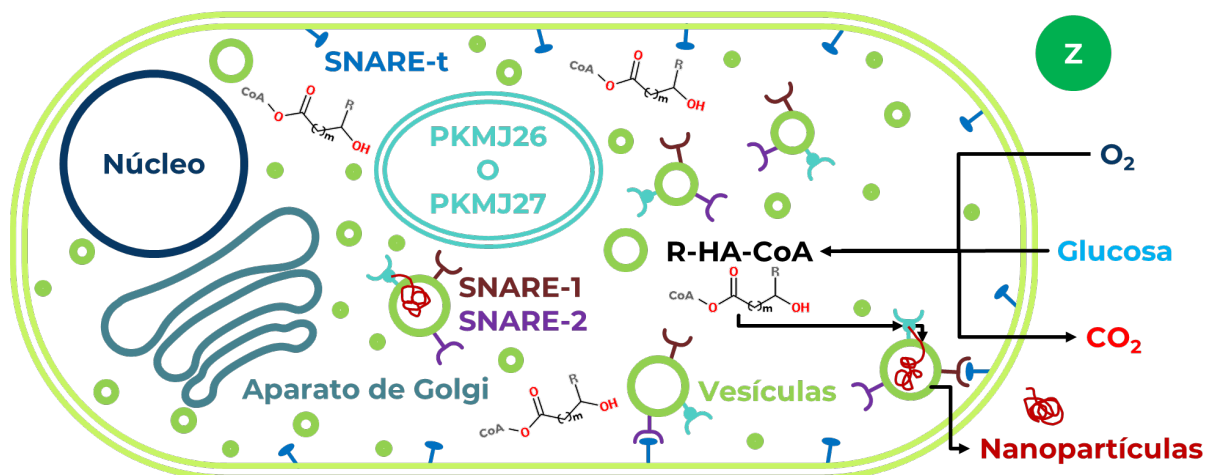


Figura 4. Modelo para la síntesis y secreción de nanopartículas mediante *S. cerevisiae* recombinante.


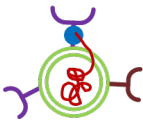

De esta forma ambas cepas recombinantes, J26 y J27, expresan las enzimas quiméricas phaC2-SNARE-2 y phaC2-SNARE-1 respectivamente, en la superficie de membrana de sus vesículas de secreción de proteínas con dirección al citosol (Muniasamy and Pérez-

Guevara, 2014). Estas proteínas recombinantes les confieren a las cepas la capacidad de polimerizar los metabolitos de tipo (R)-HA-CoA que se encuentren libres en el citosol (Tan *et al.*, 2014; Sandström *et al.*, 2015; Kalia, 2016) en la superficie de sus vesículas de secreción de proteínas (Peters, Becher and Rehm, 2007; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014).

De esta forma las cepas recombinantes, al expresar las enzimas recombinantes, pueden sintetizar PHAs y debido al transporte de las vesículas para secretar proteínas (Bennett and Scheller, 1993; Grote *et al.*, 1995), las partículas de PHA sintetizadas serían de tamaño nano y serían expulsadas al medio de cultivo, como se ilustra en la fig. 4.

### 3.1 PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA LA SÍNTESIS DE NPS-PHAS EN *S. cerevisiae*

Tabla 3. Diferencias en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

	ATCC9763 (Wt)	J26	J27
Expresa enzima recombinante	No	DTM de SNARE 2	DTM de SNARE 1
		PhaC2	PhaC2
		H-H de SNARE 2	H-H de SNARE 1
Plásmido	No	PKMJ26	PKMJ27
Produce biomaterial	No	Si, No Caracterizado	Si, No Caracterizado
Marcador de Selección	No	Zeocina	Zeocina
Vesícula (nanoreactor)			

Wt: cepa nativa de *S. cerevisiae*  
 J26: recombinante de *S. cerevisiae* J26  
 J27: recombinante de *S. cerevisiae* J27

Para lograr la síntesis y secreción de los nanomateriales, estas enzimas quiméricas poseen 3 estructuras o dominios funcionales, en la tabla 3 se ilustran las diferencias de las cepas desarrolladas en el trabajo de Muniasamy (2014).

El dominio transmembranal (DTM) de anclaje a la membrana de las vesículas de secreción de proteínas, de las proteínas SNARE-1 o SNARE-2 (Söllner *et al.*, 1993; Grote *et al.*, 1995). La secuencia de la enzima PHA sintasa II, proveniente de *Pseudomonas putida*, que no ha sido aún caracterizada debido a que corresponde a un gen homólogo putativo (Peters, Becher and Rehm, 2007; Muniasamy, 2014; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014). Los dos dominios Helicoidales (H1 y H2) de las SNARE-1 o SNARE-2 asociados al reconocimiento de membranas para iniciar la unión de la vesícula con la membrana plasmática (Rothman, 1994; Grote *et al.*, 1995).

### **3.2 PROCESO BOTTOM-UP PARA LA SÍNTESIS DE NPs-PHAs EN *S. cerevisiae***

Debido al bajo tiempo y distancia recorridos durante el transporte natural de las vesículas desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática (Bennett and Scheller, 1993; Grote *et al.*, 1995), y a que la síntesis de este biomaterial ocurre mediante la polimerización de monómeros, las partículas de PHA podrían tener una dimensión nano de forma tal que este proceso de producción sería de tipo Bottom-Up mediante un organismo (Figura 4), lo que representa una novedad con respecto a los procesos actuales para la síntesis de NPs-PHAs mediante procesos Bottom-Up, que se ilustran en la Tabla 5.

A causa del origen de los (R)-HA-CoA, en estas cepas la producción de las NPs-PHAs está asociada al crecimiento y la longitud de los monómeros depende únicamente de fuente de carbono (Robert *et al.*, 2005; Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Kalia, 2016). En este sistema de producción no se requieren de condiciones limitantes para su formación (Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014; Palma Gallardo, 2016), en contraste con los organismos procariontes (Tan *et al.*, 2014; Novak *et al.*, 2015; Kalia, 2016).

Todo esto deriva en tres novedades para la producción de NPs-PHAs mediante organismos eucariontes que emplean una enzima recombinante inmovilizada en la superficie de la vesícula (Muniasamy, 2014; Palma Gallardo, 2016). Primero, la expresión y funcionalidad de la enzima quimérica anclada a la superficie de una vesícula de secreción de proteínas

(Muniasamy, 2014; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014). Segundo, un nuevo modelo para sintetizar NPs por un proceso Bottom-up mediante levaduras recombinantes (Muniasamy, 2014; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014; Palma Gallardo, 2016). Tercero, la naturaleza termoquímica de los nanomateriales que son sintetizados, acumulados y secretados en forma amorfa.

## ANTECEDENTES

### 1. PRODUCCIÓN DE PHAS MEDIANTE *S. cerevisiae*

Algunos de los estudios que han demostrado la viabilidad de producir PHAs en *S. cerevisiae* se presentan en la Tabla 4, así como la estrategia empleada para su síntesis.

Tabla 4. Cepas de *S. cerevisiae* que se han empleado para la síntesis de PHAs.

Cepa	[mg <sub>PHA</sub> /g <sub>X</sub> ]	Genes	Expresión	Sustrato [g/L]
D603 <sup>1</sup>	0.2 a 1 x10 <sup>-2</sup>	<i>PhbC Alcaligenes eutrophus</i>	Citosol	Galactosa [20]
INVSc1 <sup>2</sup>	4.3 a 4.9	<i>PhaC1</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Peroxisoma	Ác. Oleico [1]
D603 <sup>3</sup> YPH499 <sup>3</sup> pex5-3c11 <sup>3</sup> YPH500 <sup>3</sup> pex5-16-2 <sup>3</sup> BY4743 <sup>3*</sup> wt-16-4 <sup>3</sup> BY4743 -YDR244W <sup>3*</sup> BY4741-YIL160C <sup>3</sup>	0.15 a 1.3	<i>PhaC</i> de ( <i>P. oleovorans</i> ) - <i>PST1</i> . <i>PhbC</i> ( <i>Cupriavidus necator</i> ) - <i>PST1</i>	Peroxisoma *Citosol	Ác. Láurico [0.5]
CEN.PK113-11C <sup>4 y 5</sup>	5.3 a 10	<i>PhaA</i> , <i>PhaB</i> y <i>PhaC</i> de <i>C. necator</i>	Citosol	Glucosa [20]
TMB 4440 <sup>6</sup> TMB 4443 <sup>6</sup> TMB 4444 <sup>6</sup>	4.9	<i>PhaA</i> , <i>PhaB1</i> , y <i>PhaC1</i> de <i>C. necator</i>	Citosol	Xilosa [15]

1. Leat et al., 1996;
2. Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001;
3. Zhang, Carlson and Srienc, 2006;
4. Kocharin et al., 2012;
5. Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013;
6. Sandström et al., 2015

Los estudios presentados en la tTabla 4 revelaron que la producción de PHAs en organismos eucariontes, como las levaduras es muy baja en comparación con las cepas procariontes productoras de PHAs que se emplean a nivel laboratorio. Sin embargo, también demostraron que es posible incorporar monómeros de diferentes longitudes a los PHAs (Poirier, Erard and MacDonald-Comber Petétot, 2001b; Zhang, Carlson and Srienc, 2006; Kocharin *et al.*, 2012; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Sandström *et al.*, 2015). Ninguno de estos estudios se enfocó en producir NPs-PHAs o estudiar su distribución de tamaño o propiedades.

## **2. EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA ANCLADA A LA SUPERFICIE DE UNA VESÍCULA DE *S. cerevisiae***

En el trabajo de Muniasamy & Pérez Guevara, 2014, se generaron dos 2 cepas recombinantes, la J26 y la J26-GFP que expresan las proteínas recombinantes SNARE-2-phaC2 y la SNARE-2-phaC2-GFP respectivamente. La cepa J26-GFP posee el dominio GFP al final de la proteína, con lo que se verificó que la expresión de las proteínas recombinantes tiene lugar en la superficie de la vesícula (Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014).

Empleando ambas cepas, este estudio demostró que la expresión de proteínas recombinantes en la superficie de la vesícula de secreción de proteínas, empleando el dominio de anclaje de las SNARE-2, es posible sin que exista una modificación o inhibición en el transporte y secreción de proteínas o en el crecimiento de *S. cerevisiae* (Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014).

## **3. NPs-PHAs**

Hasta el momento la forma de producir NPs-PHAs es mediante procesos Top-Down (físicos o químicos) como los que se mencionan en la Tabla 5. Con la información presentada en la Tabla 5 y el análisis de los artículos mencionados en ésta, verificamos que hasta la fecha no hay estudios para producir NPs-PHAs mediante un proceso Bottom-Up biológico.

Respecto a la producción de NPs-PHAs mediante las cepas recombinantes que se emplearan en este estudio, en las tesis de Muniasamy (2014) y de Palma Gallardo (2016), se trabajó con la cepa J26, y se observó que las muestras contienen demasiadas interferencias para poder analizarlas por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Cromatografía Líquida de Alta Presión (HLPC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) u otras técnicas de caracterización de polímeros que requieren un elevado nivel de pureza.

