



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA  
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900198756

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASAS NAD<sup>+</sup>  
DEPENDIENTES PARA LA OXIDACIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS SUPERIORES**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

**U.T.F.S.M.**  
BIBLIOTECA CENTRAL

Autor: Lorena Álvarez Alarcón  
Profesores Patrocinantes: Andrés Illanes Frontaura  
Fernando Acevedo Bonzi

DICIEMBRE, 2010

**COMISION EVALUADORA INTEGRADA POR**

**DR. JUAN REYES MARTÍNEZ**

---

**DR. RICARDO SIMPSON RIVERA**

---

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'R. Simpson', written over a horizontal line.

**DRA. SONIA E. BARBERIS**

---

**DR. GUILLERMO R. CASTRO**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Guillermo R. Castro', written over a horizontal line.

## DEDICATORIA

---

"Las ideas son como las estrellas,  
no llegarás a tocarlas con las manos,  
pero como el marinero en el desierto de las aguas,  
las eliges como guía y si las sigues alcanzarás tu destino".

*Carl Schurz.*

*A mis Padres y Hermanos  
por su apoyo, confianza y estímulo permanente  
a lo largo de toda mi vida.*

## RESUMEN

El proceso Kraft para la producción de pulpa de celulosa genera residuos que tienen un gran potencial de revalorización. Una de las fracciones que se puede obtener a partir del residuo conocido como jabón de licor negro es denominada fracción neutra liviana, la cual contiene principalmente policosanoles, dentro de los cuales se destacan los alcoholes primarios alifáticos de 22 y 24 carbonos denominados docosanol y tetracosanol respectivamente. La producción de ácidos grasos de cadena larga por oxidación de los policosanoles (docosanol y tetracosanol) obtenidos del jabón de licor negro posee una importante utilidad en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética.

La presente tesis tiene como objetivo central seleccionar microorganismos productores de alcohol deshidrogenasas e inducir en ellos la producción de una enzima alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono adicionando al cultivo alcanos o alcoholes. Para ello se estudiaron siete cepas entre las cuales se encontraba una cepa mesófila (*Candida tropicalis* ATCC20336), una termófila (*Thermus* AB1) y cinco termófilas extremas (*Thermus thermophilus* HB27, HNI11, NR17, PRQ16, PRQ25). Sólo *Candida tropicalis* ATCC20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ25 lograron producir mediante la utilización de los agentes inductores hexacosanol, docosanol y eicosanol respectivamente una alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidar alcoholes de 14, 22 y 24 átomos de carbonos. Las actividad máxima de oxidación sobre tetracosanol, docosanol y tetracosanol se obtuvo con la enzima proveniente de *Candida tropicalis* ATCC20336 con valores de 86,7; 196,9 y 218,8  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína respectivamente. Los más altos niveles de enzima se obtuvieron cuando el inductor es añadido al inicio de la fermentación y las células recolectadas al comienzo de la fase estacionaria (entre 100 y 140 h de fermentación).

La purificación de las enzimas alcohol deshidrogenasas provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 se logró mediante el uso de una mezcla de matrices cromatográficas de tipo catiónicas y aniónicas con factores de purificación de 39, 237 y 567 respectivamente y rendimientos en actividad de 24% para *Candida tropicalis* ATCC 20336 y de 36% para las enzimas de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25.

Los mejores biocatalizadores fueron obtenidos al inmovilizar las enzimas de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 en glioxil agarosa BCL por medio de unión covalente multipuntual, obteniéndose valores de actividad de 1,84; 1,82 y 2,09  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  soporte respectivamente, valores determinados sobre tetracosanol como sustrato de la reacción enzimática. La máxima actividad fue registrada a pH 7,0; 50°C para *Candida tropicalis* ATCC 20336, 60°C *Thermus* AB1 y 70°C *Thermus thermophilus* PRQ 25, en presencia de 2mM  $\text{FeSO}_4$ .

Estudios de la conversión de los alcoholes de 14, 22 y 24 carbonos revelaron que la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inmovilizada en glioxil agarosa es el mejor biocatalizador para realizar la oxidación de tetradecanol, observándose el mayor grado de conversión (84%) luego de 72 horas de reacción con un rendimiento en ácido tetradecanoico de 67% y sólo un 17% en tetradecanal. En cambio la alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25 es mejor para lleva a cabo la reacción de oxidación de docosanol y tetracosanol, con valores de conversión del 85,9% y 78,7% respectivamente y rendimientos en ácido docosanoico de 61,7% y ácido tetracosanoico 35,8% respectivamente.

## AGRADECIMIENTO

---

*Nunca un año se presentó con tantas pruebas y obstáculos, con seguridad puedo decir que los aprendizajes obtenidos en este proceso marcarán mi camino de hoy en adelante.*

*En este largo caminar más allá de obtener un grado académico, por importante que este sea, está la incesante búsqueda de encontrar respuestas o verdades que ayuden a ser más amable el pasar por este mundo, hasta encontrar la única verdad absoluta que es Dios.*

*Para alcanzar una meta profesional tan importante no es tarea fácil y no se logra sola. Son muchas las personas que colaboraron con su granito de arena y a las cuales al final del camino debemos agradecer, por lo cual me permito mencionar algunas de ellas:*

*Sr. Andrés Illanes y Fernando Acevedo, mis profesores guía, cuya paciencia y excelente disposición a orientar mi trabajo es invaluable.*

*A los destacados maestros Andrés Markovits, Claudia Altamirano, Lorena Wilson, Fanny Guzmán y Manuel Young por su labor docente, constante apoyo y entrega.*

*No se puede dejar de reconocer al espectacular equipo español que me brindó su apoyo los Dres. José Manuel Guisán, José Berenguer, Daniel Vega, Javier Rocha, Juan Manuel Bolívar y Cesar Mateo..*

*A mis amigos y compañeros de la PUCV: Araceli, Rosy, Mauricio V., Liza, Carmen, Carolina, Silvana, Cecilia, Igor, Zaida, Eduardo, Martín y Mauricio Bernal, agradecimientos infinitos por ayudarme desinteresadamente a lo largo de la tesis y brindarme su amistad.*

*A mi hermana Romina quien me acompañó durante todo este proceso, muchas gracias por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo. No podría desear una hermanita mejor.*

*A mis abuelitos, Elba y Horacio sé que me ven y están muy orgullosos de mí.*

*A los pequeños Cindy y Calambrito por su paciencia y apoyo incondicional durante el desarrollo de esta Tesis.*

*Son tantos que creo quedaré en deuda y la mejor forma de agradecer es tratando de ser una profesional responsable, y entregar lo mejor de mí al servicio de la Universidad, la sociedad y a quienes siguen nuestros pasos.*

*Sean mis palabras finales para agradecer a mis padres que siempre me han alentado a ser cada día mejor en este quehacer que yo elegí, por su cariño, compañía y tolerancia en este año... que al fin termina. En especial a mi Madre que gracias a su esfuerzo y contención he finalizado este proceso superando todas las adversidades.*

*Gracias Totales*

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
RESUMEN.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE GENERAL.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 OBTENCIÓN DE ALCOHOLES PRIMARIOS ALIFÁTICOS A PARTIR DE JABONES DE LICOR NEGRO.....	7
2.2 OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA A PARTIR DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS.....	9
2.3 ALCOHOL DESHIDROGENASA.....	11
2.3.1. Alcohol deshidrogenasas de cadena media (MDRs) o Tipo I.....	11
2.3.2. Alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDRs) o Tipo II.....	17
2.3.3. Alcohol deshidrogenasas activadas por hierro o Tipo III.....	17
2.4 OBTENCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASAS CON ACTIVIDAD SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS MEDIANTE SCREENING DE MICROORGANISMOS.....	18
2.5 PRODUCCIÓN ALCOHOL DESHIDROGENASA POR MICROORGANISMOS.....	21
2.6 USO DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA.....	22
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 MICROORGANISMOS.....	27
3.2 EQUIPOS Y MATERIALES.....	27
3.2.1 Equipos.....	27
3.2.2 Materiales.....	28
3.2.3 Reactivos.....	29
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
3.3.1 Determinación de la actividad deshidrogenasa.....	32
3.3.2 Determinación de proteína soluble.....	33

3.3.3	<i>Determinación de proteína inmovilizada por el método del ácido bicinconínico (BCA)</i> .....	34
3.3.4	<i>Cuantificación de alcoholes, aldehídos y ácidos grasos de cadena larga...</i>	35
3.3.5	<i>Cuantificación de microorganismos</i> .....	35
3.3.6	<i>Preparación de extracto crudo</i> .....	36
3.3.7	<i>Caracterización electroforética</i> .....	37
3.4	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	40
3.4.1	<i>Preselección de los microorganismos</i> .....	41
3.4.2	<i>Activación, mantención y propagación de los microorganismos</i> .....	42
3.4.3	<i>Inducción de la producción de alcohol deshidrogenasa en los microorganismos</i> .....	43
3.4.4	<i>Purificación de las alcohol deshidrogenasas producidas</i> .....	44
3.4.5	<i>Inmovilización por unión covalente en glioxil agarosa 4BCL y bromuro de cianógeno (BrCN)</i> .....	52
3.4.6	<i>Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados</i> .....	56
3.4.7	<i>Reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos de 14, 22 y 24 carbonos</i>	57
3.5	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</b> .....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
4.1	<b>ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA DE ALCOHOLES SUPERIORES</b> .....	59
4.1.1	<b>CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR DE CADA MICROORGANISMO</b> .....	59
4.1.2	<b>EFFECTO DE LA ADICIÓN DE INDUCTOR AL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR</b> .....	62
4.1.3	<b>EFFECTO DE LA ADICIÓN DE INDUCTOR AL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS</b> .....	66
4.1.4	<b>ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA PROTEÍNAS PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS</b> .....	69
4.1.5	<b>EFFECTO DEL TIEMPO DE ADICIÓN DEL AGENTE INDUCTOR AL MEDIO DE CULTIVO</b>	73
4.2	<b>PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES SUPERIORES</b> .....	77
4.3	<b>INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES SUPERIORES</b> .....	85
4.3.1	<i>Inmovilización en glioxil agarosa 4 BCL y bromocianógeno</i> .....	85
4.3.2	<i>Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados</i> .....	87
4.3.3	<i>Estudio de la estabilidad térmica de los biocatalizadores en medio acuoso</i> .....	93
4.3.4	<i>Estabilidad térmica del cofactor</i> .....	96
4.4	<b>REACCIÓN DE SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS TETRADECANOICO, DOCOSANOICO Y TETRACOSANOICO</b> .....	97
4.4.1	<b>ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS TETRADECANOICO, DOCOSANOICO Y TETRACOSANOICO</b> .....	97
4.4.2	<b>ESTABILIDAD DE LOS BIOCATALIZADORES EN EL MEDIO DE REACCIÓN</b> .....	101
<b>5</b>	<b>DISCUSION</b> .....	<b>105</b>

5.1 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA DE ALCOHOLES SUPERIORES.....	105
5.1.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR DE CADA MICROORGANISMO .....	105
5.1.2 EFECTO DE LA ADICIÓN DE INDUCTOR AL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR .....	106
5.1.3 EFECTO DE LA ADICIÓN DE INDUCTOR AL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS .....	107
5.2 PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES SUPERIORES.....	109
5.3 INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES SUPERIORES .....	111
5.3.1 INMOVILIZACIÓN EN GLIOXIL AGAROSA 4 BCL Y BROMOCIANÓGENO .....	111
5.3.2 <i>Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados</i> .....	112
5.4 REACCIÓN DE SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS TETRADECANOICO, DOCOSANOICO Y TETRACOSANOICO.....	113
5.4.1 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS TETRADECANOICO, DOCOSANOICO Y TETRACOSANOICO .....	113
5.4.2 ESTABILIDAD DE LOS BIOCATALIZADORES EN EL MEDIO ACUOSO Y EN EL MEDIO DE REACCIÓN.....	114
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>7 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>118</b>
<b>8 REFERENCIAS .....</b>	<b>119</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>128</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.1</b>	ENZIMAS ESTUDIADAS, COFACTOR UTILIZADO, FORMULACIÓN Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS. ....	4
<b>TABLA 2.1</b>	NUMERO DE MIEMBROS DE LAS FAMILIAS MDR PUBLICADOS EN SWISSPROT Y TREMBL.....	13
<b>TABLA 2.2</b>	ALCOHOLES DESHIDROGENASAS PROVENIENTES DE DISTINTAS FUENTES .....	18
<b>TABLA 3.1</b>	COMPOSICIÓN DE GELES SDS-PAGE A UN GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE 12%.....	38
<b>TABLA 3.2</b>	COMPOSICIÓN DEL GEL CONCENTRADOR A UN GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE 4%.....	39
<b>TABLA 4.1</b>	CRECIMIENTO CELULAR MÁXIMO Y VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE CADA MICROORGANISMO EN MEDIO THERMUS. ....	60
<b>TABLA 4.2</b>	CRECIMIENTO CELULAR MÁXIMO Y VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE CADA MICROORGANISMO EN MEDIO THERMUS MODIFICADO.....	61
<b>TABLA 4.4</b>	EFECTO DEL USO DE ALCANOS COMO INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES ALIFÁTICOS. ....	68
<b>TABLA 4.5</b>	CONDICIONES DE INDUCCIÓN QUE MAXIMIZAN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA CON CAPACIDAD OXIDATIVA SOBRE ALCOHOLES DE 22 Y 24 ÁTOMOS DE CARBONO. ....	76
<b>TABLA 4.6</b>	ADSORCIÓN SOBRE DIFERENTES SOPORTES IÓNICOS DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA PRODUCIDAS POR <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336, <i>THERMUS</i> AB1 Y <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25.....	77
<b>TABLA 4.7</b>	PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA A PARTIR DE UN EXTRACTO CRUDO DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336 INDUCIDA CON 0,05% HEXADECANOL.....	79
<b>TABLA 4.8</b>	PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA A PARTIR DE UN EXTRACTO CRUDO DE <i>THERMUS</i> AB1 INDUCIDA CON 0,05% DOCOSANOL. ....	79
<b>TABLA 4.9</b>	PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA A PARTIR DE UN EXTRACTO CRUDO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 INDUCIDA CON 0,05% EICOSANOL.....	80
<b>TABLA 4.10</b>	RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM DE LA BANDA 64 kDA DE LA PURIFICACIÓN DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 .....	83
<b>TABLA 4.11</b>	RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM DE LA BANDA 60 kDA OBTENIDA DE LA PURIFICACIÓN DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 I. ...	84
<b>TABLA 4.12</b>	RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM DE LA BANDA 23 kDA OBTENIDA DE LA PURIFICACIÓN <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 .....	84
<b>TABLA 4.13</b>	EFECTO DE LA ADICIÓN IONES BIVALENTES SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>THERMUS</i> AB1 INMOVILIZADA EN GLIOXIL AGAROSA 4 BCL (GLX).. ....	86
<b>TABLA 4.14</b>	INMOVILIZACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA PROVENIENTES DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336, <i>THERMUS</i> AB1 Y <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 .....	87
<b>TABLA 4.15</b>	VALORES DE CONSTANTES DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PRIMER ORDEN DE LOS BIOCATALIZADORES <i>C. TROPICALIS</i> -BRCN, AB1-BRCN Y PRQ25-BRCN.....	95

<b>TABLA 4.16</b> VALORES DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PRIMER ORDEN DE LOS BIOCATALIZADORES <i>C. TROPICALIS</i> -GLX, AB1-GLX Y PRQ 25-GLX. ....	95
<b>TABLA 4.17</b> VALORES DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DEL COFACTOR NAD <sup>+</sup> .....	97
<b>TABLA 4.18</b> PORCENTAJE DE CONVERSIÓN DE TETRADECANOL, RENDIMIENTO DE ÁCIDO TETRADECANOICO (ÁCIDO MIRÍSTICO) Y ALDEHÍDO MIRÍSTICO.....	99
<b>TABLA 4.19</b> PORCENTAJE DE CONVERSIÓN DOCOSANOL, RENDIMIENTO DE ÁCIDO DOCOSANOICO (ÁCIDO BEHÉNICO) Y ALDEHÍDO BEHÉNICO.....	100
<b>TABLA 4.20</b> PORCENTAJE DE CONVERSIÓN TETRACOSANOL, RENDIMIENTO DE ÁCIDO TETRACOSANOICO (ÁCIDO LIGNOCÉRICO) Y ALDEHÍDO LIGNOCÉRICO. ....	100
<b>TABLA 4.21</b> VALORES DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE <i>C. TROPICALIS</i> - GLX . ....	103
<b>TABLA 4.22</b> VALORES DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE AB1-GLX .....	103
<b>TABLA 4.23</b> VALORES DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE PRQ 25-GLX	104
<b>TABLA G.1</b> MEDIO THERMUS DE MANTENCIÓN Y PROPAGACIÓN .....	137
<b>TABLA G.2</b> MEDIO THERMUS DE ALMACENAMIENTO .....	137
<b>TABLA G.3</b> MEDIO THERMUS MODIFICADO .....	137
<b>TABLA H.1</b> MEDIO DEFINIDO PARA <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	138
<b>TABLA H.2</b> POOL DE VITAMINAS .....	138
<b>TABLA K1</b> ANOVA (ANÁLISIS DE VARIANZA).....	144
<b>TABLA K2</b> CONTRASTE MÚLTIPLE DE RANGO.....	145

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 ESQUEMA DEL PROCESO DE REVALORIZACIÓN DEL JABÓN DE LICOR NEGRO DESARROLLADO POR LA EMPRESA HÄRTING. ....	9
FIGURA 2.2 ESTRUCTURA DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA DE HÍGADO DE CABALLO .....	14
FIGURA 2.3 ESTRUCTURA DE LA NICOTINAMIDA ADENIN DINUCLEÓTIDO (NAD <sup>+</sup> ). ....	15
FIGURA 2.4 ESQUEMA DE LA INCORPORACIÓN DE N-ALCANOS AL METABOLISMO DE LAS LEVADURAS. ....	21
FIGURA 3.1 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE ELECTROFORESIS .....	38
FIGURA 3.2 ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL. ....	40
FIGURA 3.3 MICROSCOPIA ÓPTICA CON AUMENTO <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC20336 Y <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ25.....	42
FIGURA 3.4 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA PROVENIENTE DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336.....	47
FIGURA 3.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA PROVENIENTE DE <i>THERMUS</i> AB1 .....	49
FIGURA 3.6 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA PROVENIENTE DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25.....	51
FIGURA 3.7 ESQUEMA DE INMOVILIZACIÓN POR UNIÓN COVALENTE .....	52
FIGURA 3.8 INMOVILIZACIÓN EN GLIOXIL-AGAROSA.....	53
FIGURA 3.9 INMOVILIZACIÓN EN BROMURO DE CIANÓGENO.....	53
FIGURA 4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> HB27 .....	59
FIGURA 4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> HNI 11 .....	61
FIGURA 4.3 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ALCOHOL COMO INDUCTOR SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DE <i>THERMUS</i> AB1 Y <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336.....	62
FIGURA 4.4 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ALCOHOL COMO INDUCTOR SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DE <i>T. THERMOPHILUS</i> HB27, HNI 11, NR 17, PRQ 16 Y PRQ 25.....	63
FIGURA 4.5 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ALCANO COMO INDUCTOR SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR. DE <i>T. THERMOPHILUS</i> HB27, HNI 11, NR 17, PRQ 16 Y PRQ 25.....	64
FIGURA 4.6 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ALCANO COMO INDUCTOR SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR. DE <i>THERMUS</i> AB1 Y <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336. ....	65
FIGURA 4.7 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% EXTRACTO CRUDO DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	70
FIGURA 4.8 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% EXTRACTO CRUDO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 .71	71
FIGURA 4.9 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% EXTRACTO CRUDO DE <i>THERMUS</i> AB1.....	72
FIGURA 4.10 EFECTO DEL TIEMPO DE ADICIÓN DEL AGENTE INDUCTOR EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>THERMUS</i> AB1.....	74
FIGURA 4.11 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% DE LA PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	81

FIGURA 4.12 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% DE LA PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>THERMUS AB1</i> .....	81
FIGURA 4.13 ELECTROFORESIS SDS PAGE 12% DE LA PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>THERMUS THERMOPHILUS PRQ 25</i> .....	82
FIGURA 4.14 ELECTROFORESIS NATIVA EN GRADIENTE 4-15% DE LA PURIFICACIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>THERMUS THERMOPHILUS PRQ 25</i> .....	82
FIGURA 4.15 EFECTO DE PH EN LA ACTIVIDAD DE TETRADECANOL.....	88
FIGURA 4.16 EFECTO DE PH EN LA ACTIVIDAD DE DOCOSANOL.....	88
FIGURA 4.17 EFECTO DE PH EN LA ACTIVIDAD DE TETRACOSANOL.....	89
FIGURA 4.18 EFECTO DEL LARGO DE CADENA EN LA ACTIVIDAD A PH 7,0.....	90
FIGURA 4.19 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE TETRADECANOL A PH 7.0.....	91
FIGURA 4.20 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE DOCOSANOL A PH 7.0.....	91
FIGURA 4.21 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE TETRACOSANOL A PH 7.0.....	92
FIGURA 4.22 EFECTO DEL LARGO DE CADENA EN LA ACTIVIDAD A PH 7,0 Y LAS TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE CADA BIOCATALIZADOR. ....	93
FIGURA 4.23 ESTABILIDAD TÉRMICA EN MEDIO ACUOSO DE LOS BIOCATALIZADORES UTILIZANDO TETRACOSANOL COMO SUSTRATO ENZIMÁTICO.....	94
FIGURA 4.24 ESTABILIDAD TÉRMICA EN MEDIO ACUOSO DEL COFACTOR NAD <sup>+</sup> .....	96
FIGURA 4.25 CINÉTICA DE REACCIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS UTILIZANDO <i>C. TROPICALIS</i> -GLX COMO BIOCATALIZADOR.....	98
FIGURA 4.26 CINÉTICA DE REACCIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS UTILIZANDO AB1-GLX COMO BIOCATALIZADOR.....	98
FIGURA 4.27 CINÉTICA DE REACCIÓN DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS UTILIZANDO PRQ 25-GLX COMO BIOCATALIZADOR.....	99
FIGURA 4.28 ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE <i>C. TROPICALIS</i> -GLX A 40°C.....	101
FIGURA 4.29 ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE AB1-GLX A 60°C.....	102
FIGURA 4.30 ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN DE PRQ25-GLX A 70°C.....	102
FIGURA B.1 CURVA DE CALIBRADO DE NADH .....	129
FIGURA C.1 CURVA DE CALIBRADO DE PROTEÍNAS.....	130
FIGURA D.1 CURVA DE CALIBRADO DE PROTEÍNAS.....	131
FIGURA F.1 CURVA DE CALIBRADO DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336.....	133
FIGURA F.2 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS AB1</i> .....	134
FIGURA F.3 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> HB 27.....	134
FIGURA F.4 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25.....	135
FIGURA F.5 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 16.....	135
FIGURA F.6 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> NR-17.....	136
FIGURA F.7 CURVA DE CALIBRADO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> HNI-11.....	136
FIGURA I.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 20336.....	139

## INDICE DE FIGURAS

---

<b>FIGURA I.2</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS</i> AB1. ....	139
<b>FIGURA I.3</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> HNI 11. ....	140
<b>FIGURA I.4</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> NR 17. ....	140
<b>FIGURA I.5</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 16. ....	141
<b>FIGURA I.6</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25. ....	141
<b>FIGURA J.1</b> CURVA SEMILOGARÍTMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> CULTIVADA EN MEDIO DEFINIDO. ....	143
<b>FIGURA J.2</b> CURVAS SEMILOGARÍTMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 EN MEDIO <i>THERMUS</i> EN AGUA MINERAL. .	143
<b>FIGURA L.1</b> PROGRAMA GEL PRO 3.0 ANALYZER .....	148
<b>FIGURA L.2</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>CANDIDA TROPICALIS</i> INDUCIDO CON ALCOHOLES. ....	149
<b>FIGURA L.3</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>CANDIDA TROPICALIS</i> INDUCIDO CON ALCANOS .....	149
<b>FIGURA L.4</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 INDUCIDO CON ALCOHOLES. ....	150
<b>FIGURA L.5</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> PRQ 25 INDUCIDO CON ALCANOS. ....	150
<b>FIGURA L.6</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>THERMUS</i> AB1 INDUCIDO CON ALCOHOLES. ....	151
<b>FIGURA L.7</b> DENSITOMETRÍA DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTO CRUDO <i>THERMUS</i> AB1 INDUCIDO CON ALCANOS .....	151
<b>FIGURA M.1</b> ESQUEMA DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE PRIMER ORDEN. ....	152
<b>FIGURA M.2</b> ESQUEMA DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE PRIMER ORDEN CON ACTIVIDAD RESIDUAL. ....	153



# *Introducción*

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria de celulosa en Chile exhibe un crecimiento sostenido y representa una de las actividades económicas más importantes a nivel nacional. El proceso Kraft para la obtención de celulosa genera residuos, como los jabones de licor negro y trementina al sulfato, con un gran potencial de revalorización. Los jabones de licor negro, pueden constituir un importante insumo para la elaboración de productos químicos.

Últimamente ha surgido un gran interés en la recuperación de los alcoholes alifáticos primarios como docosanol ( $C_{22}H_{46}O$ ) y tetracosanol ( $C_{24}H_{50}O$ ) contenidos en estos residuos, dado que se ha descubierto que los alcoholes alifáticos de cadena larga (20 a 32 átomos de carbonos) son utilizados por la industria farmacéutica para la formulación de medicamentos antivirales utilizados, por ejemplo, para el tratamiento del herpes (Leung y Sacks, 2004).

Por otro lado, los ácidos grasos de cadena larga, como el ácido lignocérico o tetracosanoico ( $C_{24}H_{48}O$ ), se utilizan en formulaciones de productos cosméticos y dermatológicos (Nielsen *et al.*, 2005), artículos de limpieza de la piel (Seki, 2005), alimentos (Loh *et al.*, 2004), bebidas, helados de crema bajos en calorías (Tancibok *et al.*, 1997), en la preparación de resinas antiestáticas de poliéster biodegradable (Hasebe y Sashida, 2004). Asimismo, son utilizados en su forma metilada como biomarcadores para determinar comunidades de microorganismos aerobios y aerobios facultativos (Quezada *et al.*, 2007), y en la elaboración de combustibles y aditivos (Breakspear *et al.*, 2006)

De igual forma, el ácido lignocérico es utilizado en el área farmacéutica para la formulación de micropartículas inyectables utilizadas en el tratamiento de la dependencia de drogas (Nuwayser, 2006), en la composición de un método para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Clymer, 2006), en la formulación de agentes antialérgicos (Konishi, 2003), en la elaboración de preparados sintéticos a base de mezclas de lípidos y ceramidas para tratamientos en personas con baja permeabilidad de la piel (Jager *et al.*, 2005), en la formulación de una droga que inhibe el crecimiento de células mamífera y/o formación de metástasis (Zaloga *et al.*, 2004), como ingrediente de pastillas masticables efervescentes (Gebreselassie y Boghani, 2006) en la producción de vitaminas liposolubles (Immig *et al.*, 2006).

A su vez el ácido behénico (22 átomos de carbono) o docosanoico es utilizado para la producción de cosméticos y cremas humectantes (Fujino y Yokohama-shi, 2004), como materia prima para la elaboración de un aerosol para refrescar la piel (Noritoshi, 1999), para la elaboración de chocolate (Masanori *et al.*, 2003), tinturas (Cottard y Rodeau, 2004), para la producción de aceites de mesa bajos en calorías (Thengumpilli *et al.*, 2003), para la formulación de cremas comestibles resistentes a elevadas temperaturas (Takaaki *et al.*, 2003) y en la formulación de combustibles y aditivos (Breakspear *et al.*, 2006), en la elaboración de resinas de policarbonato para su uso en automóviles y cables eléctricos (Tatsuzi, 1990), elaboración de alimentos que presentan en su composición elementos con distinta actividad de agua; en este caso el ácido graso es utilizado para formulación de capas hidrofóbicas que separan estos elementos (Gaonkar *et al.*, 2004).

En el área farmacéutica también es utilizado para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Clymer, 2006), en la producción de medicamentos bioabsorbibles (Yoshiro, 2001; Labrecque *et al.*, 2006) y como materia prima para la elaboración de vitaminas en aerosol (Abram *et al.*, 2006).

Pese a su gran utilidad, los ácidos grasos de cadena larga como el lignocérico y behénico son los ácidos grasos naturales más escasos. En el caso del lignocérico, su ocurrencia en aceites vegetales rara vez sobrepasa 0,3 %, de modo que su oferta comercial es casi inexistente. Por otro lado el ácido behénico se encuentra en mayor cantidad, de 2 a 5% en la piel de maní y menos de un 0,5% en la semilla de raps, sésamo y oliva (UAM, 2007; Lee, 2008).

Una estrategia interesante para producir estos ácidos de cadena larga en cantidades comerciales es mediante la oxidación de los alcoholes correspondientes (docosanol, tetracosanol). Existen antecedentes para la oxidación química de octadecanol y eicosanol a los correspondientes ácidos usando como oxidante peróxido de hidrógeno y como catalizador peroxotungstofosfato de amonio cuaternario (Bi *et al.*, 2001), y para la oxidación de docosanol usando un líquido iónico como catalizador compuesto por el catión Aliquat®336 y el anión poliperioxometalato  $\{PO_4[WO(O_2)_2]_4\}_3$  (Guajardo *et al.*, 2010).

Como alternativa a la oxidación química se encuentra la oxidación enzimática mediante la enzima alcohol dehidrogenasa E.C.1.1.1.192 (ADCL), que actúa sobre alcoholes de cadena larga cuya actividad se ha comprobado en la reacción de hexadecanol a hexadecanoico (Brenda, Enzyme Database on line). Esta enzima pertenece al grupo de las oxidoreductasas y, como tal, requiere de cofactores estequiométricos (o disociables) que son quienes actúan como transportadores de electrones. En el caso de la ADCL, el cofactor requerido es  $\text{NAD}^+$ , quien se reduce a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , requiriendo dos moles de  $\text{NAD}^+$  por mol de ácido producido (Ueda y Tanaka, 1990).

La enzima alcohol dehidrogenasa (ADCL) es intracelular, estructuralmente compleja, en general inestable y de alto costo, lo que supone la conveniencia de emplearla en forma inmovilizada. Adicionalmente, en la actualidad sólo existen en el mercado dos alcohol deshidrogenasas producida por las levaduras *Candida tropicalis* y *Candida lipolytica* que son capaces de actuar en la oxidación de alcoholes de largo de cadena superior a 16 átomos de carbono (Ueda y Tanaka, 1990). Sin embargo, no se han reportado deshidrogenasas activas sobre alcoholes de cadena superior a 18 átomos de carbono.

En forma previa a la realización de esta propuesta se estudió la capacidad de oxidación de etanol, docosanol y tetracosanol de 13 alcohol deshidrogenasas (ADH), que se encuentran listadas en la Tabla 1.1, encontrándose que las alcohol deshidrogenasas de *Lactobacillus brevis* ó LB y ADH CDX013 son las únicas que presentan una elevada velocidad inicial de oxidación de docosanol y tetracosanol; sin embargo, no sobrepasan los  $0,1 \mu\text{mol NADH producidos} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  proteína.

**Tabla 1.1.** Enzimas estudiadas, cofactor utilizado, formulación y actividad específica sobre distintos sustratos.

Tipo ADH	Cofactor	Formulación	Actividad específica Etanol ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína) <sup>***</sup>	Actividad específica Docosanol ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína) <sup>***</sup>	Actividad específica Tetracosanol ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína) <sup>***</sup>
Hígado* de caballo	NAD <sup>+</sup>	sólida	0,026	0,004	0,004
Levadura	NAD <sup>+</sup>	sólida	0,025	0,006	Sin reacción
CP **	NAD <sup>+</sup>	líquida	Sin reacción	0,01	0,05
RS1**	NAD <sup>+</sup>	líquida	0,008	0,05	0,04
RS2**	NAD <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	0,0004	0,008
T**	NADP <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	0,06	Sin reacción
PR1**	NAD <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	Sin reacción	0,0005
PR2**	NAD <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	0,006	0,004
PF**	NADP <sup>+</sup>	líquida	0,016	0,015	0,016
LB**	NADP <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	Sin reacción	0,10
CDX003**	NADP <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	0,01	Sin reacción
CDX010**	NAD <sup>+</sup>	sólida	0,002	0,004	0,005
CDX013**	NADP <sup>+</sup>	sólida	Sin reacción	0,04	0,08

\* Enzimas producidas por Sigma

\*\* Kit enzimático producido por Julich Chiral solutions GMBH.

\*\*\*  $\mu\text{mol}$  NADH producidos  $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  proteína.

En este contexto es que el presente proyecto se orienta a la búsqueda de un microorganismo capaz de producir una alcohol deshidrogenasa que oxide alcoholes de cadena larga, específicamente docosanol ( $C_{22}H_{46}O$ ) y tetracosanol ( $C_{24}H_{50}O$ ), permitiendo la revalorización de alcoholes primarios alifáticos provenientes de los licores de jabones negro, además de posicionar a nuestro país como el único proveedor mundial de ácido lignocérico.

Dado los antecedentes señalados, este proyecto de investigación propone lo siguiente:

### HIPÓTESIS

Mediante la adición de alcanos o alcoholes alifáticos al medio de cultivo de cepas microbianas seleccionadas, será posible inducir la síntesis de la enzima alcohol deshidrogenasa con alta actividad oxidativa sobre alcoholes de cadena larga y obtener, luego de su purificación e inmovilización, un biocatalizador apto para efectuar la oxidación de alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono.

### OBJETIVO GENERAL

Se plantea como objetivo general del proyecto, seleccionar microorganismos productores de alcohol deshidrogenasas e inducir en ellos la producción de una enzima alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono adicionando al cultivo alcanos o alcoholes alifáticos, para su posterior purificación, caracterización e inmovilización.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Realizar un *screening* de microorganismos capaces de producir alcohol deshidrogenasas que oxiden alcoholes superiores y seleccionar aquel o aquellos microorganismos que produzcan una enzima con elevada actividad sobre tetracosanol, superior a las  $0,1 \mu\text{mol NADH producidos}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  proteína, valor máximo obtenido con alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (LB).

- 2.- Determinar el tipo de inductor, concentración y tiempo de adición en el cultivo por lote en matraces, que maximicen la producción de una alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono.
- 3.- Extraer y purificar la enzima desde el o los microorganismos seleccionados.
- 4.- Caracterizar estructuralmente la enzima producida, determinando su peso molecular y número de subunidades.
- 5.- Inmovilizar la enzima por unión covalente a fin de aumentar la estabilidad del biocatalizador producido.
- 6.- Caracterizar cinéticamente la enzima inmovilizada, estudiando el efecto de pH y la temperatura en su actividad y su estabilidad térmica, comparándola con la enzima libre.
- 7.- Evaluar la reacción de síntesis de ácidos grasos tetradecanoico, tetracosanoico y docosanoico con las enzimas producidas.



*Revisión  
Bibliográfica*

---

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A continuación se analizará el estado del arte para la obtención de los alcoholes primarios alifáticos a partir de los jabones de licor negro. Posteriormente se presentará una revisión sobre la obtención de ácidos grasos a partir de alcoholes de cadena larga. En seguida se presentarán algunas características de las alcoholes deshidrogenasas, en cuanto a su estructura, especificidad de sustrato y cofactores y, finalmente, se entregarán los antecedentes que se tienen sobre la producción de alcohol deshidrogenasa por vía fermentativa.

### 2.1 Obtención de alcoholes primarios alifáticos a partir de jabones de licor negro

Los jabones de licor negro constituyen un subproducto del proceso de obtención de la pulpa Kraft de madera de coníferas. En este proceso las astillas de madera se digieren a 170°C durante dos horas en una solución acuosa que contiene hidróxido de sodio y sulfuro de sodio; de esta forma se logra deslignificar la madera dando origen a una suspensión acuosa de color oscuro denominada licor negro. El licor negro es una mezcla compuesta por sales sódicas de ácidos grasos y ácidos resínicos, que constituyen la fracción saponificable de la mezcla, además de contener una serie de otros compuestos tales como esteroides, estanoles, alcoholes grasos o policosanoles, mono y diterpenos que en conjunto constituyen la fracción no saponificable, también denominada fracción neutra de los jabones de licor negro. Una vez realizada la reacción de deslignificación la pulpa de celulosa es separada del licor negro y luego lavada para su posterior utilización (Johansson, 1982; Härting *et al.*, 2000; Illanes *et al.*, 2008).

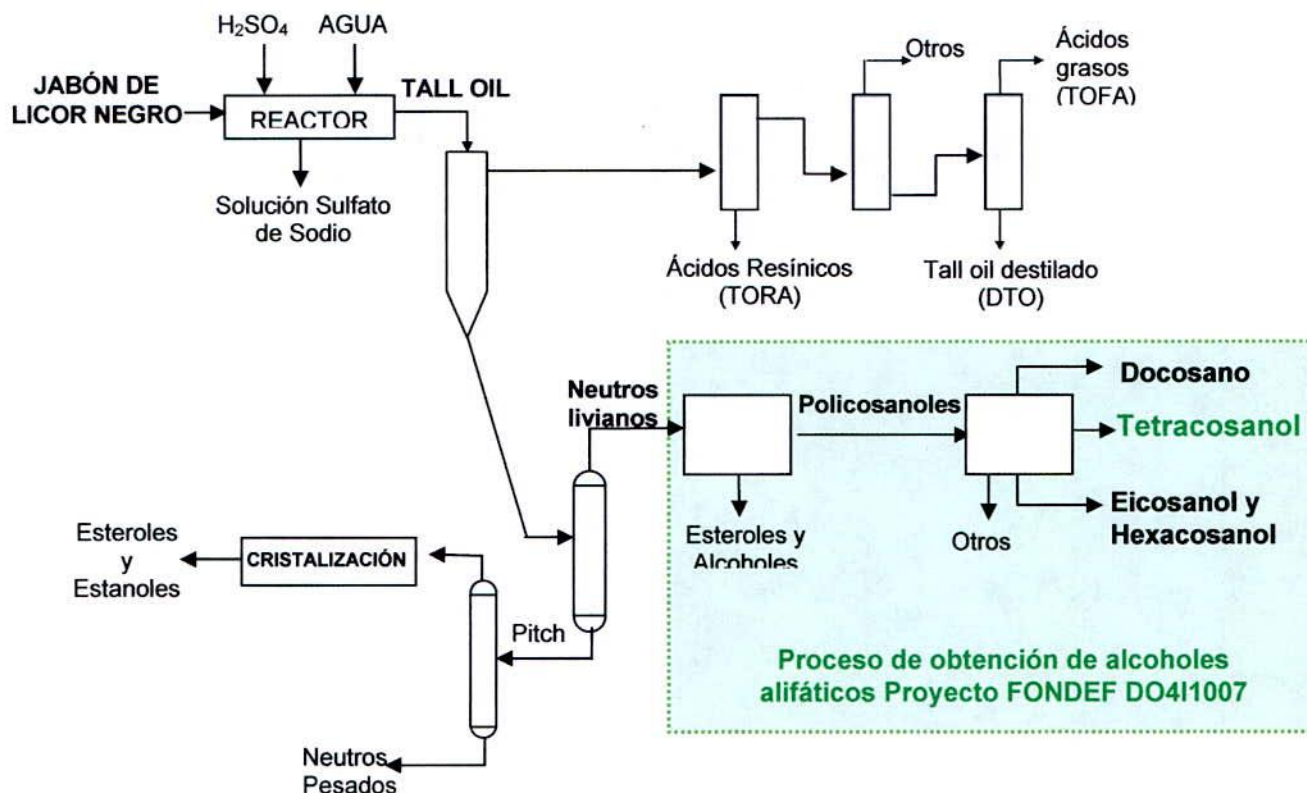
Por otro lado, el licor negro es recuperado por razones económicas y/o ambientales. Este proceso se desarrolla evaporando el licor negro hasta obtener un concentrado de aproximadamente 23-32 % en peso de sólido. De la superficie del licor concentrado se separan los jabones de ácidos grasos y resínicos en conjunto con una serie de compuestos hidrofóbicos o neutros solubilizados en dichos jabones. El material obtenido contiene entre 50-70 % de sólidos que pueden ser utilizados como combustibles, o bien acidificarse

utilizando ácido sulfúrico diluido transformando de esta forma las sales sódicas en ácidos grasos libres. Se obtiene así una fase acuosa que contiene sulfato de sodio y una fase aceite con el resto de los componentes. Esta fase aceite se conoce como el nombre de "tall-oil" crudo (CTO) (Johansson, 1982; Härting *et al.*, 2000; Illanes *et al.*, 2008).

A partir de una destilación fraccionada al vacío del CTO se obtienen por tope ácidos grasos conocidos como TOFA ("tall oil fatty acids", que constituyen una de las fracciones de mayor valor del CTO), ácidos resínicos denominados TOR ("tall oil resins") y tall-oil destilado o DTO, los cuales presentan una amplia aplicación comercial. Por fondo de la destilación se obtiene el "pitch" que contiene la mayoría de los componentes insaponificables del tall oil los que son utilizados ya sea como combustibles o en preparaciones de emulsiones asfálticas. Dentro de los componentes insaponificables con grupos funcionales alcohólicos, se encuentran los esteroides y los estanoles, cuyo proceso de separación fue desarrollado en el proyecto FONDEF D0011096 con resultados muy exitosos (Härting *et al.*, 2004; Illanes *et al.*, 2008).

El proceso de obtención de esteroides a partir de pitch genera una corriente de tope denominada "neutros livianos" que contiene los policosanoles, además de alcoholes rosínicos y eventualmente pequeñas fracciones de esteroides. Una vez obtenida esta corriente es posible la obtención de docosanol, tetracosanol y hexacosanol previa esterificación, metanólisis, destilación fraccionada y cristalización. La optimización de este proceso fue desarrollado en el proyecto FONDEF DO411007 por la Escuela de Ingeniería Bioquímica y la empresa Härting (Härting *et al.*, 2004).