*Tabla 5. Técnicas para la obtención de NPs-PHAs mediante procesos Top-Down.*

<b>Método</b>	<b>Tamaño de las NPs [nm]</b>	<b>Referencia</b>
Ultrasonificación y nanoemulsificación	280 a 360	Umesh <i>et al.</i> , 2017
Nanofibras	50 a 500	Zhang <i>et al.</i> , 2018
Impresión 3D de soportes	No dato	Zhang <i>et al.</i> , 2018
Nanoprecipitación, evaporación de solventes, miniemulsificación	43 a 306	Huth, 2015

Estas interferencias posiblemente sean proteínas, sales y otros compuestos orgánicos asociados al medio de cultivo (inicia con polipeptona [10 g/L] y extracto de levadura [10 g/L], ilustrado en la tabla 6) y a los componentes extracelulares de la biomasa. Esto ocasiona que éste sea el primer estudio de la producción de NPs-PHAs mediante un proceso Bottom-Up biológico, en el que se probaran protocolos para purificar las NPs-PHAs.



## JUSTIFICACIÓN

Al inmovilizar enzimas recombinantes funcionales en la superficie de sus vesículas es posible emplear las vesículas *S. cerevisiae* como nanoreactores en el interior de la célula, con el objetivo de sintetizar nanopartículas (Bottom-Up) aprovechando el transporte natural de secreción de proteínas de las levaduras, permitiendo plantear el desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis de NPs mediante la Bionanotecnología.

## HIPÓTESIS

Ambas cepas recombinantes, J26 y J27, al expresar una de las proteínas recombinantes funcionales SNARE-2-PhaC2 o SNARE-1-PhaC2 en la superficie de sus vesículas de secreción de proteínas, sintetizarán, acumularán y secretarán las mismas nanopartículas biodegradables de PHAs a partir de glucosa como fuente de sustrato.

En ambos casos, la proteína quimérica la región correspondiente a la PHA sintasa II será funcional y producirá PHAs por polimerización.

El modelo de síntesis de NPs-PHAs intracelulares vía Bottom-up y su secreción mediante organismos eucariontes empleando una enzima recombinante inmovilizada en la superficie de sus vesículas de secreción de proteínas es idénticamente funcional en ambas cepas.

## OBJETIVO

### GENERAL

Comparar la producción y recuperación de Nanopartículas entre las cepas de *S. cerevisiae*, transformadas y silvestre.

### ESPECÍFICOS

- Localizar las nanopartículas intracelulares y extracelulares al término de la fermentación.
- Desarrollar un protocolo de extracción y recuperación de las nanopartículas intracelulares.
- Desarrollar un protocolo de recuperación las nanopartículas extracelulares.
- Establecer la composición de las nanopartículas mediante Cromatografía de Gases.

## MATERIALES

### MICROORGANISMOS

Cepa silvestre (Wt): *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

Cepas transformadas: *Saccharomyces cerevisiae* J26 (Muniasamy, 2014; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014; Palma Gallardo, 2016) y *Saccharomyces cerevisiae* J27 (Muniasamy, 2014) que se diferencian por la proteína quimérica que expresan, conforme se muestra en la Tabla 3.

### MEDIOS DE CULTIVO

Tabla 6. Medios de cultivo empleados a nivel matraz.

YPD	g/L	YPD adicionado con Zeocina	g/L
Glucosa	15	Glucosa	15
Extracto de levadura	10	Extracto de levadura	10
Polipeptona	10	Polipeptona	10
pH 7		Zeocina	0.075
		pH 7	

Como se muestra en la tabla 6, el medio YPD se empleó para las fermentaciones con la sepa silvestre *S. cerevisiae* ATCC 9763 y el medio YPD adicionado con Zeocina se empleó para los cultivos con las cepas transformadas J26 y J27 debido a que la Zeocina es su marcador de selección (Muniasamy, 2014; Muniasamy and Pérez-Guevara, 2014; Palma Gallardo, 2016).

# TÉCNICAS

## 1. DETECCIÓN DE PHAS POR FLUORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El fluorocromo Rojo Nilo, es afín a moléculas lipídicas, permitiendo observar estructuras como las membranas y a los PHAs mediante microscopía de fluorescencia (Gorenflo *et al.*, 1999; Wu, Sheu and Lee, 2003; Saranya *et al.*, 2012; Zuriani *et al.*, 2013; Rumin *et al.*, 2015).

### 1.1 TINCIÓN CON ROJO NILO EMPLEANDO DE CEPAS DE *S. CEREVISIAE*

- 1) Lavar la biomasa tres veces con solución salina [0.85%].
- 2) Añadir 5 µl de colorante Rojo Nilo (25 mg/ml) a 1 ml [1 g/L] de muestra de biomasa lavada.
- 3) Incubar en oscuridad por 10 min.
- 4) Centrifugar a 12000 rpm, 10 min, 4°C, recuperar el pellet y resuspenderlo en solución salina al 0.85 %.

La muestra está lista para observarse en fresco mediante microscopía óptica y de fluorescencia o para leerse en un fluorómetro (Gorenflo *et al.*, 1999; Spiekermann *et al.*, 1999; Wu, Sheu and Lee, 2003; Zuriani *et al.*, 2013).

### 1.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La muestra teñida (Tinción con Rojo Nilo) se coloca sobre un portaobjetos limpio y se le coloca un cubreobjetos, es necesario encender la lámpara de fluorescencia 15 min antes de observarlas. Se procede a enfocar las levaduras por microscopía óptica (Microscopio Vertical Nikon, ECLIPSE Ci – S), una vez enfocadas a 40x, se cierra el paso de la luz, se coloca el filtro rojo (576-644 nm) y se abre el paso del haz de luz Ultravioleta (UV). Ahora se pueden observar las estructuras lipídicas (membranas y PHAs) que flourezcan (Gorenflo *et al.*, 1999; Spiekermann *et al.*, 1999; Wu, Sheu and Lee, 2003; Saranya *et al.*, 2012), si las muestras poseen mucha fluorescencia es necesario utilizar los filtros de atenuación de luz UV (ND), para disminuir el paso del haz de luz y observar las muestras mejor.

### **1.2.1 TOMA DE FOTOGRAFÍAS DE LAS MUESTRAS TEÑIDAS CON ROJO NILO**

Una vez enfocadas las muestras en el microscopio se empleó el programa Imagepro® para tomar la fotografía de las muestras, con la cámara (Evolution VF, cooled colors de MediaCybernetics®) acoplada al microscopio, y colocar las barras de medición. Hay que poner el filtro ND apropiado según la intensidad de la fluorescencia, estos filtros nos permiten que pase menos luz a la muestra permitiendo que se observe por mayor tiempo la fluorescencia emitida por el Rojo Nilo (Gorenflo *et al.*, 1999; Spiekermann *et al.*, 1999).

En este trabajo se emplearon los filtros ND8 (pasa el 50% de la luz) con 50 ms de tiempo de exposición para la cepa nativa y el ND16 (pasa el 25% de la luz) con 100 ms de tiempo de exposición para las recombinantes.

### **1.3 INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LAS MUESTRAS TEÑIDAS CON ROJO NILO**

En las muestras teñidas con Rojo Nilo se puede cuantificar la fluorescencia empleado un fluorómetro y realizando un barrido de emisión [450-550 nm] y excitación [550-650 nm] para encontrar las señales o el pico de la asociación del Rojo Nilo con los PHAs (Gorenflo *et al.*, 1999; Wu *et al.* 2003; Saranya *et al.*, 2012; Zuriani *et al.*, 2013).

## 2. DETECCIÓN DE NPs POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

La técnica de DLS permite determinar el tamaño de NPs en suspensión mediante el uso de un haz de luz (Krahn, Schweiger and Lucas, 1983; Block and Scheffold, 2010; Malvern Instruments, 2013; MALVERN, 2014). Esta técnica únicamente es cualitativa (Berry and Cotts, 1999; Malvern Instruments, 2013).

Se emplearon las siguientes condiciones en el programa del equipo Malvern SZ (Krahn, Schweiger and Lucas, 1983; Berry and Cotts, 1999; Malvern Instruments, 2013):

- Medio dispersante (RI): 1.331
- Viscosidad del medio dispersante [cP]: 0.97
- Material (RI): 1.59
- Absorción del material: 0.01
- T [°C]: 25

Se colocan 1.5 ml de la muestra en las celdas del SZ sizer, Malvern Panalytical®, se le indica al programa que realice las mediciones por triplicado y se procede con la lectura.

Los resultados que se obtienen son los siguientes: Ø de partícula, % de intensidad de la señal y desviación estándar de la lectura.

### **3. DETECCIÓN DE NPs CON RECUBRIMIENTO DE NPs DE CARBONO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FE-SEM)**

Esta técnica nos permite observar estructuras micro y nanométricas, como las levaduras a y NPs; las muestras se observaron mediante un FE-SEM (AURIGA 316 con columna GEMINI) a 0.7 kV posterior a un recubrimiento con NPs de carbono (Agnihotri *et al.*, 2009; Rimmer and Wang, 2010) .

#### **3.1 PREPARACIÓN DE LA SUPERFICIE PARA FIJAR LAS MUESTRAS**

- 1) Cortar cuadros de aluminio de 0.5 cm de lado.
- 2) Lavar tres veces con H<sub>2</sub>O bidestilada y tres veces con etanol al 90 %.
- 3) Dejar secar en un horno a 50°C por 24 h.

Para fijar la muestra de interés colocar 5 µl de muestra en el centro del aluminio y dejar secar en una caja Petri cerrada a temperatura ambiente por 24 h (Agnihotri *et al.*, 2009; Rimmer and Wang, 2010; Singh, 2016).

#### **3.2 RECUBRIMIENTO CON NPs DE CARBONO**

- 1) Colocar las muestras fijadas en el aluminio en la cámara de vacío de equipo SPI-MODULE™ Control de SPI® supplies, a una distancia de una pulgada del electrodo de carbono.
- 2) Abrir el vacío y esperar 1 min, purgar con argón y repetir el procedimiento 4 veces.
- 3) Una vez purgado el sistema, regular vacío a 0.1 torr.
- 4) Pasar corriente constante a 5v en el filamento de carbono durante 2 min, se empleó el equipo SPI-MODULE™ Carbon Coater de SPI® supplies.
- 5) Dar un pulso a 8v hasta que reviente el filamento.

Las muestras se encuentran listas para ser observadas por SEM o FE-SEM.

## **4. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (MILLER, 1959)**

### **4.1 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS**

Mezclar los siguientes reactivos en un total de 1416 ml de H<sub>2</sub>O:

- 12.8 g de NaOH
- 10.6 g de 3-5 dinitrosalicílico
- 7.6 g de fenol fundido
- 306 g de tartrato doble de sodio y potasio
- 8 g de metabisulfito de sodio

Todas las muestras para determinación de azúcares reductores con DNS se deben realizar por triplicado.

### **4.2 CURVA TIPO**

- 1) Pesar 5 g de glucosa y secar en el desecador por 1 día.
- 2) Pesar 1 g de glucosa y diluirla en 1 litro de agua bidestilada.
- 3) Realizar diluciones para obtener 5 concentraciones para la curva tipo (1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 g/L).

### **4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

- 1) Centrifugar 1 ml de muestra en un tubo de 1.5 ml a 7,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 2) Diluir con agua bidestilada el sobrenadante de acuerdo con la concentración de azúcares esperada.
- 3) Colocar 1 ml de la dilución en tubos con tapón de rosca y un blanco con H<sub>2</sub>O bidestilada.

### **4.4 PREPARACIÓN DE\* LAS MUESTRAS PARA SU LECTURA**

- 1) Agregar 1.5 ml de DNS a cada uno en los tubos, problema, curva tipo y blanco.
- 2) Colocar en baño maría con agua en ebullición durante 10 min.
- 3) Enfriar a 25 °C y añadir 7.5 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.
- 4) Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 535 nm.



## 5. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA POR PESO SECO Y DENSIDAD ÓPTICA

### 5.1 PESO SECO

Se numeran y secan placas de vidrio durante un día en un desecador. Al término de este tiempo se pesan.

Se utiliza el volumen necesario de muestra dependiendo de la etapa del cultivo (mínimo 5 ml) y a partir de estos:

- 1) Centrifugar en tubos cónicos de 15 ml a 7500 rpm a 4°C durante 15 min.
- 2) Recuperar el sobrenadante para hacer otras determinaciones, el pellet se resuspende y lava 3 veces con solución salina al 0.85%.
- 3) Transferir el pellet resuspendido a la placa de vidrio y se deja secar en un horno a 50°C durante 24 h.
- 4) Pesar las placas con biomasa.

La biomasa se determina por diferencia de peso (Kocharin *et al.*, 2012; Kocharin, Siewers and Nielsen, 2013; Baek *et al.*, 2016), y se divide entre el volumen inicial de la muestra, para reportar los gramos de biomasa por litro de medio de cultivo [g/L].

### 5.2 DENSIDAD ÓPTICA

A partir de 1 ml de muestra:

- 1) Centrifugar a 7500 rpm a 4 °C durante 15 min.
- 2) Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet solución salina al 0.85%, repetir este paso tres veces.
- 3) Medir absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm, empleando solución salina al 0.85% como blanco (Baek *et al.*, 2016; Thermo Scientific, 2016).

## **6. CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

El cromatógrafo de gases (Gas Chromatograph SRI 8610C, marca: SRI®) con la columna empacada (CHROMOSORB W-AW 80/100) se opera isotérmicamente a 171 °C durante 15 min con un Detector de Flama Ionizante (FID).

La curva tipo y las muestras se analizan por triplicado, se inyectan 0.2 µL de muestra para su lectura en el cromatógrafo.

### **6.1 CURVA TIPO**

- 1) Realizar diluciones para obtener 5 puntos en la curva tipo a 2.5, 2, 1.5, 1 y 0.5 g/L de etanol, en 1 ml.
- 2) Adicionar Isobutanol a 1 g/L, como estándar interno.

### **6.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA**

- 1) Centrifugar 1 ml de muestra en un tubo de 1.5 ml a 7,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 2) Diluir el sobrenadante, con H<sub>2</sub>O, de acuerdo con la concentración de etanol esperada.

## 7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ABSORBANCIA

Las proteínas se pueden determinar mediante el programa “proteínas 205” del Nanodrop One C® (Thermo Scientific, 2016). Se emplea el pedestal para medir la concentración de proteínas, a partir de 2  $\mu$ L de muestra, todas las muestras se deben trabajar por triplicado.

### 7.1 CURVA ESTÁNDAR

- 1) Pesar 0.05 g de Albumina de Suero Bovino (BSA).
- 2) Adicionar a 500 ml de agua bidestilada hasta que se disuelvan bien, la concentración final será de 100 mg de BSA / L.
- 3) Preparar las diluciones para la curva estándar según la Tabla 7.

*Tabla 7 Dilución de BSA para la curva estándar.*

Volumen de agua bidestilada [mL]	Volumen de stock de solución de BSA [mL]	Concentración final [mg/L]
10	0	0
8	2	20
6	4	40
4	6	60
2	8	80
0	10	100

### 7.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA

- 1) Centrifugar el medio de cultivo y recuperar el sobrenadante.

### 7.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU LECTURA

Empelando el pedestal, blanquear con 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada. Tomar 2  $\mu$ L de muestra problema o para la curva tipo y colocarlas en el pedestal para su lectura.

## 8. CUANTIFICACIÓN DE PHB POR UV-VIS

Esta técnica se basa en el principio de que cuando se realiza la digestión con  $H_2SO_4$  del PHB, éste se fragmenta en sus monómeros y libera  $H_2O$ , transformándose en ácido crotonico el cual posee un doble enlace que se puede detectar entre 220 y 245 nm (Slepecky and Law, 1960; LAW and SLEPECKY, 1961; Poindexter and Eley, 1983). Para nuestros experimentos se encontró que la longitud máxima de emisión se encuentra a 210 nm, se empleó el Nanodrop One C® para leer en UV-Vis. Las muestras se determinan por triplicado.

### 8.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- 1) Pesar 100 mg de la muestra problema en un tubo Hach® con tapa de rosca y empaque.
- 2) Adicionar 1 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y calentar a 100 °C durante 1 h.
- 3) Posterior a la digestión adicionar 9 ml de  $H_2SO_4$  14 mM.

### 8.2 CURVA TIPO

- 1) Pesar 50 mg de PHB en un tubo Hach® con tapa de rosca y empaque.
- 2) Adicionar 1 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y calentar a 100 °C durante 1 h.
- 3) Posterior a la digestión adicionar 9 ml de  $H_2SO_4$  14 mM.
- 4) Tomar 1 ml de la solución y aforar a 100 ml para obtener un stock a 50 µg/ml.
- 5) Realizar diluciones para obtener los cinco puntos como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Diluciones para curva tipo de PHB por UV-Vis.

Volumen de $H_2SO_4$ 14 mM [ml]	Volumen de stock de solución de PHB digerido [ml]	Concentración final de PHB digerido [µg/ml]
8.6	1.4	6
9	1	4
9.4	0.6	2
9.6	0.4	1
9.8	0.2	0.5

### 8.3 LECTURA DE LAS MUESTRAS

- 1) Diluir las muestras con  $H_2SO_4$  14 mM según la concentración de PHB esperada.
- 2) En el espectrofotómetro de luz UV-Vis, medir a 210 y 235 nm

## 9. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PHA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (PROPANÓLISIS ÁCIDA)

El principio de esta técnica es que al realizar una digestión con propanol ácido de los PHAs, éstos se fragmentan liberando los monómeros a los cuales se les insertará el grupo propil en el externo carbonilo, obteniendo estructuras de tipo (R)-HA-propil las cuales se pueden detectar por CG-FID (Gas Chromatograph SRI 8610C, marca: SRI®) con la columna (CHROMOSORB W-AW 80/100) isotérmicamente a 171°C, empleando ácido benzoico como estándar interno (Riis and Mai, 1988; Tan *et al.*, 2014; Koller and Rodríguez-Contreras, 2015; Abbondanzi *et al.*, 2017).

### 9.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA

Pesar 100 mg de la muestra problema en un tubo Hach® con tapa de rosca y empaque y adicionar 0.5 ml de cloroformo.

### 9.2 CURVA TIPO

- 1) Pesar 50 mg de PHBV (12%) y disolver en 10 ml de cloroformo.
- 2) Tomar 1 ml de la solución y aforar a 100 ml para obtener una solución stock a 50 µg/ml.
- 3) Realizar diluciones para obtener los cinco puntos como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Diluciones para curva tipo de PHB por cromatografía de gases.

Cloroformo [ml]	Stock de PHBV (12%) [ml]	PHBV (12%) [µg/ml]	PHB [µg/ml]	PHV [µg/ml]
0	10	50	44	6
2	8	40	35.2	4.8
4	6	30	26.4	3.6
6	4	20	17.6	2.4
8	2	10	8.8	1.2

### 9.3 DIGESTIÓN Y LECTURA DE LAS MUESTRAS

- 1) A 0.5 ml de muestra, adicionar 0.5 ml de propanol ácido al 20 % y 10  $\mu$ l de ácido benzoico (estándar interno).
- 2) Calentar las muestras a 100 °C durante 4 h.
- 3) Enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- 4) Añadir 5 ml H<sub>2</sub>O bidestilada.
- 5) Mezclar la muestra en un vortex.
- 6) Esperar a que las dos fases de las muestras se separen.
- 7) Si las muestras siguen muy turbias repetir tres veces los pasos 4, 5 y 6.
- 8) Recuperar la fase orgánica (inferior).
- 9) Inyectar 1  $\mu$ l de muestra (fase orgánica), tanto de la curva tipo como de las muestras problema.

## **10. LISIS MECÁNICA**

Esta técnica se emplea para romper a las levaduras y liberar su contenido intracelular para su análisis. La lisis celular se verifica mediante microscopía en campo claro.

### **10.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Adicionar en un tubo estéril de 15 ml.

- 3 ml de perlas de vidrio de 0.5 mm Ø estériles.
- 10 ml de levadura a 5 g/L.

### **10.2 OPERACIÓN DEL EQUIPO**

Introducir los tubos con muestra en el Fast Prep (MP Biomedicals®), operar a 4 ciclos de 60s a 6 m/s con pausas de 30s.

## **11. DECANTACIÓN POR SUCCIÓN**

Para recuperar las fracciones mediante una decantación por succión, se monta el sistema que se procede a describir:

- Colocar una pipeta de 1 ml con una manguera en el extremo superior, estériles, hasta el fondo de un frasco Schott ® de 1 L.
- Acoplar la manguera a una bomba peristáltica.
- El otro extremo de la manguera (final) se emplea para recuperar el medio de cultivo.

### **11.1 OPERACIÓN DEL EQUIPO**

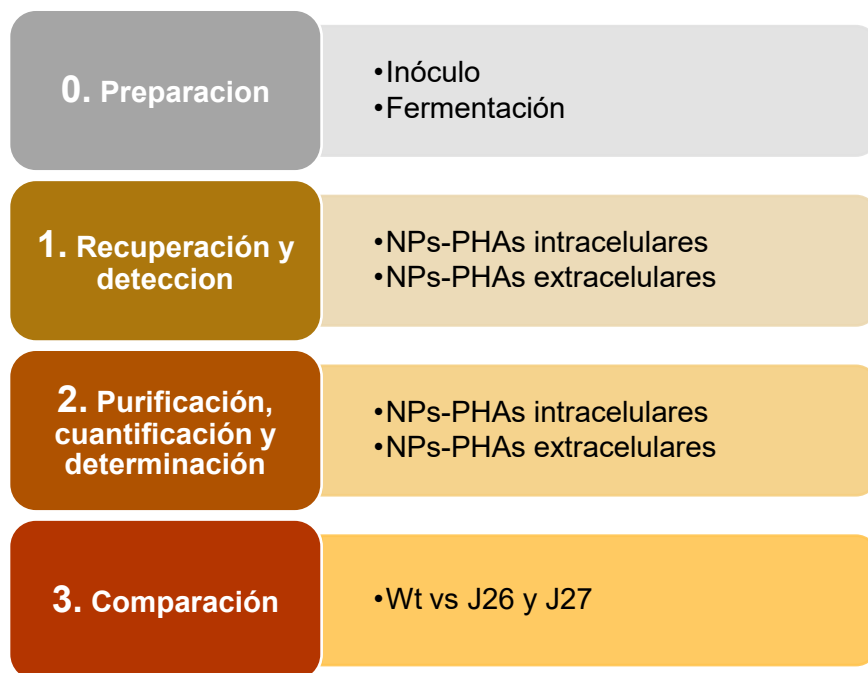
La bomba peristáltica se opera a un flujo de 10 ml/min.

Se recupera el medio de cultivo en tubos cónicos de 50 ml, obteniendo 20 fracciones de 45 ml.



## METODOS

El proyecto constó de tres etapas principales, las primeras dos se realizaron al término de una fermentación o etapa 0.



### ETAPA 0. INÓCULO Y FERMENTACIÓN A NIVEL MATRAZ


El día previo a cada fermentación se inoculó una azada de la cepa correspondiente (J26, J27 o Wt) en medio YPD sólido, adicionado con Zeocina a 75  $\mu\text{l/ml}$  para las cepas recombinantes, y se incubaron durante 48 h a 30°C.