La Figura 2.1 muestra el esquema completo del proceso de revalorización del jabón de licor negro desarrollado por la empresa Härting, destacándose la etapa de la obtención de alcoholes primarios alifáticos (docosanol y tetracosanol).



**Figura 2.1** Esquema del proceso de revalorización del jabón de licor negro desarrollado por la empresa Härting. El cuadro en verde muestra el proceso de obtención de Policosanoles (alcoholes primarios alifáticos).

## 2.2 Obtención de ácidos grasos de cadena larga a partir de alcoholes alifáticos

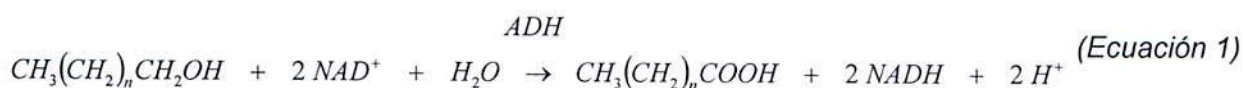
Una estrategia interesante para la producción de ácidos grasos de cadena larga en cantidades comerciales es mediante la oxidación química. Existen antecedentes para la oxidación química de octadecanol y eicosanol a los correspondientes ácidos usando como oxidante peróxido de hidrógeno y como catalizador peroxotungstofosfato de amonio cuaternario (Bi *et al.*, 2001). En la actualidad enmarcado en el proyecto FONDEF DO411007 se desarrolló una tesis de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química que estudia el proceso de oxidación de tetracosanol a ácido lignocérico; la oxidación es realizada usando un líquido iónico como catalizador compuesto por el catión Aliquat®336 y el anión poliperoxometalato {PO<sub>4</sub>[WO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub>}<sub>3</sub>. Los estudios cinéticos de la oxidación fueron llevados a cabo con y sin solventes a temperaturas que oscilan entre los 90 y 120 °C, y como

solvente se utilizó Conosol C-200, un hidrocarburo líquido que posee un alto punto de ebullición lo que permite realizar las cinéticas a las mismas temperaturas que sin solvente (Guajardo *et al.*, 2010).

La alternativa a la oxidación química es la oxidación enzimática mediante la enzima alcohol deshidrogenasa que actúa sobre alcoholes de cadena larga EC.1.1.1.192 (ADH) y cuya actividad ha sido probada en la reacción de hexadecanol a hexadecanoico (Brenda, Enzyme Database on line; Ueda y Tanaka, 1990).

Esta enzima pertenece al grupo de las oxidoreductasas y requiere de cofactores estequiométricos como  $NAD^+$  ( $NADP^+$ ) que actúen como transportadores de electrones.

La reacción de oxidación enzimática de los ácidos grasos de cadena larga a partir de alcoholes alifáticos es la siguiente:



Los cofactores son moléculas orgánicas complejas y de alto costo por lo que su regeneración es esencial para su aplicación tecnológica. Existen diversas opciones para regenerar dichos cofactores, pero la más adecuada es mediante el uso de un sistema enzimático auxiliar en que otra oxidoreductasa cataliza la reducción de un sustrato auxiliar que permite la reoxidación del cofactor  $NADH$  a  $NAD^+$ . Esto supone una dificultad tecnológica considerable, por cuanto se requiere de una enzima auxiliar y de un sustrato auxiliar que generará un subproducto que deberá ser convenientemente separado del producto a obtener (Zhao y Van der Donk, 2003; Liu y Wang, 2007; Hussain *et al.*, 2008; Findrink *et al.*, 2008; Vrsalovic y Basic-Racki, 2009).

Los cofactores pueden ser coinmovilizados o bien derivatizados y empleados en un reactor de membrana. De momento son muy escasos los procesos con oxidoreductasas que han alcanzado la madurez tecnológica, pudiendo citarse el caso de la producción de tert-leucina mediante aminación reductiva con la enzima leucina deshidrogenasa y regeneración del cofactor con el sistema auxiliar con la enzima formiato deshidrogenasa, desarrollado por la empresa alemana Degussa AG (Wandrey, 2004).

En la actualidad sólo existe en el mercado dos alcohol deshidrogenasas producida por las levaduras *Candida tropicalis* y *Candida lipolytica* capaces de actuar en la oxidación de alcoholes de cadenas superior hasta 16 átomos de carbono, no existiendo antecedentes en la literatura técnica o de patentes sobre la producción de ácido lignocérico mediante oxidación enzimática de tetracosanol.

### 2.3 Alcohol deshidrogenasa

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) son enzimas pertenecientes a la clase de las oxidoreductasas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes a aldehídos o cetonas con la correspondiente reducción de la coenzima,  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ .

Las alcohol deshidrogenasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza: se han encontrado en animales, plantas y microorganismos, jugando un rol importante en un amplio rango de procesos fisiológicos (Hirakawa *et al.*, 2004).

Han sido clasificadas de acuerdo a su tamaño molecular dividiéndolas en tres familias denominadas: alcoholes deshidrogenasas de cadena media (MDRs), alcoholes deshidrogenasas de cadena corta (SDRs) y alcoholes deshidrogenasas activadas por hierro (Jornvall *et al.*, 1987; Hummel, 1999).

#### 2.3.1. Alcohol deshidrogenasas de cadena media (MDRs) o Tipo I

Esta es la familia más estudiada. Son enzimas de unos 350 residuos aminoacídicos por subunidad, estructuradas en dímeros o tetrámeros; algunas dependen de zinc para realizar la catálisis y la gran mayoría de éstas alcohol deshidrogenasas utilizan  $\text{NAD(H)}$  o  $\text{NADP(H)}$  como cofactor (Riveros-Rosas *et al.*, 2003, Papanikolau *et al.*, 2005 y Persson *et al.*, 2008). Está compuesta por más de mil secuencias proteicas conocidas con una actividad enzimática muy diversa, y que participan en una gran diversidad de funciones fisiológicas, tales como fermentación alcohólica, detoxificación de aldehídos y alcoholes, biosíntesis de lignina, protección frente a un daño oxidativo, o en la biosíntesis de ácidos grasos (Valencia *et al.*, 2004; Jörnvall *et al.*, 2010). Principalmente son deshidrogenasas del tipo alcohol deshidrogenasa, poliol deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa glutation-dependiente y

quinoproteína etanol deshidrogenasa (Larroy *et. al*, 2002; Riveros-Rosas *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2008).

Riveros-Rosas y colaboradores (2003) indicaron que existen identificadas hasta esa fecha 583 secuencias de alcoholes deshidrogenasas de cadena media en arqueas, bacterias, protozoo, levaduras, plantas y animales, de las cuales 328 proteínas provienen de organismos eucariotas. Estas últimas fueron divididas en 3 macrofamilias que engloban a su vez a diversas familias y subfamilias.

1.- Macrofamilia I: son proteínas homodiméricas que requieren ión zinc para la catálisis y utilizan el cofactor NAD(H). Suelen ser citoplasmáticas. Está compuesta a su vez de dos familias: las polialcohol deshidrogenasas (PDH) y la familia ADH, desglosada en seis subfamilias: las ADHs de plantas, las ADH clase III, las ADHs de animales, la ADHs secundarias, las butanol deshidrogenasas (BDH) y las sorbitol deshidrogenasas (DHSO).

2.- Macrofamilia II: Son proteínas estructuradas en homodímeros u homotetrámeros que requieren ión zinc para la catálisis. Se localizan en el citoplasma y requieren NAD(H) y NADP(H) como coenzima. Están formadas por dos familias, la familia de ADHs de levadura y la familia de cinamil alcohol deshidrogenasas (CADH), desglosada en seis subfamilias: las CADHs y proteínas emparentadas, proteínas de plantas relacionadas con la defensa e inducibles por elicitador (ELI3), las ADHs de levaduras y proteínas emparentadas, las manitol deshidrogenasas de hongos (MTD), las ADHs secundarias de hongos y las ADHs de amplia especificidad de sustrato.

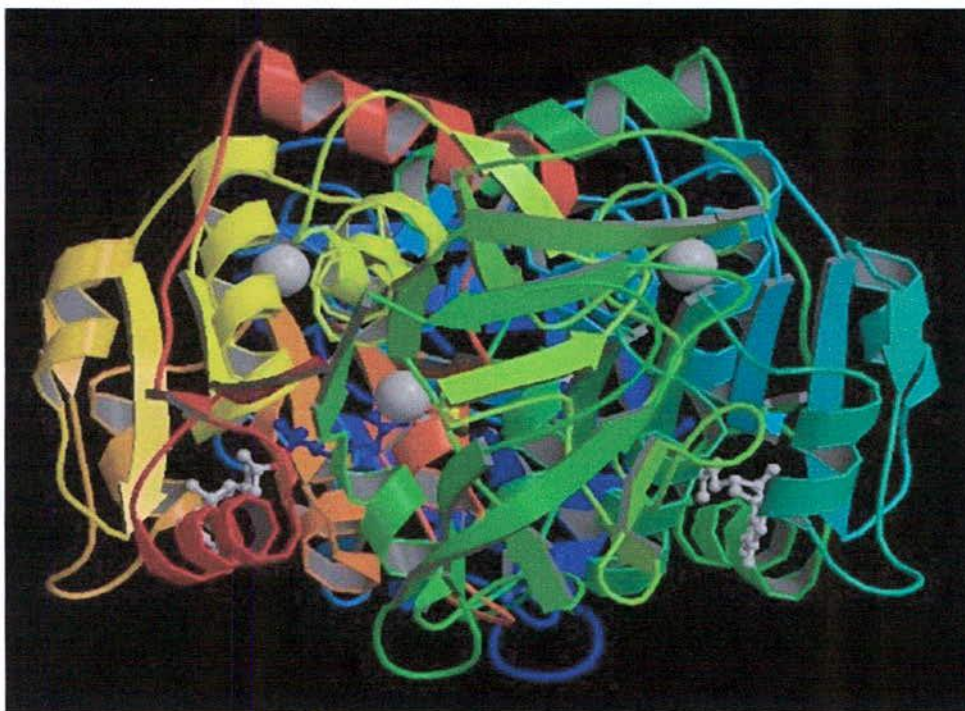
3.- Macrofamilia III: Son proteínas que no requieren zinc en la catálisis y utilizan mayoritariamente NADP(H) como cofactor. Su localización celular es muy diversa. Está formada por cuatro familias, la familia de los factores de transcripción/proteína de unión a receptores nucleares (NRBP), la familia de las enoil reductasas (ER), la familia de los leucotrienos deshidrogenasas (LTD) y la familia de las quinona oxidoreductasa (QORL). Esta macrofamilia es la más heterogénea y engloba diversas subfamilias, entre ellas: Las NRBPs, las cristalina oxidoreductasas, las quinona oxidoreductasa inducidas por p53 (PIG3) y proteínas emparentadas, las enoil reductasas (pER).

En los últimos años la familia de alcohol deshidrogenasas de cadena media ha crecido considerablemente, desde octubre de 2007 tiene cerca de 11.000 miembros, sin tener en cuenta las variaciones de las especies. Aproximadamente la mitad de las proteínas MDR se pueden agrupar en familias grandes con centenares de miembros, mientras que cerca de 1000 forman pequeños clusters con 10 o menos miembros cada uno. En la Tabla 2.1 se presentan los miembros de las familias MDR que se encuentran a la fecha publicados en UniProt sección Swissprot y TrEMBL (Persson *et al.*, 2008).

**Tabla 2.1.** Numero de miembros de las familias MDR publicados en Swissprot y TrEMBL.

Familia	Swissprot	TrEMBL
ADH	99	832
CADH	35	485
LTD	15	413
TADH	40	290
YHDH	1	294
BPDH	3	226
PDH	18	200
TDH	49	166
BurkDH	0	67
MCAS	1	57
MECR	13	36
VAT1	6	33
QOR	8	20
ACR	4	21
DOIAD	7	6
QORL	3	11
RT4I	3	7

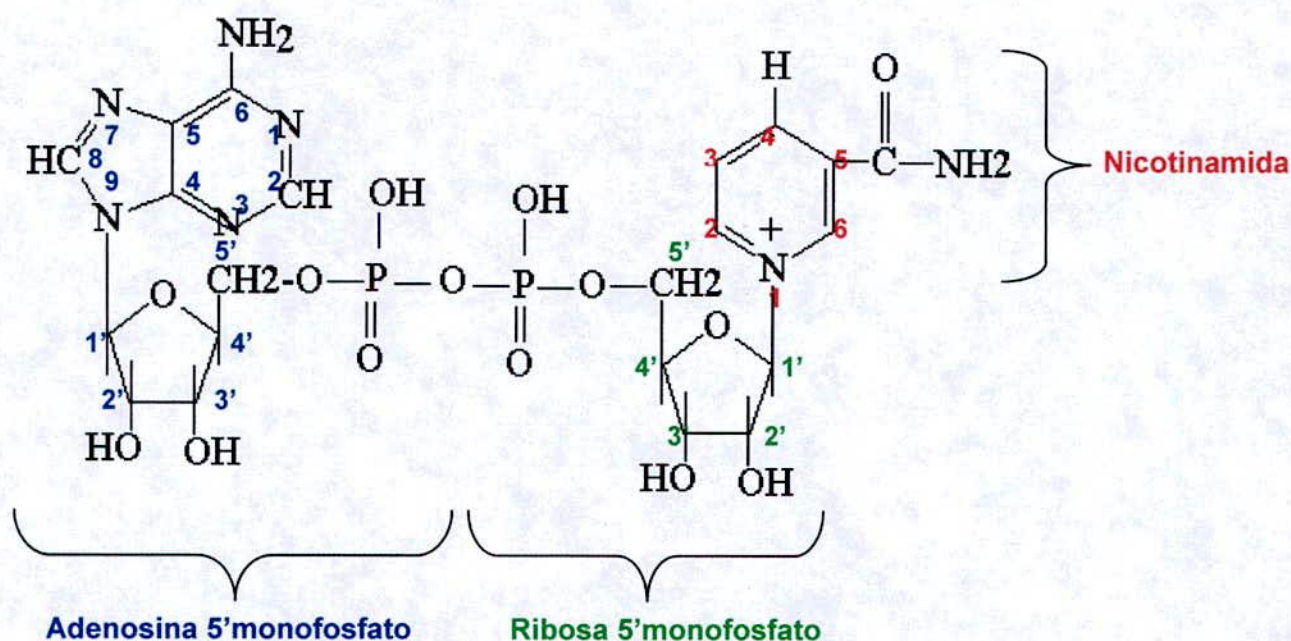
Por otro lado el miembro más representativo y más estudiado de la familia de las alcoholes deshidrogenas de cadena media es la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH). Estudios cristalográficos de esta enzima y otras MDR han revelado que todas mantienen las mismas características estructurales: se trata de proteínas formadas por subunidades de aproximadamente 40 kDa que representan dos dominios, uno catalítico y otro de unión al cofactor, separados por una profunda hendidura y dos átomos de zinc, uno con función estructural y otro con función catalítica. El espacio creado entre ambos dominios describe el centro de unión a la coenzima y el centro de unión al sustrato. Ver figura 2.2 (Eklund *et al.*, 1976; Papanikolau *et al.*, 2005).



**Figura 2.2** Estructura de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo. Los iones zinc están representados como esferas grises y la molécula de coenzima está representada en forma de modelo de bolas y bastones (Ramaswamy *et al.*, 1999).

**Sitio de unión a la coenzima:**

Para que se produzca la catálisis, la molécula de coenzima debe estar bien posicionada debido a que la transferencia de protón es al carbono 4 de la nicotinamida (Ver figura 2.3). La adecuada ubicación de la coenzima para que se de el reconocimiento del anillo de nicotinamida implica una unión fuerte con la proteína a través de múltiples interacciones, lo que crea un conflicto dado que no facilita su disociación una vez finalizada la catálisis, siendo éste el paso limitante. La molécula de NAD(P) forma entre 16 y 19 puentes de hidrógeno con la proteína, de los cuales el 30% está mediado por moléculas de agua. La hendidura entre dominios que forman el centro de unión a la coenzima se divide en tres zonas, la unión a adenina, el pirofosfato y la nicotinamida, siendo esta última la más interna (Larroy, 2006).



**Figura 2.3** Estructura de la Nicotinamida adenin dinucleótido (NAD<sup>+</sup>).

La adenosina se ubica en la posición más externa del centro de unión a la coenzima, quedando accesible al solvente. Entre los residuos involucrados en la interacción con la ribosa se encuentran las glicinas 199, 201 y 202 (para el caso de la HLADH). Un residuo aminoacídico importante para discriminar entre la unión de NAD(H) o NADP(H) es el situado en la posición 223, que para el caso de las alcoholes deshidrogenasas NAD(H) dependiente

es un ácido aspártico. El gran volumen de la cadena lateral del ácido aspártico y su carga negativa que aporta a la región de la ribosa de la adenina impedirían la adecuada ubicación de la molécula de NADP(H). El pirofosfato se sitúa en la región intermedia, siendo estabilizado los oxígenos del pirofosfato por los residuos de arginina 47 y 369 y por los nitrógenos de la cadena principal de la proteína. Finalmente la nicotinamida se une a la región más cercana al zinc catalítico, que para el caso de la HLADH la cara A del anillo se orienta hacia el espacio reservado para el sustrato de manera que en la oxidorreducción se transfiera el hidrógeno. Esta es una transferencia estereoespecífica resultado de la reorganización del centro activo. La disposición del anillo de nicotinamida en relación al sustrato determinará qué hidrógeno será transferido. (Larroy, 2006).

### **Sitio de unión al sustrato:**

Es una hendidura que se encuentra expuesta al medio; sin embargo, el cambio conformacional provocado por la entrada de la coenzima deja esta hendidura aislada del solvente. Las características del centro de unión del sustrato junto con las interacciones del sustrato con el túnel hidrofóbico de la enzima, favorecen la reacción de oxidación de alcoholes debido al entorno anhidro. La reacción se inicia con la unión de la coenzima NAD<sup>+</sup> generando la rotación del cuerpo rígido de los dominios catalíticos en 10 Å<sup>o</sup> provocando el acercamiento de la coenzima al centro de unión a la molécula. Esta unión va seguida por la ionización de la molécula de agua que coordina el zinc por el grupo hidroxilo liberándose un protón. Luego este protón es liberado a la superficie mediante un sistema de transmisión que involucra a los residuos de histidina 51, serina/treonina 48 (para el caso de la HLADH). El sustrato se acerca al zinc catalítico desplazando al hidroxilo que lo coordinaba. Las características del ión zinc y el microentorno favorecen la ionización del alcohol y el protón liberado formará una molécula de agua junto con el hidroxilo desplazado. Luego se produce la transferencia del hidruro al carbono 4 del NAD<sup>+</sup> con la consiguiente formación del aldehído y la reducción del NAD a NADH. Finalmente se disocian del sustrato y la coenzima reducida, siendo este último el paso limitante de la reacción (Larroy, 2006).

Por otro lado Ludwig y colaboradores (1995) al estudiar la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 observaron que su sitio activo está formado por dos sitios de unión a sustrato; un sitio de unión a pequeños grupos alquil y un sitio para los grupos

alquil más grandes, ambos ubicados a un costado del sitio catalítico, determinando que el sitio de unión a los pequeños grupos alquil acepta solo a grupos metil o etil, pero no a cadenas alquil de mayor longitud. Por otro lado indicaron que el sitio de unión para grupos alquil más grandes estaría conformada por una ranura hidrofóbica que se produce en la superficie de la enzima y que es capaz de aceptar las cadenas hidrocarbonadas lineales de mayor longitud.

### 2.3.2. Alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDRs) o Tipo II

Son enzimas con subunidades de unos 250 a 350 aminoácidos que no requieren metal como cofactor, tal como la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (Hirakawa *et al.*, 2004). Esta familia está compuesta por alrededor de 3000 alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD(P)<sup>+</sup>. Estas enzimas presentan actividad con un amplio rango de sustratos tales como alcoholes, azúcares, aminoácidos, esteroides, retinoides, prostaglandinas y ácidos biliares, encostrándose en esta familia de alcoholes deshidrogenasas de cadena corta actividades diversas como la actividad deshidrogenasa, deshidratasa, sintasa, epimerasa e isomerasa (Larroy, 2006 y Jörnvall *et al.*, 2010).

### 2.3.3. Alcohol deshidrogenasas activadas por hierro o Tipo III

Las alcoholes deshidrogenasas activadas por hierro con dos a cuatro subunidades de 380 a 390 aminoácidos que requieren iones divalentes para la catálisis (Hirakawa *et al.*, 2004). Actualmente es la familia más desconocida, ya que hasta la fecha se han identificado pocas enzimas que pertenezcan a este grupo, siendo éstas de bacterias y levaduras. A pesar de que se clasifican como enzimas activadas por hierro, no todas las enzimas de este grupo requieren de hierro, sino que también pueden aceptar otros iones divalentes. Dentro de los miembros más estudiado se encuentra la alcohol deshidrogenasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* activada por zinc (Hirakawa *et al.*, 2004) y la alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis* activada por hierro (Larroy, 2006).

## 2.4 Obtención de alcohol deshidrogenasas con actividad sobre diferentes sustratos mediante screening de microorganismos.

Aunque existe una gran cantidad de alcohol deshidrogenasas NAD(P)<sup>+</sup> dependientes, hoy en día a nivel tecnológico hay una gran demanda de enzimas con especificidades por nuevos sustratos. Se pueden obtener nuevos biocatalizadores o bien mejora los existentes a través de dos métodos: *screening* de enzimas desde su fuente natural o mediante mutagénesis dirigida de enzimas conocidas. La forma tradicional para descubrir nuevas enzimas es mediante el screening de microorganismos, plantas o animales. El uso de microorganismos es de interés debido al corto tiempo de generación y a la gran diversidad de rutas metabólicas y enzimas que intervienen en ella.

La literatura bioquímica y de fisiología microbiana puede ser útil a la hora de seleccionar la cepa que produzca la enzima que permita la biotransformación de nuestros sustratos de interés.

La siguiente tabla muestra algunos ejemplos de alcoholes deshidrogenasas aisladas de distintas fuentes y sus diferentes especificidades por los sustratos.

**Tabla 2.2:** Alcoholes deshidrogenasas provenientes de distintas fuentes

Tipo ADH (Fuente)	PM	Sustratos	Referencia
Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo	Homodímero 80 KDa. (40 KDa c/u)	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios.</li> <li>• Alcoholes alifáticos secundarios hasta 8 carbonos.</li> <li>• Alcoholes cíclicos.</li> <li>• Baja actividad sobre cetonas.</li> </ul>	Dickinson <i>et al.</i> , 1967  Branden <i>et al.</i> , 1973
<i>Aeropyrum pernix</i> K1 recombinante	Homotetrámero 160 KDa. (40 Kda c/u)	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios hasta 2 carbonos.</li> <li>• Alcoholes alifáticos secundarios sobre 10 carbonos.</li> <li>• Alcoholes aromáticos</li> <li>• Cetonas aromáticas y alifáticas Benzaldehído.</li> </ul>	Hirakawa <i>et al.</i> , 2004.

Continuación tabla 2.2

Tipo ADH (Fuente)	PM	Sustratos	Referencia
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	Homodímero 110 KDa (48 Kda c/u)	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios hasta 12 carbonos.</li> <li>• Alcoholes alifáticos secundarios desde 7 a 9 carbonos.</li> <li>• Enantioselectividad por S(+)</li> </ul>	Ludwig <i>et al.</i> , 1995.
<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473	Homotetrámero 200 KDa (48 KDa c/u)	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios hasta 8 carbonos.</li> <li>• No oxida alcoholes alifáticos secundarios.</li> <li>• Sustrato fisiológico es aldehído (a alcohol), sin embargo observan que realiza bien la oxidación.</li> </ul>	Ma <i>et al.</i> , 1994.
<i>Thermococcus</i> ES-1	Homotetrámero 184 KDa (46 KDa c/u) 1g-átomo de Fe por subunidad	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios hasta 8 carbonos y el mejor resultado es con 6 carbonos.</li> <li>• Baja actividad sobre alcoholes alifáticos secundarios.</li> <li>• Más eficiente su acción sobre aldehído para dar alcohol primario.</li> </ul>	Ma <i>et al.</i> , 1995.
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	Homohexámero 270 KDa (48 KDa c/u)	Especificidad por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcoholes alifáticos primarios hasta 8 carbonos a 80°C</li> <li>• Baja actividad sobre alcoholes alifáticos secundarios o polioles.</li> <li>• Más eficiente su acción sobre aldehído para dar alcohol primario.</li> </ul>	Ma <i>et al.</i> , 1999.

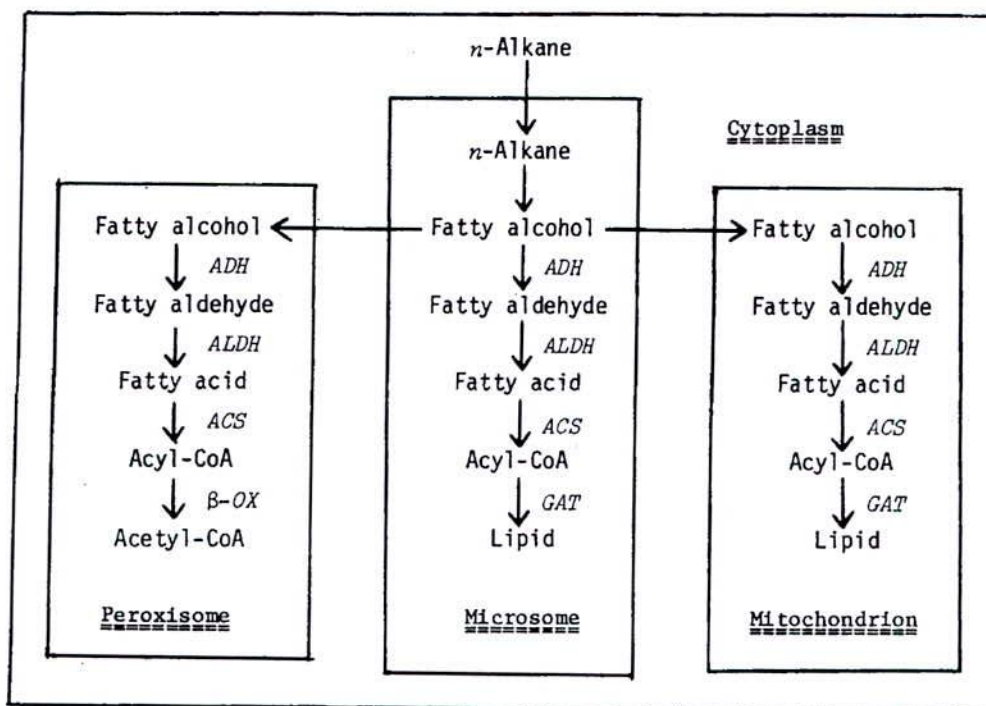
Continuación tabla 2.2

Tipo ADH (Fuente)	PM	Sustratos	Referencia
<i>Thermococcus hydrothermalis</i> Recombinante	Homotetrámero 197 KDa (45 KDa c/u) a pH 10,5  Dímeros 80,5 KDa a pH 7,5	Especificidad por: • Oxidación de alcoholes alifáticos primarios preferentemente de 2 a 8 carbonos y el mejor resultado es con 6 carbonos. • oxidación de alcoholes aromáticos • Sustrato fisiológico es aldehído, sin embargo observan que realiza bien la oxidación. •	Antoine <i>et al.</i> , 1999.
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Homodímero 70 KDa	Especificidad por: • Alcoholes alifáticos primarios lineales y ramificados hasta 5 carbonos. • Alcoholes secundarios cíclicos y lineales. • Cetonas cíclicas • Anisaldehído	Rella <i>et al.</i> , 1987  Ammendola <i>et al.</i> , 1992.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (isoenzimas VI)	Homodímero 40 KDa c/u	Especificidad por: • Alcoholes alifáticos primarios lineales y ramificados de hasta 8 carbonos. • Alcoholes aromáticos primarios. • Aldehídos	Larroy <i>et al.</i> , 2002
<i>Ralstonia autropha</i>	Monómero 73 KDa	Especificidad por: • Oxidación de alcoholes alifáticos primarios lineales hasta 6 carbonos y alcoholes alifáticos primarios ramificados generando el ácido respectivo. • Tetrahidrofurfuril alcohol	Zarnt <i>et al.</i> , 1997
<i>Comamonas testosteroni</i>	Monómero 71 KDa	Especificidad por: • Oxidación de alcoholes alifáticos primarios, principalmente etanol	De Jong <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomona putida</i>	Monómero 72 Kda	Especificidad por: • Alcoholes alifáticos primarios hasta 12 carbonos y el mejor resultado es sobre 6 a 8 carbonos.	Toyama <i>et al.</i> , 1995.

## 2.5 Producción alcohol deshidrogenasa por microorganismos

Se han realizado algunos estudios sobre la inducción de la producción de enzimas relacionadas con la  $\omega$ -oxidación y  $\beta$ -oxidación utilizando n-alcenos como única fuente de carbono. La incorporación de los alcanos pasan por una primera etapa de hidroxilación por el sistema citocromo P-450 y NADPH-citocromo P-450 reductasa, sistema que está localizado en el retículo endoplasmático (microsomias), generándose el correspondiente alcohol de cadena larga. Estos alcoholes de cadena larga producidos no son solamente degradados en la vía de la  $\beta$ -oxidación, sino que también son utilizados para la biosíntesis de lípidos en la mitocondria y el retículo endoplasmático después de producida la deshidrogenación por la alcohol deshidrogenasa que actúa sobre cadenas largas, aldehído deshidrogenasa y posiblemente existiría la participación de una alcohol oxidasa (Yi y Rehm, 1982a; Yi y Rehm, 1982b; Ueda y Tanaka, 1990; Kitamoto *et al.*, 2001; Craft *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2005; Throne-Holst *et al.*, 2006; Van Beilen *et al.*, 2007).

La figura 2.4 resume el rol que cumple las deshidrogenasas en la incorporación de los alcanos al metabolismo de las levaduras.



**Figura 2.4** Esquema de la incorporación de n-alcenos al metabolismo de las levaduras (Yamada *et al.*, 1980).

Algunas especies de levaduras que pertenecen al género *Candida* producen  $\omega$ ,  $\beta$  diácidos como consecuencia de cultivar el microorganismo en n-alcanos o ácidos grasos como única fuente de carbono. La utilización de una mezcla de n-alcanos entre 10 y 13 carbonos por las levaduras *Candida tropicalis* ATCC 20336 y *Candida lipolytica* NRRL Y-6795 como única fuente de carbono han inducido la síntesis de una alcohol deshidrogenasa, capaz de oxidar alcoholes de cadenas de largo superior entre 8 y 16 átomos de carbono, obteniendo la máxima actividad al utilizar tetradecanol ( $C_{14}H_{30}O$ ) como sustrato. Ambas enzimas son  $NAD^+$ -dependientes y se encuentran localizadas en el microsoma, mitocondria y peroxisoma. En peroxisomas, esta alcohol deshidrogenasa se encuentra localizada junto a otras enzimas tales como aldehído deshidrogenasa que actúa sobre aldehídos superiores, acyl CoA sintetasa y sistema de  $\beta$ - oxidación de ácidos grasos, indicando que en conjunto participan en la degradación de los ácidos grasos (Ueda y Tanaka, 1990).

Por otro lado es posible dirigir los sustratos hacia las vías de  $\beta$ -oxidación o  $\omega$ -oxidación utilizando ingeniería metabólica. Picataggio *et al.*, en 1992 por medio de la interrupción secuencial de los cuatro genes que codifican las isoenzimas acil-CoA oxidasas, lograron aumentar la producción de ácidos carboxílicos de cadena larga. Estas isoenzimas son las responsables de catalizar la primera reacción en la vía de la  $\beta$ -oxidación y por lo tanto los sustratos como alcanos y ácidos grasos son redirigidos hacia la  $\omega$ -oxidación. Por consecuencia la eficiente conversión y selectividad química por la oxidación terminal del correspondiente ácido carboxílico aumenta considerablemente.

## **2.6 Uso de microorganismos extremófilos para la producción de alcohol deshidrogenasa**

Es de gran interés la utilización a nivel industrial de alcoholes deshidrogenasas provenientes de microorganismos extremófilos, principalmente termófilos, debido a que a elevadas temperaturas se reducen los problemas de solubilidad de los componentes de la reacción, la utilización de solventes orgánicos y el riesgo de contaminación (Van den Burg, 2003).

En los últimos años se han realizado muchos estudios acerca de las características de las alcoholes deshidrogenasas proveniente de microorganismos termofílicos, e hidrotermofílicos.

Se conocen cerca de 20 arqueas termófilas y 17 cepas de bacterias termófilas que producen alcohol deshidrogenasas.

Los microorganismos termofílicos han sido aislados desde fuentes naturales como respiraderos hidrotermales, sedimentos marinos volcánicos, aguas calientes, o bien de fuentes no naturales como reservorios de petróleo, digestores, pilas, etc. La mayoría de estos microorganismos termófilos producen múltiples alcoholes deshidrogenasas y algunas son de diferente tipo (Radianingtyas *et al.*, 2003). En 1987, Rella y colaboradores detectaron una alcohol deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente en *Sulfolobus solfataricus* una arquea termofílica extrema, esta enzima ha sido clasificada como una alcohol deshidrogenasa de cadena media por estar conformada de 347 aminoácidos, presenta especificidad por una gran variedad de sustratos donde se incluyen alcoholes primarios lineales y ramificados, alcoholes secundarios lineales y cíclicos y cetonas cíclicas. Además que esta enzima es extraordinariamente termófila presentando un incremento en su actividad al aumentar la temperatura en un rango de 40 a 95°C. En cuanto a su estabilidad térmica se observa un tiempo de vida media de 20 h a 60°C y 5 h a 70°C.

Más tarde Ammendola *et al.*, (1992) secuenciaron el gen y la proteína de esta alcohol deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente en *Sulfolobus solfataricus* y la relacionaron con otras alcoholes deshidrogenasas, observando que existe entre un 24 a 25% de identidad con la secuencia aminoacídica de las alcoholes deshidrogenasas proveniente de hígado de caballo, levadura y *Thermoanaerobium brockii*.

Por otro lado Bryant *et al.*, 1988 purificaron dos alcoholes deshidrogenasas de *Thermoanaerobacter ethanolicus* (ATCC 31550). Ambas enzimas son tetraméricas con aparentemente idénticas subunidades. Son NADP<sup>+</sup> dependientes y presentan una elevada termoestabilidad. Lo que las diferencia es la selectividad por el sustrato: una de ellas actúa sobre alcoholes primarios incluyendo heptanol y otros alcoholes de cadena larga. La otra enzima actúa sobre alcoholes secundarios y se inactiva frente a pentanol y alcoholes superiores. La alcohol deshidrogenasa primaria es formada por *Thermoanaerobacter ethanolicus* después de la fase de crecimiento. En cambio la alcohol deshidrogenasa secundaria se produce durante la etapa de crecimiento del microorganismo, es estimulada por piruvato y tiene una baja afinidad por acetaldehído. Se postula que es responsable de la formación de etanol en la fermentación de carbohidratos.

Ludwig *et al.*, 1995 detectó una alcohol deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>- dependiente en *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 que es activa sobre un amplio rango de sustrato, particularmente sobre alcoholes alifáticos secundario de cadena larga. La enzima muestra una moderada termoestabilidad con un tiempo de vida media de 4 h a 60 °C y puede potencialmente ser utilizada para la síntesis de esteroisómeros ópticamente puros de alcoholes secundarios.

El mismo año Ma *et al.* (1995) aislaron desde aguas hidrotermales una arquea anaerobia denominada *Thermococcus* ES-1. Este microorganismo crece a temperaturas superiores a los 91°C, y su rendimiento y velocidad de crecimiento depende de la concentración de azufre elemental (S<sup>0</sup>) en el medio. Requiere de una concentración mínima de S<sup>0</sup> para detectar actividad catabólica durante la etapa de crecimiento. Dentro de las enzimas se incluye una alcohol deshidrogenasa NADP dependiente formada por homotetrámeros y que preferentemente cataliza la reducción de acetaldehído y fenilacetaldehído, aunque también se ha observado que actúa en la oxidación de alcoholes de 2 a 8 átomos de carbono.

Otra alcohol deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>- dependiente fue observada por D' Auria *et al.* (1996). Esta vez la enzima proviene del microorganismo termófilo *Bacillus acidocaldarius*; es un tetrámero compuesto por subunidades idénticas de 38 KDa cada una. Aunque presenta especificidad por alcoholes primarios y secundarios lineales y cíclicos, el etanol es el mejor sustrato y no es activa en presencia de cetonas.

Un año después Li y Stevenson (1997) purificaron una alcohol deshidrogenasa tipo III NADP(H)- dependiente de una *Thermococcus*, esta vez de la cepa AN1. Esta enzima es un homotetrámero que oxida una serie de alcoholes primarios lineales, pero no cataliza la oxidación del metanol. El valor de pH y temperatura óptima utilizando etanol como sustrato es de 7,0 y 85°C respectivamente.

Posteriormente Antoine *et al.* (1999), lograron clonar, secuenciar y sobre expresar en *Escherichia coli* el gen que codifica la alcohol deshidrogenasa tipo III NADP(H)- dependiente de *Thermococcus hydrothermalis*. La enzima recombinante fue purificada, caracterizada y comparada con la enzima nativa observando que la estructura de la recombinante es dependiente del pH: a pH 10,5 es un homotetrámero de 45 kDa cada subunidad y a pH 7,5 es un dímero de 80,5 KDa. Por otro lado, los parámetros cinéticos muestran que la enzima recombinante presenta mayor afinidad por el aldehído, aunque también oxida alcoholes

alifáticos primarios preferentemente de dos a ocho átomos de carbono y alcoholes aromáticos, además de presentar actividad sobre metanol, glicerol y estéreo especificidad por monoterpenos.

Holt *et al.* (2000), clonan, secuencian y expresan en *Escherichia coli* el gen de una alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200, obteniendo una alcohol deshidrogenasa termoestable capaz de oxidar alcoholes primarios de cadena larga. La secuencia nucleotídica de adhA corresponde a un ORF (open reading frame) de 1179 pb que codifican 399 aminoácidos. El análisis de la secuencia aminoacídica muestra que existe un 69% de identidad con alcohol deshidrogenasas desde dos especies de arqueas (*Thermococcus* AN1 y *Thermococcus litorales*).

Posteriormente, Hirakawa *et al.* (2004), purificaron una alcohol deshidrogenasa de la arquea hipertermofílica *Aeropyrum pernix* K1 y la expresan en *Escherichia coli*. La enzima recombinante obtenida es un homotetrámero cuyo pH para las reacciones oxidativas es de 10,5 y para las reductivas es alrededor de 8,0. Esta enzima es una NAD<sup>+</sup>-dependiente termofílica cuya actividad catalítica se incrementa al aumentar la temperatura sobre los 95°C y mantiene sobre 24% de su actividad inicial durante 30 min. a 98°C. Su especificidad por sustratos incluye alcoholes alifáticos y aromáticos y cetonas alifáticas y aromáticas.

Kube *et al.* (2006) optimizaron la producción de la alcohol deshidrogenasa de la arquea termoactiva *Pyrococcus furiosus* (Adh C) a través de diferentes estrategias de cultivo del microorganismo. Para eso expresaron el gen que codifica la Adh C en *Escherichia coli* para posteriormente estudiar el crecimiento en medio mínimo de este microorganismo en cultivo en un biorreactor operado en la modalidad por lote. Las estrategias de cultivo utilizadas para optimizar la producción de la enzima consistieron en variar la temperatura de 37 a 28°C, aplicar shock térmicos desde 37 a 42°C y desde 37 a 45°C y variar el tiempo de inducción. La máxima actividad registrada fue de 30 UI/l (correspondiente a 6 mg/l proteína), donde una unidad internacional UI es definida como a cantidad de enzima requerida para la conversión de 1 μmol NAD por min a condiciones estándar, utilizando 2,3 butanodiol como sustrato y realizando el shock térmico de 37 a 42°C.

Este proyecto se centra en la producción y purificación de una alcohol deshidrogenasa que oxide alcoholes de cadena larga produciendo el respectivo ácido carboxílico de interés industrial, ya que mediante la revisión del estado del arte se pudo determinar que es factible inducir la producción de alcoholes deshidrogenasas en microorganismos utilizando como sustrato el alcano o alcohol correspondiente; sin embargo, no existen trabajos realizados sobre la síntesis alcohol deshidrogenasa con activa sobre alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono.

Por otro lado se descartó la utilización de enzimas comerciales debido a que no existe en el mercado una enzima capaz de oxidar alcoholes de 22 y 24 carbonos, y a que estudios previos de la capacidad de oxidación de docosanol y tetracosanol de 13 alcohol deshidrogenasas (Ver tabla 1.1), que fueron descritas para actuar sobre alcoholes superiores y que se encuentran disponibles comercialmente no presentaron actividad significativa sobre estos sustratos de interés.



*Materiales  
y Métodos*

---

---

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Microorganismos

Las cepas utilizadas para el estudio fueron *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* HB27, HNI-11, NR-17, PRQ16, PRQ25, proporcionadas por el Dr. José Berenguer y el Dr. Daniel Vega del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

### 3.2 Equipos y materiales

#### 3.2.1 Equipos

- Autoclave, Fab. Lequex S.A.
- Incubadora orbital Labtech , modelo LSI-3016R
- Centrífuga Sorvall, modelo RC-SB
- Centrífuga Sorvall, modelo RC2-B
- Estufa de secado Memmerth, modelo ULM 600
- Microscopio óptico Zeiss.
- Vortex Heidolph, modelo Reax 2000
- Centrífuga de mesa sprout
- Espectrofotómetro Jenway modelo 6715 UV/VIS
- Baño de agua con termocirculador de inmersión Julabo Modelo EC
- Cromatógrafo de gases Pelkin Elmer, modelo Clarus 500
- Columna HP-5, Crosslinked 5% fenil metil silicona
- Detector FID 300 °C
- Cámara de electroforesis Bio-RaD Mini Protein tetra System
- Fuente de poder Thermo Electrón corporation, modelo EC 250-90
- pHmetro HANNA, Instruments pH 211
- Roller Mixer SRT2
- Bomba de vacío
- Balanza granataria Precisa, modelo XB 220A
- Balanza granataria Precisa, modelo XB 4200C

- Placa agitadora multiestación Variomag Telesystem

### 3.2.2 Materiales

- Matraces erlenmeyer 250, 500 ml y 1 l
- Asa de loop
- Cámara Neubauer Improved Bright
- Placas de petri
- Portapipetas
- Pipetas graduadas 1, 5 y 10 ml
- Termómetro
- Homogenizador de vidrio
- Barras de agitación magnética (distintos tamaños)
- Matraz de aforo 10, 25, 50, 100, 250, 500 ml, 1 l y 2 l
- Vasos de precipitado 50, 100, 250, 500 ml y 1 l
- Probetas de 50, 100, 250 y 500 ml
- Tubos de ensayo - gradillas
- Cronómetro
- Micropipetas graduadas de 10  $\mu$ l , 100  $\mu$ l , 1000  $\mu$ l y 5000  $\mu$ l
- Tips para micropipetas
- Espátula
- Tubos eppendorf
- Papel filtro Whatman N° 1
- Matraz Kitazato
- Embudo Büchner
- Embudo Millipore N°4 con frita
- Mechero, trípode y rejilla
- Viales de centelleo
- Tubos eppendorf con filtro millipore 0,22  $\mu$ m
- Celdas de cuarzo y plásticas para espectrofotómetro
- Embudos de decantación

### 3.2.3 Reactivos

- Albúmina de bovino (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido Bicinconínico (Pierce Biotechnology, USA)
- Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido fólico (Sigma Co,USA )
- Ácido ortofosfórico 85% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido pantoténico (Sigma Co,USA )
- Agua mineral sin gas (Cachantun, Chile)
- Azul de metileno (Sigma Co,USA)
- Biotina (Sigma Co,USA )
- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma Co,USA )
- Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania)
- diglyme (Sigma Co,USA )
- Extracto de levadura (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Glicerol 87% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Lutrol F-68 ( BASF, Alemania)
- Niacina (Sigma Co,USA )
- N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (Sigma Co,USA )
- Piridina (Sigma Co,USA )
- Tiamina (Sigma Co,USA )
- Triptona (Merck, Darmstadt, Alemaia)
- Sulfato de potasio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tiosulfato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NAD<sup>+</sup> (Julich Chiral solutions GmbH, Alemania)
- NADH (Julich Chiral solutions GmbH, Alemania)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaIO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaOH (Merck, Darmstadt, Alemania)

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{CoCl}_2$  (Loba Chemie,India )
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Loba Chemie,India )
- $\text{MoO}_3$  (Loba Chemie,India )
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Butanol (Sigma Co,USA )
- Octanol (Sigma Co,USA )
- Dodecanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tetradecanol (Sigma Co,USA )
- Tetradecano (Sigma Co,USA )
- Hexadecanol (Sigma Co,USA )
- Heptadecano (Sigma Co,USA )
- Octadecano(Sigma Co,USA )
- Eicosanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Docosanol (Sasol Germany GmbH)
- Tetracosanol (ABCR GmbH & CoKG)
- Trizma Base (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Glicina (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Co,USA )
- Marcador de peso molecular (MW-SDS- 200 KiT SIGMA)
- Glicerol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- $\beta$  Mercaptoetanol (Sigma Co,USA )
- Azul de bromofenol (Sigma Co,USA )
- Acrilamida (Sigma Co,USA )
- N,N' metilenbisacrilamida (Sigma Co,USA )
- Persulfato de amonio (Sigma Co,USA )
- N,N,N',N' tetrametiletilen diamina (TEMED) ( Merck, Darmstadt, Alemania)
- Etilendiaminotetracetato disódico (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Coomassie Brilliant Blue (Sigma Co,USA )
- Agarosa 4 BCI (Iberagar, Portugal)
- Q-sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences, Suiza)
- CM-sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences, Suiza)
- SP-sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences, Suiza)
- DEAE-sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences, Suiza)
- CNBr sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences, Suiza)
- Imino diacetic acid (Sigma Co,USA )
- Glicidol (Sigma Co,USA )
- Hexano (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tritón X-100 (Sigma Co,USA )
- Glicerina (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaBH<sub>4</sub> (Sigma Co,USA )
- CuSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania)
- β Mercaptoetanol (Sigma Co,USA )
- Epiclorhidrina (Sigma Co,USA )
- Etilendiamina (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Dextrano sulfato 100 kDa (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Imidazol (Merck, Darmstadt, Alemania)

### 3.3 Métodos analíticos

#### 3.3.1 Determinación de la actividad deshidrogenasa

La actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa fue determinada espectrofotométricamente mediante el método de Rella *et al.* (1987) modificado. La actividad fue determinada registrando el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, utilizando 0,2 mM de sustrato (alcohol alifático), 100 mM NAD<sup>+</sup> en tampón fosfato 100 mM pH 7,0 con 0,65% diglyme.

La actividad enzimática es medida como velocidad inicial de reacción; una unidad internacional (UI) de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de NADH por minuto a las condiciones antes mencionadas.

Es importante destacar que por cada 2 moles de NAD<sup>+</sup> consumido se produce un mol de ácido.

##### Preparación de reactivos:

Se preparó una solución de NAD<sup>+</sup> 100 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7,0 y soluciones stock 30,6 mM de los diferentes sustratos (etanol, butanol, octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, docosanol y tetracosanol) en diglyme para solubilizar el alcohol de cadena larga.

##### Procedimiento:

Antes de comenzar la medición de actividad el sustrato fue diluidos a una concentración final 0,2 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7,0 bajo agitación y temperatura de aproximadamente 70°C.

La reacción se llevó a cabo agregando 2 ml de sustrato 0,2 mM en una cubeta de cuarzo, luego se adicionó entre 50 a 200 μl de enzima y se preincubó durante 5 minutos a 30 °C las enzimas provenientes de microorganismos mesófilos, 50°C para *Thermus* y 70°C *Thermus thermophilus*, bajo agitación magnética. Se dio inicio a la reacción adicionando 100 μl de NAD<sup>+</sup> 100 mM. Luego de 2 minutos de reacción se determinó la pendiente de la curva absorbancia del producto (NADH) versus tiempo en minuto obtenida a 340 nm.

El cálculo de la actividad deshidrogenasa y la determinación del coeficiente de extinción molar de NADH se presentan en los apéndices A y B respectivamente.

### 3.3.2 Determinación de proteína soluble

La cuantificación de proteínas fue realizada mediante el método colorimétrico de Bradford (1976), el cual involucra la unión de Coomassie Brilliant Blue G 250 a la proteína. Esta unión produce un cambio en el máximo de absorción que es monitoreada a 595 nm. Es un método rápido y reproducible, y no presenta interferencias por la presencia de aminoácidos en el medio. El proceso esta virtualmente completo después de 15 minutos con un buen color y estabilidad por 1 hora.

#### Preparación de Reactivo de Bradford

Se disolvieron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol 95%. Se agregaron lentamente 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% (p/v), y se aforó la solución a 1 l con agua desionizada. Se almacenó la solución resultante a temperatura ambiente protegida de la luz.

#### Procedimiento

A partir de una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración 1 mg/ml en agua destilada fue preparada una batería de tubos eppendorf entre 0 y 0,1 mg/ml. A cada tubo se adicionó 1 ml reactivo de Bradford se homogenizó la mezcla y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm después de 15 minutos y antes de 1 hora de reacción, contra un blanco de reactivo preparado con agua. Posteriormente se graficó absorbancia versus concentración de proteína patrón (Ver apéndice C).

La concentración de proteínas de una muestra fue obtenida aplicando el procedimiento del punto anterior e interpolando el valor de absorbancia obtenido a 595 nm en la curva patrón calibrada con albúmina de suero bovino (BSA).

### 3.3.3 Determinación de proteína inmovilizada por el método del ácido bicinconínico (BCA)

La determinación de la proteína inmovilizada se lleva a cabo por el método del ácido bicinconínico, ensayo disponible en forma de kit de Pierce (Rockford, Illinois). Este es un método colorimétrico que permite cuantificar y detectar proteínas totales aún en presencia con detergentes o unidas a soportes (Stoscheck, 1990). El método se basa en el principio que las proteínas reducen el ión  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  bajo condiciones alcalinas y posteriormente el ión  $\text{Cu}^{+1}$  reacciona con dos moléculas de ácido bicinconínico formando un complejo de color púrpura. Este complejo soluble presenta una máxima absorción a 562 nm que se mantiene lineal con el aumento de las concentraciones de proteínas en un rango amplio de trabajo (5-2000  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### Preparación de Reactivo

Fue preparado poniendo en contacto 50 partes del reactivo A (Ácido bicinconínico) con 1 parte de reactivo B (Sulfato de cobre 4%) al momento de usar.

#### Procedimiento

A partir de un estándar 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) se preparó una batería de tubos eppendorf entre 0 y 0,2 mg/ml. A cada tubo se adicionó 1 ml reactivo BCA, se homogenizó la mezcla y calentó a 60°C durante 30 minutos. Se enfrió y midió la absorbancia en espectrofotómetro a 562 nm, contra un blanco de reactivo preparado con agua. Posteriormente se graficó absorbancia versus concentración de proteína patrón. (Ver Apéndice D).

Para medir la proteína inmovilizada se pesó alrededor de 20 mg de biocatalizador en un tubo eppendorf de 2 ml, se adicionó 980  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 1 ml de reactivo BCA. Se homogenizó la mezcla y calentó a 60°C durante 30 minutos. Finalmente la muestra fue enfriada y centrifugada a 5.000 r.p.m por 2 min., se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 562 nm.

### 3.3.4 Cuantificación de alcoholes, aldehídos y ácidos grasos de cadena larga

La cuantificación de los sustratos y productos de la reacción de oxidación fue realizado por cromatografía gaseosa. Las especies cuantificadas por cromatografía fueron: tetradecanol, docosanol, tetracosanol, ácido tetracosanoico, ácido docosanoico, ácido tetracosanoico y sus respectivos aldehídos. Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron las siguientes:

Cromatógrafo	: Perkin Elmer Clarus 500
Carrier	: Helio 68,4 (64 cm/s), flujo constante
Columna	: HP-5 (fenil metil silicona entrecruzada al 5%) 30 m * 0.25 mm * 0.88 $\mu$ m
Inyección	: Split (1:1) 0,5 $\mu$ l
Detector	: FID 300 °C

Los cálculos de cuantificación de los compuestos de se encuentra en el apéndice E.

### 3.3.5 Cuantificación de microorganismos

La determinación de la concentración celular fue realizada por peso seco y densidad óptica.

#### Procedimiento

A partir de un cultivo que se encontraba en fase de crecimiento exponencial se tomaron por triplicado 30 ml de caldo de cultivo en tubos o capachos de centrifuga, los que son centrifugados a 8.000 g x 15 minutos y 4°C, retirando el máximo sobrenadante pero evitando tomar biomasa. El pellet obtenido fue lavado tres veces con agua destilada. Luego del último lavado, el pellet fue resuspendido en un mínimo volumen de agua destilada y trasladado en su totalidad a un capacho de papel aluminio que ha sido previamente pesado luego de secado durante 12 hrs. a 100°C. Las muestras fueron secadas en estufa a 80°C durante 48 hrs. y pesadas. La masa celular se obtuvo por diferencia y la concentración celular o biomasa se determinó dividiendo la masa celular en gramos por el volumen inicial de caldo de cultivo utilizado en litros.

Posteriormente se realizó la curva de calibrado de absorbancia versus concentración celular en g/L. Para tal efecto se tomaron muestras del mismo caldo de cultivo en fase de crecimiento exponencial y fueron diluidas en agua destilada y medida su absorbancia a una longitud de onda de 650 nm frente a un blanco de agua. Se realizaron alrededor de ocho diluciones distintas de tal forma que los valores se encontraran en una rango de 0,1 a 0,8 unidades de absorbancia. Los datos registrados por densidad óptica fueron correlacionados con los datos de concentración celular correspondientes obteniéndose de esta forma la curva de calibrado.

La determinación de concentración celular en una muestra desconocida fue realizará tomando un volumen determinado de muestra convenientemente diluida para que se encuentre en el rango lineal. Luego se midió su absorbancia a una longitud de onda de 650 nm y se interpoló el valor de concentración celular en la curva de calibrado.

Las curvas de calibrado correspondientes a los diferentes microorganismos se presentan en el apéndice F.

### **3.3.6 Preparación de extracto crudo**

Las células fueron recolectadas durante la fase estacionaria por centrifugación a (10.000 g x 10 min) y congeladas a -18 °C. Luego fueron resuspendidas en 10 mM tampón fosfato de sodio pH 7,5 con 10 mM de NaCl y 3 mM benzamidina en razón 1/1 peso volumen y homogenizada por medio de abrasión mecánica con alúmina (0,5 g / ml). La fracción soluble obtenida tras la centrifugación (15.000 g x 15 min, 4 °C) fue refrigerada a 4°C y utilizada como fuente de alcohol deshidrogenasa.

Se comprobó el grado de ruptura celular determinando el porcentaje de células viables utilizando la tinción de azul de metileno (Allen, 1994b). Para tal efecto se preparó una solución de metileno 0,1% en agua destilada, luego se tomó una muestra de células en un tubo de ensayo y se diluyó con agua destilada hasta tener una muestra que contenga aproximadamente entre 100 y 200 células en el campo del microscopio. Se mezcló la muestra completamente y se adicionaron 10 gotas de azul de metileno. Se mezcló y dejó reposar 3 a 5 min. Se puso una gota en el porta objeto y cubrió con el cubre objeto. Se

examinó la muestra bajo el microscopio a una amplificación de 100X y se contaron las células totales y las células teñidas (rotas), calculando el porcentaje de células rotas.

### 3.3.7 Caracterización electroforética

La electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) desarrollada por Laemmli, U.K. (1970) es uno de los métodos más resolutivos empleados para la separación, identificación y medición del índice de pureza de macromoléculas. Se realiza confeccionando geles mediante la polimerización inducida por radicales libres de acrilamida y N,N'-metilbisacrilamida, formando poros de distintas dimensiones que permiten el retraso de las moléculas grandes con respecto a las menores.

Se emplea dodecil sulfato de sodio (SDS) para inducir en la proteína una forma cilíndrica (denaturalizada) permitiendo que la separación se produzca en base a la masa molecular, debido a los efectos de la filtración en el gel. La masa molecular de una proteína se determina sometiendo a una electroforesis conjunta la proteína en estudio con diversas "proteínas marcadoras" de masa molecular conocida, lo que permite realizar una curva de calibrado relacionando la distancia de migración con la masa molecular (Voet *et al.*, 1992).

#### Preparación de Reactivos:

*Solución acrilamida-bisacrilamida 30 %:* se disolvieron 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada.

*Persulfato de amonio (PSA) 10%:* se disolvió 1g de PSA en 10 ml de H<sub>2</sub>O.

*SDS 10%:* se disolvió 1 g en 10 ml de H<sub>2</sub>O.

*Buffer Lower:* (1.5 M Tris-HCl a pH 8,8) fue preparado disolviendo 18,2 g de Tris-HCl en 80 ml de agua destilada, ajustando pH 8,8 y aforando a 100 ml.

*Buffer Upper:* (0.5 M Tris-HCl a pH 6,8) fue preparado disolviendo 6 g de Tris-HCl en 80 ml de agua destilada, ajustando pH 6,8 y aforando a 100 ml.



4.- Una vez polimerizado el gel, fue extraído el butanol con agua destilada. A continuación se agregó la solución del gel concentrador al 4% que fue preparado previamente de acuerdo a la Tabla 3.2 en un vial de centelleo de 20 ml.

**Tabla 3.2** Composición del gel concentrador a un grado de polimerización de 4%.

Reactivos	4%
Acrilamida/Bisacrilamida	300 $\mu$ l
Buffer Upper pH 6,8	750 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	1,5 ml
Bisacrilamida 2%	200 $\mu$ l
Persulfato de amonio 10%	15 $\mu$ l
TEMED*	5,0 $\mu$ l

\* N,N,N',N' tetrametiletilen diamina

5.- Una vez polimerizado el gel concentrador, fue instalada en la cámara de electroforesis formándose un compartimiento superior e inferior.

6.- Fue llenado cada compartimiento con tampón de corrimiento pH 8,3 que contiene Tris base 0,125 M /Glicina 0,96 M /SDS 0,1 %, hasta cubrir completamente los bolsillos del gel.

7.- Posteriormente fueron digeridas las muestras de enzima en solución cargadora en relación 1:4 v/v y calentar por 3 minutos. Posteriormente fueron cargadas las muestras en el gel e iniciada la migración aplicando 150 volt.

8.- Una vez terminada la separación, se desmontó la cámara y el gel fue extraído para su posterior tinción con Coomassie Brilliant Blue.

9.- Una vez que es posible visualizar las bandas proteicas, el gel fue secado utilizando una solución de glicerol 5 % y montado en papel celofán para su posterior análisis.

### 3.4 Metodología Experimental

A continuación se presenta detalladamente la metodología experimental desarrollada para cumplir los objetivos propuestos. Las actividades fueron realizadas en la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC. España. (Ver Figura 3.2).

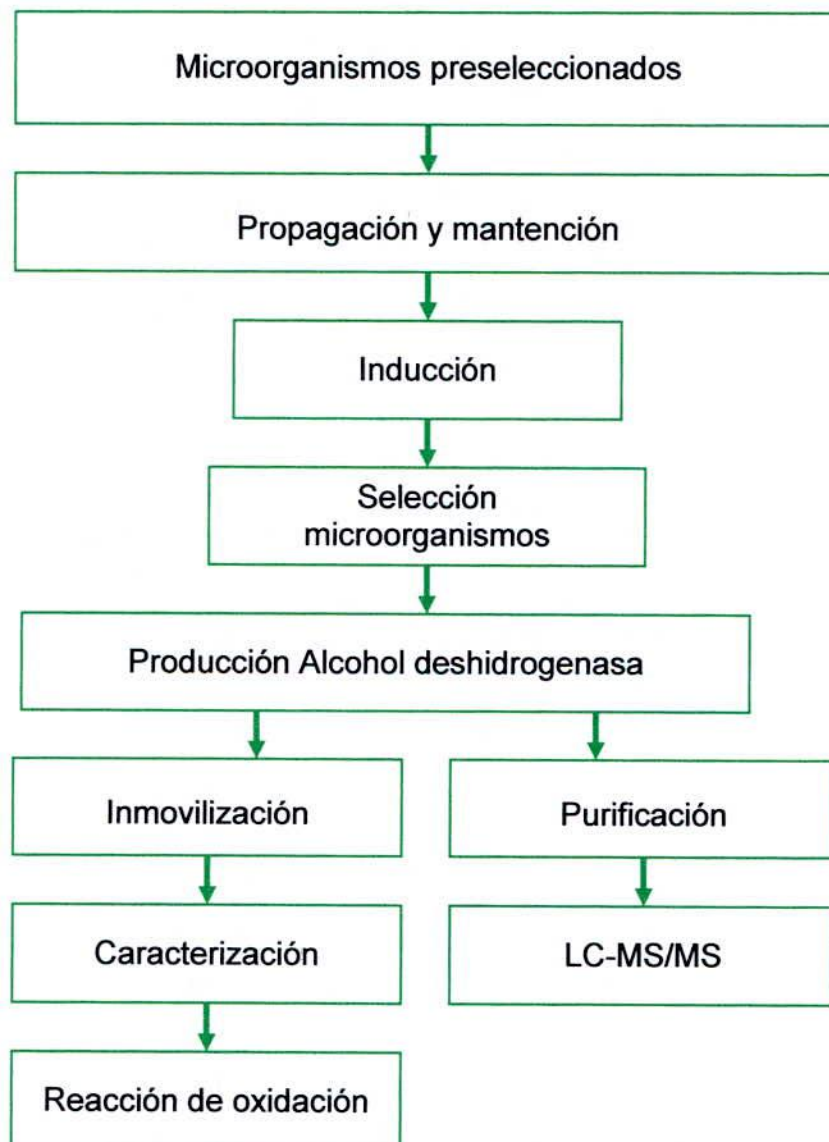


Figura 3.2 Esquema de la metodología experimental.

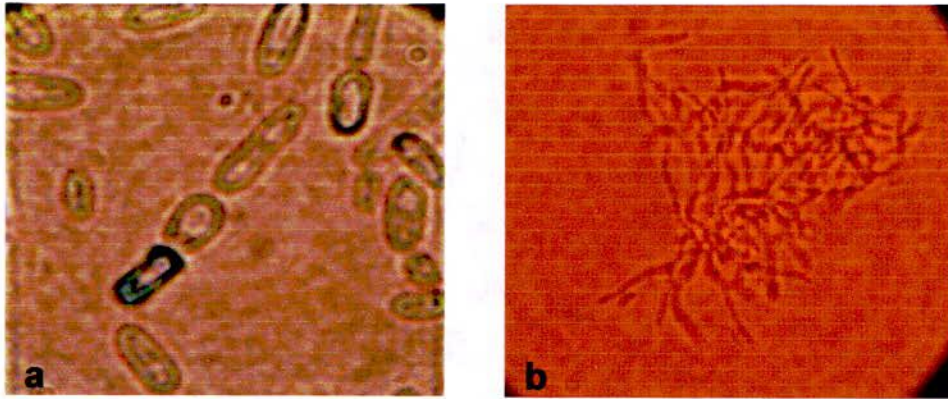
### 3.4.1 Preselección de los microorganismos

Con la finalidad de acotar el estudio del *screening* de microorganismos se realizó una preselección basándose en la capacidad de los microorganismos extremófilos de producir enzimas capaces de actuar a elevadas temperaturas, temperaturas a las cuales los sustratos enzimáticos de interés en este estudio (docosanol y tetracosanol) se encuentran en estado líquido. Las cepas estudiadas que por bibliografía se sabe que son productoras de alcohol deshidrogenasas que oxidan alcoholes de más de seis carbonos son las siguientes:

*Thermus thermophilus* HB27, HNI-11, NR-17, PRQ16, PRQ25. Todas bacterias Gran negativas de la clase *Deinococci*, utilizadas en una gran variedad de aplicaciones como organismo modelo para la manipulación genética, la genómica estructural y la biología de sistemas, además de ser productoras de enzimas termoestables con aplicación biotecnológicas como es el caso de la enzima ADN polimerasa utilizada en las técnicas de PCR. Son termófilas extremas con temperaturas óptimas de crecimiento de aproximadamente 65 a 70 °C y originalmente han sido aisladas de fuentes de aguas termales de Japón, España y Portugal (Mooser *et al.*, 2006) (Ver Figura 3.3 b).

*Thermus* AB1 es una bacteria Gran negativa obtenida de fuentes de aguas termales de As Burga, España por el Dr. José Berenguer del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, España. Crece a temperaturas de alrededor de 50°C. Es un microorganismo recién descubierto y no se tiene mayor información al respecto.

Por otro lado se incluyó en este estudio a la levadura *Candida tropicalis* (ATCC 20336) por ser el único microorganismo que por bibliografía se sabe que produce una alcohol deshidrogenasa que oxida alcoholes superiores hasta 16 átomos de carbono, producción inducida adicionando al medio de cultivo del microorganismo una mezcla de alcanos entre 10 y 13 átomos de carbono. Es un microorganismo mesófilo cuya temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C en un medio básico; pertenece al genero fúngico *Candida* y a la clase *Saccharomycetes*. (Ver Figura 3.3 a)



**Figura 3.3** Microscopía óptica con aumento 100X. a) *Candida tropicalis* ATCC20336) b) *Thermus thermophilus* PRQ25.

### 3.4.2 Activación, mantención y propagación de los microorganismos

Las cepas liofilizadas de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus*, fueron activadas resuspendiendo cada cepa en 20  $\mu$ l de medio Thermus (Ver apéndice G) y propagadas en matraces de 250 ml con 20 ml del mismo medio e incubadas durante 24 hrs. a 200 r.p.m y 50 °C (AB1) o 70°C (HB27, HNI-11, NR-17, PRQ16 y PRQ25).

La cepa liofilizada de *Candida tropicalis* fue resuspendida en 1 ml de agua destilada estéril y posteriormente propagada en matraces de 500 ml con 100 ml de medio definido diseñado para crecimiento de 3 g/l utilizando glicerol como sustrato limitante (Ver apéndice H) e incubadas durante 24 hrs. a 200 r.p.m y 30 °C.

La mantención de las cepas se realizó en agar inclinado con un medio de cultivo definido para *Candida tropicalis* y en medio Thermus para *T. thermophilus*. Los tubos de agar inclinados fueron inoculados e incubados a 30 °C, 50 °C y 70° C respectivamente durante 3 días, y posteriormente fueron almacenados a 4°C.

La propagación de las cepas se realizó durante 30 horas, tiempo donde se estudió la cinética de crecimiento celular y se determinó la velocidad específica de crecimiento. La fermentación fue realizada en matraces de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo a las condiciones antes mencionadas.

### 3.4.3 Inducción de la producción de alcohol deshidrogenasa en los microorganismos

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de inducción de la producción de la enzima alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidar alcoholes superiores se estudió

- Tipo de inductor para cada microorganismo.
- Concentración del inductor que permita un mayor crecimiento de los microorganismos.
- Etapa de adición de inductor (inicio del cultivo / fase de crecimiento exponencial).
- Tiempo de cultivo que maximice la producción de la enzima.

La inducción de las cepas *Thermus* AB1, *Thermus thermophilus* y *Candida tropicalis* ATCC 20336 fue realizada adicionando al medio de cultivo 0,025; 0,05; 0,5; 1 y 2 % de alcoholes o alcanos. Alcoholes entre 2 y 24 átomos de carbono y alcanos entre 14 a 24 átomos de carbono. Además a la cepa *Candida tropicalis* ATCC 20336 se le adicionó 0,05 % Tween 80. La fermentación fue llevada a cabo en matraces de 500 ml con 200 ml a 200 r.p.m y 30°C (*Candida tropicalis* ATCC), 50 °C (AB1) y 70°C (HB27, HNI-11, NR-17, PRQ16 y PRQ25). Una vez que se obtuvo el crecimiento máximo de las diferentes cepas (al inicio de la fase estacionaria), se recolectaron las células y se procedió a la obtención del extracto crudo como se describe en la sección 3.3.6., para posteriormente determinar la presencia de alcohol deshidrogenasa. A partir de este estudio se seleccionaron los microorganismos que produjeron enzimas con actividad oxidativa sobre docosanol y tetracosanol.

Posteriormente, para cada microorganismo se determinó el tipo de inductor que produjo la enzima con más elevada actividad oxidativa sobre docosanol y tetracosanol.

Finalmente se evaluó la etapa de adición y el tiempo de cultivo que maximizara la producción de enzima. Este estudio fue realizado adicionando el agente inductor al inicio del cultivo y en fase de crecimiento exponencial. Se tomaron muestras durante la fermentación y se analizó la presencia de enzima evaluando la actividad sobre docosanol y tetracosanol.

Una vez determinado el tipo de microorganismo y las condiciones de inducción que maximizaran la producción de la alcohol deshidrogenasa se precedió a producir enzima en mayor cantidad para su posterior inmovilización, purificación y caracterización.

### 3.4.4 Purificación de las alcohol deshidrogenasas producidas

Los protocolos de purificación de las enzimas producida por *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25, fueron desarrollados en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC. Campus Universidad Autónoma de Madrid gracias a la Beca Chile de estancia en el extranjero (CONICYT), con el apoyo del grupo de investigación dirigido por el Dr. José Manuel Guisán. En cambio la purificación de las enzimas producida *Candida tropicalis* ATCC 20336 fue diseñada en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC y ejecutada en el laboratorio de biocatálisis de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Los extractos crudos de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 se prepararon recolectando las células durante la fase estacionaria por centrifugación a (10.000 g x 10 min) y congeladas a -18 °C. Luego fueron resuspendidas en 10 mM tampón fosfato de sodio pH 7,5 con 10 mM de NaCl y 3 mM benzamidina en razón 1/1 peso volumen. La disrupción celular fue realizada a 4 °C utilizando un sonicador ultrasónico Scientz, modelo JY 88 operado a 250 Watts y 25 kHz de frecuencia, por ciclos de 5 minutos durante un periodo total de 30 minutos. La fracción soluble obtenida tras la centrifugación (15.000 g x 15 min, 4 °C) fue refrigerada a 4°C y utilizada como fuente de alcohol deshidrogenasa. En cambio el extracto crudo de *Candida tropicalis* fue preparado como se describe en la sección 3.3.6.

Se probaron las diferentes matrices cromatográficas:

*Intercambiador catiónico:*

- Carboximetil-sepharose ( – OCH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> ) (soporte comercial)
- Sulfopropil-sepharose ( –O–CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ) (soporte comercial)
- DxSO<sub>4</sub><sup>-</sup> ( dextrano sulfato 100 kDa, preparado en laboratorio Dr. Guisán)

Intercambiador aniónico:

- Q-sepharose (  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) (soporte comercial)
- DEAE-sepharose (  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$ ) (soporte comercial)
- $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$  ( $-\text{N}-(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2-\text{Cu}^{+2}$ ) (a base de ácido imidinodiacil diacético, preparado en laboratorio Dr. Guisán)

Las matrices cromatográficas o resinas fueron lavados con abundante agua y equilibrados en tampón fosfato 5 mM pH 7,0. Posteriormente se pusieron en contacto 0,5 g de cada resina con 5 ml de extracto crudo que contiene 0,1% de tritón X-100 y se dejaron bajo agitación en rodillos. Se midió la actividad del blanco o tiempo cero (sin resina) y posteriormente se fue midiendo la evolución la adsorción en el tiempo evaluando la actividad en suspensión y sobrenadante hasta un período final de 2 horas. La actividad deshidrogenasa fue determinada en cubeta utilizando como sustrato 0,2 mM de docosanol y adicionando 2 mM de  $\text{FeSO}_4$ .

Con aquellas resinas que presentaron sobre un 80% de adsorción se procedió a desorber la enzima que se encuentra semi purificada. El proceso de desorción consistió en poner el catalizador en contacto con concentraciones crecientes de imidazol desde 5 mM hasta 25 mM en el caso de unión a  $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$  y de NaCl desde 50 a 400 mM para las enzimas unidas a las otras resinas. Para ello se pusieron en contacto 0,5 g de cada catalizador con 2 ml de tampón fosfato 25 mM pH 7,0 c/ imidazol o NaCl según sea el caso; se dejó durante un período de 30 minutos a 1 hora con agitación en rodillos y se midió tanto el sobrenadante como la suspensión (resina + sobrenadante). Luego se lavó la resina y se puso en contacto con una concentración mayor de imidazol o NaCl.

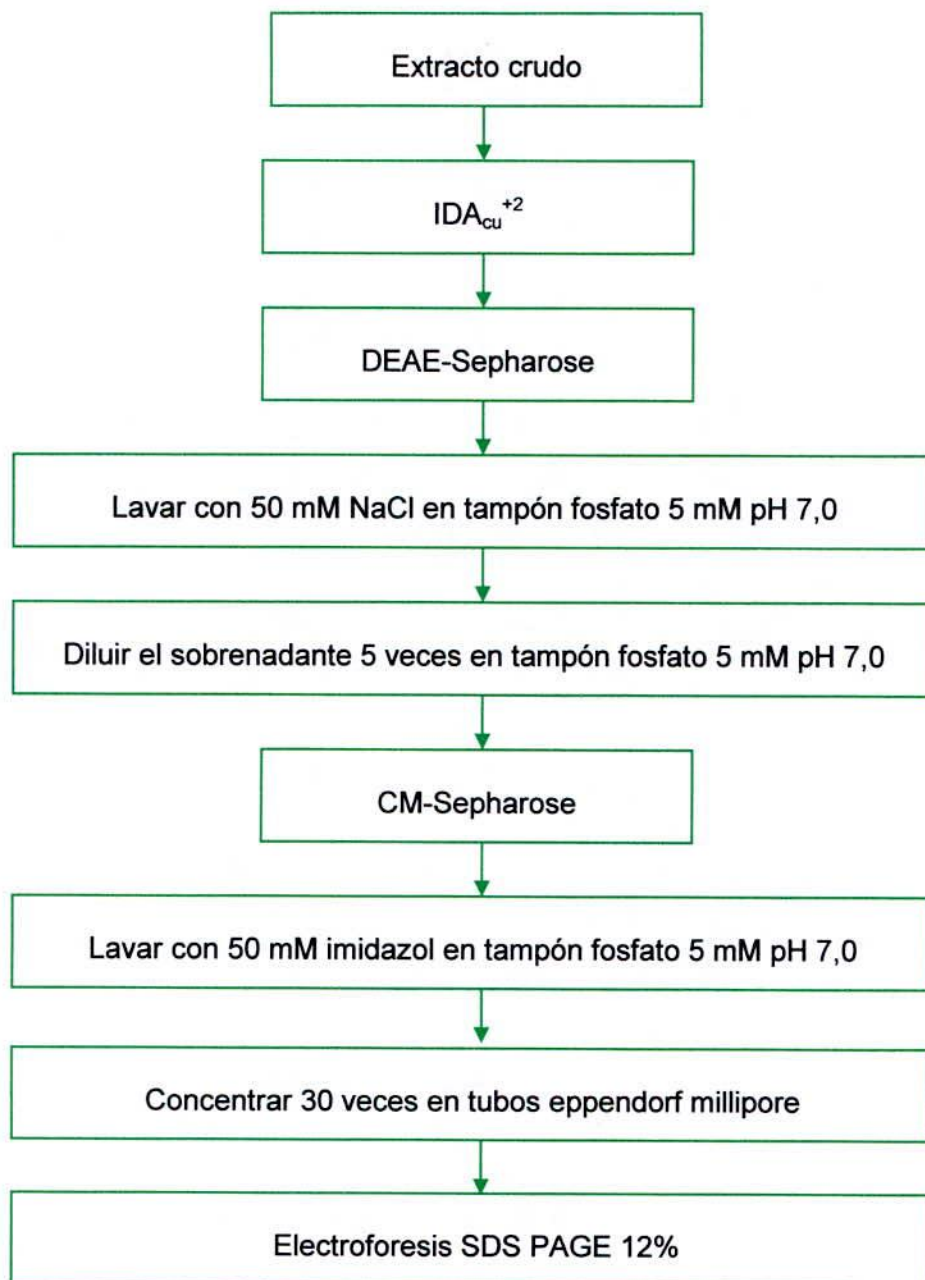
Una vez que se conoce en qué tipo de resina se adsorbe a cada una de las enzimas por sobre el nivel mínimo aceptable se procedió a diseñar el protocolo de purificación. El criterio utilizado fue primero contactar los extractos crudos con aquellas resinas que no adsorben la alcohol deshidrogenasa y que estarían adsorbiendo otro tipo de proteína presentes en el

crudo. Para luego contactar este crudo semi purificado con la resina que obtuvo mayor rendimiento de adsorción. Finalmente eluir la alcohol deshidrogenasa para obtener la enzima en forma soluble

#### Protocolo purificación de alcohol deshidrogenasa proveniente de *Candida tropicalis* ATCC20336:

Se pusieron en contacto 6 g de IDA<sub>cu</sub><sup>+2</sup> con 40 ml de extracto crudo de *Candida tropicalis* que contiene 0,1% de tritón X-100 y se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y el sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de DEAE-sepharose, dejando bajo agitación en rodillos durante dos horas. Luego se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos, la resina recuperada se lavó con 20 ml de NaCl 50 mM en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. El sobrenadante recuperado que contiene la enzima de interés fue diluido 5 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y puesto en contacto con 5 g de CM-sepharose bajo agitación en rodillos durante dos horas, nuevamente es centrifugado a 1.000 g x 5 minutos y la resina lavada con 6 ml de imidazol 50 mM en tampón fosfato 5 mM pH 7,0. Se recuperó el sobrenadante y se concentró 30 veces utilizando tubos Eppendorf con filtro Millipore. Al filtrado se le determinó proteína, actividad y electroforesis SDS PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. Todo el protocolo de purificación fue realizado a temperatura ambiente.

La Figura 3.4 muestra el diagrama de bloques del protocolos de purificación realizado para *Candida tropicalis* ATCC 20336.

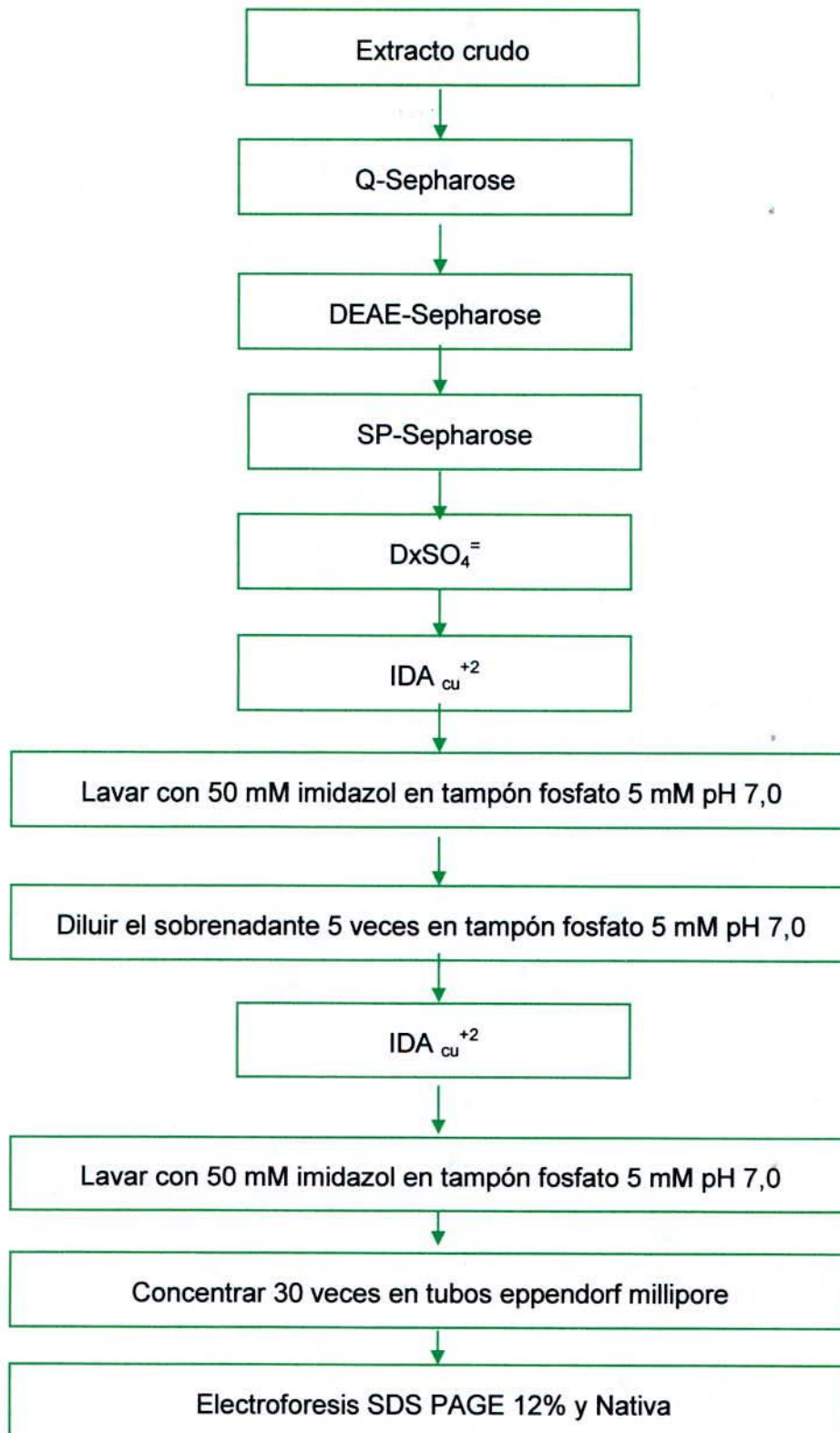


**Figura 3.4** Diagrama de bloques del proceso de purificación de alcohol deshidrogenasa proveniente de *Candida tropicalis* ATCC 20336

#### Protocolo purificación de alcohol deshidrogenasa proveniente de *Thermus AB1*:

Se pusieron en contacto 6 g de Q-sepharose con 20 ml de extracto crudo de *Thermus AB1* que contiene 0,1% de tritón X-100 y se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos, el sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de DEAE-sepharose se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas y se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. El sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de SP-sepharose durante dos horas. Nuevamente se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y el sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de  $\text{DxSO}_4^-$  durante dos horas, se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y luego se puso en contacto el sobrenadante con 2 g  $\text{IDA}_{\text{Cu}}^{+2}$  por dos horas más; nuevamente se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. La resina recuperada luego de la última centrifugación se lavó con 10 ml de imidazol 50 mM en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo la enzima de interés fue diluido 5 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y puesto en contacto nuevamente con 1 g de  $\text{IDA}_{\text{Cu}}^{+2}$ . Se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. la resina se lavó con 2 ml de imidazol 50 mM en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se concentró 10 veces utilizando tubos Eppendorf con filtro Millipore. Al filtrado se le determinó proteína, actividad y se realiza electroforesis nativa y SDS PAGE 12%, ambos geles teñidos con azul de Coomassie.

La Figura 3.5 muestra el diagrama de bloques de protocolo de purificación realizado para *Thermus AB1*.