Las fermentaciones se realizaron en matraces de 1L con 330 ml de medio YPD, se incubaron con 250 rpm de agitación a 30 °C durante 48 h. La cepa nativa se retiró de la incubadora a las 24 h, debido a que termina su crecimiento por glucosa, se analizó de igual forma que las cepas recombinantes. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Al final de cada fermentación de las diferentes cepas, se analizó la glucosa residual, la biomasa y la formación de etanol, usando las técnicas, de Miller, peso seco y densidad óptica, y la Cromatografía de gases, respectivamente.

## ETAPA 1. RECUPERACIÓN Y DETECCIÓN

La primera etapa consistió en determinar la presencia de las partículas de PHA, intra y extracelulares al término de las fermentaciones. Para la recuperación de las NPs al final de cada fermentación, el medio de cultivo agotado con biomasa se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 15 min, permitiendo que se separaran y analizaran independientemente la biomasa y el medio de cultivo agotado (figs. 5 y 6).

En la biomasa se buscaron las partículas de PHA Intracelulares mediante microscopía de fluorescencia y cuantificando la intensidad de la fluorescencia. Simbología  en la fig. 5.

En el medio de cultivo agotado se buscaron las partículas de PHA Extracelulares, empleando técnicas como la FE-SEM. Simbología  y la DLS Simbología  en la fig.6.

## ETAPA 2. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La segunda etapa consistió en probar diferentes protocolos para extraer y purificar las NPs-PHAs. Estos estudios se realizaron posterior a la detección de las NPs empleando las técnicas mencionadas en la etapa anterior.

Las operaciones unitarias empleadas en esta etapa son, la centrifugación a 7000 rpm a 4°C durante 15 min, la liofilización durante 9 h a -43°C y 0.2 torr, la propanólisis ácida y lectura mediante CG, la lisis mecánica que consistió en 4 ciclos de 60s a 6 m/s con pausas de 30s, el lavado del medio de cultivo adicionando 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O y la separación de fracciones del medio de cultivo agotado mediante una decantación por succión (esta únicamente se probó con las cepas recombinantes).

### NPs-PHAs INTRACELULARES

Se emplearon tres protocolos para la extracción y cuantificación de NPs intracelulares, que se representan en la fig. 5. Las corrientes empleadas en esta etapa inician con la biomasa lavada 3 veces con solución salina [0.85 %], el pellet de cada cepa se recuperó en la primera centrifugación.

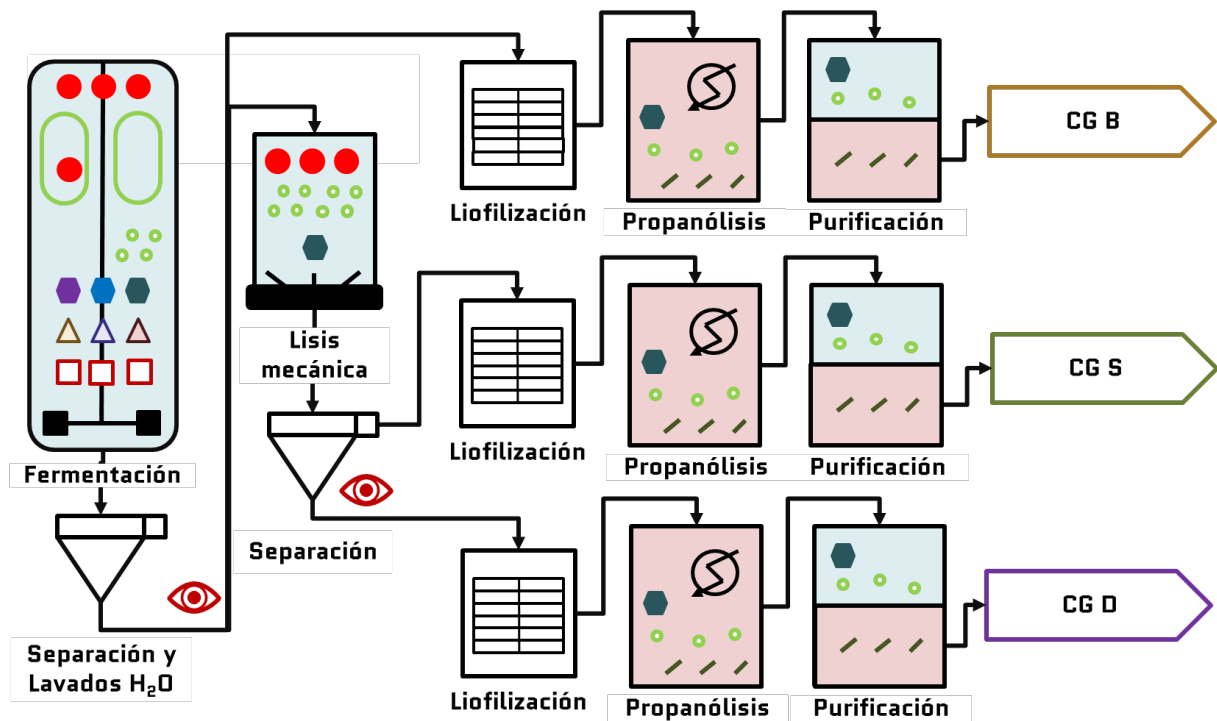


Figura 5. Diagrama de flujo del protocolo de recuperación de NPs intracelulares

La simbología empleada en la fig. 5 es:



Para el caso de la primera corriente (parte superior de la Figura 5, corriente CG B) el pellet (biomasa) lavado se liofilizó y una vez seca la biomasa se sometió a la digestión con propanol ácido y se analizó por CG, y a la digestión con  $H_2SO_4$  y se analizó por UV-Vis.

El segundo y tercer protocolos (corrientes intermedia e inferior de la Figura 5) son el resultado de la lisis mecánica, una vez realizado el ciclo se separaron dos corrientes (CG S y SGD de la fig. 6) mediante una centrifugación a 7500 rpm a  $4^\circ C$  durante 15 min. La corriente CG S de la Figura 6 es el sobrenadante, éste se recuperó mediante decantación. La otra corriente CG D de la Figura 6 contenía las perlas de vidrio, las cuales se lavan 3

veces con 10 ml de solución salina al 8.5% de NaCl, de la solución de lavado se obtiene el debris celular.

Posterior a la lisis mecánica y a la separación mencionada en el párrafo anterior, las corrientes CG S y CG D de la fig. 6 (segundo y tercer protocolos) se liofilizaron. Una vez secas las muestras se sometieron a una propanólisis ácida para leerlas por CG.

### NPs-PHAS EXTRACELULARES

Para las NPs extracelulares, se probaron los tres protocolos mostrados en la fig. 6. Las corrientes de esta etapa inician con el medio de cultivo agotado recuperado de la primera centrifugación.

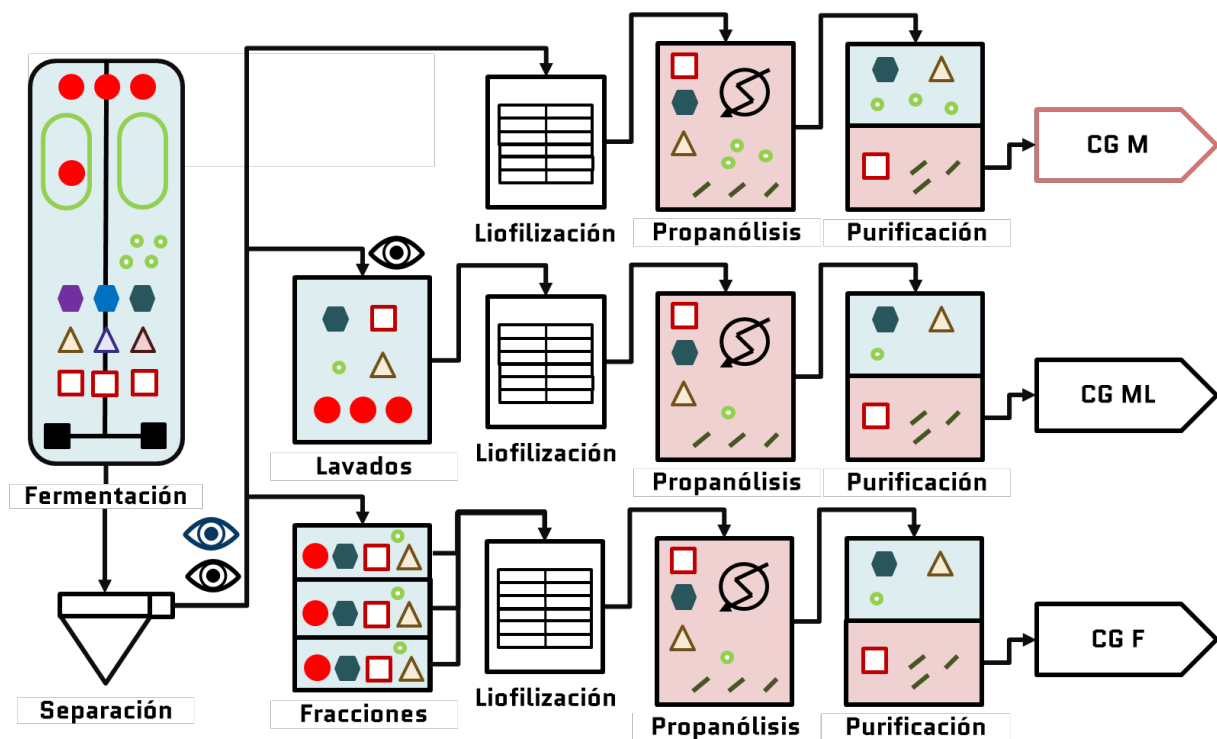


Figura 6. Diagrama de flujo del protocolo de recuperación de NPs extracelulares

La simbología empleada en la fig. 5 es la misma que en la fig. 6.

En el primer protocolo (corriente CG M, parte superior de la fig. 6), el medio de cultivo agotado se liofilizó y sometió a propanólisis ácida.

Del segundo protocolo (corriente intermedia en la Figura 6) se trabajó con dos tratamientos del medio lavado, con y sin filtrado (con una membrana de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente cada tratamiento se lavó (tres veces) con dos volúmenes de H<sub>2</sub>O bidestilada, centrifugando y recuperando un volumen (superficial) por decantación. Ambos tratamientos se analizaron por DLS, después de realizar este análisis, el medio no filtrado se liofilizó y sometió a la digestión con propanol ácido y se analizó por CG.

Para el tercer protocolo (parte inferior de la Figura 6) se aprovechó que las fermentaciones se realizaron por triplicado, recuperándose 0.9 L de medio de cultivo agotado, de cada cepa recombinante, en frascos de 1L y se refrigeró por 24 h. Posteriormente se realizó la separación del medio de cultivo agotado, de las cepas recombinantes, en fracciones. Para la cepa J26 se estudiaron 10 fracciones (juntando dos fracciones consecutivas), mientras que para J27 se analizaron las 20 fracciones. A cada fracción se les determinó la concentración de proteínas, se liofilizó y se propanolizó para su análisis por GC.

### **ETAPA 3. COMPARACIÓN**

En esta etapa se procedió con el análisis de los resultados obtenidos anteriormente, con la finalidad de determinar las similitudes y diferencias entre las cepas recombinantes contra la cepa Wt. En este trabajo la cepa Wt es un control negativo ya que no produce PHAs normalmente ni bajo condiciones de estrés.