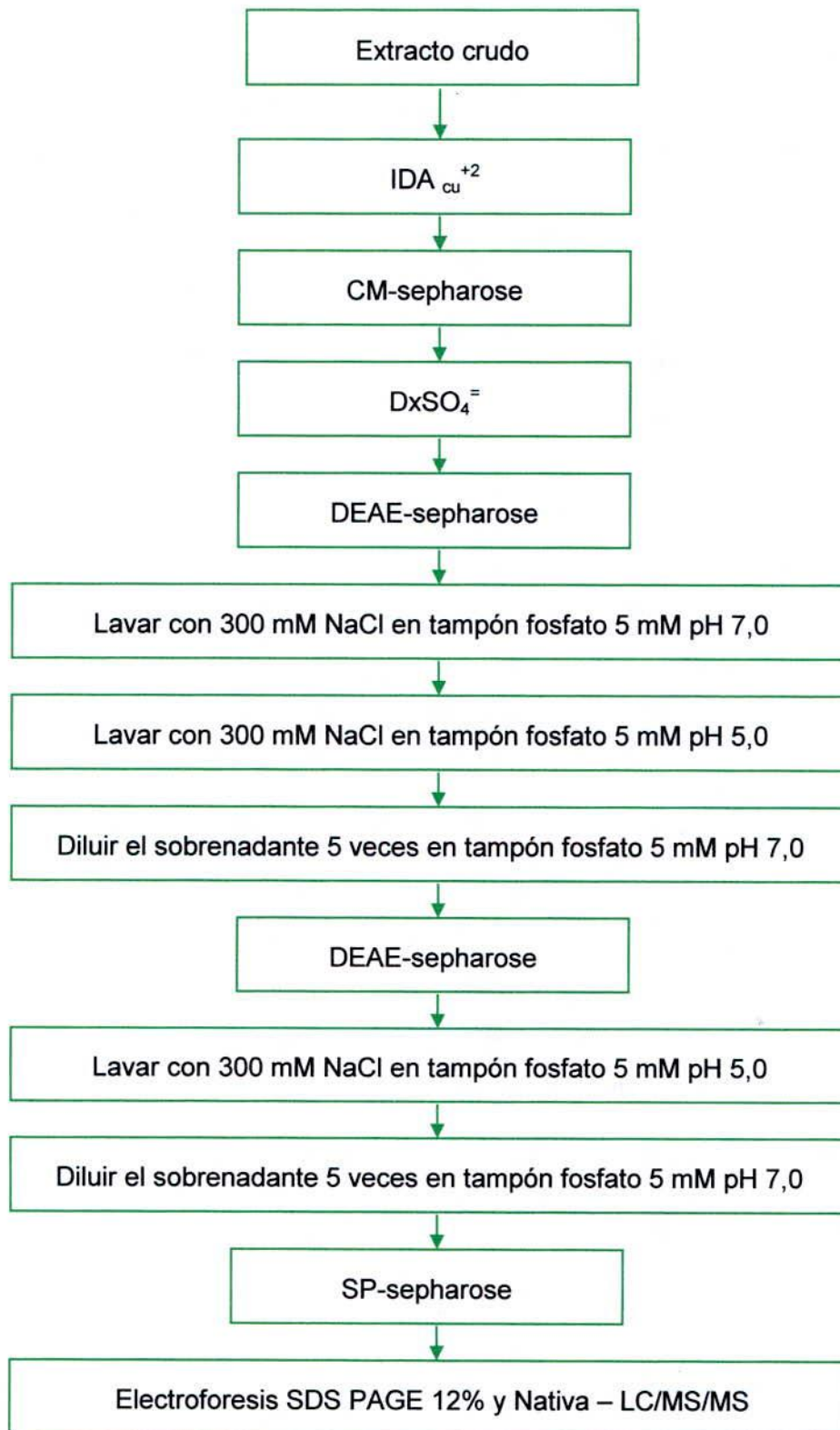


**Figura 3.5** Diagrama de bloques del proceso de purificación de alcohol deshidrogenasa proveniente de *Thermus* AB1

#### Protocolo purificación *Thermus thermophilus* PRQ 25:

Se pusieron en contacto 5 g de  $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$  con 20 ml de extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 que contiene 0,1% de tritón X-100 y se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y temperatura ambiente, el sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de CM-sepharose se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas, se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos. El sobrenadante recuperado se puso en contacto con 6 g de  $\text{DxSO}_4^-$  durante dos horas. Nuevamente se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y el sobrenadante se puso en contacto con 3 g de DEAE-sepharose durante dos horas y se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y temperatura ambiente. La resina recuperada se lavó primero con 10 ml de NaCl 300 mM en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y centrifugado a 1.000 g x 5 minutos y luego se lavó con 10 ml de NaCl 300 mM en tampón fosfato 5 mM pH 5,0. El sobrenadante conteniendo la enzima de interés fue diluido 5 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y puesto en contacto con 1 g de DEAE-sepharose durante dos horas, se dejó bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y el soporte se lavó con 2 ml de NaCl 300 mM en tampón fosfato 5 mM pH 5,0. El sobrenadante recuperado fue diluido 5 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 y se puso en contacto con 0,5 g SP-sepharose bajo agitación en rodillos durante dos horas a temperatura ambiente, se centrifugó a 1.000 g x 5 minutos y temperatura ambiente. Finalmente a la resina se le determinó proteína, actividad, realizar electroforesis nativa y SDS PAGE 12%. La electroforesis SDS- PAGE se realizó en duplicado, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y el otro gel sin teñir fue enviado al Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, en Madrid. España, para la identificación de las bandas por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) y posterior comparación de los resultados de secuenciación peptídica con la base de datos del genoma de *Thermus thermophilus* PRQ 25.

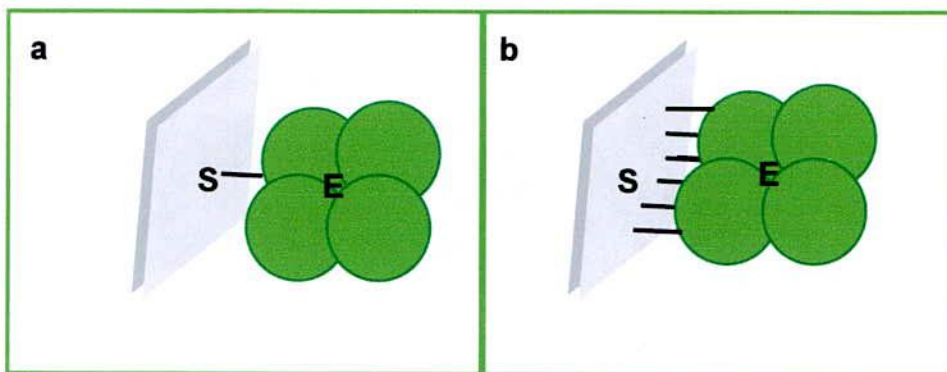
La Figura 3.6 muestra el diagrama de bloques del protocolo de purificación realizado para *Thermus thermophilus* PRQ 25.



**Figura 3.6** Diagrama de bloques del proceso de purificación de alcohol deshidrogenasa proveniente de *Thermus thermophilus* PRQ 25

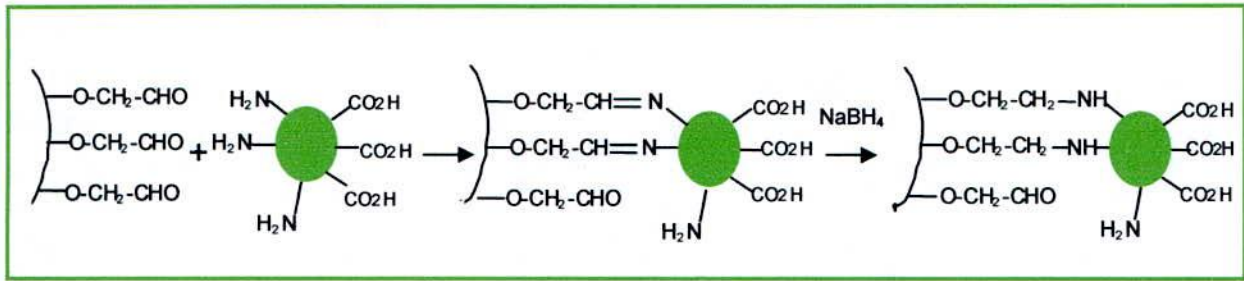
### 3.4.5 Inmovilización por unión covalente en glioxil agarosa 4BCL y bromuro de cianógeno (BrCN)

La inmovilización de la enzima permite generar biocatalizadores robustos, incrementar su eficiencia de uso mediante su reutilización o mediante procesos continuos, y obtener un producto no contaminado por el catalizador (Illanes, 2002). La inmovilización por medio de unión covalente, genera una unión de tipo fuerte entre la enzima y el soporte, pudiéndose generar un punto de unión denominada interacción unipuntual (Ver Figura 3.7 b) o varios puntos de unión o unión multipuntual (Ver Figura 3.7 a).



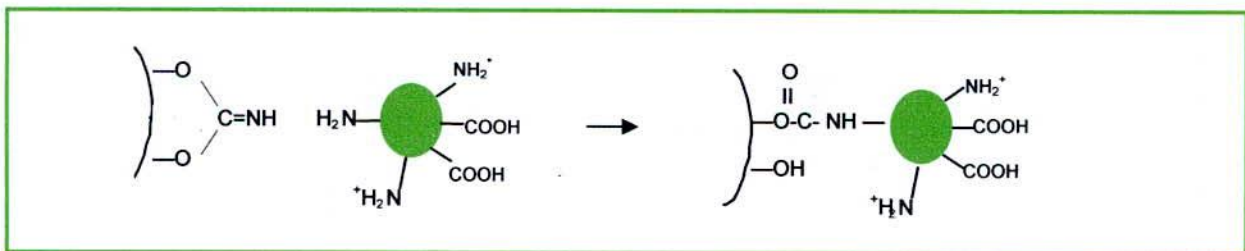
**Figura 3.7** Esquema de inmovilización por unión covalente: a) unipuntual y b) multipuntual. S: soporte, E: enzima.

La inmovilización sobre glioxil agarosa se basa en la unión covalente de grupos aldehídos del soporte que reaccionan con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina. Esta metodología ha sido extensamente utilizada (Mateo et al., 2005). Se parte del gel agarosa que contiene grupos OH muy reactivos en el C6; estos grupos OH son posteriormente activados con glicidol formando glioxil agarosa la cual puede unir a grupos  $\text{NH}_2$  de proteínas mediante enlace covalente multipuntual, generando una base de Schiff inestable, que por una posterior reducción del doble enlace  $\text{C}=\text{N}$  genera una amina secundaria. Ver figura 3.8 (Guisán et al., 1997).



**Figura 3.8** Inmovilización en glioxil-agarosa.

La inmovilización en geles de agarosa activados con bromuro de cianógeno es a través de unión covalente unipuntual. Los grupos hidroxilos de la agarosa se combinan con el bromuro de cianógeno para dar paso a un imidocarbonato reactivo. Este reacciona con los grupos amino primarios de la superficie de proteínas y a condiciones de pH neutro se favorece la unión del soporte a través del grupo amino terminal de la proteína. Este tipo de interacción genera una mayor flexibilidad de la enzima unida al soporte por lo que tiene un comportamiento similar a la enzima soluble. Ver figura 3.9 (Mateo et al., 2005; Palomo, 2009).



**Figura 3.9** Inmovilización en bromuro de cianógeno.

La inmovilización fue realizada como se describe a continuación:

### Inmovilización en Glioxil agarosa

#### *Preparación del Gel glioxil agarosa 4BCL:*

Contempla dos pasos: la activación del gel y su posterior oxidación hasta la formación del aldehído.

a) Activación del gel, que corresponde a la introducción de grupos dioles:

El gel utilizado presentó un entrecruzamiento del 4%, permitiendo una capacidad de carga de 150  $\mu$ moles de dioles /ml de gel. Se mezcló 105 g de agarosa con agua destilada hasta completar un volumen de 180 ml y se añadió 3,4 g de NaOH preparado en 50 ml agua, en frío ya que la reacción desprende calor. Sobre esta solución ya fría se agregó 1,425 g de  $\text{NaBH}_4$ . Posteriormente se adicionó en forma lenta 36 ml de glicidol enfriado en hielo para evitar el aumento de la temperatura. Se dejó agitando durante 18 h a temperatura ambiente. Se filtró y se lavó con abundante agua destilada, obteniendo de esta forma agarosa activada con grupos dioles.

b) Oxidación hasta aldehído:

Para la oxidación se utiliza peryodato cuya relación estequiométrica es de un  $\mu$ mol de  $\text{NaIO}_4$  por cada  $\mu$ mol de OH oxidado. A la agarosa activada en el paso anterior se adicionó 8,7 g de  $\text{NaIO}_4$  disueltos en 375 ml de agua destilada (correspondiente a 272  $\mu$ mol/ml gel ofrecido); luego el gel obtenido se suspendió en agua destilada en proporción 1:10 y se dejó oxidar bajo agitación suave durante 3 hrs. Finalmente se filtró y lavó con abundante agua destilada.

#### *Inmovilización*

La inmovilización fue realizada modificando la metodología citada por Guisán *et al.* (1997). Inicialmente se diluyeron 25 ml de extracto crudo con 0,1 % tritón x-100 en 25 ml de tampón bicarbonato 100 mM pH 10,05. Se ajustó el pH a 10,05 y se tomó una pequeña muestra para cuantificar actividad y concentración de proteína inicial. Se agregó la solución resultante sobre 5 g de gel glioxil agarosa preparado anteriormente mezclando lentamente para evitar la formación de acúmulos de gel. Se dejó agitando en rodillos durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido dicho tiempo se adicionó  $\text{NaBH}_4$  hasta una concentración final de 1mg/ml. La adición de  $\text{NaBH}_4$  genera desprendimiento de  $\text{H}_2$ , de modo que es necesario mantener el sistema bajo campana de extracción y con agitación para evitar la formación de espuma, dejando que ocurra la reducción durante 30 min. Luego se

filtró y lavó con abundante agua destilada y tampón fosfato 100 mM pH 7,0, guardando el inmovilizado a 4°C.

### Inmovilización en bromuro de cianógeno (BrCN sepharose 4B ó BrCN)

BrCN es un soporte comercial que presenta un entrecruzamiento del 4%, permitiendo una capacidad de carga de aproximadamente 60 mg de proteína por g de soporte. El soporte se presenta como un polvo liofilizado en presencia de aditivos que requieren ser eliminados previamente para su utilización

#### *Hidratación del soporte:*

Se mezclaron 3 g de soporte BrCN con 190 ml agua destilada acidificada a pH 2 y se dejó bajo agitación en rodillos por un periodo de 30 minutos. Luego se filtró para su uso.

#### *Inmovilización*

La inmovilización fue realizada poniendo en contacto 30 ml de extracto crudo con 0,1 % tritón X-100 y 3 g de soporte hidratado. Se tomó una pequeña muestra para cuantificar actividad y concentración de proteína inicial. Se dejó agitando en rodillos durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido dicho tiempo se filtró el biocatalizador y se bloquearon los grupos remanentes del soporte incubando el biocatalizador con 30 ml de Tris HCl 100 mM pH 8,0 a temperatura ambiente y bajo agitación en rodillos por un periodo de 2 horas. Se filtró y el inmovilizado fue guardado a 4°C.

Durante el periodo de inmovilización se tomaron muestras a distintos tiempos midiendo proteínas y actividad en el sobrenadante y la suspensión. Para la medición de actividad se utilizó tetradecanol, docosanol y tetracosanol como sustrato enzimático.

Durante la inmovilización se requirió estudiar la adición de iones bivalentes al realizar la determinación de la actividad enzimática. Los iones estudiados fueron  $ZnCl_2$ ,  $FeSO_4$  y  $MgSO_4$  adicionando concentraciones entre 0,1 a 2,5 mM.

### 3.4.6 Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados

Con la finalidad de caracterizar el biocatalizador inmovilizado y encontrar las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos, se realizó el estudio de efecto de pH, temperatura, estabilidad térmica en medio acuoso. Además se estudio la estabilidad de NAD<sup>+</sup>.

#### Efecto de pH

La actividad enzimática fue determinada tal como se indica en la sección 3.3.1, utilizando 0,2 mM de sustrato (alcohol alifático) preparado en diferentes tampones: acetato de sodio 100 mM pH 6,0; fosfato de sodio 100 mM pH 7, borato de sodio 100 mM pH 8 y 9. Las mediciones se realizaron con 50 µl de una suspensión de biocatalizador 0,1 g/ml.

#### Efecto de temperatura

Una vez determinada el pH óptimo para cada biocatalizador se determinó el efecto de la temperatura a dicho pH. La determinación de la actividad enzimática fue realizada a 30 °C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Las mediciones se realizaron con 50 µl de una suspensión de biocatalizador 0,1 g/ml.

#### Estabilidad térmica del biocatalizador en medio acuoso

La estabilidad térmica de cada biocatalizador se estudió incubando una suspensión de 0,5 g de biocatalizador en 2,5 ml de tampón fosfato a 40°C, 60 y 70°C. En forma periódica se tomaron muestra de biocatalizador para la posterior determinación de la actividad remanente sobre tetracosanol. Finalmente se construyó una curva de estabilidad graficando el porcentaje de actividad remanente versus tiempo.

#### Estabilidad térmica del cofactor NAD<sup>+</sup> en medio acuoso

La estabilidad térmica de NAD<sup>+</sup> se realizó de forma indirecta, esto es midiendo la actividad de la enzima PRQ 25 inmovilizada en glioxil agarosa, utilizando butanol como sustrato enzimático. El cofactor fue previamente incubado a 40°C, 60°C y 70 °C y se tomaron muestras a distintos tiempos para la medición de la actividad.

### 3.4.7 Reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos de 14, 22 y 24 carbonos

Se realizó la reacción de oxidación de alcoholes de 14, 22 y 24 carbonos utilizando las enzimas producidas por las cepas seleccionadas: *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 inmovilizadas en glioxil agarosa 4 BCL.

Se preparó una mezcla de sustrato 100 mM (tetradecanol, docosanol y tetracosanol) disuelto en lutrol F-68 (tensoactivo no iónico) 20 mg/mL en tampón fosfato 25 mM pH 7,0. La mezcla fue sonicada a 70 °C por 20 a 30 minutos hasta formar una emulsión estable. Posteriormente a esta emulsión se le adicionó la enzima inmovilizada de forma tal que la masa adicionada contenga 4 UI totales. Se dió inicio a la reacción adicionando 2 ml NAD<sup>+</sup> 2,5 mM en tampón fosfato 25 mM pH 7,0 (500 mM final de NAD<sup>+</sup>). Las reacciones se llevaron a cabo bajo agitación magnética en cruz por un período total de 72 horas a 40°C para la enzima producida por *Candida tropicalis*, 60 °C para *Thermus* AB1 y 70°C para *Thermus thermophilus* PRQ 25.

Se tomaron muestras a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas para su posterior análisis por cromatografía de gases; cada muestra correspondía a una reacción independiente. Previo análisis por cromatografía gaseosa se separaron las fases de las muestras por decantación; la fase acuosa que contenía la enzima fue filtrada y la enzima inmovilizada lavada en tampón fosfato 25 mM pH 7,0 para su posterior medición de actividad remanente. A la fase orgánica se le adicionaron 20 mg de colesterol y 5 ml de cloroformo, luego fue sonicada por 5 minutos para disolverlo completamente, 1,5 ml de la mezcla fue transferida a un vial GC y evaporada bajo nitrógeno líquido. Se adicionaron 300 µl de reactivo silanizante (N,O Bis(trimetilsilil) acetamida) y 400 µl de piridina. Los viales GC se cerraron, agitaron y calentaron a 80°C por 15 minutos, para finalmente ser inyectados al cromatógrafo.

### 3.5 Análisis estadístico de los resultados

Todos los experimentos fueron realizados en duplicados y las muestras analizadas en duplicado.

Para obtener resultados válidos y objetivos en el procedimiento de selección del mejor inductor y microorganismos con capacidad de producir alcohol dehidrogenasa con la más elevada capacidad oxidativa sobre tetracosanol, docosanol y tetradecanol (basado en el parámetro actividad en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{célula}$ ), se realizó primero un análisis de varianza de las medias (ANOVA), donde el test-F de la tabla ANOVA prueba si existe diferencia significativa entre las medias. Si las hubiere, posteriormente las pruebas del rango múltiple dirán qué medias son significativamente diferentes entre ellas utilizando el método de la diferencia significativa mínima ó LSD de Fisher (Least significant differences Tests) que realiza una comparación de pares de medias (Montgomery, 2004).

Los cálculos fueron realizados utilizando el software STATGRAPHICS PLUS versión 5.1 (2000).



# *Resultados*

---

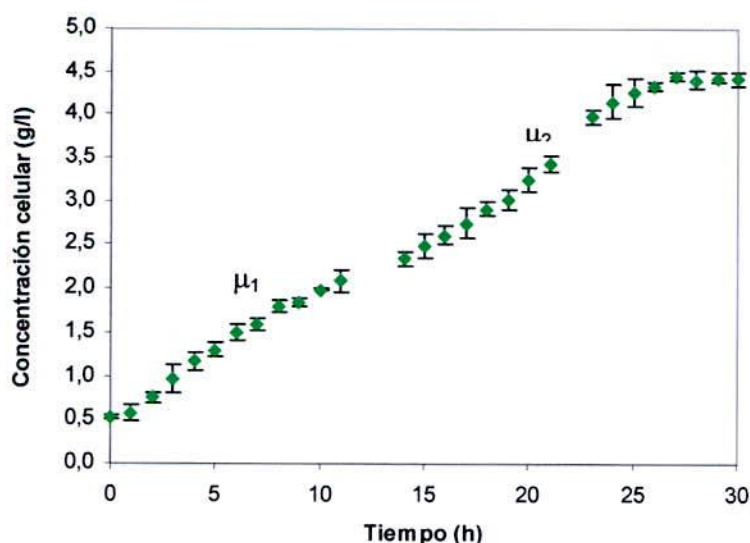
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudio de las condiciones de crecimiento e inducción de los microorganismos para la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa de alcoholes superiores

#### 4.1.1 Cinética de crecimiento celular de cada microorganismo

Con el objetivo de determinar el tiempo de cultivo para obtener el crecimiento máximo y la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo se realizó el estudio de las cinéticas de crecimiento celular. *Thermus thermophilus* HB 27, HNI 11, NR 17, PRQ 16, PRQ 25 y *Thermus* AB1 fueron cultivados en modalidad de lotes en matraz de 500 ml en medio Thermus a 200 r.p.m, 70°C y 50°C respectivamente ajustando el pH inicial de 7,5 con NaOH 2 N. En cambio *Candida tropicalis* fue cultivada a 30°C y 180 r.p.m. en un medio mínimo ya definido para un crecimiento celular de 3 g/l a pH 6,0 utilizando glicerol como nutriente limitante y única fuente de carbono y energía.

La Figura 4.1 representa la cinética de crecimiento de *Thermus thermophilus* HB27; las gráficas de los restantes microorganismos se muestran en el Apéndice I.



**Figura 4.1** Cinética de crecimiento celular *Thermus thermophilus* HB27. ( $\mu_1$  y  $\mu_2$ ) velocidad específica de crecimiento, (I) desviación estándar.

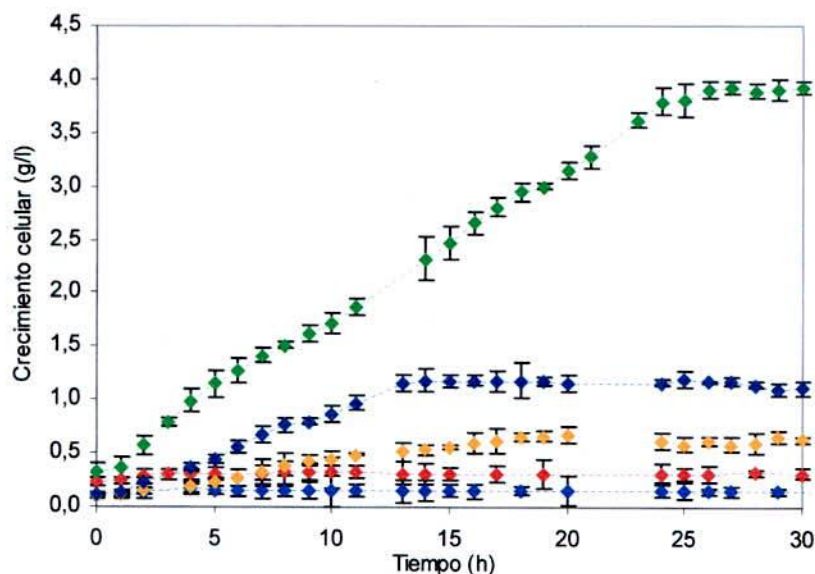
Los resultados de la velocidad específica de crecimiento y los valores de crecimiento celular de cada microorganismo a las condiciones estudiadas se presentan en la Tabla 4.1. El ejemplo de cálculo la velocidad específica de crecimiento en el Apéndice J.

**Tabla 4.1** Crecimiento celular máximo ( $\Delta X$ ) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de cada microorganismo.

Cepa	$\Delta X$ (g/l)	$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_2$ (h <sup>-1</sup> )	pH final
<i>Thermus thermophilus</i> HB 27	3,89	0,14	0,06	8,3
<i>Thermus thermophilus</i> HNI 11	3,59	0,20	0,04	8,8
<i>Thermus thermophilus</i> NR 17	3,41	0,17	0,06	8,6
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 16	2,75	0,11	0,04	8,5
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25	3,37	0,18	0,04	8,6
<i>Thermus</i> AB1	1,91	0,06	-	8,4
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	2,96	0,11	-	5,9

Si bien el medio de cultivo utilizado para los microorganismos *Thermus* y *thermus thermophilus* no es un medio diseñado para un determinado  $\Delta X$ , si es un medio complejo cuya concentración de triptona y extracto de levadura nos llevaría a pensar que el crecimiento máximo debería estar alrededor de 8 g/l, sin embargo no superó los 3,9 g/l.

Al determinar el pH final de las fermentaciones evidenciaron un aumento importante de éste, donde la máxima diferencia se observó con *Thermus thermophilus* HNI-11 cuyo pH final fue de 8,8. Este aumento de pH podría ser una causal de la inhibición del crecimiento celular. Para comprobar este efecto se estudio la factibilidad de modificar el medio *Thermus*, reemplazando el agua mineral por tampón fosfato de sodio pH 7,5 a diferentes concentraciones 10; 25; 50 y 100 mM. Como se observa en la Figura 4.2, se obtiene para *Thermus thermophilus* HNI 11 un crecimiento máximo luego de 30 horas de cultivo de 0,96 g/L con 10 mM de tampón fosfato, 0,59 g/L con 25 mM; 0,08 g/L con 50 mM y sin crecimiento con 100 mM. Similares resultados se obtienen para el resto de los microorganismos *Thermus thermophilus* y *Thermus*. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados están dados en promedio con su desviación estándar.



**Figura 4.2** Cinética de crecimiento celular *Thermus thermophilus* HNI 11 reemplazando el agua mineral por tampón fosfato de sodio pH 7,5. (◆) Control sin tampón, (◆) tampón fosfato 10 mM, (◆) tampón fosfato 25 mM, (◆) tampón fosfato 50 mM, (◆) tampón fosfato 100 mM, (I) desviación estándar.

Estos resultados demuestran que los microorganismos *Thermus* y *Thermus thermophilus* requieren de otro tipo de sales que están presentes en el agua mineral tales como potasio, calcio y magnesio. A continuación se modificó el medio *Thermus* esta vez reemplazando el agua mineral por diferentes sales como se muestran en la tabla G.3 del apéndice G. Esta experiencia se realizó con y sin tampón fosfato 10 mM pH 7,5; observando un crecimiento celular similares a los obtenidos utilizando agua mineral Cachantún (Ver Tabla 4.2).

**Tabla 4.2** Crecimiento celular máximo ( $\Delta X$ ) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de cada microorganismo en medio *Thermus* modificado en tampón fosfato 10 mM pH 7,5.

Cepa	$\Delta X$ (g/l)	$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_2$ (h <sup>-1</sup> )
<i>Thermus thermophilus</i> HB 27	3,71	0,15	0,06
<i>Thermus thermophilus</i> HNI 11	3,66	0,24	0,05
<i>Thermus thermophilus</i> NR 17	3,35	0,16	0,05
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 16	2,63	0,10	0,04
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25	3,31	0,16	0,04
<i>Thermus</i> AB1	2,20	0,08	-

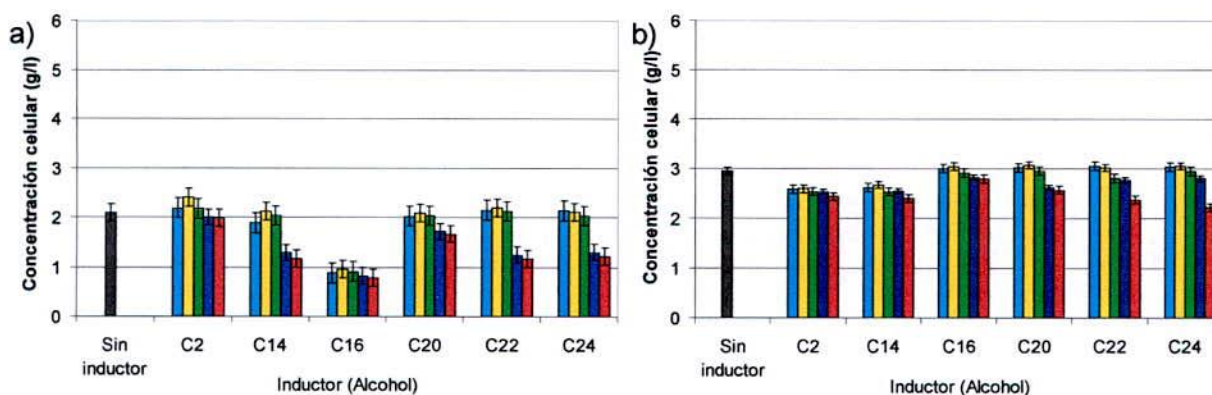
Finalmente se realizaron estudios reemplazando el medio Thermus por un medio mínimo definido para un crecimiento de 4 g/L con glucosa como única fuente de carbono y energía observando en todos los casos crecimientos muy por debajo a los obtenidos utilizando medio Thermus en agua mineral. Al modificar la fuente de carbono y energía por glicerol se observaron resultados similares a los obtenidos con glucosa, por lo que se decidió usar el medio Thermus original (con agua mineral Cachantún) en las siguientes experiencias.

#### 4.1.2 Efecto de la adición de inductor al medio de cultivo sobre el crecimiento celular

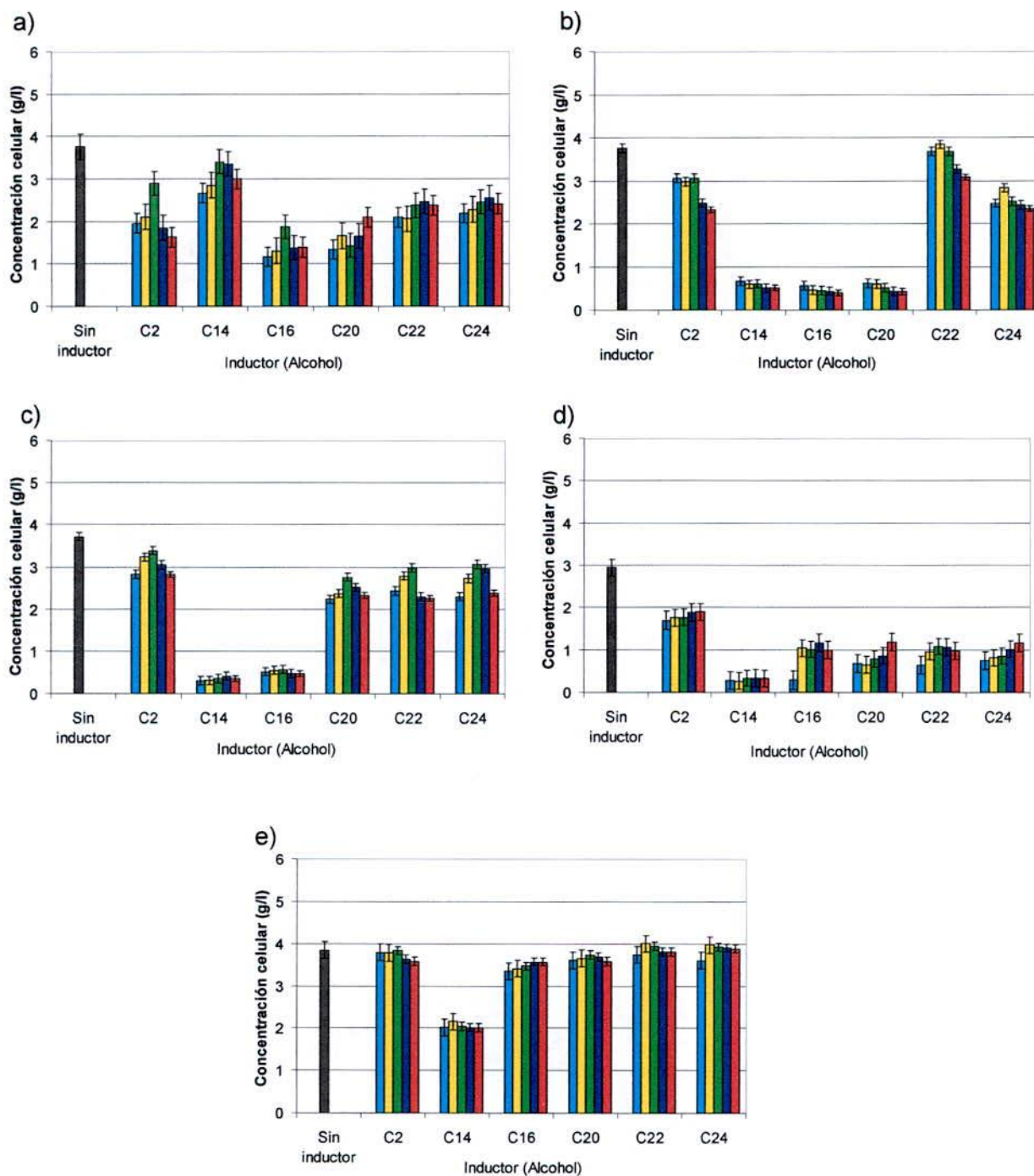
Con la finalidad de estudiar la toxicidad de los agentes inductores se adicionó al medio de cultivo 0,025; 0,05; 0,5; 1 y 2 % de alcoholes entre 2 y 24 átomos de carbono o alcanos entre 14 y 24 átomos de carbono, se determinó el efecto que genera en el crecimiento celular la adición de estos inductores luego de 96 horas de fermentación. Se evaluó el tipo y concentración de inductor.

En forma previa se estudio el uso de alcoholes 2 a 24 átomos de carbono como única fuente de carbono, no observándose crecimiento celular en ningún microorganismo.

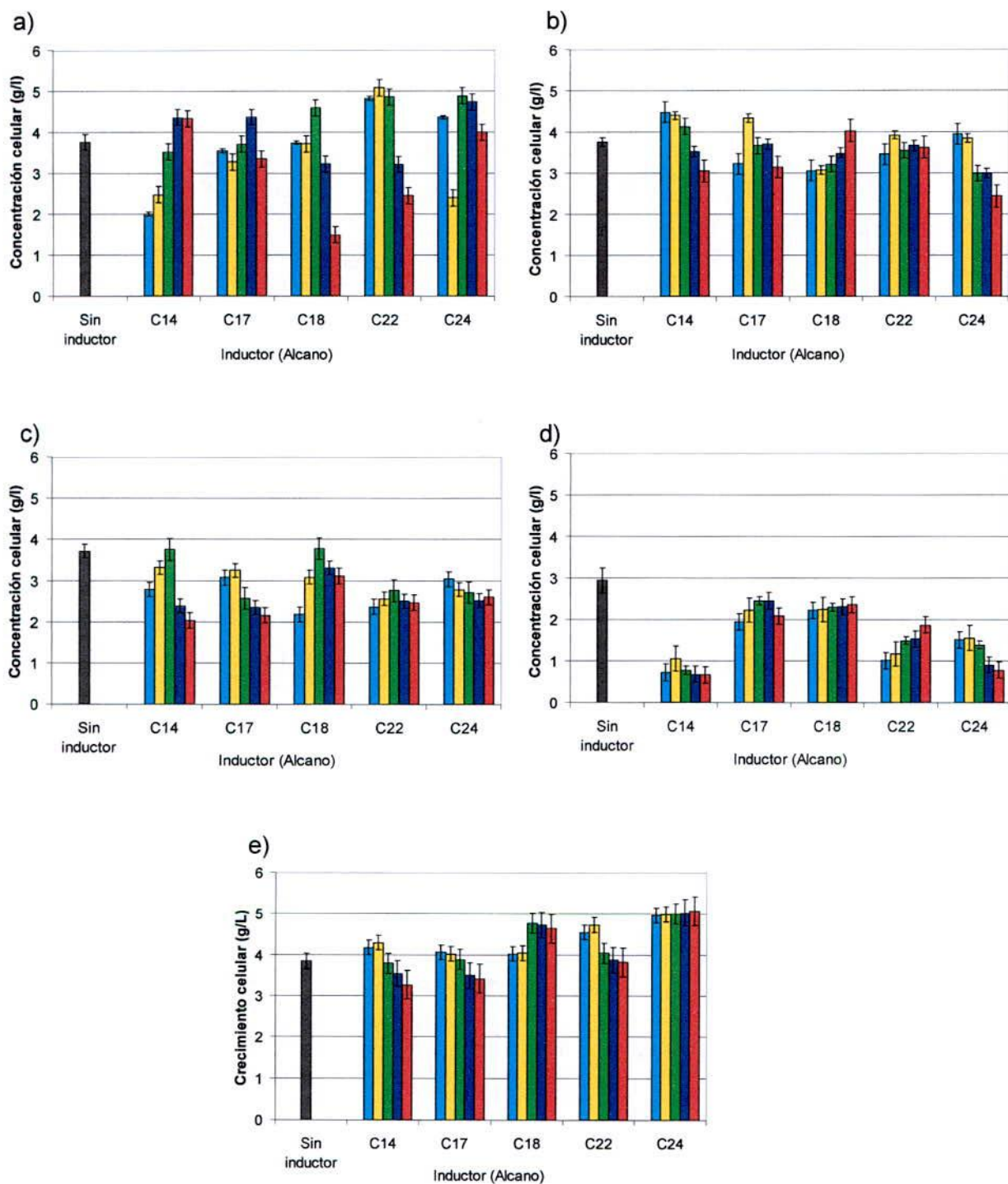
El efecto de la concentración de los alcoholes adicionados al medio de cultivo se muestra en la Figura 4.3, 4.4 y de alcanos en las Figura 4.5 y 4.6. Todos los resultados fueron realizados por duplicado.



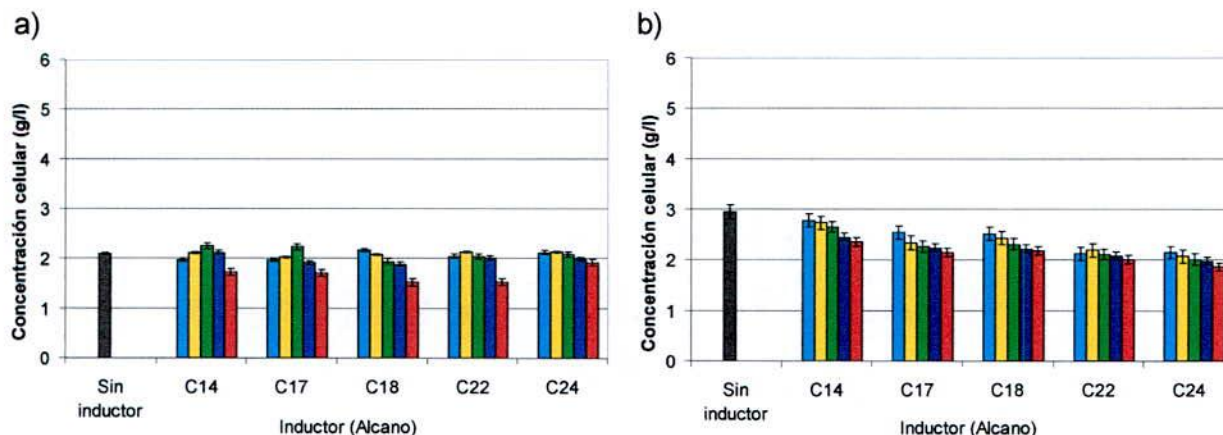
**Figura 4.3** Efecto de la adición de alcohol como inductor sobre el crecimiento celular. (a) *Thermus AB1*, (b) *Candida tropicalis* ATCC 20336. La inducción fue realizada adicionando al medio de cultivo: (■) 0,025 %, (■) 0,05%; (■) 0,5%; (■) 1%; (■) 2% de alcoholes entre 2 y 24 átomos de carbono, (I) desviación estándar.



**Figura 4.4** Efecto de la adición de alcohol como inductor sobre el crecimiento celular. (a) *T. thermophilus* HB27, (b) *T. thermophilus* HNI 11, (c) *T. thermophilus* NR 17, (d) *T. thermophilus* PRQ 16 y (e) *T. thermophilus* PRQ 25. La inducción fue realizada adicionando al medio de cultivo (■) 0,025 %, (■) 0,05%; (■) 0,5%; (■) 1%; (■) 2% de alcoholes entre 2 y 24 átomos de carbono, (I) desviación estándar.



**Figura 4.5** Efecto de la adición de alcano como inductor sobre el crecimiento celular. (a) *T. thermophilus* HB 27, (b) *T. thermophilus* HNI 11, (c) *T. thermophilus* NR 17, (d) *T. thermophilus* PRQ 16 y (e) *T. thermophilus* PRQ 25. La inducción fue realizada adicionando al medio de cultivo: (■) 0,025 %, (■) 0,05%; (■) 0,5%; (■) 1%; (■) 2% de alcanos entre 14 y 24 átomos de carbono, (I) desviación estándar.



**Figura 4.6** Efecto de la adición de alcano como inductor sobre el crecimiento celular. (a) *Thermus* AB1, (b) *Candida tropicalis* ATCC 20336. La inducción fue realizada adicionando al medio de cultivo: (■) 0,025 %, (■) 0,05%; (■) 0,5%; (■) 1%; (■) 2% de alcanos entre 14 y 24 átomos de carbono, (I) desviación estándar.

El comportamiento de las cepas es distinto frente a los diferentes inductores. Sin embargo se observó que al utilizar alcohol como inductor el crecimiento celular de la gran mayoría de las cepas es menor al control.

Por otro lado las cepas *Thermus thermophilus* HB27, HNI 11 y PRQ 25 presentan un aumento del crecimiento celular con todos los alcanos. El crecimiento máximo de *Thermus thermophilus* HB27 se logra con docosano, 37% más respecto al control. En cambio *Thermus thermophilus* PRQ 25 con octadecano, docosano y tetracosano se logra un aumento de 24, 23 y 32% respectivamente.

En relación a la concentración de inductor se realizó un análisis estadístico como fue descrito en la sección 3.5, utilizando el software STATGRAPHICS PLUS versión 5.1 (2000) mediante las pruebas del rango múltiple LSD (Least significant differences Tests) que compara pares de medias y ordena los resultados en forma ascendente desde el porcentaje de inductor que inhibe el crecimiento celular al porcentaje de inductor que produce mayor crecimiento celular. Este análisis arrojó que los mejores resultados de crecimiento celular fueron obtenidos a valores entre 0,05 y 1%. A concentraciones sobre

1% se produjo en la mayoría de los casos disminución del crecimiento. Sin embargo, se observa que tetradecanol inhibe el crecimiento de todas las cepas incluso a concentraciones muy bajas de 0,025% excepto *Thermus thermophilus* HB27 y AB1. A su vez hexadecanol inhibe el crecimiento de *Thermus thermophilus* HNI-11, NR 17, PRQ 16 y *Thermus* AB1 a todas las concentraciones estudiadas.

Por otro lado a concentraciones mayores a 0,5% se observa precipitación del agente inductor en el medio de cultivo. Lo que llevó a seleccionar 0,05% como la concentración más adecuada para los posteriores estudios de producción de la enzima alcohol deshidrogenasa.

### **4.1.3 Efecto de la adición de inductor al medio de cultivo en la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes alifáticos.**

A continuación se evaluó la capacidad de oxidación de diferentes alcoholes alifáticos utilizando las enzimas obtenidas en los extractos crudos de los diferentes microorganismos luego de 96 horas de fermentación, utilizando 0,05% de agente inductor (alcohol o alcano) en el medio de cultivo. La actividad fue determinada a 30°C, 50°C y 70°C para las enzimas producidas por *Candida tropicalis*, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* respectivamente. Es importante mencionar que estas alcohol deshidrogenasas son enzimas intracelulares cuya metodología de disruptión celular se presentan en la sección 3.3.6.

En las Tablas 4.3 y 4.4 se presentan los resultados de actividad específica sobre distintos alcoholes de las enzimas producidas por inducción con alcoholes y alcanos respectivamente. Todos los resultados son el promedio de duplicados.

**Tabla 4.3** Efecto del uso de alcoholes como inductores en la producción de enzimas con capacidad oxidativa sobre alcoholes alifáticos.

Cepa	Inductor alcohol	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de proteína)						
		Sustrato enzimático						
		Etanol	Octanol	Dodecanol	Tetradecanol	Hexadecanol	Docosanol	Tetracosanol
<i>Thermus thermophilus</i> HB 27	Control*	24,8	0	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	1,1	0	0	0	0	1,6	7,7
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	0	0	5,8	0	0	0	0
	C <sub>20</sub>	0	0	0	0	0	5,9	16,8
	C <sub>22</sub>	0	7,5	0	0	0	8,8	0
	C <sub>24</sub>	0	13,3	0	0	4,7	6,2	7,9
<i>Thermus thermophilus</i> HNI 11	Control*	27,4	0	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	18,9	12,6	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>20</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>22</sub>	0	0	0	0	0	13,4	15,1
	C <sub>24</sub>	0	0	0	0	17,9	17,8	19,3
<i>Thermus thermophilus</i> NR 17	Control*	5,8	0	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	5,4	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>20</sub>	0	0	0	0	1,3	10,5	10,8
	C <sub>22</sub>	0	0	0	0	5,8	7,8	7,7
	C <sub>24</sub>	0	0	0	0	7,2	8,8	0
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 16	Control*	9,3	9,2	10,1	0	11,8	0	0
	C <sub>2</sub>	176,6	60,2	87,4	19,0	46,8	0	0
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	62,6	8,5	12,9	33,5	70,1	0	0
	C <sub>20</sub>	6,5	4,8	1,6	1,1	16,1	16,4	10,4
	C <sub>22</sub>	8,2	0	0	2,6	1,1	9,4	4,5
	C <sub>24</sub>	7,0	0	0	0	7,6	8,8	9,7
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25	Control*	10,6	0	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	5,0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	0	0	64,9	0	0	0	0
	C <sub>20</sub>	9,2	0	0	15,0	29,2	27,4	36,4
	C <sub>22</sub>	0	0	0	11,6	0	24,1	15,7
	C <sub>24</sub>	0	0	0	8,9	31,0	20,9	21,6
<i>Thermus</i> AB1	Control*	6,9	5,8	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	14,7	13,2	2,3	0	0	4,4	7,7
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>20</sub>	4,5	4,0	4,8	0	0	3,8	6,9
	C <sub>22</sub>	0	1,0	1,9	1,9	1,0	20,4	42,9
	C <sub>24</sub>	0	6,4	21,2	15,7	17,2	15,5	25,8
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	Control*	7,6	0	0	0	0	0	0
	C <sub>2</sub>	14,4	12,9	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	5,2	4,4	3,6	0	0	0	0
	C <sub>16</sub>	54,0	69,8	65,1	86,7	145,9	196,9	218,8
	C <sub>20</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>22</sub>	0	0	0	5,3	6,1	5,4	6,4
	C <sub>24</sub>	0,5	0	0	0	0	4,2	5,0

\* Sin inductor

**Tabla 4.4** Efecto del uso de alcanos como inductores en la producción de enzimas con capacidad oxidativa sobre alcoholes alifáticos.

Cepa	Inductor alcano	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de proteína)						
		Sustrato enzimático						
		Etanol	Octanol	Dodecanol	Tetradecanol	Hexadecanol	Docosanol	Tetracosanol
<i>Thermus thermophilus</i> HB 27	Control*	24,8	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	3,4	0	0	0	0	0	0
	C <sub>17</sub>	0	0	0	0	0	9,9	14,0
	C <sub>18</sub>	4,6	0	0	0	0	3,2	12,8
	C <sub>22</sub>	3,8	0	0	0	0	8,9	14,5
	C <sub>24</sub>	3,3	0	0	0	7,6	7,9	18,1
<i>Thermus thermophilus</i> HNI 11	Control*	27,4	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>17</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>18</sub>	22,2	0	0	0	15,8	18,8	16,3
	C <sub>22</sub>	0	0	0	0	0	21,4	20,1
	C <sub>24</sub>	0	0	0	0	0	19,7	21,0
<i>Thermus thermophilus</i> NR 17	Control*	5,8	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	10,8	9,5	0	0	0	1,5	2,3
	C <sub>17</sub>	8,1	3,9	0	0	0	4,1	5,4
	C <sub>18</sub>	6,5	1,7	1,4	0	0	5,2	5,0
	C <sub>22</sub>	2,0	0	0	0	0	7,0	5,5
	C <sub>24</sub>	0	0	0	0	2,4	5,9	7,1
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 16	Control*	9,3	9,2	10,1	0	11,8	0	0
	C <sub>14</sub>	0	4,4	0	0	0	9,0	9,1
	C <sub>17</sub>	0	0	0	0	0	9,8	9,8
	C <sub>18</sub>	0	8,4	0	0	6,1	10,5	11,1
	C <sub>22</sub>	0	0	0	0	0	10,8	15,6
	C <sub>24</sub>	6,9	9,7	0	0	0	9,7	15,5
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25	Control*	10,6	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	12,7	0	0	0	0	25,2	8,1
	C <sub>17</sub>	2,0	0	0	0	0	26,8	31,3
	C <sub>18</sub>	1,5	0	0	0	0	18,3	22,2
	C <sub>22</sub>	1,6	0	0	0	0	15,7	32,4
	C <sub>24</sub>	2,7	0	0	0	0	27,2	30,1
<i>Thermus</i> AB1	Control*	6,9	5,8	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0	16,6	2,3	11,1	19,2	0	0
	C <sub>17</sub>	0	0	0	0	0	2,2	12,5
	C <sub>18</sub>	5,0	0	0	0	0	8,5	11,3
	C <sub>22</sub>	3,0	0	0	0	0	29,2	16,8
	C <sub>24</sub>	0	2,9	2,0	0	14,9	16,2	18,7
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	Control*	7,6	0	0	0	0	0	0
	C <sub>14</sub>	0,9	1,3	0	0	0	0	0
	C <sub>17</sub>	5,8	0	0	0	0	0	0
	C <sub>18</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>22</sub>	0	0	0	0	0	0	0
	C <sub>24</sub>	0	0	0	0	0	0	0

\* Sin inductor

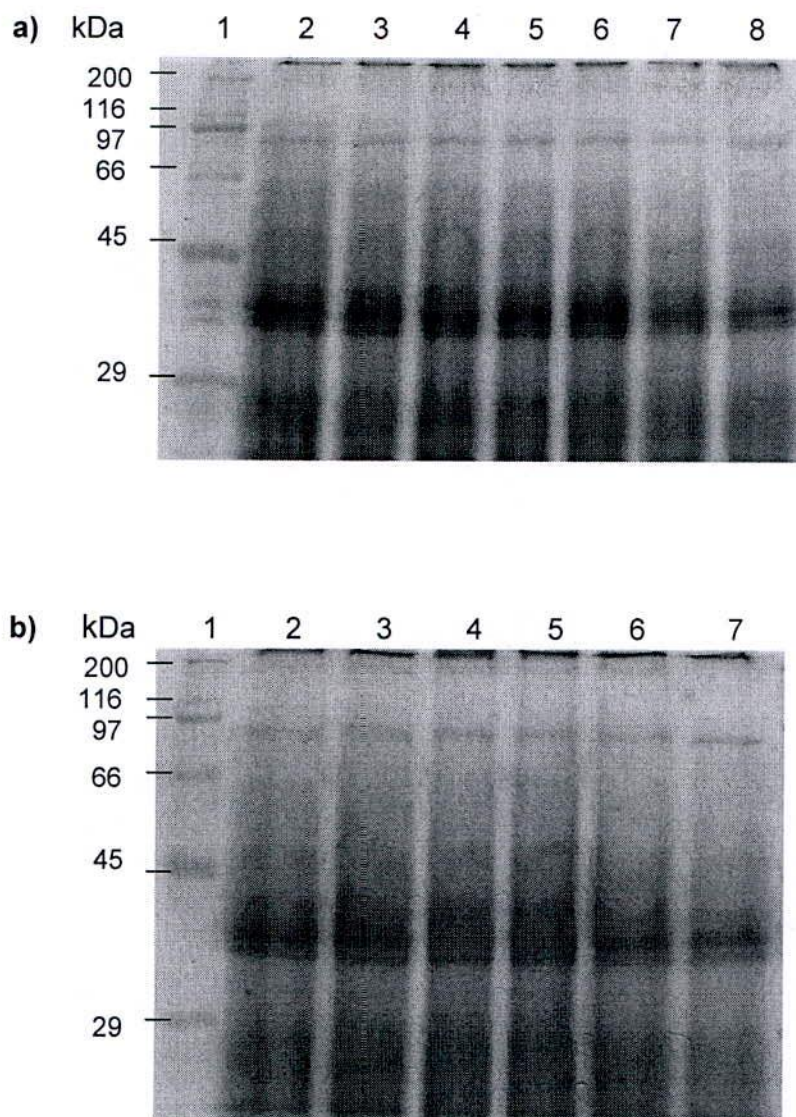
Para determinar el tipo de microorganismo e inductor que produce una enzima con elevada actividad sobre tetradecanol, docosanol y tetracosanol se realizó el análisis estadístico como fue descrito en la sección 3.5, utilizando el software STATGRAPHICS PLUS versión 5.1 (2000). El Test de Rangos Múltiples utilizando de prueba LSD (Least significant differences Tests) permite comparar la actividad específica sobre tetradecanol, docosanol y tetracosanol de las enzimas producidas por los microorganismos inducidos con alcoholes y alcanos. El Test de Rangos Múltiples ordena los microorganismos inducidos en forma ascendente, desde el microorganismo inducido que generó la enzima con menor actividad al microorganismo inducido que generó la enzima con mayor actividad (Ver apéndice J). Se incluyó tetradecanol como sustrato importante en este estudio ya que como se mencionó en la revisión bibliográfica, sólo hay reportada una enzima producida por *Candida tropicalis* con capacidad de oxidar alcohol de cadena larga de hasta 16 carbonos cuya máxima actividad es sobre tetradecanol.

Es interesante destacar que las más alta actividad sobre alcoholes de 14, 22 y 24 átomos de carbono se lograron con las enzimas alcohol deshidrogenasas provenientes de *Candida tropicalis* ATCC20336 inducidas con hexadecanol ( $C_{16}$ ), *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con eicosanol ( $C_{20}$ ) y *Thermus* AB1 inducida con docosanol ( $C_{22}$ ), seleccionando estos microorganismos e inductores para continuar con el estudio.

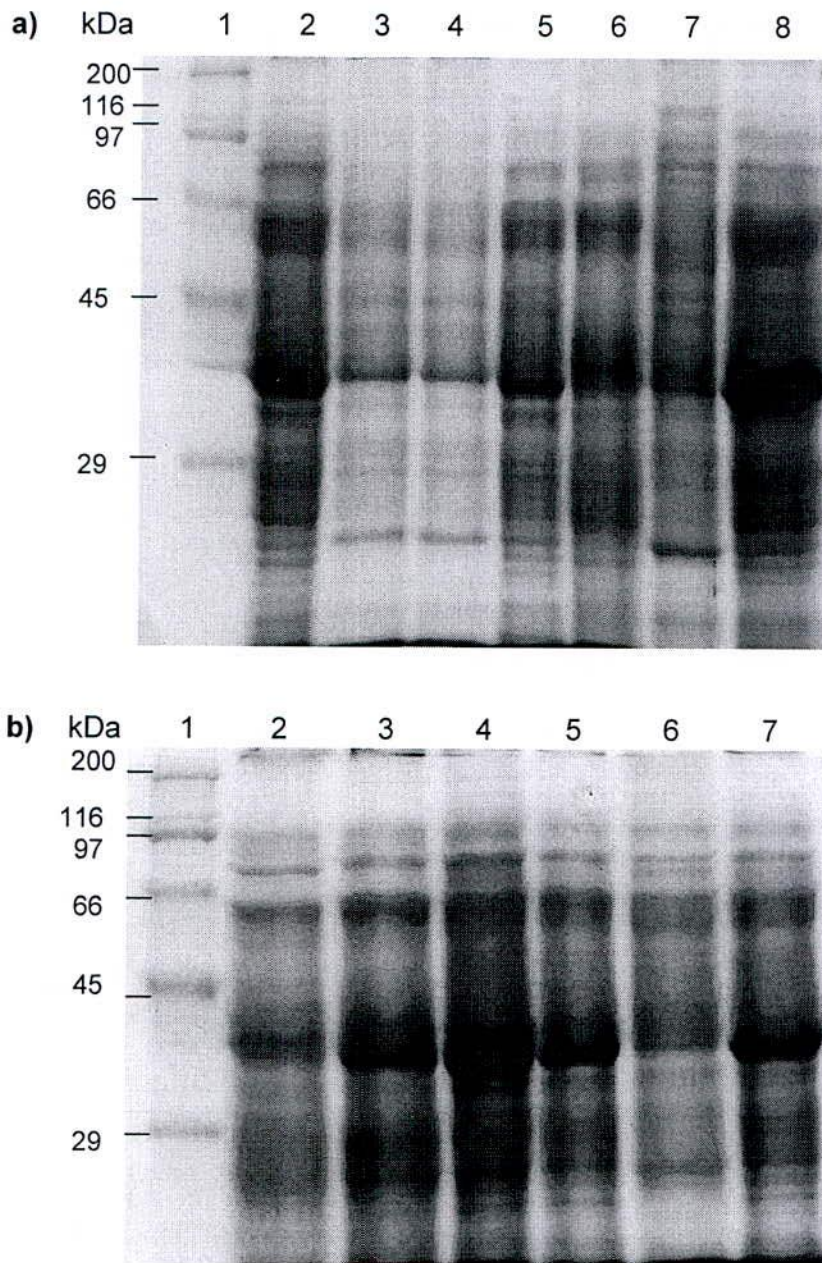
Por otra parte, sin inducción solo hay actividad sobre etanol, a excepción de *Thermus* AB1 que además presenta actividad sobre octanol y *Thermus thermophilus* PRQ 16 que se escapó algo del patrón, observándose actividad sobre etanol, octanol, dodecanol y hexadecanol.

#### **4.1.4 Análisis electroforético de la proteínas provenientes de los diferentes extractos crudos.**

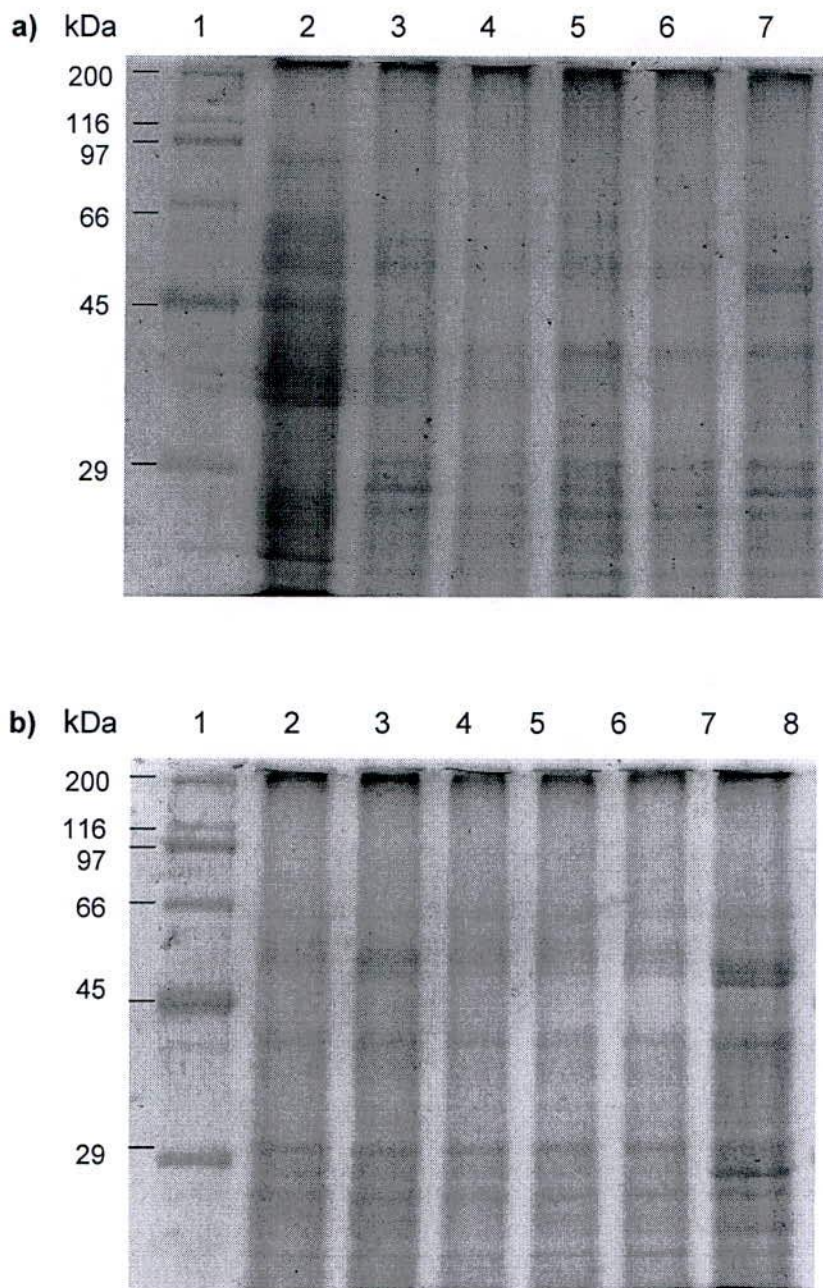
Con la finalidad de observar si existe la sobreproducción de alguna proteína en los cultivos por efecto de la adición del agente inductor al medio, se realizó la caracterización electroforética en geles de poliacrilamida SDS al 12% de las proteínas obtenidas del extracto crudo proveniente de *Candida tropicalis*, *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Thermus* AB1 como se muestra en las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9 respectivamente.



**Figura 4.7** Electroforesis SDS PAGE 12% extracto crudo de *Candida tropicalis* inducidas con **a) Alcoholes**: línea 1 marcador de peso molecular, línea 2: etanol, línea 3: tetradecanol, línea 4: hexadecanol, línea 5: eicosanol, línea 6: docosanol, línea 7: tetracosanol, línea 8: sin inducción. **b) Alcanos**: línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: tetradecano, línea 3: heptadecano, línea 4: octadecano, línea 5: docosano, línea 6: tetracosano, línea 7: sin inducción. Se cargaron 30  $\mu$ g proteínas totales. Tinción azul de Coomassie.



**Figura 4.8** Electroforesis SDS PAGE 12% extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducidas con **a) Alcoholes**: línea 1 marcador de peso molecular, línea 2: etanol, línea 3: tetradecanol, línea 4: hexadecanol, línea 5: eicosanol, línea 6: docosanol, línea 7: tetracosanol, línea 8: sin inducción. **b) Alcanos**: línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: tetradecano, línea 3: heptadecano, línea 4: octadecano, línea 5: docosano, línea 6: tetracosano, línea 7: sin inducción. Se cargaron 30  $\mu$ g proteínas totales. Tinción azul de Coomassie.



**Figura 4.9** Electroforesis SDS PAGE 12% extracto crudo de *Thermus AB1* inducidas con **a) Alcoholes**: línea 1 marcador de peso molecular, línea 2: etanol, línea 3: hexadecanol, línea 4: eicosanol, línea 5: docosanol, línea 6: tetracosanol, línea 7: sin inducción. **b) Alcanos**: línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: tetradecano, línea 3: heptadecano, línea 4: octadecano, línea 5: docosano, línea 6: tetracosano, línea 7: sin inducción. Se cargaron 30 µg proteínas totales. Tinción azul de Coomassie.

El análisis de la densitometría óptica con programa Gel Pro 3.0 analyzer de los perfiles electroforéticos revelan que para las proteínas provenientes de *Candida tropicalis* inducidas por alcoholes y alcanos las bandas se concentra en los pesos moleculares entre 20 y 100 kDa. Entre las proteínas de 20 y 60 kDa se observa que a medida que aumenta el largo de cadena del agente inductor hay un aumento en la densidad óptica tanto para alcoholes como para alcanos. (Ver densitometría en apéndice K).

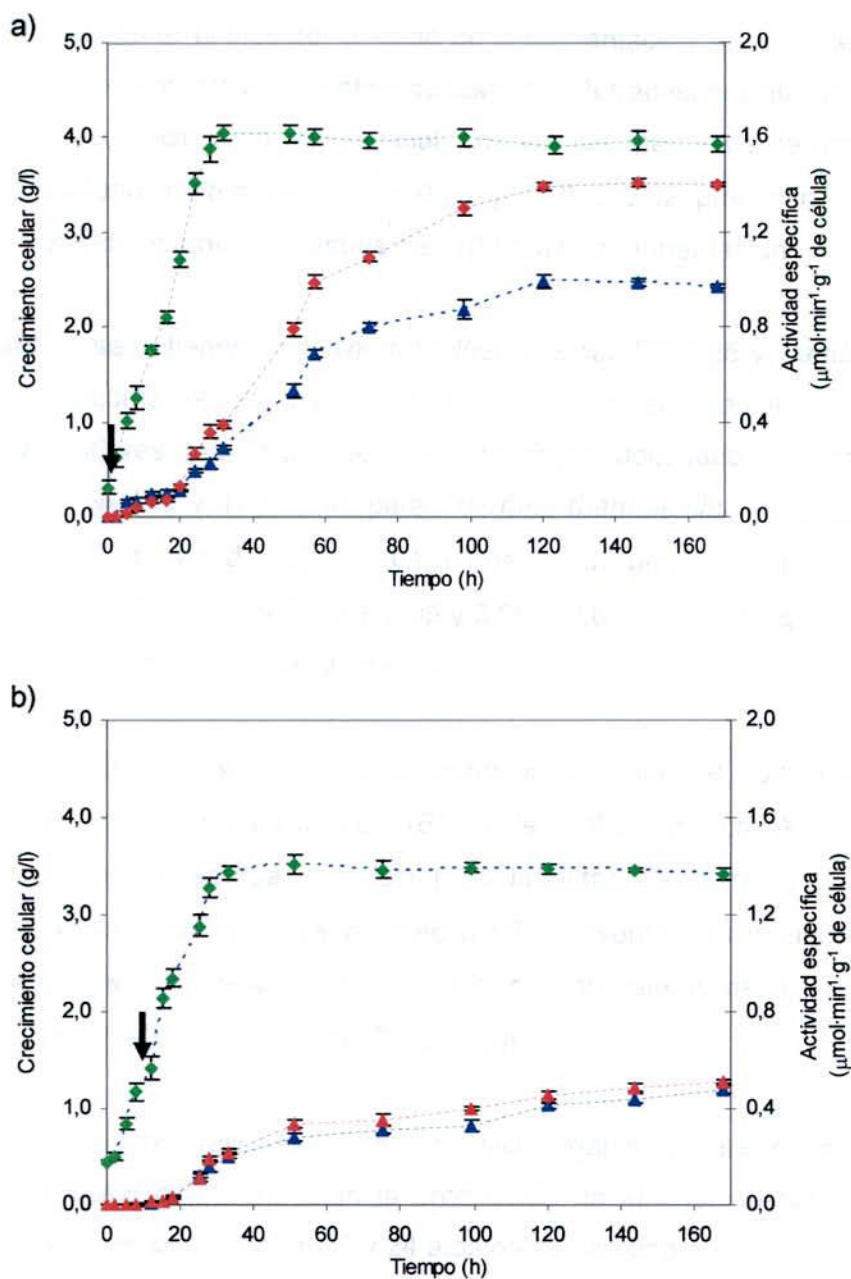
En cambio el análisis densitométrico de las proteínas provenientes de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducidas tanto por alcoholes como alcanos muestran que las bandas se concentran principalmente entre los pesos moleculares 20 y 80 kDa. A medida que el agente inductor utilizado posee mayor largo de cadena se observa un aumento en la densidad óptica principalmente entre las proteínas de 50 y 66 kDa.

Finalmente se observar que en los perfiles de proteínas de *Thermus* AB1 las bandas se concentran entre 20 y 100 kDa. Al aumentar el largo de cadena del alcohol como agente inductor se observa un aumento en la densidad óptica de las bandas de menor peso molecular (22 y 29 kDa), en cambio al aumentar el largo de cadena del alcano aumenta la densidad óptica de las proteínas entre 58 y 60 kDa.

### 4.1.5 Efecto del tiempo de adición del agente inductor al medio de cultivo

Con la finalidad de determinar si el tiempo de adición del agente inductor al medio de cultivo generaba algún efecto en la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes alifáticos, se realizaron cinéticas de crecimiento de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con eicosanol ( $C_{20}$ ), *Thermus* AB1 inducida con docosanol ( $C_{22}$ ) y *Candida tropicalis* ATCC20336 inducidas con hexadecanol ( $C_{16}$ ), adicionando el agente inductor al inicio del cultivo y a la mitad de la fase de crecimiento exponencial. Para este estudio se utilizaron como inóculos las células inducidas (inóculos adaptados).

Los resultados obtenidos para *Thermus* AB1 se presentan en la Figura 4.10.



**Figura 4.10** Efecto del tiempo de adición del agente inductor en la producción de alcohol deshidrogenasa de *Thermus AB1*. La inducción fue realizada adicionando 0,05% de docosanol al medio de cultivo (a) al inicio del cultivo (b) en la fase de crecimiento exponencial (12 horas). Las células fueron colectadas a distinto tiempo para la medición de actividad sobre los sustratos enzimáticos docosanol y tetracosanol. (◆) Crecimiento celular, (▲) actividad sobre docosanol, (▲) actividad sobre tetracosanol, (flecha en negro) período de adición del inductor, (I) desviación estándar.

Se observó que al adicionar el inductor al inicio de la fermentación se produce una alcohol deshidrogenasa con mayor actividad sobre docosanol y tetracosanol que al adicionar el inductor en la fase de crecimiento exponencial. Los valores más altos de actividad sobre docosanol y tetracosanol fueron de  $1,00 \pm 0,03$  y  $1,40 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula respectivamente, ambos obtenidos después de 120 horas de fermentación.

Resultados similares se obtienen para *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Candida tropicalis* ATCC20336, los mejores resultados se obtienen cuando se induce al inicio de la fermentación. Los valores más altos de actividad sobre docosanol y tetracosanol se obtuvieron después de 140 y 100 horas para *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Candida tropicalis* respectivamente, siendo  $1,32 \pm 0,04$  y  $1,64 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula para *Thermus thermophilus* PRQ 25 y de  $2,83 \pm 0,05$  y  $3,20 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de célula para *Candida tropicalis* ATCC 20336 respectivamente.

Es interesante destacar que al adicionar el inductor al inicio del cultivo la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) para *Thermus* AB1 es de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  con un  $\Delta X$  de  $3,96 \pm 0,08 \text{ g/l}$ . En cambio cuando se agrega el inductor en la mitad de la fase de crecimiento exponencial se observan que la curva de crecimiento presenta dos  $\mu$ , uno antes de la adición del inductor y el otro después de la inducción con valores de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  y  $0,05 \text{ h}^{-1}$  respectivamente con un valor de  $\Delta X$  de  $3,42 \pm 0,06 \text{ g/l}$ .

La Tabla 4.5 resume los resultados de los microorganismos seleccionados y las condiciones de inducción que maximizan la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono.

**Tabla 4.5** Condiciones de inducción que maximizan la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono de los microorganismos seleccionados. La actividad fue determinada a 30°C, 50°C y 70°C para las enzimas producidas por *Candida tropicalis*, *Thermus AB1* y *Thermus thermophilus* PRQ 25 respectivamente.

Cepa	Tipo inductor	% inductor	Tiempo Cultivo (h)	Actividad específica Docosanol		Actividad específica Tetracosanol	
				$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ Célula	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ célula
				<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	Hexadecanol (C16)	0,05	100
<i>Thermus AB1</i>	Docosanol (C22)	0,05	120	16,8	1,0	48,7	1,4
<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25	Eicosanol (C20)	0,05	140	10,6	1,3	39,7	1,6

## 4.2 Purificación de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes superiores

Se realizó la purificación de las alcohol deshidrogenasas provenientes de los extractos crudos de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 obtenidos a las condiciones de inducción señaladas en la Tabla 4.5.

El primer paso para la purificación fue probar la capacidad de adsorción de las enzimas a las diferentes matrices cromatográficas; esta capacidad de adsorción es expresada como rendimiento de adsorción y es definido como:

$$\text{Rendimiento en adsorción} = \frac{\text{Actividad específica expresada}}{\text{Actividad específica contactada}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

La medición de actividad fue realizada utilizando docosanol como sustrato. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6

**Tabla 4.6** Adsorción sobre diferentes soportes iónicos de las alcohol deshidrogenasas producidas por *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25

Soporte	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	<i>Thermus</i> AB1	<i>Thermus thermophilus</i> PRQ 25
	Rendimiento de adsorción %	Rendimiento de adsorción %	Rendimiento de adsorción %
IDA $\text{Cu}^{+2}$	0	85	36
DxSO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	79	44	34
DEAE - sepharose	98	16	82
Q - sepharose	85	6,5	95
CM - sepharose	97	44	23
SP - sepharose	70	0	39

Con aquellos resinas que presentaron sobre un 80% de rendimiento de adsorción se procedió a desorber la enzima adicionando concentraciones crecientes de imidazol o NaCl (Ver sección 3.4.4). La alcohol deshidrogenasa de AB1 adsorbida en IDA<sub>Cu+2</sub> es eluida de esta resina a una concentración 5 mM de imidazol en tampón fosfato 5 mM pH 7,0. La alcohol deshidrogenasa producidas por PRQ25 adsorbidas en DEAE-sepharose y Q-sepharose son eluidas utilizando 200 mM y 300 mM de NaCl respectivamente. A su vez la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* adsorbida en DEAE-sepharose y CM-sepharose son eluidas de las resinas con 50 mM de NaCl y 50 mM imidazol respectivamente.

Una vez conocida la capacidad de adsorción de las diferentes alcohol deshidrogenasas se procedió a diseñar el protocolo de purificación. Se probaron tres protocolos para cada enzima; sin embargo sólo se presentan los resultados con los que se obtuvieron mejores resultados (Ver sección 3.4.4).

El seguimiento de la purificación fue evaluado a través del factor de purificación (F) y rendimiento de purificación (R), los que fueron definidos como:

$$\text{Factor de purificación} = \frac{\text{Actividad específica purificado}}{\text{Actividad específica extracto crudo}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Rendimiento de purificación} = \frac{\text{Actividad total purificado}}{\text{Actividad total extracto crudo}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Como se observa en la tabla 4.7 se logra purificar la alcohol deshidrogenasa proveniente de *Candida tropicalis* con un factor de purificación de 39 veces en comparación con el extracto crudo, pero se pierde el 76% de la actividad. En cambio el grado de purificación de la enzima de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 en mucho mayor con factores de 237 y 567 respectivamente y en ambos casos se recupera alrededor del 36% de la actividad inicial (Ver Tablas 4.8 y 4.9).

**Tabla 4.7** Purificación de alcohol deshidrogenasa a partir de un extracto crudo de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inducida con 0,05% hexadecanol. La concentración de proteína en el crudo inicial es de 5,3 mg/ml.

Pasos de Purificación	Actividad total ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína)	F*	R** (%)
Extracto crudo inicial	5,86	2,11	27,8	1	100
Sobrenadante luego de interacción con $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$ - DEAE y lavado con 50 mM NaCl	1,6	1,84	870	31,3	27
Sobrenadante luego de la interacción con CM, lavado con 50 mM imidazol y concentrado	1,42	1,32	1076	39	24

\* Factor de purificación

\*\* Rendimiento de purificación

**Tabla 4.8** Purificación de alcohol deshidrogenasa a partir de un extracto crudo de *Thermus* AB1 inducida con 0,05% docosanol. La concentración de proteína en el crudo inicial es de 35,5 mg/ml.

Pasos de la Purificación	Actividad total ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína)	F*	R** (%)
Extracto crudo inicial	2,52	710	3,55	1	100
Sobrenadante luego de contactar con Q - DEAE- SP- $\text{DxSO}_4^-$	2,02	64	31,6	8,9	80
Sobrenadante luego de interacción con $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$ y lavado con 50 mM imidazol	1,12	8	140	39,4	44
Sobrenadante luego de la segunda interacción con $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}$ , lavado con 50 mM imidazol y concentrado	0,9	1,07	841	237	36

\* Factor de purificación

\*\* Rendimiento de purificación

**Tabla 4.9** Purificación de alcohol deshidrogenasa a partir de un extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con 0,05% eicosanol. La concentración de proteína en el crudo inicial es de 34,4 mg/ml.

Pasos de Purificación	Actividad total ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína)	F*	R** (%)
Extracto crudo inicial	2,06	688	3,0	1	100
Sobrenadante luego de contactar con $\text{IDA}_{\text{Cu}^{+2}}\text{-CM} - \text{DxSO}_4^-$	1,98	81	24	8	96
Sobrenadante luego de interacción con DEAE y lavado con 50 mM imidazol pH 7,0 y pH 5,0	1,50	6	250	83	73
Sobrenadante luego de la segunda interacción con DEAE y lavado con 50 mM imidazol pH 5,0	1,15	1,8	639	213	56
Luego de interacción con SP	0,70	0,41	1707	569	34

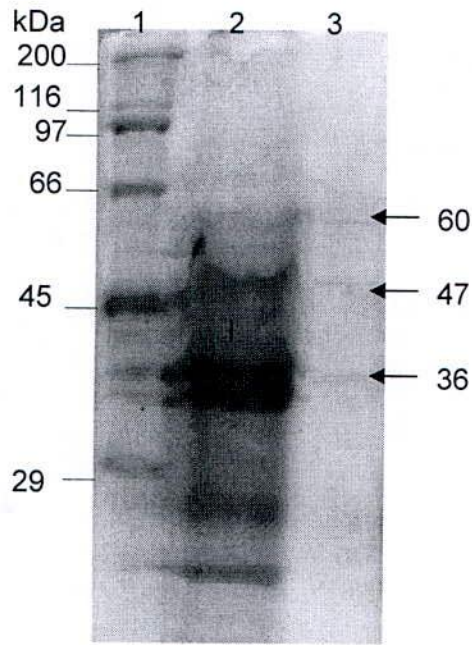
\* Factor de purificación

\*\* Rendimiento de purificación

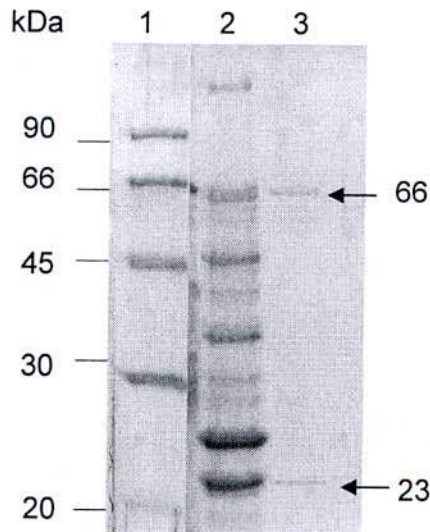
Es importante señalar que la concentración de proteína del extracto crudo de *Candida Tropicalis* es mucho menor a la concentración de proteína de los extractos crudos de los microorganismos *Thermus*, debido a que la ruptura celular de éstos fue realizada utilizando un sonicador ultrasónico que permitió la mayor ruptura celular y por lo tanto mayor liberación de las proteínas a la solución.

En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran los perfiles electroforéticos SDS-PAGE 12% de las proteínas de los extractos crudos y purificados de *Candida tropicalis* ATCC 20336 y *Thermus* AB1 respectivamente.

La purificación de alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* muestra tres bandas de 60, 47 y 36 kDa respectivamente. En cambio *Thermus* AB1 presenta dos bandas muy tenues de 66 y 23 kDa.

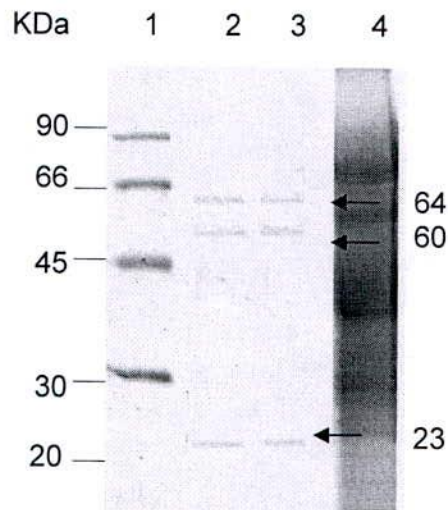


**Figura 4.11** Electroforesis SDS PAGE 12% de la purificación de alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis*. línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: extracto crudo inicial de *Candida tropicalis*, línea 3: *Candida tropicalis* - IDACu+2 - DEAE - CM. Se cargaron 40 µg proteínas totales. Tinción coomassie brilliant blue.

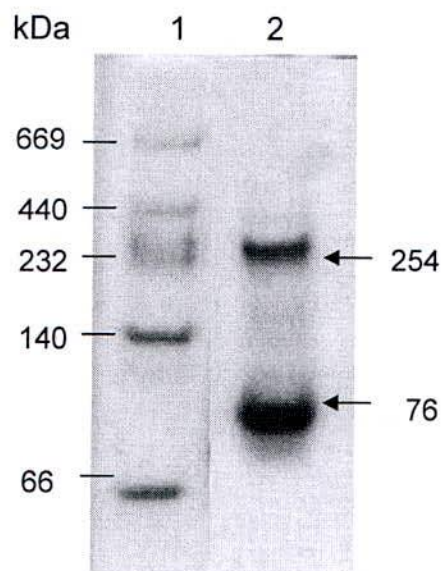


**Figura 4.12** Electroforesis SDS PAGE 12% de la purificación de alcohol deshidrogenasa de *Thermus AB1*. línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: extracto crudo inicial, línea 3: purificado. Se cargaron 40 µg proteínas totales. Tinción coomassie brilliant blue.

Al analizar la purificación de *Thermus thermophilus* PRQ 25 por electroforesis SDS PAGE se obtienen tres bandas de 64, 60 y 23 kDa. En cambio al analizar la misma muestra mediante electroforesis nativa se obtienen dos bandas de 254 y 76 kDa (Ver Figuras 4.13 y 4.14).



**Figura 4.13** Electroforesis SDS PAGE 12% de la purificación de alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25. línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: purificado, línea 3: purificado, línea 4: extracto crudo inicial. Se cargaron 40 µg proteínas totales. Tinción coomassie brilliant blue.