También se analizaron los protocolos de purificación planteados (corriente CG ML y CG F), fundamentados en las propiedades físicas esperadas de las NPs-PHAs, ya que permitirán evitar el uso excesivo de solventes para recuperar las NPs-PHAs en su forma nativa (estado amorfo).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se dividirán en dos secciones; primero se explicarán los resultados para detectar y determinar las partículas de PHA intracelulares, posteriormente se procederá a analizar y discutir los resultados para detectar y determinar las partículas de PHA extracelulares.

### DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PARTÍCULAS INTRACELULARES DE PHA

Al término de cada fermentación las muestras se tiñeron con Rojo Nilo, y se tomaron fotografías donde se detectó la presencia de PHAs (Figura 5). Una vez enfocada las muestras en el microscopio, que emiten fluorescencia, ésta sólo se pudo observar durante 400 ms aproximadamente con el filtro ND 16. Esto se determinó mediante un video en el cual se tomaron fotos cada 45s con el filtro ND 16 (resultados no mostrados). Con esto se establecieron las condiciones mencionadas anteriormente para adquirir las fotografías mostradas en las figs. 7 y 8.

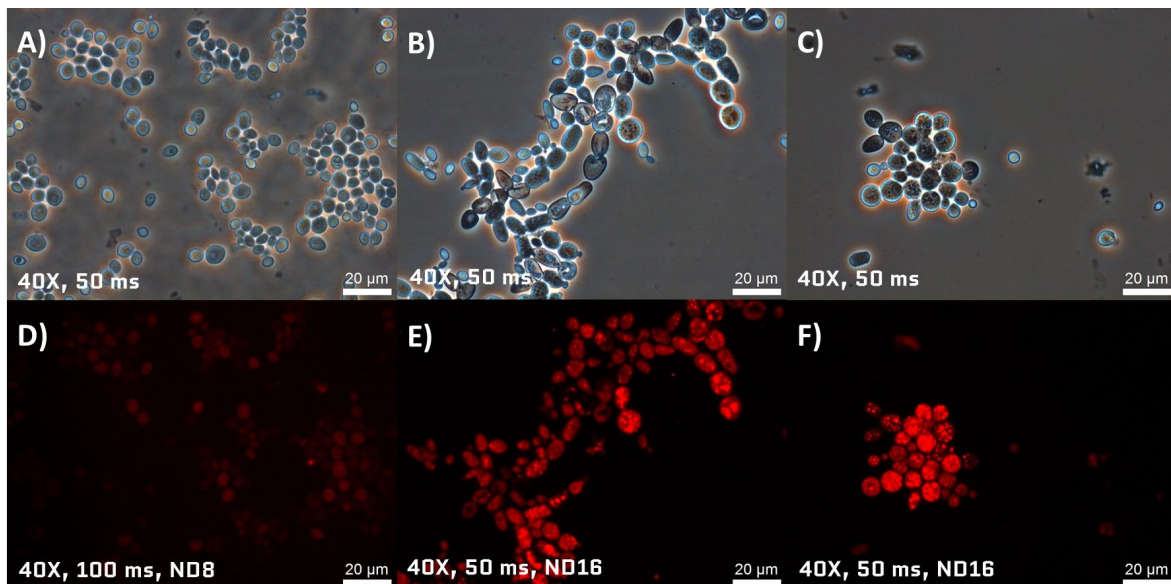
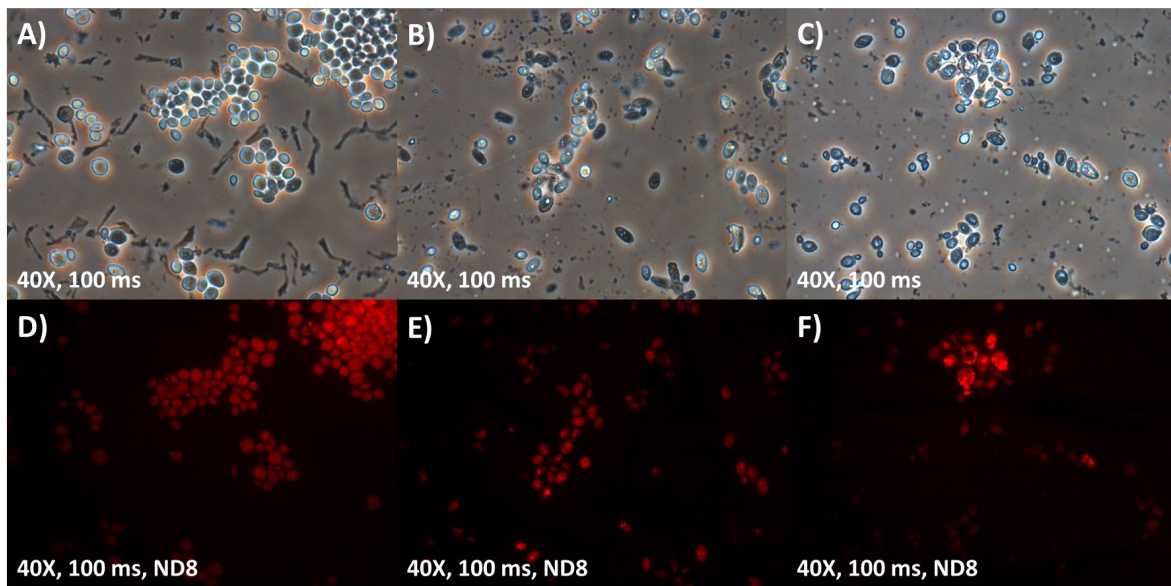


Figura 7. Fotografías de las cepas de *S. cerevisiae* (A y D es Wt, B y E es J26, C y F es J27) en microscopía óptica (hilera superior) y con una tinción con Rojo Nilo en Microscopía de Fluorescencia (hilera inferior).

Tras realizar la tinción se observaron las diferentes levaduras mediante microscopía de fluorescencia; en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se encontró que las morfologías de las tres cepas son similares, pero las recombinantes (imágenes B y C)

son ligeramente más grandes que la cepa Wt (imagen A). Adicionalmente en la fig. 7 se observa que ambas cepas recombinantes presentaron una mayor fluorescencia en sus vesículas (imágenes E y F), observándose éstas con mayor nitidez e intensidad, requiriéndose un menor tiempo de exposición para fotografiarlas (50 ms en lugar de 100 ms), a diferencia de la cepa nativa en la cual su señal fue escasa (imagen D).

Posteriormente se realizó la lisis celular, se tiñeron los restos celulares con Rojo Nilo y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (fig. 5). En la Figura 8 se observa que la lisis celular se realizó exitosamente, ya que se obtuvieron restos celulares y células rotas, para las 3 cepas (imágenes A, B y C).



*Figura 8. Fotografías de las cepas de S. cerevisiae (A y D es Wt, B y E es J26 y C y F es J27) después de realizar la lisis celular, en microscopía óptica (hilera superior) y con una tinción con Rojo Nilo en Microscopía de Fluorescencia (hilera inferior).*

En la fig. 8 también se observó que la mayoría de las levaduras, de ambas cepas recombinantes (imágenes E y F), perdieron el compuesto que hacía resaltar sus vesículas en la fig. 7, es decir que ambas cepas recombinantes produjeron un biomaterial que se liberó al realizar la lisis celular, lo cual coincide con lo esperado (sintetizar PHAs en la superficie de las vesículas); así mismo se observó que al liberarse dicho compuesto la fluorescencia de las cepas recombinantes es equiparable con la de la cepa Wt (imagen D).

Respecto a la cuantificación de PHAs por fluorescencia, se encontró una mayor fluorescencia a una emisión de 530 nm y excitación ente 550-650 nm, en las levaduras

transformadas contra la cepa nativa (resultados no mostrados), lo que coincide con lo que se observó en la microscopía de fluorescencia (fig. 7). Sin embargo, no fue posible emplear la fluorescencia para cuantificar PHAs como mencionan en los trabajos de Gorenflo (1999) y de Zuriani *et al.* (2013), lo que puede deberse a dos razones. Primero, nuestro estudio empleó levaduras (las cuales poseen organelos intracelulares además de ser 10 veces más grandes que las bacterias) mientras que ellos emplearon bacterias (las cuales poseen sólo la membrana y pared celular). Segundo, la cantidad de PHAs que contienen nuestras muestras es muy bajo (aún no se ha cuantificado) mientras que sus cepas acumulaban hasta un 85 % de PHAs. Ambas diferencias ocasionan efectos en la medición de la intensidad de la fluorescencia.

Al comparar los resultados de las figs. 7 y 8 con los resultados de los cromatogramas presentados en los incisos A y D de la Figura 9, podemos observar que la cepa nativa con y sin lisis mecánica muestra las señales correspondientes a propil-lactato, propil-propionato, una señal no identificada (N.I.), 2-propil-succinato y ác. Benzoico (estándar interno). La diferencia de las señales encontradas (figs. 7, y 9) radica en que la intensidad de las señales del propil-lactato, el propil-propionato, la señal no identificada (N.I.) y el 2-propil-succinato obtenidas cuando se realizó la lisis mecánica es menor. Esta muestra nos permitió conocer algunos de los metabolitos presentes en el cultivo, que pueden o no estar asociados a la transformación.

Para las cepas recombinantes (Incisos B, C, E y F de la fig. 9), con y sin lisis mecánica se presentaron las mismas señales que en la cepa nativa. De igual forma que en la Wt, en las recombinantes las muestras con lisis mostraron señales con menor intensidad. Adicionalmente las recombinantes con y sin lisis presentaron una señal correspondiente al tiempo de retención de propil-HV (Figura. 9), y cuando se realizó la lisis se también se observó la señal de propil-HB. Sin embargo, a pesar de que se observó la señal, esta se encontró en una concentración tan baja que no permitió su cuantificación.



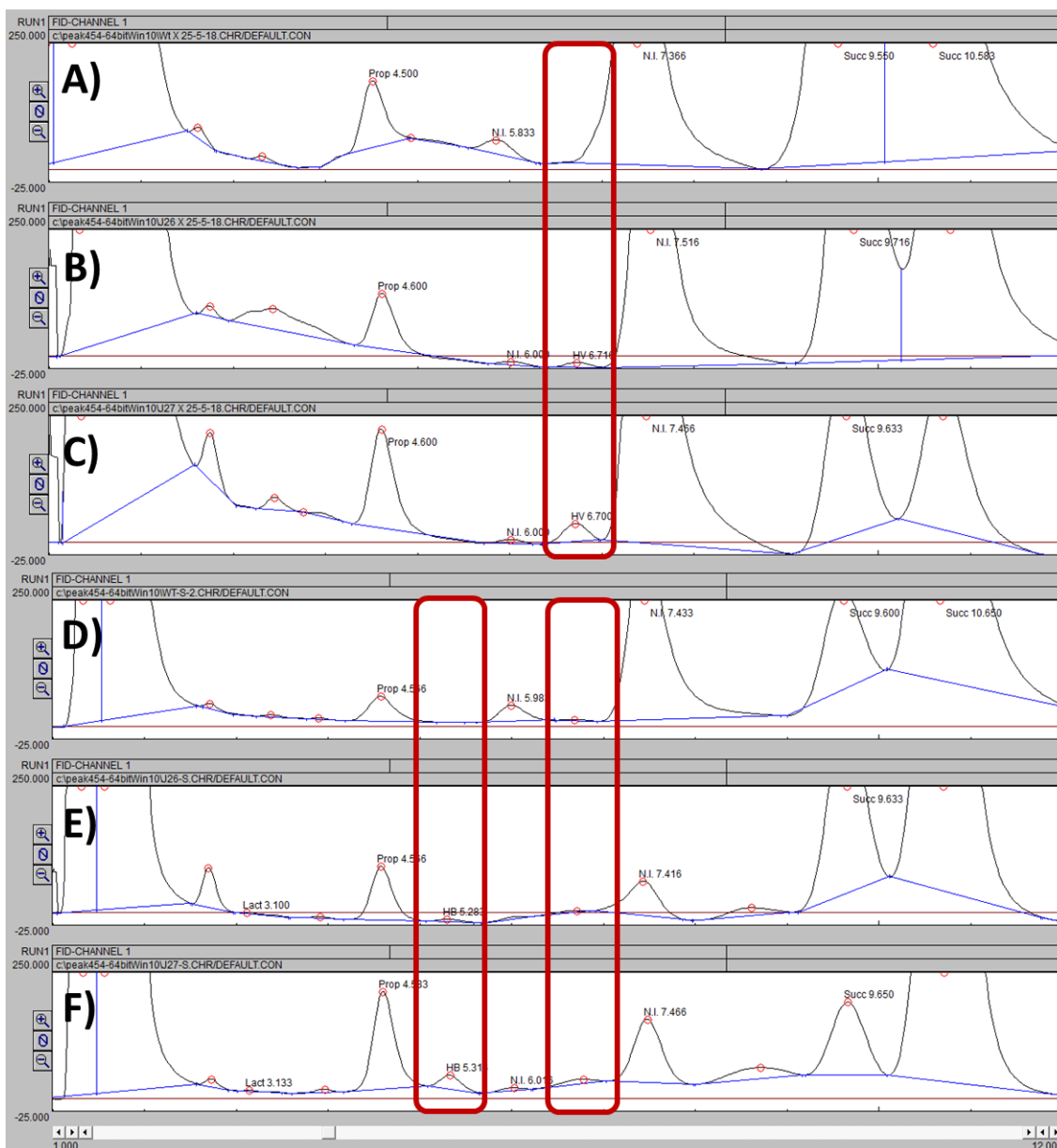


Figura 9. Cromatogramas para determinar la composición de las partículas intracelulares de las cepas de *S. cerevisiae* (A y D es Wt, B y E es J26 y C Y F es J27) al término de la cinética (corriente CG B) y al sobrenadante después de realizar la lisis celular (corriente CG S) después de realizarles la digestión con propanol ácido.

En las muestras, sin lisis, que se sometieron a la digestión con  $H_2SO_4$  (fig.) se encontraron interferencias en el espectro UV donde se encuentra la señal del ácido crotonico ( $\lambda = 200-240$  nm). Estas interferencias impidieron la cuantificación del ácido crotonico, por esta razón esta técnica no se empleó en los estudios posteriores.

## DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PARTÍCULAS EXTRACELULARES

Debido a que se encontró que las cepas recombinantes produjeron y acumularon partículas de PHAs en la superficie de sus vesículas (fig. 7, 9 y 10), se procedió con la localización de las NPs-PHAs secretadas por las levaduras recombinantes, siguiendo los protocolos de la Figura 6.

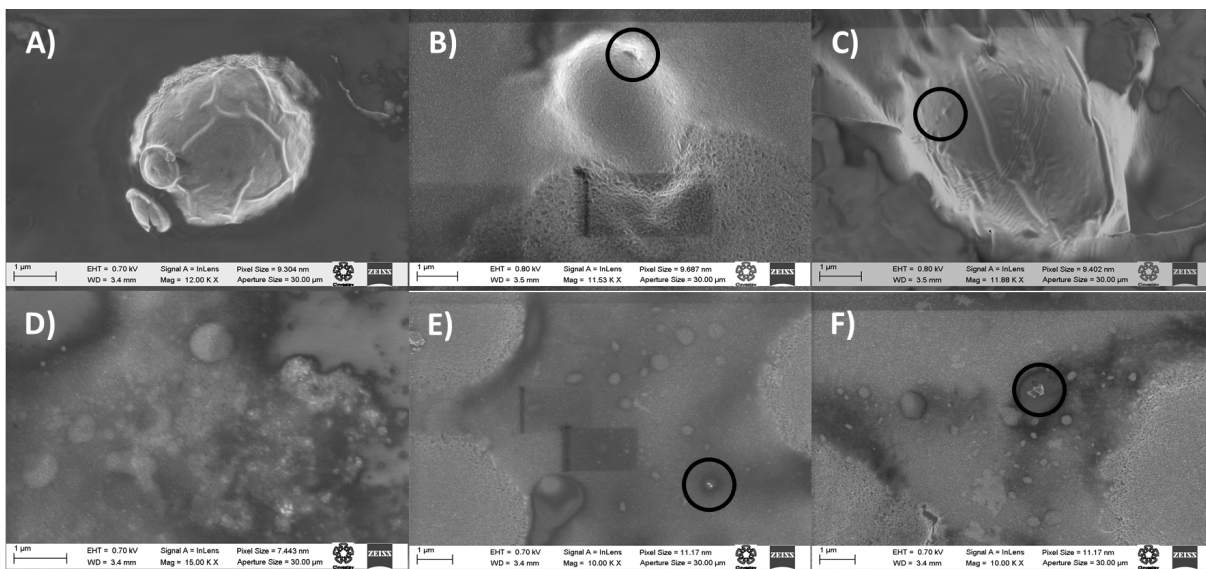


Figura 10. Fotografías tomadas mediante FE-SEM de las cepas de *S. cerevisiae* (A es Wt, B es J26 y C es J27) y de sus medios de cultivo al término de la fermentación (D es Wt, E es J26 y F es J27), en círculos negros se resaltan las partículas encontradas.

En la Figura 10 podemos observar la presencia de partículas (encerradas en círculos negros) para el caso de las cepas recombinantes (imágenes B y C) y en sus medios de cultivo agotados (imágenes E y F). Estas fotografías demostraron que las levaduras recombinantes secretaron partículas del biopolímero en contraste con la cepa nativa (imágenes A y D). Las partículas observadas en los medios de cultivo de las cepas recombinantes (imágenes E y F de las fig. 11) parecen aglomeraciones que poseen tamaños de 270 hasta 500 nm de longitud y no se encontraron estructuras similares en el medio de cultivo de la cepa nativa (imagen D de la fig. 11), indicándonos que la presencia de las partículas está asociada a la transformación.

Considerando que los PHAs son insolubles en H<sub>2</sub>O (Gorenflo *et al.*, 1999; Peters, Becher and Rehm, 2007) y se encuentran en forma de NPs (Bouza *et al.*, 2016; Singh, 2016), las

NPs-PHAs podrían encontrarse suspendidas en las capas superficiales del medio de cultivo agotado, lo que permitiría recuperarlas mediante decantación. Por esta razón se montaron los siguientes dos experimentos con la finalidad de establecer si las NPs-PHAs se encuentran suspendidas en las capas superficiales (corriente CG F de la fig. 6) y existe la posibilidad de purificarlas mediante decantación y lavados (corriente CG ML de la fig. 6).

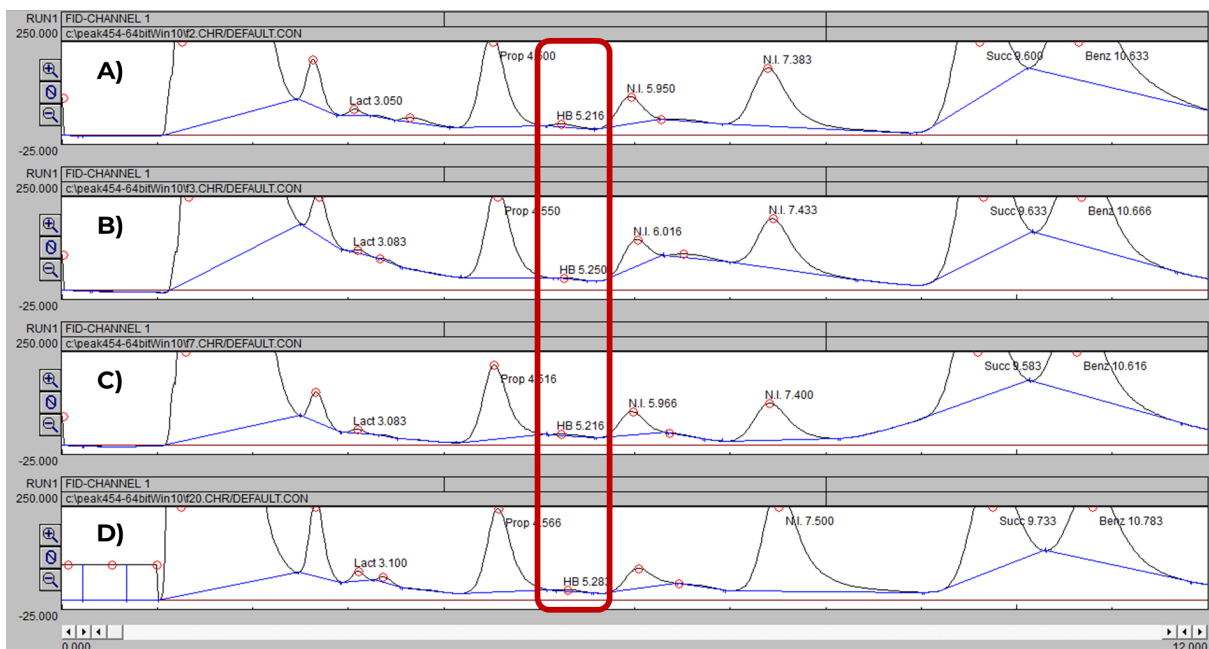


Figura 11. Cromatogramas de las fracciones 2 (A), 7(B), 10 (C) y 20 (D) del medio de cultivo agotados de J27, en un rectángulo rojo se muestra la señal correspondiente al propil-HB.

Del análisis de las fracciones de los medios de cultivo agotados de las cepas recombinantes (corriente inferior de la Figura 6), ambas cepas presentaron impurezas proteicas [ $11.5 \pm 1$  g/L] distribuidas homogéneamente en el medio de cultivo agotado. La diferencia entre el peso del material liofilizado y de las proteínas determinadas [ $3 \pm 1$  g/L] posiblemente se conformó tanto de otras impurezas del medio de cultivo (posiblemente sales y restos celulares), como del polímero producido por las cepas recombinantes.

En los cromatogramas de las diferentes fracciones se encontraron señales de propil-HB distribuidas homogéneamente y algunas de propil-HV que no se alcanzaron a identificar adecuadamente debido a su baja concentración y a su cercanía con la señal anterior, esto se ilustra en la Figura 11 donde se muestran algunas de las fracciones del medio de cultivo

agotado de J27. Nuevamente la concentración de las señales de interés fue muy baja para cuantificarla.