**Figura 4.14** Electroforesis nativa en gradiente 4-15% de la purificación de alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25. línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: purificado. Se cargaron 40 µg proteínas totales. Tinción azul de Coomassie.

Los resultados de identificación de las bandas por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) de la electroforesis SDS PAGE 12% de la purificación de alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25 ( Figura 4.13) se muestran en las tablas 4.10, 4.11 y 4.12, destacándose que al comparar los resultados de secuenciación peptídica con la base de datos del genoma de *Thermus thermophilus* PRQ 25 solo la banda de 64 kDa presenta tres secuencias peptídicas **RQAAEAVLEAGGYPIPR**, **RIYLAQALDRA** y **KLALM\*VAGLAVQK.Y** que estarían asociadas a deshidrogenasas.

Estos resultados junto a las electroforesis denaturante y nativas de la purificación de PQR 25 nos podría indicar que la enzima alcohol deshidrogenasa correspondería a una proteína de aproximadamente 254 kDa compuesta por cuatro subunidades de 64 kDa cada una. (Ver Figuras 4.13 y 4.14).

**Tabla 4.10** Resultados de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) de la banda 64 kDa obtenida de la purificación de alcohol deshidrogenasa de un extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con 0,05% eicosanol.

Reference	MH+	z	Peptide
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1957,939	2	R.LDGDATFVQVYEDTS GLK.V
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1700,889	2	R.GVSM*DEILQLPVVER.I
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1700,889	2	R.GVSM*DEILQLPVVER.I
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	2630,345	2	K.EVKPAGEYTVVEPVPVLEDGTELK.M
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	2630,345	3	K.EVKPAGEYTVVEPVPVLEDGTELK.M
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1270,700	2	K.VGEEGLVGEI.R.L
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1722,852	3	R.GGM*VLGTVPEFSFTHK.I
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1573,837	2	R.TVLIANTS NM*PVAARE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1600,727	2	R.DQGFS VALM*ADS TS.R.W
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1334,622	2	R.ENVAEDYPEL.R.D
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1722,852	2	R.GGM*VLGTVPEFSFTHK.I
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	965,553	2	R.GVVVHALDRE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1044,568	2	R.DAIS ELLQRE
PRQ25_0221_ORF_00012_00062 [30055 - 31860] acylamino-acid-releasing protein	1772,943	2	R.GLLPEGNVALYALEEGK.A
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1950,868	2	R.YVSEEEFPAYLEEAM*K.E
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1044,568	2	R.DAIS ELLQRE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1573,837	2	R.TVLIANTS NM*PVAARE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	2630,345	2	K.EVKPAGEYTVVEPVPVLEDGTELK.M
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	2724,275	3	R.YVSEEEFPAYLEEAM*KEIQGAFK.A
PRQ25_1412_ORF_00084_00003 [2484 - 751] (REVERSE SENSE) acyl-CoA dehydrogenase	1641,859	2	R.QAAEAVLEAGGYPIPR
PRQ25_1412_ORF_00084_00003 [2484 - 751] (REVERSE SENSE) acyl-CoA dehydrogenase	1062,594	2	R.IYLAQALDRA
PRQ25_1412_ORF_00084_00003 [2484 - 751] (REVERSE SENSE) acyl-CoA dehydrogenase	1229,729	2	K.LALM*VAGLAVQK.Y
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1935,916	2	R.LEEMPAEAGYPPYLAAR.L
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1334,622	2	R.ENVAEDYPEL.R.D
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	884,441	2	K.TGGPLM*HR.T
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1044,568	1	R.DAIS ELLQRE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	1557,842	2	R.TVLIANTS NMPVAARE
PRQ25_1352_ORF_00074_00008 [2658 - 4394] V-type ATP synthase alpha chain (V-ty	932,523	2	-.M*IQGVQK.I

• marca el sitio de corte con tripsina

\* metionina oxidada

**Tabla 4.11** Resultados de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) de la banda 60 kDa obtenida de la purificación de alcohol deshidrogenasa de un extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con 0,05% eicosanol.

Reference	MH+	z	Peptide
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	2338,28784	3	R.GQKLPFSGSLPANEIAAQIAR.Q
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1465,76453	2	R.TQQILAYESGVTRA
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1465,76453	2	R.TQQILAYESGVTRA
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	2270,15234	3	R.FHITQGGSTLTAQEPLNNVVRT
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1406,71954	2	R.VGVSITLEDM*QK.L
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1717,91187	2	R.SVLFNKAADDPTIER.I
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1898,92432	2	K.QVSDQLYSAYANGVDIR.K
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1460,70557	2	RELSYFIQEFERT
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1259,60547	2	R.YLQFADAFERF
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1259,60547	2	R.YLQFADAFERF
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	2338,28784	3	R.GQKLPFSGSLPANEIAAQIAR.Q
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1717,91187	3	R.SVLFNKAADDPTIER.I
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1928,87348	2	R.GYPGYM*YTDLATIYERA
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1793,89160	2	R.EAGSTAAQEIAFTLADAK.A
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1251,62292	2	R.FFINQGGQNR.S
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1360,83105	2	R.LPITGLPLNPVAR.R
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1784,95007	2	K.LVAIHGEDALTENDRRY
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1928,87348	2	R.GYPGYM*YTDLATIYERA
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	820,49274	2	R.SVLFNKA
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1855,93372	2	R.FFDPN SPLNEPVPVQR.I
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	1460,70557	2	RELSYFIQEFERT
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1008,51086	2	R.IDPELHER.R
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	820,49274	1	R.SVLFNKA
PRQ25_1892 ORF_00386_00017 [9179 - 10723] methylmalonyl-CoA mutase	1855,93372	2	R.FFDPN SPLNEPVPVQR.I
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	820,49274	2	R.SVLFNKA
PRQ25_1353 ORF_00074_00010 [4405 - 5841] V-type ATP synthase beta chain (V-type	916,43707	2	K.ADDPTIER.I

• marca el sitio de corte con tripsina

\* metionina oxidada

**Tabla 4.12** Resultados de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) de la banda 23 kDa obtenida de la purificación de alcohol deshidrogenasa de un extracto crudo de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con 0,05% eicosanol.

Reference	MH+	z	Peptide
PRQ25_0819 ORF_00043_00123 [73443 - 74063] GTP cyclohydrolase I	1287,68042	3	K.TREEFLSHLR.D

• marca el sitio de corte con tripsina

Se realizaron pruebas de actividad en el gel nativos in situ incubando en 0,2 mM docosanol, 100 mM NAD<sup>+</sup> en 2 mM etilendiamina tetra acético / 50 mM Tris HCl pH 8,0; 15 mg nitroblue tetrazolium, 1 mg phenazine methisulfate y finalmente 2 mM FeSO<sub>4</sub>. Para luego revelar con una mezcla etanol/acido acético/glicerol/agua razón (5.2:1:4), sin embargo el FeSO<sub>4</sub> precipitó en estas condiciones impidiendo observar la presencia de actividad en los

geles y como se verá en la siguiente sección la alcohol deshidrogenasa requiere de este ión bivalente para la catálisis.

### **4.3 Inmovilización y caracterización de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes superiores**

Con la finalidad de obtener un biocatalizador que nos permita realizar la síntesis de los ácidos grasos de 22 y 24 átomos de carbono, se procedió a inmovilizar y caracterizar las enzimas producidas de tal forma de estudiar las condiciones más apropiadas de pH, temperatura y estabilidad térmica.

#### **4.3.1. Inmovilización en glioxil agarosa 4 BCL y bromocianógeno**

Estudios preliminares de inmovilización de alcohol deshidrogenasa provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 en glioxil agarosa 4 BCL (Glx) y bromuro de cianógeno (BrCN) indicaron que la enzima inmovilizada requería de la presencia de algún catión bivalente para oxidar los alcoholes, ya que si bien se observa actividad al medir la suspensión (extracto crudo más soporte), también se observa pérdida total de la actividad al medir en el inmovilizado (soporte). Por lo tanto el siguiente paso fue medir la actividad sobre tetracosanol de los biocatalizadores inmovilizados (glioxil agarosa 4BCL) en presencia de diferentes cationes bivalente, ya que se ha visto en bibliografía que gran cantidad de alcohol deshidrogenasas requieren de iones bivalentes para la catálisis, ya sea formando parte de la función estructural o catalítica de la enzima. Los iones utilizados para este estudio fueron  $ZnCl_2$ ,  $FeSO_4$  y  $MgSO_4$  a concentraciones en el medio de reacción entre 0,1 y 2,5 mM.

En la Tabla 4.13 se muestran los resultados del efecto de adición de iones divalentes sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa provenientes de *Thermus* AB1 inmovilizada en glioxil agarosa 4 BCL, similares resultados se obtienen para la enzima proveniente en *Candida tropicalis* ATCC 20336 y *Thermus thermophilus* PRQ 25. En todos los casos la máxima actividad se logra al adicionar al medio de reacción 2 mM  $FeSO_4$ . A concentraciones sobre 2 mM se observa precipitación de las sales en el medio de reacción. Si bien con  $ZnCl_2$  también existe un efecto de aumento de la actividad, al realizar

mediciones de actividad utilizando una mezcla de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnCl}_2$  se obtienen valores similares a los obtenidos con sólo la adición de  $\text{FeSO}_4$ .

Es importante mencionar que a partir de este estudio todas las siguientes mediciones de velocidad de oxidación utilizando la enzima inmovilizada fueron realizadas adicionando  $\text{FeSO}_4$ . Aunque no se mencionó en la sección anterior (sección 4.2), la medición de actividad durante la purificación también fue realizada en presencia de 2 mM  $\text{FeSO}_4$ .

**Tabla 4.13** Efecto de la adición iones bivalentes sobre la velocidad de oxidación de alcohol deshidrogenasa de *Thermus* AB1 inmovilizada en glioxil agarosa 4 BCL (Glx). La velocidad de oxidación fue determinada utilizando tetracosanol como sustrato a 30°C.

Concentración mM	ZnCl <sub>2</sub>	FeSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>
	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biocatalizador)	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biocatalizador)	Actividad específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biocatalizador)
0,1	0	0	0
0,25	0	0	0
0,5	0,15	0,30	0
1,0	0,24	0,48	0,11
1,5	0,38	0,93	0,15
2,0	0,54	1,63	0,22
2,5	0,55	1,39	0,20

Los resultados de inmovilización de alcohol deshidrogenasa provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 sobre glioxil agarosa 4 BCL (Glx) y bromuro de cianógeno (BrCN) se presentan en la Tabla 4.14. Todos los resultados fueron realizados por duplicado y los resultados están dados en promedio con un error no superior al 5%.

Se definió el rendimiento de inmovilización como:

$$\text{Rendimiento de inmovilización} = \frac{\text{Actividad específica inmovilizada}}{\text{Actividad específica contactada}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

**Tabla 4.14** Inmovilización de alcohol deshidrogenasa provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 en glioxil agarosa 4 BCL (Glx) y bromuro de cianógeno (BrCN). El rendimiento de inmovilización es determinado en base a la actividad sobre tetracosanol.

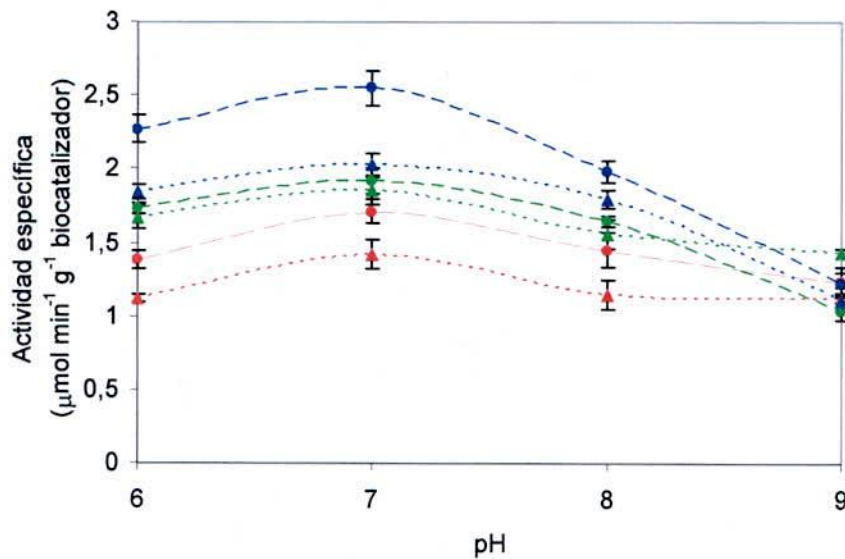
<b>Biocatalizador</b>	<b>Actividad específica Contactada</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ soporte	<b>Actividad específica Inmovilizada</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ soporte	<b>Rendimiento de inmovilización</b> %
C. tropicalis – BrCN	2,6	1,87	72
C. tropicalis – Glx	2,6	1,84	71
AB1- BrCN	2,05	1,97	96
AB1 – Glx	2,05	1,82	89
PRQ 25 – BrCN	2,2	2,17	99
PRQ 25 – Glx	2,2	2,09	95

#### 4.3.2 Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados

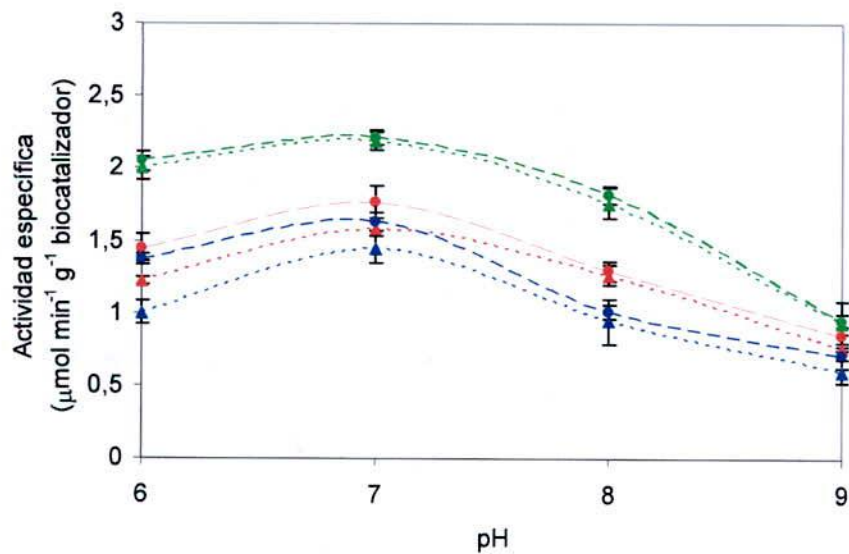
Para determinar las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos se estudio el efecto de pH y temperatura de los biocatalizadores inmovilizados. Denominando C. tropicalis-BrCN y C. tropicalis-Glx a los biocatalizadores provenientes de *Candida tropicalis* inmovilizados en bromocianógeno y glioxil agarosa respectivamente, del mismo modo se denominaron AB1-BrCN, AB1-Glx, PRQ 25-BrCN y PRQ 25-Glx a los biocatalizadores inmovilizados provenientes de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25. Es importante mencionar que el tipo de interacción de las enzimas unida a bromocianógeno le da una mayor flexibilidad a la enzima permitiendo simular el comportamiento que presenta en forma soluble.

Se determinó el efecto de pH analizando la actividad sobre los sustratos tetradecanol, docosanol y tetracosanol. Las mediciones fueron realizadas con 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de biocatalizador 0,1 g/ml a 30°C, 50°C y 70°C para las enzimas inmovilizadas provenientes de *Candida tropicalis*, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.15, 4.16 y 4.17.

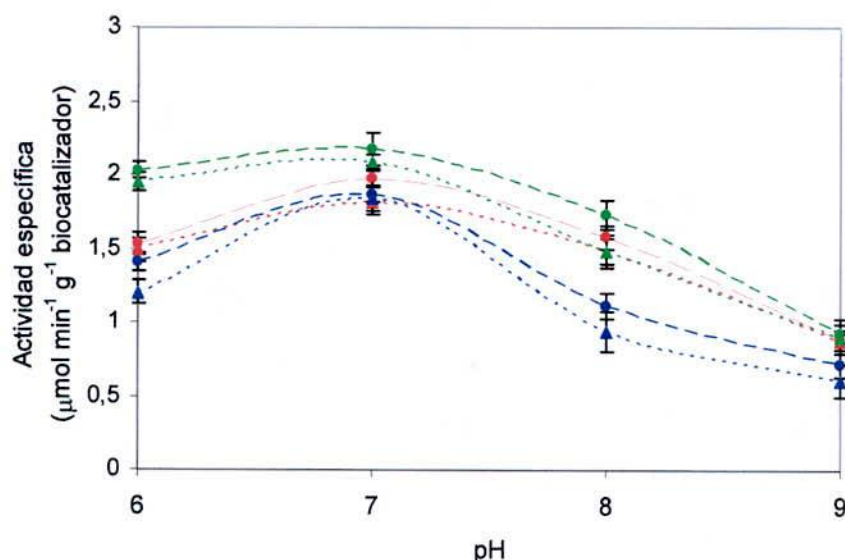
En todos los casos se aprecia que a pH 7,0 se logra la máxima velocidad de oxidación de los tres alcoholes alifáticos utilizando los diferentes preparados enzimáticos.



**Figura 4.15** Efecto de pH en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre tetradecanol. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) C. tropicalis-Glx, (●) C. tropicalis-BrCN, (I) desviación estándar.



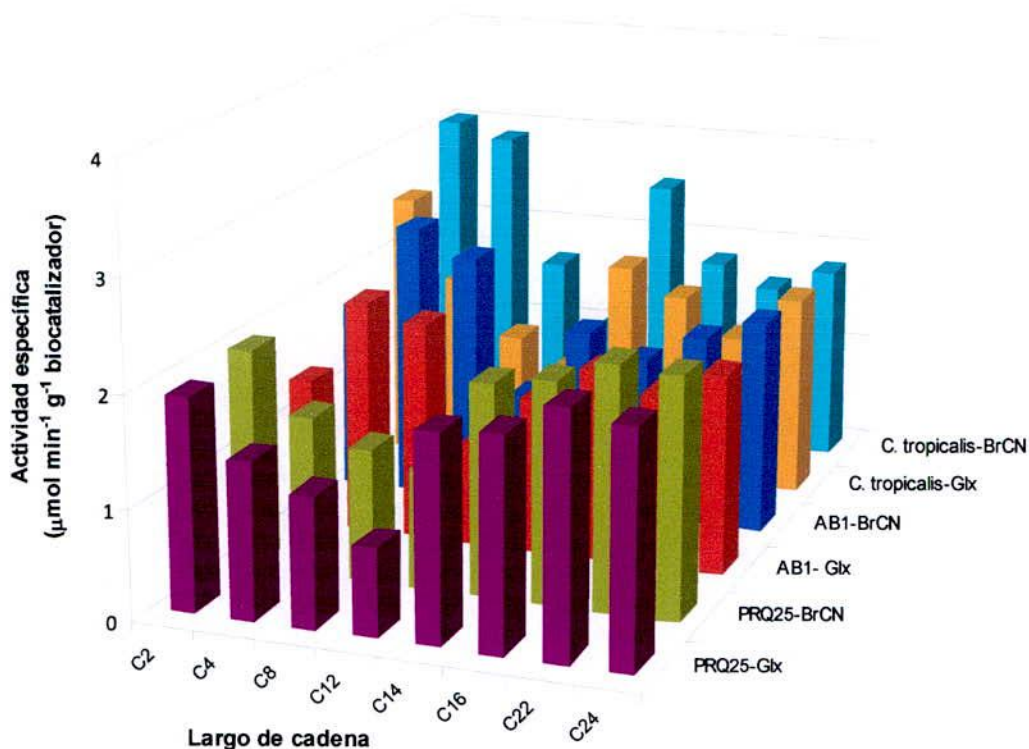
**Figura 4.16** Efecto de pH en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre docosanol. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) C. tropicalis-Glx, (●) C. tropicalis-BrCN, (I) desviación estándar.



**Figura 4.17** Efecto de pH en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre tetracosanol. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) *C. tropicalis*-Glx, (●) *C. tropicalis*-BrCN, (I) desviación estándar.

Como se puede apreciar el pH óptimo para cada biocatalizador inmovilizado tiene una pequeña diferencia al pH óptimo de cultivo de los microorganismos, para el caso de *Candida tropicalis* su pH óptimo de cultivo es 6,0 y para los microorganismos *Thermus AB1* y *Thermus thermophilus* PRQ 25 es de 7,5.

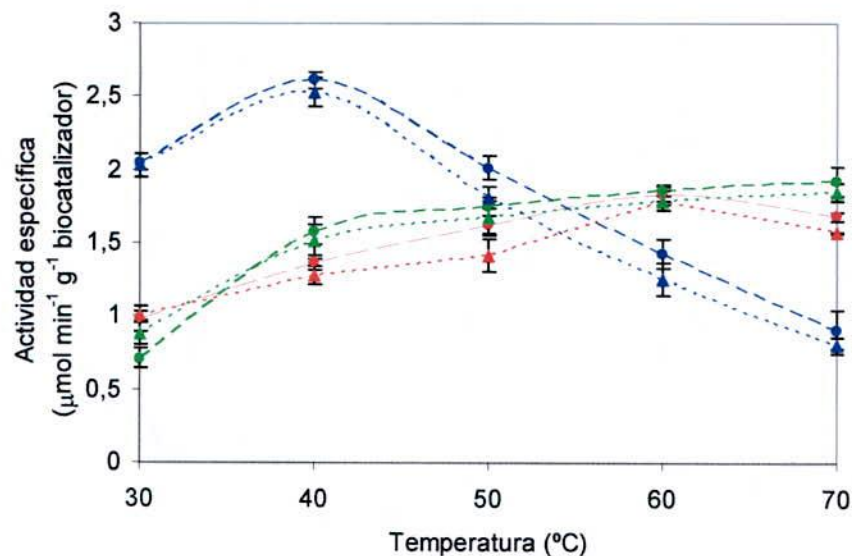
Un análisis de efecto del largo de cadena nos muestra en la Figura 4.18 que a pH 7,0 a medida que aumenta el tamaño del sustrato enzimático de etanol a dodecanol la velocidad de oxidación se ve disminuida y a partir de dodecanol hacia alcoholes alifáticos superiores de 22 a 24 carbonos nuevamente se observa un aumento en la velocidad de oxidación. Este fenómeno se observa utilizando en prácticamente todos los preparados enzimáticos.



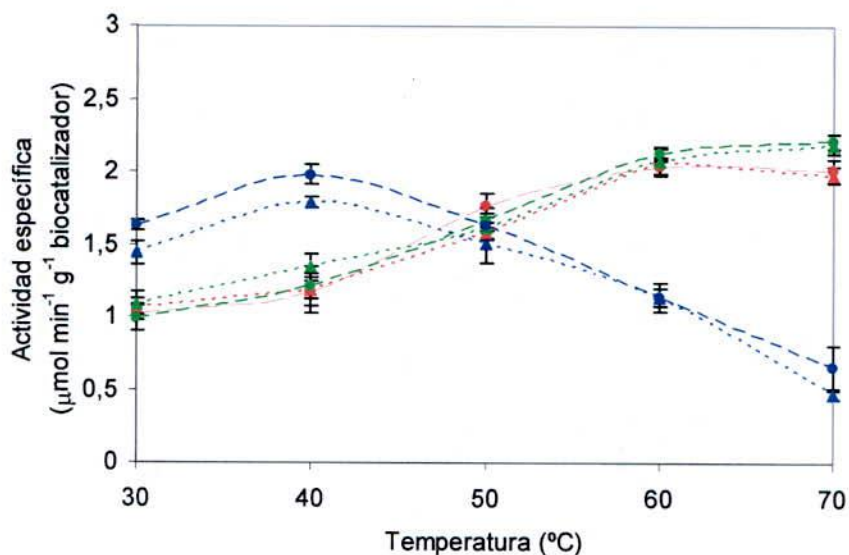
**Figura 4.18** Efecto del largo de cadena en la actividad a pH 7,0. (■) AB1-Glx, (■) AB1-BrCN, (■) PRQ 25-Glx, (■) PRQ 25-BrCN, (■) C. tropicalis-Glx, (■) C. tropicalis-BrCN.

Una vez determinado que el pH óptimo para cada biocatalizador se analizó el efecto de la temperatura cuantificando la actividad sobre los alcoholes tetradecanol, docosanol y tetracosanol a 30 °C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C a pH 7,0. Nuevamente las mediciones fueron realizadas con 50 µl de una suspensión de biocatalizador 0,1 g/ml. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 4.19, 4.20 y 4.21 utilizando los biocatalizadores provenientes de *Candida tropicalis*, *Thermus AB1* y *Thermus thermophilus* PRQ 25.

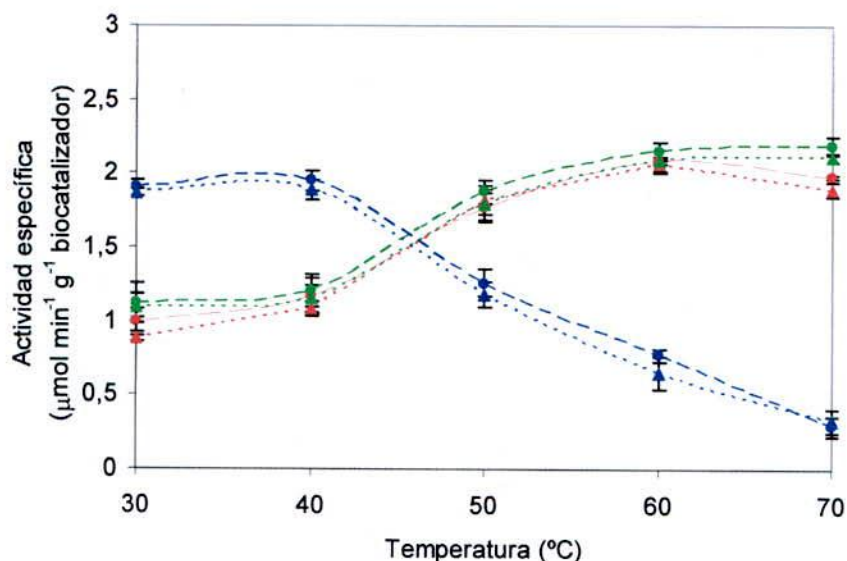
Como se puede apreciar las temperaturas óptimas para cada biocatalizador inmovilizado son muy similares a las temperaturas óptimas de cultivo de los microorganismos de los cuales provienen. *C. tropicalis*-Glx y *C. tropicalis*-BrCN presentan su máxima actividad sobre los tres sustratos enzimáticos a 40°C, AB1-Glx y AB1-BrCN a los 60°C y finalmente PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN a 70°C (Ver Figura 4.19, 4,20 y 4.21).



**Figura 4.19** Efecto de la temperatura en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre tetradecanol a pH 7,0. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) C. tropicalis-Glx, (●) C. tropicalis-BrCN, (I) desviación estándar.



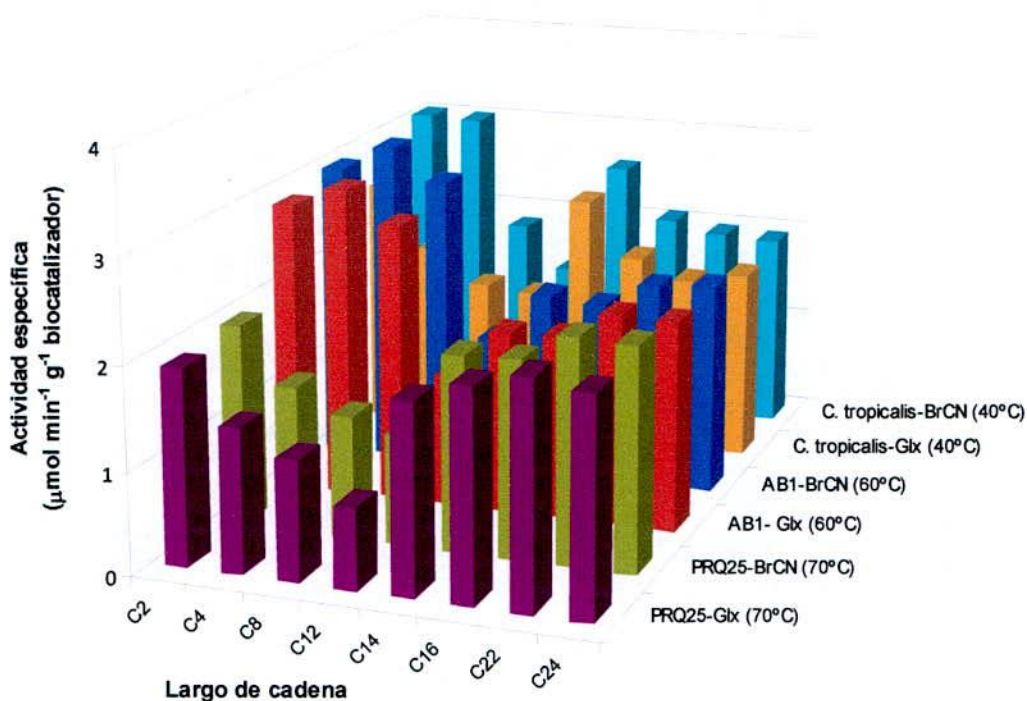
**Figura 4.20** Efecto de la temperatura en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre docosanol a pH 7,0. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) C. tropicalis-Glx, (●) C. tropicalis-BrCN, (I) desviación estándar.



**Figura 4.21** Efecto de la temperatura en la actividad de las alcohol deshidrogenasas sobre tetracosanol a pH 7,0. (▲) AB1-Glx, (●) AB1-BrCN, (▲) PRQ 25-Glx, (●) PRQ 25-BrCN, (▲) C. tropicalis-Glx, (●) C. tropicalis-BrCN, (I) desviación estándar.

Un análisis de efecto del largo de cadena se muestra en la Figura 4.22 a pH 7,0 y a las respectivas temperaturas óptimas. Nuevamente se observa que a medida que aumenta el tamaño del sustrato enzimático de etanol a dodecanol la velocidad de oxidación se ve disminuida y a partir de dodecanol hacia alcoholes alifáticos superiores de 22 a 24 carbonos nuevamente se observa un aumento en la velocidad de oxidación.

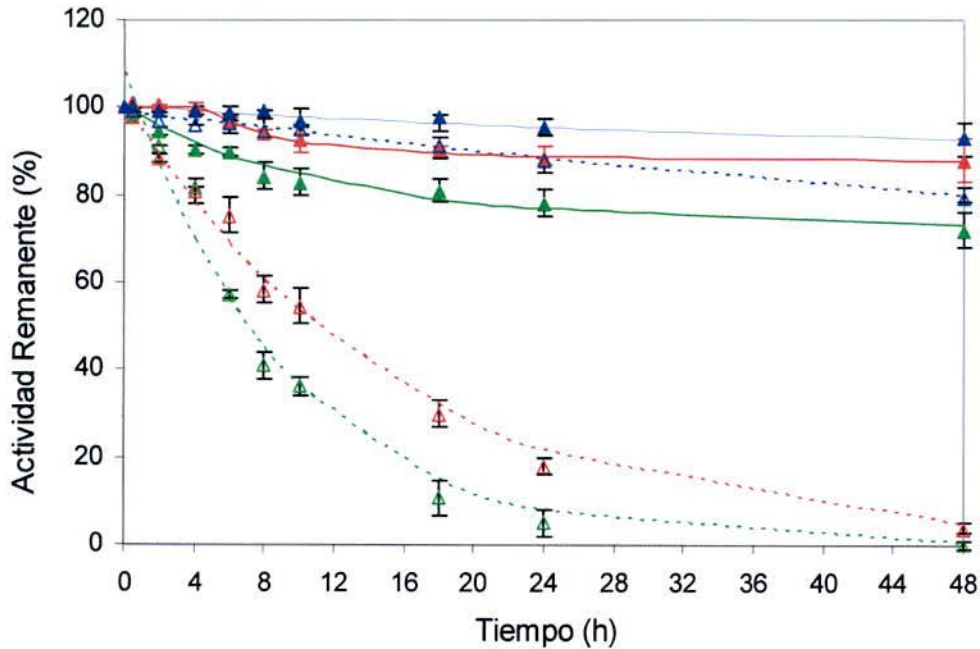
Es interesante destacar que se obtiene la mayor actividad sobre tetradecanol utilizando las enzimas C. tropicalis-Glx y C. tropicalis-BrCN, en cambio la máxima actividad sobre docosanol y tetracosanol se logra con PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN.



**Figura 4.22** Efecto del largo de cadena en la actividad a pH 7,0 y las temperaturas óptimas de cada biocatalizador. (■) AB1-Glx, (■) AB1-BrCN, (■) PRQ 25-Glx, (■) PRQ 25-BrCN, (■) C. tropicalis-Glx, (■) C. tropicalis-BrCN.

#### 4.3.3 Estudio de la estabilidad térmica de los biocatalizadores en medio acuoso

Se estudio la estabilidad térmica en medio acuoso de cada biocatalizador a la temperatura considerada como óptima para cada enzima. Se prepararon suspensiones de 0,5 g de biocatalizador en 2,5 ml de tampón fosfato 25 mM pH 7,0. Los biocatalizadores C. tropicalis-Glx y C. tropicalis-BrCN fueron incubados a 40°C, AB1-Glx y AB1-BrCN a 60°C, PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN a 70 °C, por un periodo de 48 horas monitoreando la actividad sobre tetracosanol. Los resultados se muestran en la Figura 4.23.



**Figura 4.23** Estabilidad térmica en medio acuoso de los biocatalizadores utilizando tetracosanol como sustrato enzimático. (▲) *C. tropicalis*-Glx a 40°C, (△) *C. tropicalis*-BrCN a 40°C, (▲) AB1-Glx a 60°C, (△) AB1-BrCN a 60°C, (▲) PRQ 25-Glx a 70°C, (△) PRQ 25-BrCN a 70°C, (I) desviación estándar, las líneas corresponden a la estimación de los modelos.

Estos resultados de estabilidad fueron analizados estadísticamente y modelados determinando que el modelo de inactivación que mejor se ajusta a los datos experimentales es un modelo de inactivación térmica de primer orden, que para el caso de los biocatalizadores inmovilizados en glioxil agarosa el modelo es de inactivación térmica con actividad residual distinta de cero, en cambio los inmovilizados en bromuro de cianógenos la actividad residual es igual a cero.

En la figura 4.23 las líneas representan el modelo que mejor ajusta los datos obtenidos según los resultados presentados en las tablas 4.15 y 4.16. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos por regresión no lineal de los datos de actividad versus tiempo utilizando las ecuaciones M1 y M2 (ver apéndice M) para los mecanismos con actividad residual igual a cero y distinta de cero respectivamente.

**Tabla 4.15** Valores de constantes de inactivación térmica de primer orden con actividad residual igual a cero de los biocatalizadores C. tropicalis-BrCN, AB1-BrCN y PRQ25-BrCN.

Parámetros	C. tropicalis-BrCN	AB1-BrCN	PRQ 25-BrCN
$k_D$ ( $h^{-1}$ )	0,0051	0,064	0,109
$t_{1/2}$ (h)	136	10,7	6,4
r	0,991	0,995	0,993

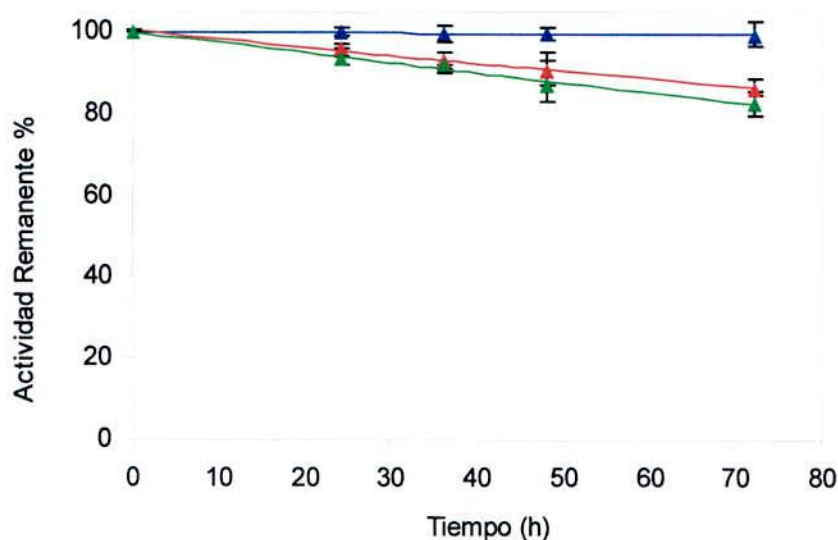
**Tabla 4.16** Valores de las constantes de inactivación térmica de primer orden con actividad residual distinta a cero de los biocatalizadores C. tropicalis-Glx, AB1-Glx y PRQ 25-Glx.

Parámetros	C. tropicalis-Glx	AB1-Glx	PRQ 25- Glx
$k_D$ ( $h^{-1}$ )	0,02	0,079	0,084
$\beta$	0,88	0,087	0,073
r	0,997	0,994	0,995

Como se observa en las tablas 4.15 y 4.16 los biocatalizadores inmovilizados en glioxil agarosa son mucho más estables que los inmovilizados en bromuro de cianógeno. Al analizar la estabilidad de AB1-BrCN y PRQ25-BrCN a 60 y 70°C respectivamente se obtiene que en ambos casos hay pérdida del 100% de la actividad, en cambio la actividad remanente de AB1-Glx y PRQ25-Glx a las 48 horas de incubación es de 87% y 73% respectivamente. A su vez la actividad remanente de C. tropicalis- Glx y C. tropicalis- BrCN luego de 48 horas de incubación a 40°C son de 88% y 80% respectivamente. Estos resultados comprueban el hecho de que los biocatalizadores fabricados en glioxil agarosa por medio de interacción multipuntual son mucho más estables que aquellos fabricados en bromuro de cianógeno por interacción unipuntual.

#### 4.3.4 Estabilidad térmica del cofactor

Finalmente se estudio la estabilidad del cofactor  $\text{NAD}^+$  a condiciones extremas de temperatura. Para tal efecto se determinó la estabilidad térmica del cofactor  $\text{NAD}^+$  en medio acuoso incubando a  $40^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$   $100\text{mM}$  de  $\text{NAD}^+$  preparado en tampón fosfato  $100\text{ mM}$   $\text{pH}$   $7,0$  por un período de 72 horas. En forma periódica se tomaron muestras de cofactor para la posterior determinación de actividad sobre butanol utilizando PRQ 25-Glx como biocatalizador. Los resultados se muestran en la Figura 4.24.



**Figura 4.24** Estabilidad térmica en medio acuoso del cofactor  $\text{NAD}^+$ . ( $\blacktriangle$ )  $40^\circ\text{C}$ , ( $\blacktriangle$ )  $60^\circ\text{C}$ , ( $\blacktriangle$ )  $70^\circ\text{C}$ , (—) estimación modelo de primer orden a  $40^\circ\text{C}$ , (—) estimación modelo de primer orden a  $60^\circ\text{C}$ , (—) estimación modelo de primer orden a  $70^\circ\text{C}$ , (I) desviación estándar.

Estos resultados de estabilidad fueron analizados estadísticamente determinando que los datos obtenidos se ajustan al mecanismo de inactivación térmica de primer orden sin actividad residual. Los parámetros cinéticos determinados se presentan en la Tabla 4.17. El valor del coeficiente de determinación que se presenta en la misma tabla y se puede observar que existe un buen ajuste del modelo a los datos experimentales para los tres casos.

**Tabla 4.17** Valores de las constantes de inactivación térmica del cofactor NAD<sup>+</sup>.

Parámetros	40°C	60°C	70°C
$k_D$ (h <sup>-1</sup> )	0,0001	0,002	0,003
$t_{1/2}$ (h)	6931	330	257
r	0,990	0,998	0,993

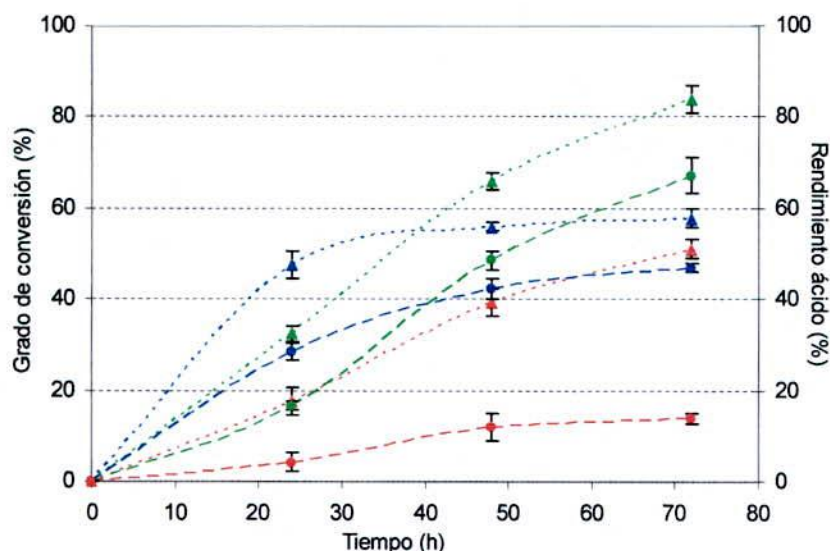
El tiempo de vida media de NAD<sup>+</sup> a 40°C es significativamente mayor que los obtenidos a 50°C y 60 °C, sin embargo los valores obtenidos a las tres temperaturas son satisfactorios para llevar a cabo la reacción de oxidación por un largo período de tiempo sin que se vea afectada la estabilidad del cofactor.