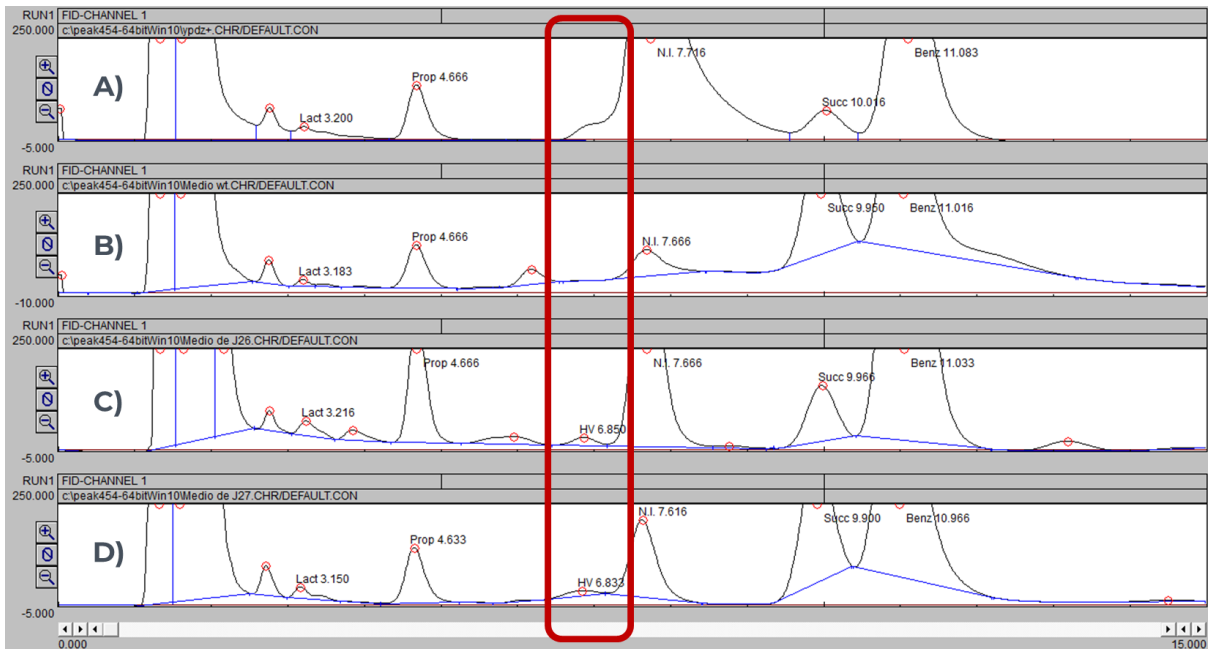


Figura 12. Cromatogramas del medio de cultivo inicial (A) y de los medios de cultivos agotados de las cepas de *S. cerevisiae* Wt (B), J26 (C) y J27 (D), en un rectángulo rojo se muestra la señal correspondiente al propil-HV.

Dado que no se observaron diferencias de las señales en las fracciones, se concluyó que las NPs-PHAs no se encuentran suspendidas en las capas superficiales del medio de cultivo agotado, más bien se encuentran distribuidas de manera homogénea. Por esto, en la corriente CG F (fig. 6) sólo se analizó la fracción superior (100 ml) de cada medio de cultivo agotado.

En la Figura 12 podemos observar, en el medio de cultivo inicial, las mismas señales encontradas en la biomasa, con y sin lisis, de la cepa Wt (fig. 9), estas señales también se presentaron en el medio agotado de Wt y de las recombinantes. Sin embargo, el medio agotado de las cepas recombinantes presentó una señal en el tiempo de retención del propil-HV, que no fue cuantificable, la cual no apareció el medio de cultivo inicial ni en el medio agotado de la cepa Wt.

*Los análisis con DLS (*

Figura 13), de la corriente intermedia de la Figura 6, muestran que todos los medios de cultivo (agotados e inicial) sin filtrar, presentaron dos grupos de partículas, uno entre 100 y 600 nm y otro alrededor de 5000 nm. Después de que se filtró, la señal principal disminuyó su distribución entre 80 y 300 nm, pero siguió apareciendo la señal de 5000 nm. Esta señal a 5000 nm es atribuible a una posible aglomeración de proteínas (Krahn, Schweiger and Lucas, 1983; Berry and Cotts, 1999; Malvern Instruments, 2013).

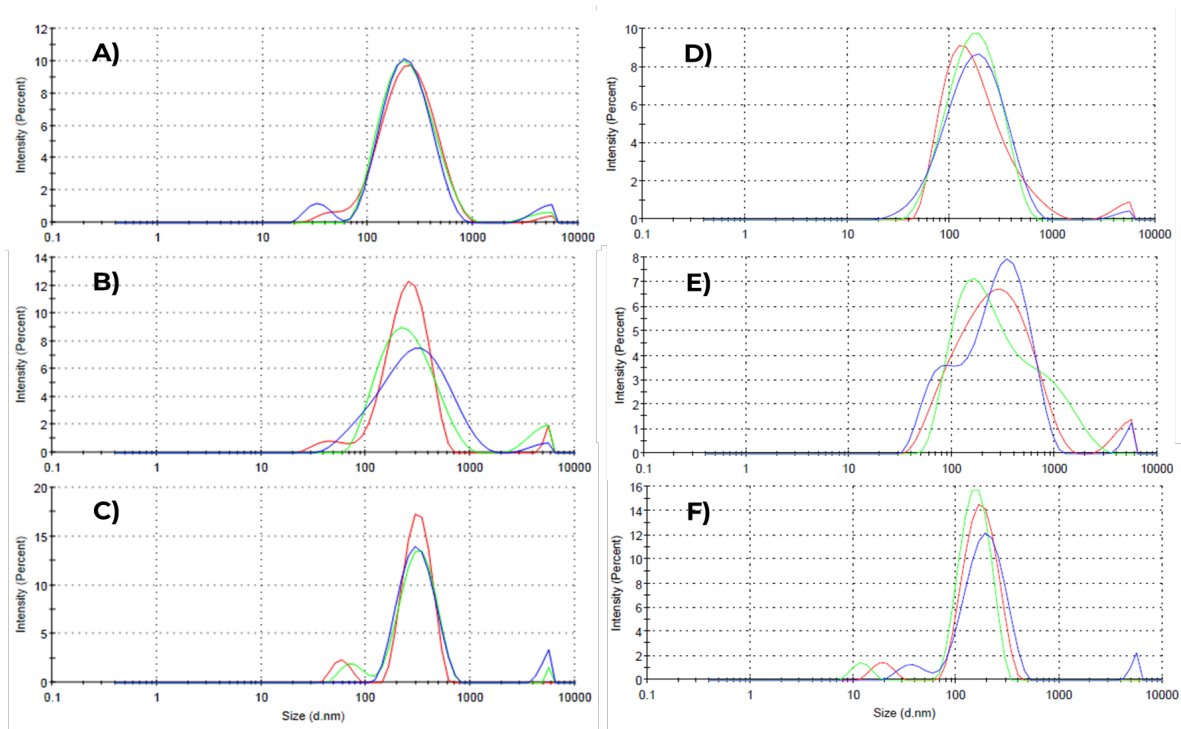


Figura 13. DLS de los medios de cultivos agotados (A es Wt, B es J26, C es J27) y al filtrar con  $0.22 \mu\text{m}$  (C es Wt, D es J26 y E es J27)

Así mismo se encontró que después de que se realizaron los lavados (corriente intermedia de la fig. 6), las señales de propil-HV o propil-HB obtenidas en los cromatogramas desaparecieron (resultados no mostrados). Lo análisis de los medios de cultivo lavados por DLS (fig. 14) mostraron que las señales disminuían su amplitud conforme se lava la muestra (cada columna es una cepa y hacia abajo se muestran los lavados). Debido a que no se aisló una sola señal la purificación por decantación y lavados no es eficiente.

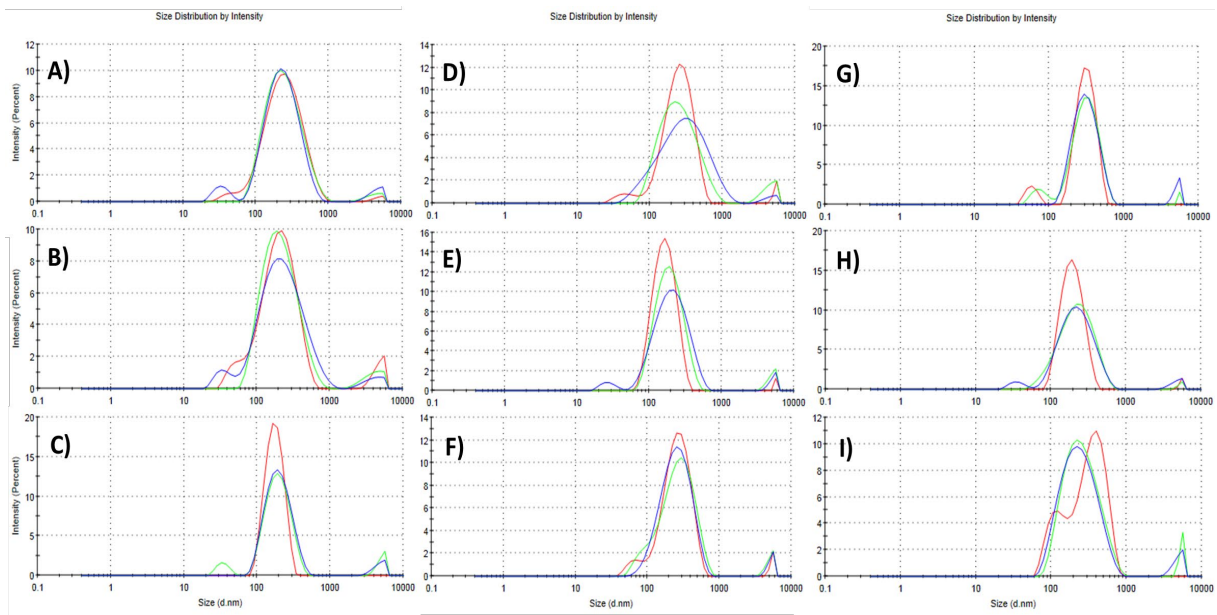


Figura 14. DLS de los medios agotados (Wt es A J26 es D y J27es G), con el primer lavado (Wt es B, J26 es E y J27 es H), con el segundo lavado (Wt es C, J26 es F y J27 es I)

Los resultados obtenidos en las Figura 11, 12, 13 y 14, nos confirmaron que las partículas de PHAs no están suspendidas (flotando) en la parte superficial de los medios agotados como esperábamos, por lo que es necesario probar otras técnicas para concentrar, purificar y recuperar las partículas de PHAs.

## COMPARACIÓN Y ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Al comparar los cromatogramas de las figs. 9, 11 y 12, podemos observar que las señales de propil-lactato, propil-propionato, dos no identificadas (a los tiempos  $5.9 \pm 0.2$  y  $7.9 \pm 0.2$  min respectivamente) y propil-succinato, se encuentran tanto en el medio de cultivo como en la biomasa de la cepa silvestre. Estas señales posiblemente provengan de componentes presentes en el medio de cultivo inicial (extracto de levadura) y asociados al crecimiento.

Como se planteó en la hipótesis, en ambas cepas recombinantes se encontraron PHAs compuestos por monómeros de HB o HV, debido a que se empleó como fuente de carbono la glucosa. A pesar de que los análisis de las NPs intracelulares siempre mostraron señal de propil-HV, en ocasiones se encontró que las partículas secretadas también presentaron señales de propil-HB.

Al analizar los resultados de las cromatografías (fFigura 12) en conjunto con los obtenidos por microscopía de fluorescencia (figs. 7 y 8) y por FE-SEM (fFigura 10) consideramos que las partículas observables en las imágenes de la fig. 10, correspondientes a J26 y J27 y a sus respectivos medios de cultivos agotados, son partículas de PHAs secretadas por las levaduras recombinantes.

También se esperaba que los PHAs se acumularon y secretaran en forma de NPs, al comparar y analizar los resultados de DLS (figs. 13 y 14) con los de la microscopía de fluorescencia (figs. 7 y 8) y los del FE-SEM (fFigura 10), se encontró que las partículas de PHAs pueden estar aglomeradas o no, en tamaños desde micro hasta nano partículas.

Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos, consideramos que es necesario mejorar las técnicas de recuperación y purificación, para determinar apropiadamente tanto la composición, como el tamaño de las partículas producidas por las cepas recombinantes.

## CONCLUSIONES

- Ambas cepas recombinantes, J26 y J27, sintetizan y acumulan un compuesto que flúorese cuando se tiñen con Rojo Nilo, observable por microscopía de fluorescencia, que se libera cuando se realiza la lisis celular.
- Mediante digestión con propanólisis ácida se determinó que las cepas recombinantes, J26 y J27, sintetizan, acumulan y secretan partículas, a partir de glucosa, compuestas de HV según el tiempo de retención por CG.
- La inducción con el antibiótico Zeocina de los plásmidos empleados en las levaduras recombinantes (pkmJ26 y pkamj27) permiten expresar proteínas quiméricas funcionales ancladas a las vesículas de las cepas recombinantes J26 y J27 respectivamente.
- Se pueden emplear vesículas como nanoreactores para la síntesis de partículas vía Bottom-up en organismos eucariontes como *S. cerevisiae*.



## PERSPECTIVAS A FUTURO

Es necesario realizar más experimentos para obtener una interpretación adecuada de los resultados de este trabajo, para lo que se proponen dos estrategias de estudio.

La primera consistiría en probar otros protocolos para concentrar, extraer y purificar las NPs-PHAs, por ejemplo:

- Usar otros solventes para su extracción, como en los trabajos de Shi (2009) y Tan *et al.* (2014).
- Precipitar las proteínas con sulfato de amonio del medio de cultivo agotado o al realizar la lisis celular para disminuir la cantidad de impurezas proteicas.
- Emplear una cromatografía de permeación en gel para separar las fracciones por sus pesos moleculares.

La otra estrategia estaría enfocada en determinar la composición y cuantificar al PHA sintetizado como, por ejemplo:

- Analizar las muestras propanolizadas por Cromatografía de Gases acoplada a Masas, como se realizó en los trabajos de Poirier, Erard and Petétot (2001) y Zhang, Carlson and Srien (2006).
- Realizar una digestión con  $H_2SO_4$  y analizar los resultados mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, como se efectuó en los trabajos de Kocharin *et al.* (2012); Kocharin, Siewers and Nielsen (2013); y Sandström *et al.* (2015).
- Emplear la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier para buscar la señal correspondiente a los enlaces de tipo éster, como se empleó en los trabajos de Abd-El-Haleem (2009) y Umesh, *et al.* (2017) o como mencionan en el trabajo de Tan *et al.*, (2014).

## BIBLIOGRAFÍA

Abbondanzi, F., Biscaro, G., Carvalho, G., Favaro, L., Lemos, P., Paglione, M., Samori, C., Torri, C. (2017). Fast method for the determination of short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHAs) in bacterial samples by In Vial-Thermolysis (IVT). *New Biotechnology*.

Abd-El-Haleem, D. A. M. (2009). Biosynthesis of polyhydroxyalkanotes in wild type yeasts. *Polish Journal of Microbiology*.

Agnihotri, M., Joshi, S., Kumar, A. R., Zinjarde, S., & Kulkarni, S. (2009). Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters*.

Arroyo-Maya, I. J., & McClements, D. J. (2015). Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Research International*.

Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., Braunegg, G. (2011). Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Avérous, L., & Pollet, E. (2012). Environmental Silicate Nano-Biocomposites. *Green Energy and Technology*.

Baek, S. H., Kwon, E. Y., Kim, Y. H., & Hahn, J. S. (2016). Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Bennett, M. K., & Scheller, R. H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Berry, G. C., & Cotts, P. M. (1999). Static and Dynamic Light Scattering. *Modern Techniques for Polymer Characterization*. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.39.6206&rep=rep1&type=pdf>

Block, I. D., & Scheffold, F. (2010). Modulated 3D cross-correlation light scattering: Improving turbid sample characterization. *Review of Scientific Instruments*.

Bouza, R., del Mar Castro, M., Dopico-García, S., Victoria González-Rodríguez, M., Barral, L. F., & Bittmann, B. (2016). Polylactic acid and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nano and microparticles for packaging bioplastic composites. *Polymer Bulletin*.

Breuer, U., Terentiev, Y., Kunze, G., & Babel, W. (2002). Yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates: Genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Macromolecular Bioscience*.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*.

Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)*.

Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*.

Christen, S., & Sauer, U. (2011). Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by <sup>13</sup>C flux analysis and metabolomics. *FEMS Yeast Research*.

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*.

García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, O. G., & Córdova, A. (2013). Síntesis y Biodegradación de Polihidroxiálkanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.

Gorenflo, V., Steinbüchel, A., Marose, S., Rieseberg, M., & Scheper, T. (1999). Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Grote, E., Hao, J. C., Bennett, M. K., & Kelly, R. B. (1995). A Targeting Signal in VAMP Regulating Transport to Synaptic Vesicles. *Cell*.

Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Chisti, Y. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*.

Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Heidelberg, T. (2014). Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Huth, C. (2015). Development of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Therapy Applications. Syracuse University Honors Program Capstone Projects.

Jendrossek, D., Schirmer, A., & Schlegel, H. G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*.

Jutz, G., & Böker, A. (2011). Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks - A new class of nanomaterials. *Polymer*.

Kajihata, S., Matsuda, F., Yoshimi, M., Hayakawa, K., Furusawa, C., Kanda, A., & Shimizu, H. (2015). <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with a reduced Crabtree effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

Kalia, V. C. (2016). Microbial Factories: Biodiversity, Biopolymers, Bioactive Molecules: Volume 2. Chapters 1, 2, 3, 5 & 6. *Microbial Factories: Biofuels, Waste treatment*. Springer.

Kocharin, K., Chen, Y., Siewers, V., & Nielsen, J. (2012). Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*.

Kocharin, K., Siewers, V., & Nielsen, J. (2013). Improved polyhydroxybutyrate production by *Saccharomyces cerevisiae* through the use of the phosphoketolase pathway. *Biotechnology and Bioengineering*.

Koller, M., & Rodríguez-Contreras, A. (2015). Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences*.

Krahn, W., Schweiger, G., & Lucas, K. (1983). Light scattering measurements of mutual diffusion coefficients in binary liquid mixtures. *The Journal of Physical Chemistry*.

Kwon, H. S., Jung, S. G., Kim, H. Y., Parker, S. A., Batt, C. A., & Kim, Y. R. (2014). A multi-functional polyhydroxybutyrate nanoparticle for theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*.

Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*.

Li, Z., & Loh, X. J. (2017). Recent advances of using polyhydroxyalkanoate-based nanovehicles as therapeutic delivery carriers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*.

Li, Z., Yang, J., & Loh, X. J. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*.

Lizarraga-Valderrama, L. R., Panchal, B., Thomas, C., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2016). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*.

Kolybaba, M., Tabil, L. G., Panigrahi, S., Crerar, W.J., Powell, T., & Wang, B. (2003). *Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future*. ASAE, The Society for engineering in agricultural, food, and biological systems.

MALVERN. (2014). Zetasizer Nano Series. Malvern Instruments Ltd. Retrieved from <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/>

Malvern Instruments. (2013). Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics, 1–6. Retrieved from: Saved from URL: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662> P

Melchy, O., Ortega, C., Martínez, A., Flores, F., Gómez, O., Sánchez, J., & de la Torre, M. (2000). Cultivo por lote alimentado de *Saccharomyces cerevisiae* a alta concentración celular. Reporte de un congreso.

Muniasamy, G. (2014). Cloning, expression and localization of polyhydroxyalkanoate synthase type II of *Pseudomonas putida* CA-3 onto secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Tesis de Doctorado, Dpto. de Biotecnología CINVESTAV-IPN, México, CDMX.

Muniasamy, G., & Pérez-Guevara, F. (2014). Use of SNAREs for the immobilization of poly-3-hydroxyalkanoate polymerase type II of *Pseudomonas putida* CA-3 in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *Journal of Biotechnology*.

Novak, M., Koller, M., Braunegg, G., & Horvata, P. (2015). Mathematical Modelling as a Tool for Optimized PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*.

Ojumu, T. V., Yu, J., & Solomon, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*.

Palma Gallardo, L. O. (2016). Producción de Nanopartículas por vía fermentativa. Tesis de licenciatura, UPIBI-IPN, México, CDMX.

Brayner, R., & Fiévet, F. (2013). *Nanomaterials: A Danger or a Promise?* Chapters 2 & 6. Springer.

Peters, V., Becher, D., & Rehm, B. H. A. (2007). The inherent property of polyhydroxyalkanoate synthase to form spherical PHA granules at the cell poles: The core region is required for polar localization. *Journal of Biotechnology*.

Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*.

Poindexter, J. S., & Eley, L. F. (1983). Combined procedure for assays of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and inorganic polyphosphate. *Journal of Microbiological Methods*.

Poirier, Y., Erard, N., & MacDonald-Comber Petétot, J. (2001). Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*.

Ramon-Portugal, F., Pingaud, H., & Strehaiano, P. (2004). Metabolic transition step from ethanol consumption to sugar/ethanol consumption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*.

Rey, D. (2012). Nanoparticle-Coated Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules for Biomedical Applications. Ph. D. Thesis' presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University.

Riis, V., & Mai, W. (1988). Gas chromatographic determination microbial biomass after hydrochloric of poly-beta-hydroxybutyric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*.

Rimmer, M., & Wang, Q. (2010). Assessing the effects of alkaline desalination treatments for archaeological iron using scanning electron microscopy. *The British Museum Technical Research Bulletin*.

Robert, J., Marchesini, S., Delessert, S., & Poirier, Y. (2005). Analysis of the  $\beta$ -oxidation of trans-unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase-dependent pathway. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*.

Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*.

Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*.

Sahayaraj, K., & Rajesh, S. (2011). Bionanoparticles: Synthesis and antimicrobial applications. *Science against Microbial Pathogens*.

Sandström, A. G., Muñoz de las Heras, A., Portugal-Nunes, D., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2015). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of poly-3-d-hydroxybutyrate from xylose. *AMB Express*.

Saranya, V., Poornimakkani, Krishnakumari, M. S., Suguna, P., Binuramesh, C., Abirami, P., Rajeswari, V., Ramachandran, K. B., & Shenbagarathai, R. (2012). Quantification of intracellular polyhydroxyalkanoates by virtue of personalized flow cytometry protocol. *Current Microbiology*.

Shi, D. (2009). *NanoScience in biomedicine*. Chapters 1, 2, 3 & 23. Springer.

Shrivastav, A., Kim, H.-Y., & Kim, Y.-R. (2013). Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*.

Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N., & Guezennec, J. (2012). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from alkanoates and glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Singh, A. K. (2016). *Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles*. Engineered Nanoparticles.

Slepecky, R. A., & Law, J. H. (1960). Rapid Spectrophotometric Assay of Alpha, Beta-Unsaturated Acids and Beta-Hydroxy Acids.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., & Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*.

Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*.

Steinbüchel, A., & Valentin, E. H. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. *FEMS Microbiology Letters*.

Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*.



Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*.

Thermo Scientific. (2016). NanoDrop One - Guía de usuario. Recuperada del sitio web: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>

Umesh, M., Priyanka, K., Thazeem, B., & Preethi, K. (2017). Biogenic PHA nanoparticle synthesis and characterization from *Bacillus subtilis* NCDC0671 using orange peel medium. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*.

Ward, P. G., & O'Connor, K. E. (2005). Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Wu, H. A., Sheu, D. S., & Lee, C. Y. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*.

Zhang, B., Carlson, R., & Srienc, F. (2006). Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., & Chen, G. Q. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering*.

Zuriani, R., Vigneswari, S., Azizan, M. N. M., Majid, M. I. A., & Amirul, A. A. (2013). A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.