#### 4.4 Reacción de síntesis de los ácidos tetradecanoico, docosanoico y tetracosanoico

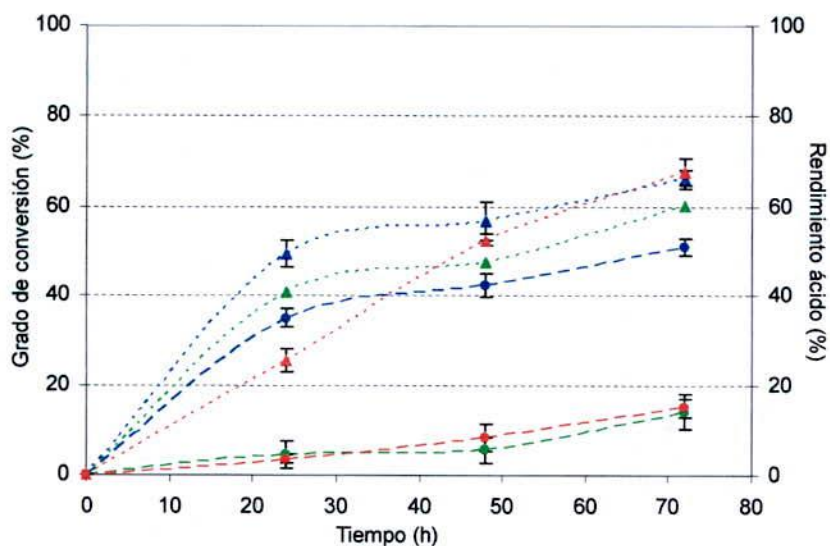
Para el estudio de la síntesis de los ácidos de cadena larga fueron seleccionados aquellos biocatalizadores inmovilizados en glioxil agarosa 4BCL que presentaron mayor estabilidad térmica.

##### 4.4.1 Estudio de la síntesis de los ácidos tetradecanoico, docosanoico y tetracosanoico

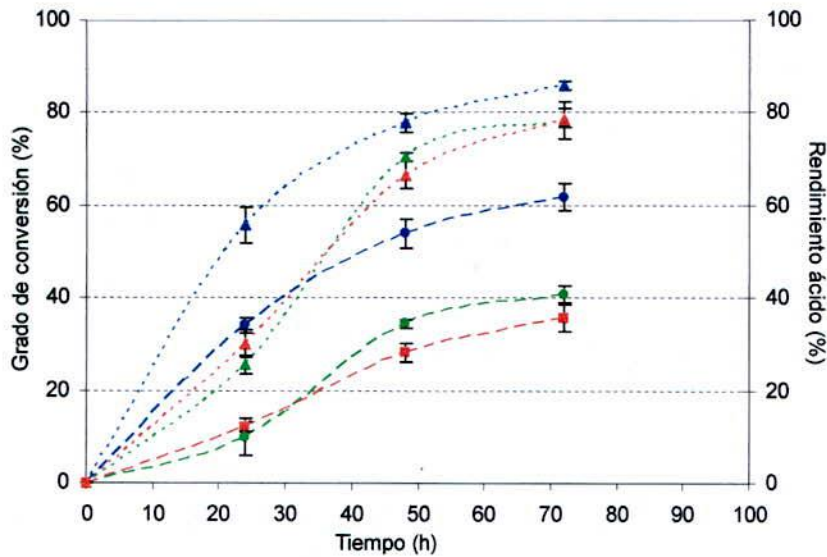
Se realizó la reacción de oxidación de tetradecanol, docosanol y tetracosanol, utilizando las enzimas producidas por *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25. Las reacciones se llevaron a cabo como está descrito en la sección 3.4.7, por un periodo total de 72 horas a 40°C para la enzima C. tropicalis-Glx, 60 °C para AB1-Glx y 70°C para PRQ 25-Glx. Las cinéticas de oxidación de los alcoholes alifáticos se presentan en las Figuras 4.25, 4.26 y 4.27. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados están dados en promedio con un error no superior al 5%.



**Figura 4.25** Cinética de reacción de alcoholes alifáticos utilizando *C. tropicalis*-Glx como biocatalizador. Grado de conversión de tetradecanol (▲), docosanol (▲), tetradecanol (▲) y rendimiento en ácido tetradecanoico (●), docosanoico (●) y tetracosanoico (●), (I) desviación estándar.



**Figura 4.26** Cinética de reacción de alcoholes alifáticos utilizando AB1-Glx como biocatalizador. Grado de conversión de tetradecanol (▲), docosanol (▲), tetradecanol (▲) y rendimiento en ácido tetradecanoico (●), docosanoico (●) y tetracosanoico (●), (I) desviación estándar.



**Figura 4.27** Cinética de reacción de alcoholes alifáticos utilizando PRQ 25-Glx como biocatalizador. Grado de conversión de tetradecanol (▲), docosanol (▲), tetradecanol (▲) y rendimiento en ácido tetradecanoico (●), docosanoico (●) y tetracosanoico (●), (I) desviación estándar.

Los resultados del porcentaje de conversión de los alcoholes, rendimiento de los ácidos y aldehídos a las 72 horas de reacción (Ver apéndice E) se muestran en las Tabla 4.18 a la 4.20.

**Tabla 4.18** Porcentaje de conversión de tetradecanol, rendimiento de ácido tetradecanoico (ácido mirístico) y aldehído mirístico luego de 72 horas de reacción.

Biocatalizador	Conversión Alcohol (%)	Rendimiento Ácido (%)	Rendimiento Aldehído (%)
C. tropicalis-Glx	84,1	67,0	17,1
AB1-Glx	60,3	14,0	46,3
PRQ 25-Glx	78,3	40,7	37,6

**Tabla 4.19** Porcentaje de conversión docosanol, rendimiento de ácido docosanoico (ácido behénico) y aldehído behénico luego de 72 horas de reacción (Ver apéndice E).

<b>Biocatalizador</b>	<b>Conversión Alcohol (%)</b>	<b>Rendimiento Ácido (%)</b>	<b>Rendimiento Aldehído (%)</b>
C. tropicalis-Glx	57,8	47,0	10,8
AB1-Glx	66,2	50,9	15,3
PRQ 25-Glx	85,9	61,7	24,2

**Tabla 4.20** Porcentaje de conversión tetracosanol, rendimiento de ácido tetracosanoico (ácido lignocérico) y aldehído lignocérico luego de 72 horas de reacción.

<b>Biocatalizador</b>	<b>Conversión Alcohol (%)</b>	<b>Rendimiento Ácido (%)</b>	<b>Rendimiento Aldehído (%)</b>
C. tropicalis-Glx	51,1	13,8	37,3
AB1-Glx	67,9	14,8	53,1
PRQ 25-Glx	78,7	35,8	42,9

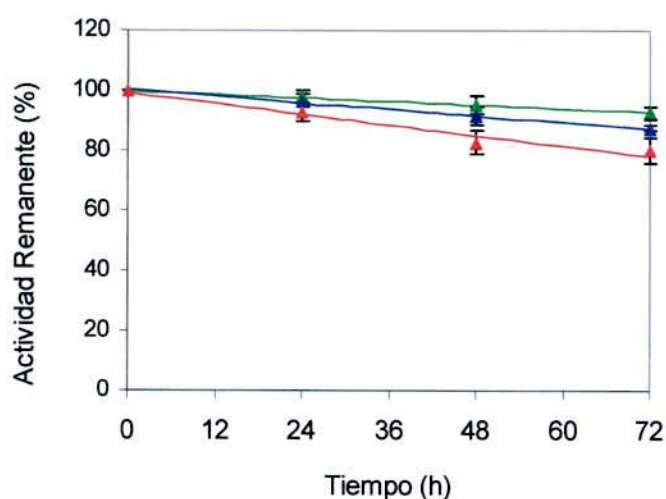
Como es posible observar, la máxima conversión de tetradecanol se logra utilizando el biocatalizador C. tropicalis-Glx, en cambio para docosanol y tetracosanol se obtiene con PRQ25-Glx, sin embargo, se aprecia que a las 72 horas en la mayoría de las reacciones aún no se llega al máximo de conversión de los alcoholes, salvo en la oxidación de tetradecanol con PRQ25-Glx y la oxidación de docosanol con AB1-Glx y C. tropicalis-Glx, debiéndose aumentar el tiempo de reacción para lograr obtener conversiones cercanas al 100%.

En cuanto al rendimiento, los alcoholes de 14 y 22 carbonos son oxidados principalmente a ácido, sin embargo cuando se trata de un alcohol de 24 carbonos hay una mayor

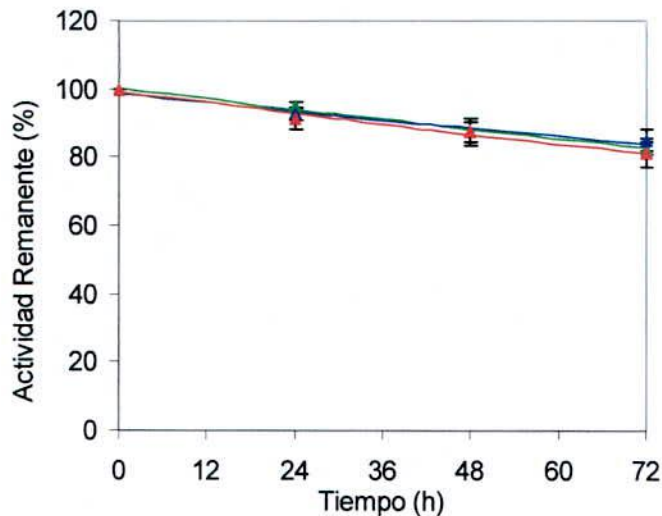
producción de aldehído que ácido, lo que nos podría indicar que a medida que aumenta el largo de cadena la reacción se hace más lenta.

#### 4.4.2 Estabilidad de los biocatalizadores en el medio de reacción

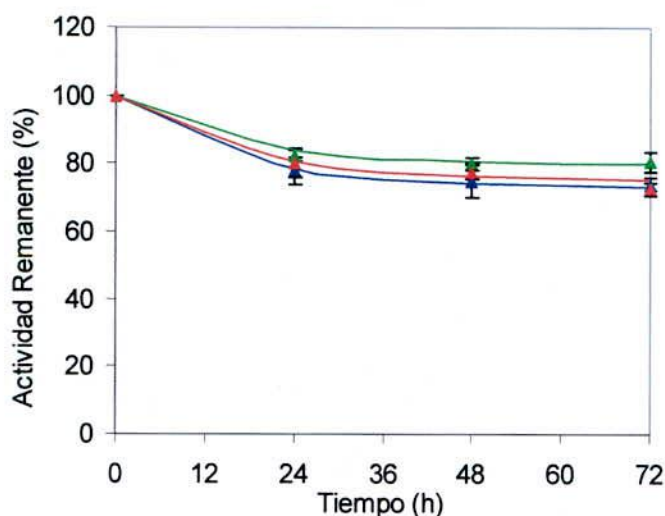
En el transcurso de la reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos junto a la toma de muestra para el análisis de la conversión de los alcoholes, se tomaron muestras de los diferentes biocatalizadores inmovilizados para la determinación de su actividad remanente a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas. La actividad remanente fue determinada utilizando tetradecanol, docosanol ó tetracosanol como sustrato. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.28 a 4.30.



**Figura 4.28** Estabilidad en el medio de reacción de *C. tropicalis*-Glx a 40°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/mL en tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de  $\text{NAD}^+$ , 2mM  $\text{FeSO}_4$ . Actividad inicial 4 UI totales. (▲) tetradecanol, (▲) docosanol, (▲) tetracosanol, (I) desviación estándar, las líneas representan la estimación del modelo de inactivación térmica de primer orden con actividad residual igual a cero.



**Figura 4.29** Estabilidad en el medio de reacción de AB1-Glx a 60°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/ml / tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de NAD<sup>+</sup>, 2mM FeSO<sub>4</sub>. Actividad inicial 4 UI totales. (▲) tetradecanol, (▲) docosanol, (▲) tetracosanol, (I) desviación estándar, las líneas representan la estimación del modelo de inactivación térmica de primer orden con actividad residual igual a cero.



**Figura 4.30** Estabilidad en el medio de reacción de PRQ25-Glx a 70°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/ml / tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de NAD<sup>+</sup>, 2mM FeSO<sub>4</sub>. Actividad inicial 4 UI totales. (▲) tetradecanol, (▲) docosanol, (▲) tetracosanol, (I) desviación estándar, las líneas representan la estimación del modelo de inactivación térmica de primer orden con actividad residual distinta a cero.

Los resultados fueron analizados estadísticamente para determinar el mecanismo de inactivación que mejor representa las cinéticas obtenidas. Los biocatalizadores *C. tropicalis*-Glx y AB1-Glx presentaron un comportamiento de inactivación térmica de primer orden con actividad residual igual a cero frente a los tres sustratos enzimáticos, en cambio los resultados la enzima PRQ 25-Glx se ajustan al mecanismo de inactivación térmica de primer orden con actividad residual distinta de cero. Los parámetros cinéticos determinados se presentan en las Tablas 4.21 a 4.23.

**Tabla 4.21** Valores de las constantes de inactivación en el medio de reacción de *C. tropicalis*-Glx a 40°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/ml / tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de NAD<sup>+</sup>, 2mM FeSO<sub>4</sub>.

Parámetros	tetradecanol	docosanol	Tetracosanol
$k_D$ (h <sup>-1</sup> )	0,0011	0,0019	0,0033
$t_{1/2}$ (h)	630	365	210
r	0,997	0,997	0,990

Como se observa en la Figura 4.28 luego de 72 horas de reacción sólo se aprecia alrededor de un 20% de pérdida de la actividad inicial para la enzima *C. tropicalis*-Glx. El mayor tiempo de vida media (Ver Tabla 4.21) se obtiene al utilizar tetradecanol como sustrato, y a su vez presenta mayor selectividad por tetradecanol ya que se obtienen conversiones del 84% con rendimientos en ácido tetradecanoico del 67% (Ver Tabla 4.18).

**Tabla 4.22** Valores de las constantes de inactivación en el medio de reacción de AB1-Glx a 60°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/ml / tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de NAD<sup>+</sup>, 2mM FeSO<sub>4</sub>.

Parámetros	tetradecanol	docosanol	tetracosanol
$k_D$ (h <sup>-1</sup> )	0,0027	0,0023	0,0028
$t_{1/2}$ (h)	257	301	248
r	0,996	0,982	0,991

En relación a AB1-Glx se observa en la Tabla 4.22, que el mayor tiempo de vida media se obtiene al utilizar docosanol como sustrato, sin embargo no hay gran diferencia en relación al tiempo de vida media obtenido con tetradecanol y tetracosanol como sustratos enzimáticos.

**Tabla 4.23** Valores de las constantes de inactivación en el medio de reacción de PRQ 25-Glx a 60°C, 100 mM de sustrato (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) en lutrol F-68 20 mg/ml / tampón fosfato 25 mM pH 7,0; 500 mM de NAD<sup>+</sup>, 2mM FeSO<sub>4</sub>.

Parámetros	tetradecanol	docosanol	tetracosanol
$k_D$ (h <sup>-1</sup> )	0,07	0,066	0,061
$\beta$	0,80	0,73	0,75
r	0,992	0,995	0,991

En cuanto a los resultados obtenidos con PRQ 25-Glx, luego de 72 horas de reacción en condiciones extremas de temperatura el biocatalizador pierde el 27% de su actividad original permitiendo realizar conversiones máximas de docosanol del 86% y rendimientos en ácido docosanoico de 62% (Ver tabla 4.20).

Por otro lado, al comparar la estabilidad de los biocatalizadores en medio acuoso y en medio de reacción a las 48 horas y midiendo la actividad residual en tetracosanol se observa que las diferencias son muy pequeñas y pueden estar dentro del margen de error. En el medio de reacción *C. tropicalis*-Glx, AB1-Glx y PRQ 25 presentan actividades residuales de 90%, 91% y 78% respecto a la inicial respectivamente (Ver Figuras 4.28, 4.29 y 4.39). En cambio en medio acuoso las actividades residuales son de 88% para *C. tropicalis*-Glx, 87% para AB1-Glx y 73% para PRQ 25 luego de 48 horas de incubación a 40°C, 60°C y 70°C respectivamente (Ver Figura 4.23).



*Discusión*

---

## 5 DISCUSION

### 5.1 Estudio de las condiciones de crecimiento e inducción de los microorganismos para la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa de alcoholes superiores

#### 5.1.1 Cinética de crecimiento celular de cada microorganismo

Los resultados del estudio de las cinéticas de crecimiento celular de los microorganismos *Thermus thermophilus* HB 27, HNI 11, NR 17, PRQ 16 y PRQ 25 (Ver Sección 4.1.1) en medio Thermus y Thermus modificado revelan un crecimiento en dos fases o comportamiento bifásico de multiplicación celular que posiblemente se trataría de un crecimiento diaúxico debido a la utilización secuencial de distintas fuentes de carbono presentes en este medio complejo. Otra explicación pudiera ser que debido a la elevada velocidad específica de crecimiento obtenidas con  $\mu_1$  de alrededor de  $0,20 \text{ h}^{-1}$  (Ver Tabla 4.1 y 4.2) se produzca una temprana muerte celular con la subsiguiente lisis y la posibilidad de que nuevas células se multipliquen a expensas de las que han muerto (Nápoles *et al.*, 2006). Este último fenómeno explicaría por qué en la cinética de crecimiento de *Thermus* AB1 no se aprecia un comportamiento bifásico pese a que se utilizó el mismo medio de cultivo que los microorganismos *Thermus thermophilus*, ya que el crecimiento de *Thermus* AB1 es mucho más lento con una velocidad específica de crecimiento de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  en comparación a los *Thermus thermophilus*.

No se aprecian diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento ni en el crecimiento celular máximo en los medios de cultivos Thermus y Thermus modificado. De esta forma se pudo determinar los requerimientos en sales que necesitan las cepas *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* para su crecimiento ya que si bien hay información de los componentes principales del agua mineral Cachantún, en un estudio comparativo de las aguas minerales que se consumen en Chile realizado por Servicio Nacional del Consumidor (SERNAC, 2001), se desconocen las concentraciones de sales como cobre, zinc, cadmio, manganeso que son importantes para el crecimiento microbiano. El reemplazo del medio Thermus por Thermus modificado a nivel de laboratorio no es relevante, pero sí lo es a nivel industrial ya que el proceso tiene un costo menor al sustituir el agua mineral por sales.

La adición de tampón fosfato pH 7.5 al medio de cultivo *Thermus* modificado permitió descartar que el aumento del pH durante la fermentación (medio sin tampón) fuera uno de los causantes del bajo crecimiento celular pese a que el medio contiene concentraciones de triptona y extracto de levadura para un crecimiento máximo de 8 g/l. Este bajo crecimiento puede estar relacionado con el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato o bien ser una respuesta de la expresión génica de los microorganismos *Thermus* y *Thermus thermophilus* frente a los componentes del medio de cultivo.

En cuanto a *Candida tropicalis* ATCC 20336 los valores obtenidos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ) y crecimiento celular máximo ( $\Delta X = 2,96 \text{ g/l}$ ) fueron los esperados, ya que se utilizó un medio mínimo definido para un crecimiento celular de 3 g/l (a pH 6,0) utilizando glicerol como nutriente limitante y única fuente de carbono y energía. No hay información en bibliografía sobre la velocidad específica de crecimiento de *Candida tropicalis* a las condiciones de cultivo estudiadas.

### 5.1.2 Efecto de la adición de inductor al medio de cultivo sobre el crecimiento celular

Al estudiar la toxicidad de los agentes inductores adicionando al medio de cultivo 0,025; 0,05; 0,5; 1 y 2 % de alcoholes entre 2 y 24 átomos de carbono o alcanos entre 14 y 24 átomos de carbono (Ver Sección 4.1.2). La adición de alcohol como agente inductor provocó la inhibición del crecimiento celular en la gran mayoría de las cepas. En cambio la adición de alcanos como agente inductor principalmente a las cepas *Thermus thermophilus* HB27, HNI 11 y PRQ 25 mostró un aumento del crecimiento celular con respecto al control indicando que efectivamente los alcanos son utilizados por estos microorganismos como fuente de carbono. Similares resultados han sido reportados por Kato *et al.* (2009) al estudiar el efecto de suplementar el medio de cultivo con alcanos de diferente tamaño sobre el crecimiento celular de *Geobacillus thermoleovorans* B23, observando un aumento en el crecimiento celular y la producción de proteínas relacionadas con la  $\beta$  oxidación, cuyo efecto de la inducción se correlaciona con el largo de cadena del alcano.

En relación a la concentración del agente inductor, se determinó que 0,05% (w/v) fue más adecuada para estudiar la inducción de la enzima alcohol deshidrogenasa, debido a que a esa concentración la inhibición del crecimiento celular es mínima y no hay precipitación del agente inductor. En estudios reportados por Ueda y Tanaka (1990) se utilizó 0,7% de una

mezcla de alcanos entre 10 y 13 átomos de carbono; sin embargo, fue difícil solubilizar los nutrientes a 30°C aún adicionando Tween 80. En cambio Kato *et al.* (2009) suplementaron el medio de cultivo con 0,1% v/v de un alcano o una mezcla de alcanos entre 10 y 34 átomos de carbono en un medio a 70°C, cultivando a esas condiciones por un período de 10 días.

### 5.1.3 Efecto de la adición de inductor al medio de cultivo en la producción de alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes alifáticos

La capacidad de oxidación de diferentes alcoholes alifáticos de las enzimas obtenidas en los extractos crudos de los diferentes microorganismos utilizando 0,05% de agente inductor (alcohol o alcano) en el medio de cultivo fue determinada a 30°C, 50°C y 70°C para las enzimas producidas por *Candida tropicalis*, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* respectivamente.

Las más alta actividad sobre alcoholes de 14, 22 y 24 átomos de carbono se logró con las enzimas alcohol deshidrogenasas provenientes de *Candida tropicalis* ATCC20336 inducidas con hexadecanol (C<sub>16</sub>), de *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con eicosanol (C<sub>20</sub>) y de *Thermus* AB1 inducida con docosanol (C<sub>22</sub>) (Ver Tablas 4.3 y 4.4). Estos resultados demuestran que si bien los alcoholes producen un efecto de inhibición del crecimiento celular, son muy buenos inductores de la producción de alcohol deshidrogenasas con capacidad de oxidar alcoholes alifáticos de cadena larga.

La actividad sobre tetracosanol obtenida con la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inducida con hexadecanol (86,7  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína) fue superior al valor previamente reportado por Ueda y Tanaka en 1990 (70  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína), donde se utilizó una mezcla de alcanos de 10 a 13 átomos de carbono como única fuente de carbono y energía. Por otra parte, sin inducción de *Candida tropicalis* ATCC 20336 sólo se observa actividad sobre etanol; en cambio Kemt *et al.*, 1988 reportaron un aumento de la actividad alcohol oxidasa, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa de *Candida tropicalis* cultivada en un medio con glucosa, de 10 veces al adicionar una mezcla de alcanos como agente inductor.

Las enzimas provenientes de *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Thermus* AB1 inducidas con eicosanol y docosanol respectivamente produjeron elevada actividad sobre tetracosanol, con

valores de 36,4 y 42,9  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína respectivamente. Por otro lado sin inducción ambos microorganismos produjeron alcohol deshidrogenasa con actividad sobre etanol; sin embargo, *Thermus* AB1 además presentó actividad sobre octanol (Ver Tabla 4.3). No existen estudios publicados sobre la producción de alcohol deshidrogenas que oxiden alcoholes de cadena larga en estos microorganismos.

Es interesante destacar que existe cierta correlación entre el largo de cadena del inductor y el nivel de actividad expresado respecto del largo de cadena del sustrato de la reacción en varias cepas de *Thermus*. La excepción es *Candida tropicalis* que no siguió ese patrón. De igual manera Kato et al. (2009) reportan un aumento de la actividad acil-CoA oxidasa al inducir su producción en *Geobacillus thermoleovorans* B23 con alcanos entre 2 y 10 átomos de carbono.

Por otro lado, la magnitud del efecto de la inducción varía según el momento de adición del agente inductor durante la fermentación. Se observó que para *Thermus* AB1, *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Candida tropicalis* ATCC20336 la adición al inicio de la fermentación produce una alcohol deshidrogenasa con mayor actividad sobre docosanol y tetracosanol que al adicionar el inductor en la fase de crecimiento exponencial (12 horas de fermentación). Se obtuvo la máxima actividad al cosechar las células después de 120, 140 y 100 horas de fermentación de *Thermus* AB1, *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Candida tropicalis* ATCC20336 respectivamente (Ver Sección 4.1.5 y Figura 4.10). Bryant et al., (1988 y 1992) reportaron que el tiempo de cosecha de la células de *Thermoanaerobacter ethanolicus* ATCC 31550 es muy importante; ya que fue posible detectar dos diferentes alcohol deshidrogenasas, una con afinidad por los alcoholes primarios, como heptanol, producida después de la fase de crecimiento exponencial y la otra con mayor afinidad por alcoholes secundarios y alcoholes alifáticos de cadena larga que se produce durante la fase de crecimiento exponencial.

La adición del agente inductor al inicio del cultivo en *Thermus* AB1 produce un efecto de disminución de la velocidad de crecimiento del microorganismo con respecto a la adición en la mitad de la fase de crecimiento exponencial; sin embargo, provoca un mayor crecimiento celular. Esto nos estaría indicando que además de utilizar al alcohol como inductor de la producción de enzimas, también se estaría en parte utilizando como fuente de carbono y energía para la producción de biomasa (Ver Figura 4.10).

La caracterización electroforética en geles de poliacrilamida SDS al 12% de las proteínas obtenidas del extracto crudo proveniente de *Candida tropicalis*, *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Thermus* AB1 inducidas con alcoholes y alcanos como se muestra en las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9 respectivamente, permitió evidenciar que a mayor largo de cadena del agente inductor se observa un aumento en la intensidad de la banda principalmente entre las proteínas de bajo peso molecular; entre 20 y 60 kDa para *Candida tropicalis*, entre 50 y 66 kDa para *Thermus thermophilus* PRQ 25 y entre 58 a 60 kDa para *Thermus* AB1. Dentro de este rango de pesos moleculares se encuentran las principales enzimas relacionadas con la  $\omega$  y  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos como; alcohol deshidrogenasa de *Thermococcus* ES-1 que es un homotetrámero de 46 kDa cada subunidad (Ma *et al.*, 1995), alcohol oxidasa de *Candida tropicalis* formada por dos subunidades de 68 kDa (Dickinson y Wadforth en 1992), alcohol deshidrogenasa del termófilo *Bacillus acidocaldarius* compuesta por un tetrámero de subunidades idénticas de 38 KDa cada una (D' Auria *et al.*, 1996), acil-CoA oxidasa de *Geobacillus thermoleovorans* B23, Citocromo P 450 de *Bacillus subtilis* de 48 kDa (Lee *et al.*, 2003), entre otras.

Es importante mencionar que si bien toda la información bibliográfica apunta a que la adición de n-alcanos al medio de cultivo induce la producción de enzimas con capacidad oxidativa, ya sea alcohol deshidrogenasas u oxidasas, en este estudio se logró evidenciar que con la adición de alcohol al medio de cultivo también es posible inducir la inducción de estas enzimas.

### **5.2 Purificación de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes superiores**

El diseño de los protocolos de purificación de las alcohol deshidrogenasas provenientes de *Thermus* AB1, *Candida tropicalis* y *Thermus thermophilus* PRQ 25 se realizó basándose en los resultados obtenidos al analizar la adsorción de las enzimas en matrices cromatográficas de tipo iónico. El criterio utilizado fue contactar primero los extractos crudos con aquellas resinas que no adsorben la alcohol deshidrogenasa y que estarían adsorbiendo otro tipo de proteína presentes en el crudo, para luego contactar este crudo semi purificado con la resina que obtuvo mayor rendimiento de adsorción y finalmente eluir la alcohol deshidrogenasa para obtener la enzima en forma soluble.

Mediante el protocolo que se mostró en la Figura 3.5 se logró purificar la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC20336 con un factor de purificación de 39 veces en comparación con el extracto crudo, pero se perdió el 76% de la actividad. Esta pérdida de actividad se debe principalmente a la ineficiente desorción de la enzima desde DEAE-Sepharose con NaCl; tal vez esto se pueda solucionar realizando la desorción con una mayor concentración de NaCl o bien aumentando el tiempo de lavado a 2 o 3 horas (Ver Tabla 4.7). El perfil electroforético SDS PAGE de la purificación de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* muestra tres bandas muy tenues de 60, 47 y 36 kDa (Ver Figura 4.11), pudiendo corresponder una de estas bandas a la alcohol deshidrogenasa con actividad sobre alcoholes alifáticos de cadena larga o bien ser una subunidad de esta enzima, ya que se ha visto que las alcohol deshidrogenasas provenientes de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 (Ludwig *et al.*, 1995), hígado de caballo (Dickinson *et al.*, 1967), *Aeropyrum pernix* K1 recombinante (Hirakawa *et al.*, 2004), *Saccharomyces cerevisiae* (Larroy *et al.*, 2002) entre otras, están formadas por homodímeros, dímeros o tetrámeros entre 70 y 40 kDa. Pese a que existe información de la producción de la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* y su localización subcelular (Ueda y Tanaka, 1990), no hay información al respecto de su estructura y peso molecular.

Por otro lado, la purificación de la alcohol deshidrogenasa proveniente de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 fueron mucho mejores que la realizada con *Candida tropicalis*, logrando factores de purificación de 237 y 567 respectivamente y en ambos casos se recuperó alrededor del 36% de la actividad inicial (Ver Tablas 4.8 y 4.9). Nuevamente la pérdida de actividad se produjo principalmente por la mala desorción de la enzima desde las resinas. Si bien durante el diseño de los protocolos de purificación se realizó un estudio inicial a pequeña escala de la desorción con diferentes sales y concentraciones de estas sales, no se obtuvieron los mismos resultados al utilizar una mayor cantidad de resina durante la purificación. Además no se debe descartar la posible inactivación de la enzima durante la purificación. En cuanto al perfil electroforético SDS PAGE de la purificación de la enzima proveniente de *Thermus* AB1 se obtienen dos bandas muy tenues de 66 y 23 kDa que pueden corresponder a la enzima o a una subunidad de ella (Ver Figura 4.11). En cambio en la electroforesis SDS PAGE de la purificación de la enzima proveniente de *Thermus thermophilus* PRQ 25 se obtienen tres bandas de 64, 60 y 23 kDa. El análisis de la identificación de estas bandas por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS) de la banda de 64 kDa entregó tres secuencias peptídicas

RQAAEAVLEAGGYPIPR, RIYLAQALDRA y KLALM\*VAGLAVQK.Y que al contrastarlas con la base de datos del genoma de *Thermus thermophilus* PRQ 25 comprobó que la banda de 64 kDa estaría asociada a una deshidrogenasa. Al comparar la secuencia RQAAEAVLEAGGYPIPR con la base de datos del Protein Data Bank se pudo evidenciar que existe un alineamiento de la secuencia con las proteínas Acil-CoA deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* HB27 y *Thermus thermophilus* HB8 con un 100% de identidad y con Acil-CoA deshidrogenasa de *Thermus aquaticus* Y51MC23 con 82% de identidad. Finalmente a través de la electroforesis nativa se pudo evidenciar que la enzima alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25 es una proteína de aproximadamente 254 kDa compuesta por cuatro subunidades de 64 kDa cada una. (Ver Figuras 4.13 y 4.14).

### **5.3 Inmovilización y caracterización de alcohol deshidrogenasa con capacidad oxidativa sobre alcoholes superiores**

#### **5.3.1. Inmovilización en glioxil agarosa 4 BCL y bromocianógeno**

Las alcohol deshidrogenasas de bacterias y levaduras en general requieren de hierro para llevar a cabo la catálisis (Hirakawa *et al.*, 2004) y las alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 no fueron la excepción. Estos iones bivalentes estarían formando parte de la función estructural o catalítica de estas enzimas, tal como se observó con la alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis* (Scopes, 1983; Larroy, 2006). El estudio realizado durante el proceso de inmovilización evidenció que la concentración óptima de FeSO<sub>4</sub> para activar las alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 es de 2 mM. Sobre 2 mM se observó precipitación de las sales en el medio de reacción. Con ZnCl<sub>2</sub> también existe un efecto de activación, pero en menor medida y al utilizar una mezcla de FeSO<sub>4</sub> y ZnCl<sub>2</sub> se obtienen el mismo efecto que al utilizar sólo FeSO<sub>4</sub>.

Los más altos rendimientos de inmovilización medidos en actividad se lograron con las enzimas provenientes de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 tanto para las enzimas inmovilizadas en glioxil agarosa 4 BCL (Glx), como en bromuro de cianógeno (BrCN), con valores sobre el 90% (Ver Tabla 4.14). En cambio para *Candida tropicalis* el

rendimiento fue de 72% en glioxil agarosa 4 BCL ( $1,87 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  soporte) y 71% en bromuro de cianógeno ( $1,84 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  soporte).

### 5.3.2 Caracterización de los biocatalizadores inmovilizados

La caracterización de los biocatalizadores inmovilizados permitió determinar las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de oxidación de los alcoholes alifáticos tetradecanol, docosanol y tetracosanol. El estudio del efecto del pH en la oxidación de tetradecanol, docosanol y tetracosano por parte de las enzimas inmovilizadas en bromocianógeno y glioxil agarosa provenientes de *Candida tropicalis*, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 reveló que a pH 7,0 se logra la máxima velocidad de oxidación de los tres sustratos (Ver Figuras 4.15, 4.16 y 4.17). Estos valores difieren con lo reportado por Cea et al. (2009) quienes determinaron que pH 8,8 es el óptimo para llevar a cabo la oxidación de docosanol y tetracosanol por la enzima alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo, obteniendo valores de actividad que no superaron los  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  soporte. Las temperaturas óptimas para cada biocatalizador son muy similares a las temperaturas óptimas de cultivo de los microorganismos de los cuales provienen: las enzimas *C. tropicalis*-Glx y *C. tropicalis*-BrCN presentan su máxima actividad sobre los tres sustratos enzimáticos (tetradecanol, docosanol y tetracosanol) a  $40^{\circ}\text{C}$ , AB1-Glx y AB1-BrCN a los  $60^{\circ}\text{C}$  y finalmente PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN a  $70^{\circ}\text{C}$  (Ver Figura 4.19, 4.20 y 4.21).

El análisis de efecto del largo de cadena en la actividad de los biocatalizadores a la temperatura y pH óptimo revelaron que los biocatalizadores inmovilizados en bromuro de cianógeno presentaron una levemente mayor actividad que los inmovilizados en glioxil agarosa, lo que puede deberse a que el tipo de interacción multipuntual generada al inmovilizar en glioxil agarosa produce un biocatalizador más rígido que dificulta en cierto grado la interacción enzima-sustrato (Ver Figura 4.22). Por otro lado se observó que al ir aumentando el tamaño del sustrato enzimático desde etanol a dodecanol la velocidad de oxidación se ve disminuida y a partir de dodecanol hacia alcoholes alifáticos superiores de 22 a 24 átomos de carbono nuevamente se observa un aumento en la velocidad de oxidación. Posiblemente esto se deba a que se estaría en presencia de más de un tipo de alcohol deshidrogenasa o isoenzimas que presentarían diferente selectividad por los alcoholes de cadena corta (2 a 4 átomos de carbono), de cadena media (8 a 12 átomos de carbono) y de cadena larga (14 a 24 átomos de carbono). Este mismo fenómeno se observa

al medir actividad con la enzima directamente del extracto crudo sin inmovilizar (Ver Tabla 4.3); la selectividad por los sustratos no se vio modificada al inmovilización las distintas enzimas.

### **5.4 Reacción de síntesis de los ácidos tetradecanoico, docosanoico y tetracosanoico**

#### **5.4.1 Estudio de la síntesis de los ácidos tetradecanoico, docosanoico y tetracosanoico**

La síntesis de los ácidos de cadena larga se desarrolló con los biocatalizadores inmovilizados en glioxil agarosa 4BCL por presentar una mayor estabilidad térmica a las condiciones de pH y temperaturas determinadas como óptimas para estas enzimas y considerando que el cofactor  $\text{NAD}^+$  es estable a estas condiciones de trabajo (Ver Figura 4.24 y Tabla 4.17).

El análisis de estos resultados revela que con *C.tropicalis*-Glx se logra el mayor grado de conversión de tetradecanol (84%) luego de 72 horas de reacción con un rendimiento en ácido tetradecanoico de 67% y solo un 17% en aldehído. En cambio PRQ 25-Glx y AB1-Glx no superaron el 78,3% y 60,3% de conversión de tetradecanol con un rendimiento en ácido tetradecanoico de 40% y 14% respectivamente y en ambos casos con un elevado rendimiento en aldehído (PRQ 25-Glx 37,6% y AB1-Glx 46,3%). Estos resultados muestran que *C.tropicalis*-Glx, además de presentar mayor selectividad por tetradecanol, presenta una mayor velocidad de oxidación del aldehído al ácido que la observada por PRQ 25-Glx y AB1-Glx.

Por otro lado, con la enzima PRQ 25-Glx se logró el mayor grado de conversión tanto de docosanol como tetracosanol con valores de 85,9% y 78,7% respectivamente y rendimientos en ácido docosanoico de 61,7% y ácido tetracosanoico 35,8% respectivamente. (Ver Tabla 4.20). A su vez la enzima AB1-Glx presenta similar grado de conversión de docosanol y tetracosanol, sin embargo del 66,2 % de conversión del docosanol el 50,9 % es ácido docosanoico, en cambio del 67,9 % de conversión del tetracosanol sólo el 14% es ácido

tetracosanoico y el 53,1% restante es aldehído. Estos resultados sugieren que el mecanismo de transformación de los alcoholes alifáticos de cadena larga a su ácido respectivo pasaría primero por la oxidación del alcohol a aldehído y luego de aldehído al ácido.

Se aprecia que a las 72 horas en la mayoría de las reacciones aún no se llega al máximo de conversión de los alcoholes, salvo en la oxidación de tetradecanol con PRQ25-Glx y la oxidación de docosanol con AB1-Glx y *C. tropicalis*-Glx.

Estos resultados estarían comprobando que efectivamente se logró inducir en los microorganismos *Candida tropicalis*, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 la producción de una enzima alcohol deshidrogenasa con capacidad de oxidación de alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono adicionando al cultivo alcoholes alifáticos de cadena larga.

### **5.4.2 Estabilidad de los biocatalizadores en el medio acuoso y en el medio de reacción**

Una clara ventaja en la inmovilización en glioxil agarosa es el nivel de estabilización logrado ya que el estudio de estabilidad térmica en medio acuoso de cada biocatalizador a la temperatura considerada como óptima para cada enzima (*C. tropicalis*-Glx y *C. tropicalis*-BrCN incubados a 40°C, AB1-Glx y AB1-BrCN a 60°C, PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN a 70 °C) demostró que las enzimas provenientes de *Thermus* AB1 y *Thermus Thermophilus* PRQ 25 inmovilizadas en glioxil agarosa y luego de 48 horas de incubación en medio acuoso sólo pierden el 13% y 23% de su actividad inicial, en cambio las enzimas inmovilizadas en bromuro de cianógeno se inactivan completamente luego de 48 horas (Ver Figura 4.23). En el caso de las enzimas *C. tropicalis*- Glx y *C. tropicalis*- BrCN luego de 48 horas de incubación a 40°C la actividad remanente es de 88% y 80% respectivamente; sin embargo, debe señalarse que en este caso la temperatura es moderada.

Por otro lado, el estudio de estabilidad en el medio de reacción luego de un período de tiempo de 72 horas, reveló que AB1-Glx y PRQ25-Glx pierden el 20% y 25% de su actividad inicial utilizando docosanol, tetracosanol y tetradecanol como sustrato con tiempos de vida media de alrededor de 250 a 300 hora para AB1-Glx, en cambio *C. tropicalis*-Glx luego de un período de tiempo de 72 horas sólo pierde el 10% de su actividad inicial.



*Conclusiones*

---

## 6 CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que es posible modular el tipo de alcohol deshidrogenasa sintetizada en función de su actividad con respecto a la longitud de cadena de su sustrato por medio del uso de un inductor de una longitud de cadena correspondiente.
- Se observó una relación entre el largo de cadena del inductor y el nivel de actividad expresado respecto al largo de cadena del sustrato de la reacción en las cepas *Thermus* y *Thermus thermophilus*, a excepción de *Candida tropicalis* ATCC20336 y *Thermus thermophilus* NR17 que no siguieron ese patrón.
- El tipo de inductor, su concentración y el tiempo de adición durante la fermentación, son los parámetros más importantes para la producción de alcohol deshidrogenasas con actividad sobre alcoholes alifáticos de cadena larga.
- La concentración de agente inductor más adecuada para el crecimiento celular fue 0,05%. A concentraciones de inductor 0,5% o superior se observó un efecto perjudicial sobre el crecimiento celular.
- Los mejores resultados en términos de actividad de alcohol deshidrogenasa en la oxidación de alcoholes alifáticos de 14, 22 y 24 átomos de carbono se obtuvieron con las enzimas provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inducida con hexadecanol, *Thermus* AB1 inducida con docosanol y *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducida con eicosanol.
- No sólo se validó que con el uso de alcanos es posible inducir la producción de enzimas con capacidad oxidativa, sino que se logró evidenciar que con la adición de alcohol al medio de cultivo también es posible inducir la producción de estas enzimas.
- Los más altos niveles de actividad enzimática se obtuvieron cuando el inductor es añadido al inicio de la fermentación y las células recolectadas al comienzo de la fase estacionaria (entre 100 y 140 h de fermentación).

- La actividad sobre tetracosanol obtenida con la alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inducida con hexadecanol fue superior al valor previamente reportado por Ueda y Tanaka (1990).
- Se logró purificar las enzimas alcohol deshidrogenasas provenientes de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 mediante el uso de una mezcla de matrices cromatográficas de tipo catiónicas y aniónicas con factor de purificación de 39, 237 y 567 respectivamente y rendimientos en actividad de 24% para *Candida tropicalis* ATCC 20336 y de 36% para las enzimas de *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25.
- Las alcohol deshidrogenasas de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 requieren de la presencia de  $\text{FeSO}_4$  para llevar a cabo la catálisis enzimática.
- Es muy probable que la enzima alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25 sea una proteína tetramérica de 254 kDa con subunidades de 64 kDa cada una.
- Los mejores biocatalizadores fueron obtenidos al inmovilizar las enzimas de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 en glioxil agarosa BCL, obteniéndose valores de actividad de 1,84; 1,82 y 2,09  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  soporte respectivamente, determinados sobre tetracosanol como sustrato enzimático.
- Las enzimas de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 inmovilizadas por unión covalente multipuntual en glioxil agarosa 4BCL presentaron mayor estabilidad que las inmovilizadas en bromuro de cianógeno 4BCL y son igualmente estables en medio acuoso que en el medio de reacción.
- La máxima actividad de los biocatalizadores producidos se obtuvo a pH 7,0 y 50°C (C. tropicalis-Glx y C. tropicalis-BrCN), 60°C (AB1-Glx y AB1-BrCN) y 70°C (PRQ 25-Glx y PRQ 25-BrCN).
- La alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336 inmovilizada en glioxil agarosa fue el mejor biocatalizador para realizar la oxidación de tetradecanol,

observando el mayor grado de conversión (84%) luego de 72 horas de reacción con un rendimiento en ácido tetradecanoico de 67% y de sólo un 17% en tetradecanal.

- La alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* PRQ 25 fue la mejor enzima para llevar a cabo la reacción de oxidación de docosanol y tetracosanol, con valores de conversión de 85,9% y 78,7% respectivamente y rendimientos en ácido docosanoico de 61,7% y ácido tetracosanoico 35,8% respectivamente.
- La alcohol deshidrogenasa de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 presentan una mayor actividad sobre los sustratos docosanol y tetracosanol que los reportados por Cea et al. (2009) con la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo.
- Fue posible validar la hipótesis propuesta, ya que mediante la adición de alcoholes alifáticos al medio de cultivo de cepas microbianas seleccionadas (*Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25), fue posible inducir la síntesis de la enzima alcohol deshidrogenasa con alta actividad oxidativa sobre alcoholes de cadena larga y obteniendo, luego de su purificación e inmovilización, un biocatalizador apto para efectuar la oxidación de alcoholes de 22 y 24 átomos de carbono.

The background of the page is a complex, abstract composition of overlapping, semi-transparent ribbons and lines. The colors are primarily shades of blue, cyan, and magenta/pink. The ribbons are of varying thicknesses and are arranged in a way that suggests movement and depth, creating a sense of a tangled or layered structure. The overall effect is a vibrant, textured backdrop for the text.

# Recomendaciones

---

## 7 RECOMENDACIONES

Para proyectar la información obtenida en esta investigación, se sugiere:

1. Mejorar el proceso de purificación específicamente en las etapas de desorción de la enzima desde la resina para evitar la pérdida de actividad por retención en la columna.
2. Perfeccionar la técnica de medición de actividad en los geles de electroforesis de modo que se permita evidenciar si efectivamente las proteínas purificadas corresponde a una alcohol deshidrogenasa.
3. Evaluar si las proteínas inducidas con los distintos alcoholes y alcanos corresponden a la misma proteína o son diferentes y estudiar si provienen de un mismo gen o de diferentes genes.
4. Realizar un estudio más acabado de la cinética de la reacción de oxidación para lograr obtener conversiones cercanas al 100%.
5. Evaluar la estabilidad operacional de los biocatalizadores producidos a través de lotes sucesivos.



# Referencias

---

## 8 REFERENCIAS

- Abram, A., R. Buchta, R. Houlden, and R. Ye. 2006. Vitamin formulation. US Patent 0292080.
- Allen, F. 1994b. The microbrewery laboratory manual - A practical guide to laboratory techniques and quality control procedures for small-scale brewers, Part I: Yeast Management. *Brewing Techniques* 2(4).
- Ammendola, S., C. Raia, C. Caruso, L. Camardella, S. D'Auria, M. De Rosa and M. Rossi, M. 1992. Thermostable NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*: Gene and protein sequence determination and relationship to other alcohol dehydrogenases. *Biochemistry* 31: 12514-12523.
- Antoine, E., J. Rolland, J. Raffin and J. Dietrich. 1999. Cloning and over-expression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*. *European Journal of Biochemistry* 264: 880-889.
- Arndt, A. and B. Eikmanns. 2007. The alcohol dehydrogenase gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *Journal of Bacteriology* 189(20): 7408-7416.
- Bi, Y., M. Zhou, H. Hu, C. Wei, W. Li and K. Zhen. 2001. Oxidation of long chain primary alcohols to acids over the quaternary ammonium peroxotungstophosphate catalyst system. *Reaction Kinetics and Catalysis* 72(1): 73-82.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Branden, C., H. Eklund, B. Nordstrom, T. Boiwe, G. Soderlund, E. Zeppezauer, I. Ohlsson and A. Akeson. 1973. Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9-angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(8): 2439-2442.
- Breakspear, A., R. Caprotti, and C. Fava. 2006. Fuel additives and compositions. US Patent 0254127.
- Brenda. The enzyme information system. In: Enzyme Database (on line). 5 March 2006. (cited 10 May 2006). Available from: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>
- Bryant, F., J. Wiegel and L. Ljungdahl. 1988. Purification and properties of primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Applied Environmental Microbiology* 54(2): 460-465.
- Bryant, F., J. Wiegel and L. Ljungdahl. 1992. Comparison of alcohol dehydrogenases from wild-type and mutant strain, JW200 Fe 4, of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37(4): 490-495.
- Clymer, J. 2006. Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Patente Mexicana 06001477 A.

- Cottard, F. and C. Rondeau. 2004. Composition for oxidation dyeing of keratin fibers, comprising non-oxyalkenylated fatty alcohol, oxidation dye, associative polymer, and alkanolamine and c14-30 fatty acid amide exhibiting desirable stabilized density and viscosity due to elapse of time without need for increasing concentration of fatty acid. European Patent 1,426,032.
- Craft, D., K. Madduri, M. Eshoo and R. Wilson. 2003. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to  $\omega$ ,  $\beta$ -dicarboxylic acids. Applied and Environmental Microbiology 69(10): 5983-5991.
- D' Auria, S., F. La Cara, F. Nazzaro, N. Vespa and M. Rossi. 1996. A thermophilic alcohol dehydrogenase from *Bacillus acidocaldarius* not reactive towards ketones. The Journal of Biochemistry 120(3): 498-504.
- De Jong, G., A. Geerlof, J. Stoorvogel, J. Jongejan, S. De Vries and J. Duine. 1995. Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. European Journal of Biochemistry 230: 899-905.
- Dickinson, F. and K. Dalziel. 1967. The specificities and configurations of ternary complexes of yeast and liver alcohol dehydrogenases. Biochemical Journal 104: 165-171.
- Dickinson, F. and C. Wadforth. 1992. Purification and some properties of alcohol oxidase from alkane-grown *Candida tropicalis*. Biochemical Journal 282: 325-331.
- Eklund, H., B. Nordström, E. Zeppezauer, G. Söderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe, B. Söderberg, O. Tapia, C. Brändén and A. Akeson. 1976. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. Journal of Molecular Biology 102(1): 27-59.
- Fujino, J. and K. Yokohama-shi. 2004. Humectant and cosmetics and external preparations containing the same. European Patent 1,417,955.
- Frindrik, Z., I. Simunovic and D. Vasic-Racki. 2008. Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in the reaction of L-amino acid oxidation. Biochemical Engineering Journal 30: 319-327.
- Gaonkar, A., L. Herbst, W. Chen and D. Kim. 2004. Multilayer edible moisture barrier for food products. US Patent 0197459.
- Gebreselassie, P. and N. Boghani. 2006. Effervescent pressed gum tablet compositions. US Patent. 0078508.
- Guajardo, N., J. Santana and C. Carlesi. 2010. The use of an ionic liquid catalyst for the oxidation of hydrophobic high molecular weight alcohols. Información Tecnológica 21(3): 57-65.
- Guisan J., A. Bastida, R. Blanco, R. Fernandez-Lafuente and E. Garcia-Junceda. 1997. Immobilization of Enzymes on glyoxyl supports: Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment In: Immobilization of Enzymes and Cells, Bickerstaff, G ed. Serie Methods Biotchnol. Vol 1. The Humana Press Inc. NJ, 277-288.

Härting, T., Al. Markovits, A. Markovits, R. Chamy, A. Illanes, I. Martínez, A. Olivares, V. Iturra, L. Álvarez, M. Fuenzalida, M. Berrios y M. Keller. 2000. Valorización de residuos del proceso kraft de pulpeo de la celulosa para la elaboración mediante biocatálisis de productos para la industria de aromas, farmacéutica y nutracéutica. Proyecto FONDEF D00I1096. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso y Empresa Härting S.A.

Härting, T., Al. Markovits, A. Markovits, R. Chamy, A. Illanes, L. Wilson, C. Altamirano, A. Olivares, M. Fuenzalida, M. Berrios y M. Keller. 2004. Recuperación y purificación de alcoholes alifáticos de cadena larga de los residuos del proceso kraft de pulpeo de la celulosa para su uso en la industria farmacéutica. Proyecto FONDEF DO4I1007. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso y Empresa Härting S.A.

Hasebe, T. and K. Sashida. 2004. Biodegradable polyester resin composition and films, sheets and other molded articles thereof. US Patent 0024141.

Henley, JP. and A. Saldana. 1986. Deactivation Theory. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1277-1285.

Hirakawa, H., N. Kamiya, Y. Kawarabayashi and T. Nagamune. 2004. Properties of an alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(3): 202-206.

Holt, P., R. Williams, K. Jordan, C. Lowe and N. Bruce. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the primary alcohol dehydrogenase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200. *FEMS Microbiology Letters* 190: 57-62.

Hummel, W. 1999. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In T. Scheper (Eds), *New enzymes for organic synthesis, screening, supply and engineering*, pp. 145-184, Springer Desktop Editions in Chemistry.

Hussain, W., D. Pollard, M. Truppo and G. Lye. 2008. Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 55: 19-29.

Illanes, A., 2002. Cinética enzimática en fase heterogénea. F. Acevedo, J. C. Gentina, A. Illanes (Eds.), *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*, pp.69-90. Valparaíso. Ediciones Universitarias.

Illanes, A., L. Álvarez and G. Álvaro. 2008. Chemoselective transesterification of wood sterols by lipases. *Revista Colombiana Biotecnología* 10(1): 17-35.

Immig, I., R. Wilkie and J. Wilson. 2006. Fat soluble vitamin feed supplements and processes for delivering same. US Patent 0210611.

Jager, M., G. Gooris, M. Ponc and J. Bouwstra. 2005. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behaviour. *Journal of Liquid Research* 46: 2649-2656.

- Johansson, A. 1982. By-product recovery and valorization in the kraft industry-a review of current trends in the recovery and use of turpentine and tall-oil derivatives. *Biomass* 2(2): 103-13.
- Jornvall, H., B. Persson and J. Jeffery. 1987. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* 167: 195-201.
- Jörnvall, H., J. Hedlund, T. Bergman, U. Oppermann and B. Persson. 2010. Superfamilies SDR and MDR: from early ancestry to present forms emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396(1): 125-130.
- Kato, T., A. Miyanaga, S. Kanaya and M. Morikawa. 2009. Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiol.* (9): 60.
- Kemp, G., F. Dickinson and C. Ratledge. 1988. Inducible long chain alcohol oxidase from alkane-grown *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29(4): 370-374.
- Kitamoto, D., T. Ikegami, G. Suzuki, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura and H. Yanagishita. 2001. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnology Letters* 23(20): 1709-1714.
- Kolattukudy, P. 1970. Reduction of fatty acids to alcohols by cell-free preparations of *Euglena gracilis*. *Biochemistry* 9(5): 1095.
- Konishi, J. 2003. Fatty acid-containing composition. US Patent 0018011 A1.
- Kube, J., C. Brokamp, R. Machielsen, J. van der Oost and H. Märkl. 2006. Influence of temperature on the production of an archaeal thermoactive alcohol dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus* with recombinant *Escherichia coli*. *Extremophiles* 10: 221-227.
- Labrecque, R., Moodie, G., Rogers, L., Ferraro, J., Karwoski, T., Herweck, S. and Martakos, P. (2006). Solubilizing a drug for use in a coating. US Patent 0088596.
- Ladero, M., Ferrero, R., Vian, A., Santos, A. and Garcia-Ochoa, F. 2005. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 505-513.
- Larroy, C., Fernández, R., González, E., Parés, X. and Biosca, J. 2002. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochemical Journal* 361(1): 163-172.
- Larroy, C. 2006. Estudio estructural y funcional de las Ciamil alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona 180 pp.
- Leammli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.

- Lee, D., A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S. Adachi, S. Park and Y. Shiro. 2003. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*. *The journal of biological chemistry* 278(11): 9761-9767.
- Lee J. In: USDA scientists find treasure in peanut skins (on line). (cited 30 July 2008). Available from: <<http://www.hbci.com/~wenonah/new/pnutskin.htm>>.
- Leung, D. and S. Sacks. 2004. Docosanol: a topical antiviral for herpes labialis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5(12): 2567-2571.
- Li, D. and K. Stevenson. 1997. Purification and sequence analysis of a novel NADP(H)-dependent type III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus* strain AN1. *Journal of Bacteriology* 179(13): 4433-4437.
- Liu, W. and P. Wang. 2007. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*. 15: 369-384.
- Loh, J., M. Almendarez, T. Hansen, L. Herbst and A. Gaonkar. 2004. Edible moisture barrier for food products. US Patent 0101601.
- Ludwig, B., A. Akundi and K. Kendall. 1995. A Long-chain secondary alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. *Applied and Environmental Microbiology* 3729-3733.
- Ma, K., F. Robb and M. Adams. 1994. Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental microbiology* 562-568.
- Ma, K., H. Loessner, J. Heider, M. Johnson and M. Adams. 1995. Effects of elemental sulphur on the metabolism of the deep-sea hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* strain ES-1: characterization of a sulphur-regulated, non-heme iron alcohol dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 177(16): 4748-4756.
- Ma, K. and M. Adams. 1999. An unusual oxygen-sensitive, iron-and zinc-containing alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 181(4): 1163-1170.
- Masanori, I., S. Katsuma, T. Keiji and T. Masahiro. 2003. Chocolate confection and production thereof. Japanese Patent. 250448.
- Mateo, C., O. Abian, M. Bernedo, E. Cuencas, M. Fuentes, G. Fernández-Lorente, JM. Palomo, V. Grazu, B. Pessela, C. Giacomini, G. Irazoqui, A. Villarino, K. Ovsejevi, F. Batista-Viera, R. Fernández-Lafuente and JM. Guisán. 2005. Some special feature of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 456-462.
- Montgomery, D.C. 2004. Diseño y análisis de experimentos. 2ª edición, 686pp. México: Addison Wesley.

- Mooser, D., O. Mager, F. MacMilan, F. Malatesta, T. Soulimane and B. Ludwig. 2006. The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from *Thermus thermophilus*: Protein domains and subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1084-1095.
- Nápoles, M., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G. y Somers, E. 2006. Efecto de diferentes medios de cultivos en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cultivos celulares* 27(1): 35-38.
- Nielsen, J., T. Raschke and H. Riedel. 2005. Cosmetic and dermatological preparations in the form of o/w-emulsions containing sterols and/or C12-C40 fatty acids. US Patent 0037036 A1.
- Noritoshi, K. 1999. Aerosol agent. Japanese Patent. 11060471.
- Nuwayser, E. 2006. High drug loaded injectable microparticle compositions and methods of treating opioid drug dependence. US Patent 7,041,320 B1.
- Palomo, JM. 2009. Modulation of enzyme selectivity via immobilization. *Current organic synthesis* 6: 1-14.
- Papanikolaou, Y., I. Tsigos, V. Papadovasilaki and K. Repratos. 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an alcohol dehydrogenase from the antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *Acta Crystallographic Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 61: 246-248.
- Persson, B., J. Hedlund and H. Jörnvall. 2008. The MDR superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3879-3894.
- Picataggio, S., T. Rocher, K. Deanda, D. Lanning, R. Reynolds, J. Mielenz and D. Eirich. 1992. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology* 10: 894-898.
- Quezada, M., G. Buitrón, I. Moreno-Andrade, G. Moreno and L. López-Marín. 2007. The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultative aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Letters* 266: 75-82.
- Radianingtyas, H. and P. Wright. 2003. Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 593-616.
- Ramaswamy, S., D. Park and B. Plapp. 1999. Substitutions in a flexible loop of horse liver alcohol dehydrogenase hinder the conformational change and unmask hydrogen transfer. *Biochemistry* 38: 13951-13959.
- Rella, R., C. Raia, M. Pensa, F. Psiani, A. Gambacorta, M. De Rosa and M. Rossi. 1987. A novel archaeobacterial NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 165: 475-479.
- Riveros-Rosas, H., A. Julián-Sánchez, R. Villalobos-Molina, J. Pardo and E. Piña. 2003. Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry* 270: 3309-3334.

Sanders, R., R. Ofman, F. Valianpour, S. Kemp and R. Wanders. 2005. Evidence for two enzymatic pathways for  $\omega$ -oxidation of docosanoic acid in rat liver microsomes. *Journal of Lipid Research* 46: 1001-1008.

Seki, T. 2005. Skin cleansing compositions. US Patent 0020461 A1.

SERNAC. Estudio comparativo de aguas minerales envasadas que se expenden en la ciudad de Santiago. En: SERNAC (en línea). Noviembre 2001. (Referido el 26 Septiembre 2010). Disponible en: <http://www.sernac.cl/download.php?id=204&n=1/>

Stoffel, W., D. Lekim and G. Heyn. 1970. Metabolism of sphingosine bases. XIV. sphinganine (dihydrosphingosine), an effective donor of the alk-1-enyl chain of plasmalogens. *Hoppe-Seyler's Z. Physiology Chemistry* 351: 875-883.

Stoscheck, CM. 1990. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69.

Takaaki, M., K. Hiroaki, M. Yasuyuki, F. Noriko, N. Masayuki and S. Yasuhiko. 2003. Frozen whipped cream. Japanese Patent 093006.

Tancibok, K, B. Sekula and G. Gardner. 1997. Reduced calorie ice cream-type frozen dessert and butter fat mimetics therefore. US Patent 5,645,881.

Tatsuzi, S., N. Naoki and O. Genzi. 1990. Polycarbonate resin composition. European Patent 0232838.

Thengumpilli, K., K. Sanjit and P. Raghapudi. 2003. Enzymatic process for preparing reduced-calorie fats containing behenic acid. US Patent 6,617,141.

Throne-Holst, M. and S. Markussen. 2006. Utilization of n-alkane by newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Applied Microbial and Cell Physiology* 72: 353-360.

UAM. En: Ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados (en línea) (referido el 21 Julio 2007). Disponible en: [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/alimento/Apuntes/2-TCAC Características físico-químicas aceites.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/Apuntes/2-TCAC Características físico-químicas aceites.pdf)

Ueda, M. and A. Tanaka. 1990. Long-Chain alcohol dehydrogenase of *Candida* Yeast. *Methods Enzymology* 188: 171-175.

Valencia, E., C. Larroy, W. Ochoa, X. Parés, I. Fita and J. Biosca. 2004. Apo and holo structures of the NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Molecular Biology* 341: 1049-1062.

Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 6: 213-218.

Van Beilen, J. and E. Funhoff. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 13-21.

Voet D. and J. Voet. 1992. Purificación de proteínas. En: D.Voet, I. Geis and J. Voet (Eds.), *Bioquímica*, 1ª edición, Barcelona, Editorial Omega.

- Vrsalovic, A. and D. Basic-Racki. 2009. Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase. *Process Biochemistry* 44: 54-61.
- Wandrey, C. 2004. Biochemical reaction engineering for redox reactions. *The Chemical Record* 4: 254-265.
- Wang, D., C. Cooney, A. Demain, P. Dunnill, A. Humphrey and M. Lilly. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*, pp.57-58, John Wiley & Sons.
- Yamada, T., H. Nawa, S. Kawamoto, A. Tanaka and S. Fukui. 1980. Subcellular localization of long-chain alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Archives of Microbiology* 128: 145-151.
- Yi, Z. and H. Rehm. 1982 a. A new metabolic pathway from n-dodecane to  $\alpha$ ,  $\omega$ -dodecanedioic acid in a mutant of *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 15(3): 175-179.
- Yi, Z. and H. Rehm. 1982 b. Metabolic formation of dodecanedioic acid from n-dodecane by a mutant of *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 14(4): 254-258.
- Yoshiro, M. 2001. Lubricant for medicine or candy tablet. Japanese Patent 055342.
- Zaloga, G., R. Siddiqui and W. Stillwell. 2004. Fatty acid phenolic conjugates. US Patent 0254357.
- Zarnt, G., T. Schröder and JR. Andreesen. 1997. Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia eutropha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinine-dependent alcohol dehydrogenase. *Applied and environmental microbiology* 63(12): 4891-4898.
- Zhao, H. and A. Van der Donk. 2003. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 583-589.



# Apéndices

---

## APÉNDICE

APÉNDICE A: CÁLCULO DE ACTIVIDAD DESHIDROGENASA .....	128
APÉNDICE B: DETERMINACIÓN COEFICIENTE EXTINCIÓN MOLAR ( $\epsilon$ ) DE NADH .....	129
APÉNDICE C: CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD .....	130
APÉNDICE D: CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL ACIDO BICINCONÍNICO (BCA) .....	131
APÉNDICE E: CÁLCULO DE LA CONVERSIÓN Y RENDIMIENTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN .....	132
APÉNDICE F: CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS ESTUDIADOS .....	133
APÉNDICE G: MEDIO DE CULTIVO THERMUS.....	137
APÉNDICE H: MEDIO DEFINIDO PARA CULTIVO POR LOTE EN MATRAZ DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	138
APÉNDICE I: CINÉTICA DE CRECIMIENTO .....	139
APÉNDICE J: EJEMPLO DE CÁLCULO PARA OBTENER LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO .....	142
APÉNDICE K: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA SIMPLE .....	144
APÉNDICE L: ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LAS ELECTROFORESIS SDS PAGE.....	148
APÉNDICE M: MODELO DE INACTIVACIÓN TÉRMICA .....	152

**APÉNDICE A. CÁLCULO DE ACTIVIDAD DESHIDROGENASA**

Se calcula la actividad total como:

$$Actividad = \frac{b}{\epsilon_{\lambda_{340\text{ nm}}} \cdot l} \cdot \frac{V_{es}}{V_{ee}} \cdot V_t \quad (\text{Ecuación A-1})$$

Donde:

Actividad = UI ó  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ .

b = pendiente curva absorbancia del producto (NADH) versus tiempo en minuto

$\epsilon_{\lambda_{340\text{ nm}}}$  = coeficiente de extinción molar ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

l = largo de la celda (cm)

$V_{es}$  = volumen ensayo (ml)

$V_{ee}$  = volumen enzima (ml)

$V_t$  = volumen total extracto enzimático (ml)

Se calcula la actividad específica como:

$$Actividad\ específica = \frac{b}{\epsilon_{\lambda_{340\text{ nm}}} \cdot l} \cdot \frac{V_{es}}{V_{ee}} \cdot \frac{V_t}{m} \quad (\text{Ecuación A-2})$$

Donde:

Actividad específica =  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína,  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de célula ó  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de soporte.

b = pendiente curva absorbancia del producto (NADH) versus tiempo en minuto

$\epsilon_{\lambda_{340\text{ nm}}}$  = coeficiente de extinción molar ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

l = largo de la celda (cm)

$V_{es}$  = volumen ensayo (ml)

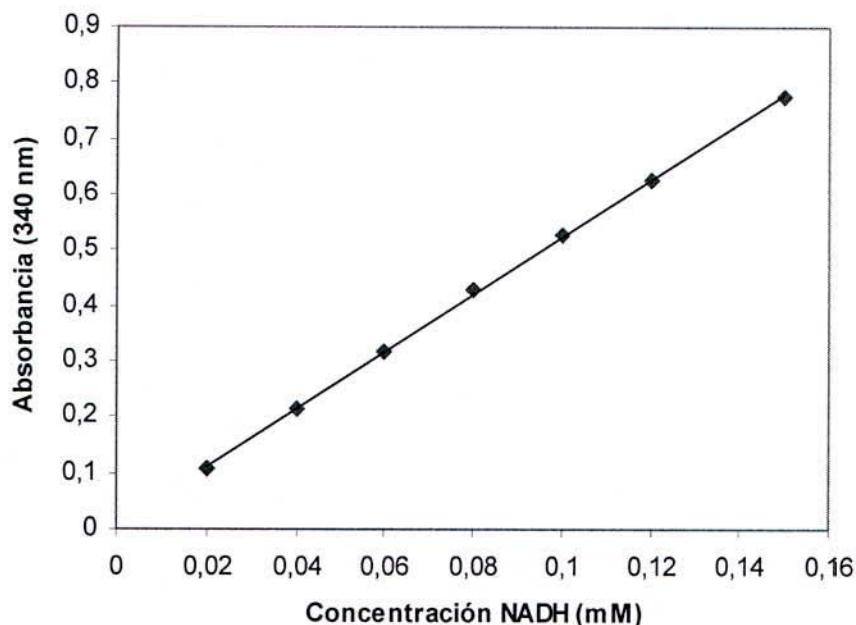
$V_{ee}$  = volumen enzima (ml)

$V_t$  = volumen total extracto enzimático (ml)

m = masa de proteína, células o soporte (g)

## APÉNDICE B. DETERMINACIÓN COEFICIENTE EXTINCIÓN MOLAR ( $\epsilon$ ) DE NADH

Se preparó una solución patrón de NADH 2 mM en tampón fosfato de sodio 100mM pH 7. A partir de este estándar se preparó una batería de tubos con solución de NADH entre 0 y 0,15 mM y fueron medidos espectrofotométricamente a 340 nm. Posteriormente se graficó absorbancia versus concentración de NADH como se muestra en la Figura B.1.



**Figura B.1** Curva de calibrado de NADH

Donde la ecuación que representa a la curva es:

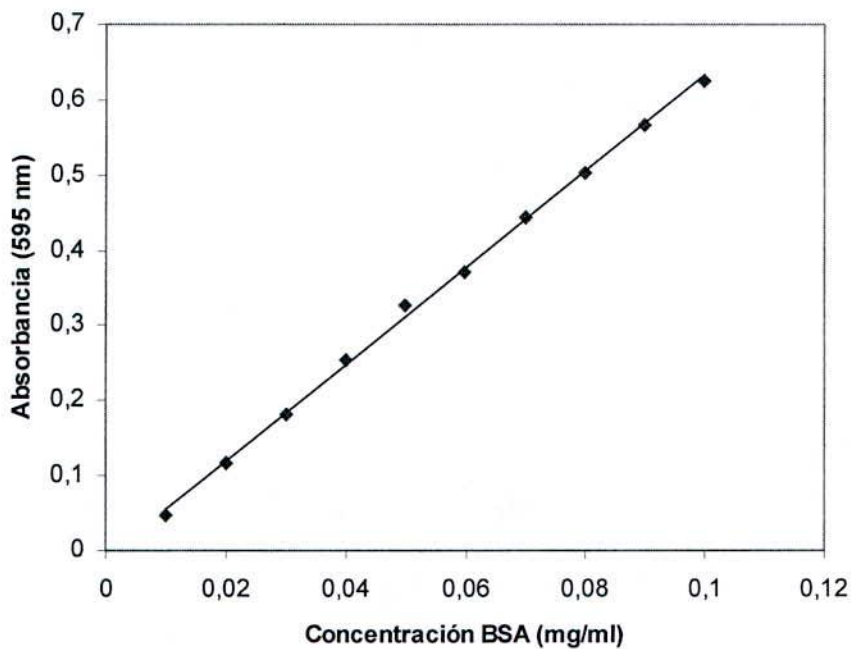
$$\begin{aligned}
 \text{Abs}(340\text{nm}) &= 5,1455 * \text{Concentración NADH} + 0,0094 \\
 R^2 &= 0,9996
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación B-1}$$

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{\lambda,340\text{nm}}$ ) se obtiene a partir de la pendiente de la curva de calibrado de NADH:

$$\epsilon_{\lambda,340\text{nm}} = 5,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}
 \tag{Ecuación B-2}$$

**APÉNDICE C. CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

La curva de calibrado se elaboró con una solución estándar de albúmina de suero bovino de concentración 1 mg/ml. A partir de este estándar se preparó una batería de tubos entre 0 y 0,1 mg/ml, los cuales fueron analizados mediante el método de Bradford. Los resultados se muestran en la Figura C.1



**Figura C.1** Curva de calibrado de proteínas

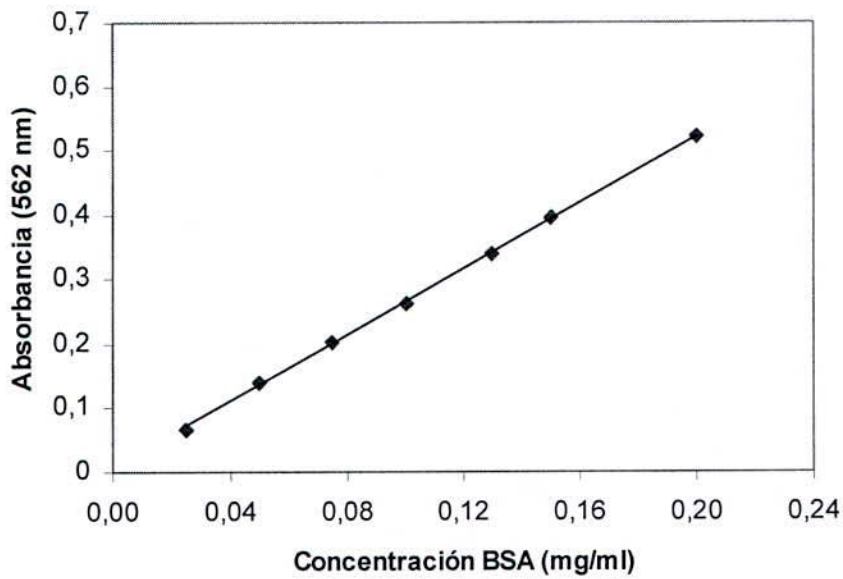
La concentración de proteína en mg/ml se obtiene de:

$$Abs(595\text{ nm}) = 6,413 \cdot \text{Concentración Proteína} - 0,0095$$

$$R^2 = 0,9988 \quad (\text{Ecuación C-1})$$

**APÉNDICE D. CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL ACIDO BICINCONÍNICO (BCA)**

La curva de calibrado se elaboró con una solución estándar de albúmina de suero bovino de concentración 0,5 mg/ml. A partir de este estándar se preparó una batería de tubos entre 0 y 0,2 mg/ml, los cuales fueron analizados mediante el método del ácido bicinconínico. Los resultados se muestran en la Figura D.1



**Figura D.1** Curva de calibrado de proteínas

La concentración de proteína en mg/ml se obtiene de:

$$Abs(562\text{ nm}) = 2,5614 \cdot \text{Concentración Proteína} + 0,0082$$

$$R^2 = 0,9995 \quad (\text{Ecuación D-1})$$

**APÉNDICE E. CÁLCULO DE LA CONVERSIÓN Y RENDIMIENTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN**

Cálculo de Conversión

La conversión de la reacción se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X (\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación E-1})$$

Donde:

X (%) = Porcentaje de conversión de alcoholes (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol)

$m_0$  = masa inicial en gramos de alcohol (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol)

$m_t$  = masa en gramos de alcohol (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol) a tiempo t de transcurrida la reacción.

$m_0 - m_t$  = masa en gramos de alcohol que reaccionan.

Cálculo de rendimiento de la reacción

El rendimiento de la reacción se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y_{Ac} (\%) = \frac{m_{Ac}}{m_0} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación E-2})$$

Donde:

$Y_{Ac} (\%)$  = Porcentaje de rendimiento de ácido (tetradecanoico, docosanoico ó tetracosanoico)

$m_0$  = masa inicial en gramos de alcohol (tetradecanol, docosanol ó tetracosanol)

$m_{Ac}$  = masa de ácido en el producto de reacción.

APÉNDICE F. CURVA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS ESTUDIADOS

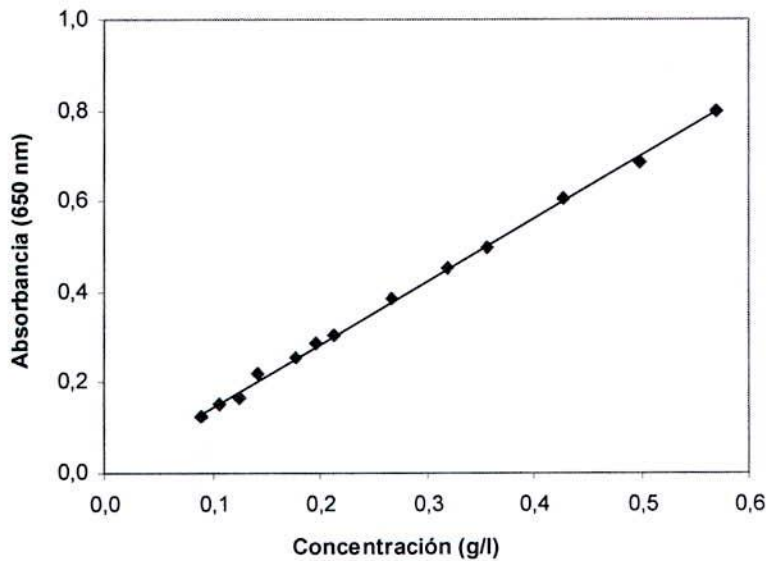
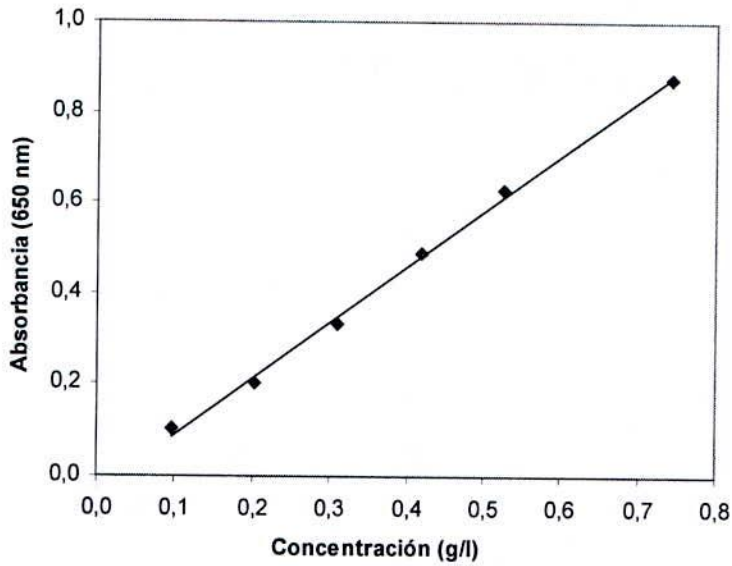


Figura F.1 Curva de calibrado de *Candida tropicalis* ATCC 20336

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs(650\text{ nm}) = 1,384 \cdot \text{Concentración celular} + 0,0084$$

$$R^2 = 0,9984 \quad (\text{Ecuación F-1})$$

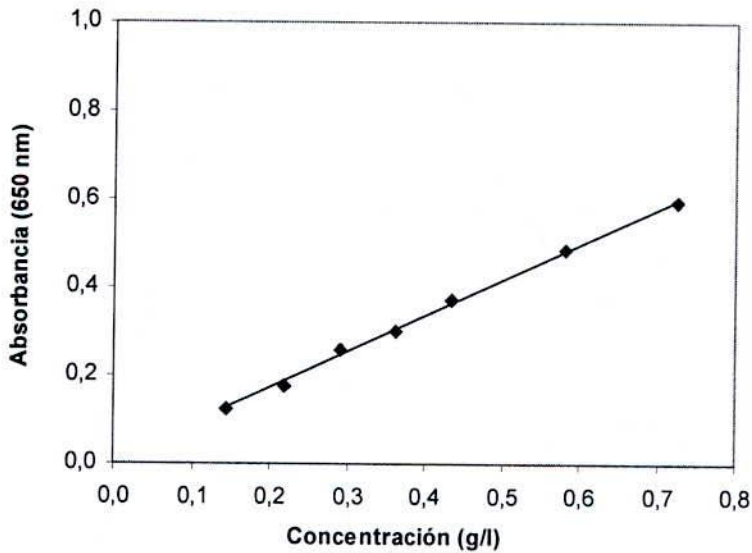


**Figura F.2** Curva de calibrado de *Thermus* AB1

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs(650\text{ nm}) = 1,2274 \cdot \text{Concentrac ión celular} - 0,0322 \quad \text{Ecuación F-2}$$

$$R^2 = 0,9975$$

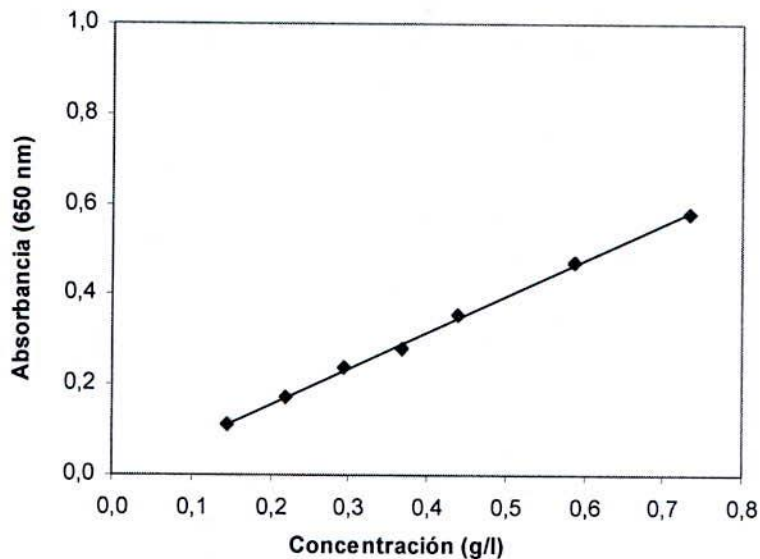


**Figura F.3** Curva de calibrado de *Thermus thermophilus* HB 27

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs(650\text{ nm}) = 0,8134 \cdot \text{Concentrac ión celular} + 0,0093 \quad \text{(Ecuación F-3)}$$

$$R^2 = 0,9978$$

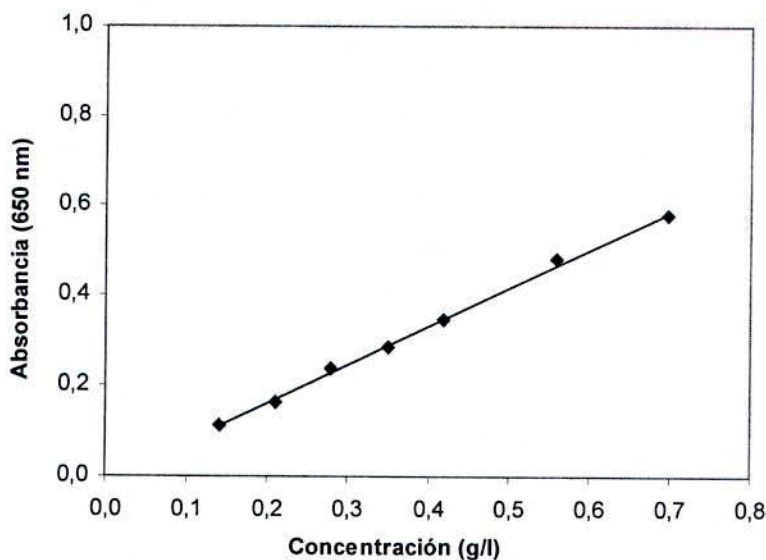


**Figura F.4** Curva de calibrado de *Thermus thermophilus* PRQ 25

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs(650\text{ nm}) = 0,799 \cdot \text{Concentrac i3n celular} - 0,0038 \quad (\text{Ecuaci3n F-4})$$

$$R^2 = 0,9989$$

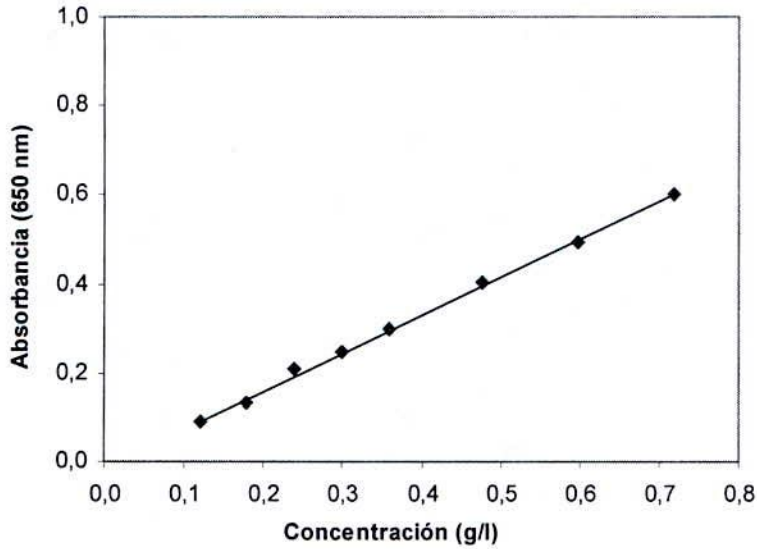


**Figura F.5** Curva de calibrado de *Thermus thermophilus* PRQ 16

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs(650\text{ nm}) = 0,8442 \cdot \text{Concentrac i3n celular} - 0,007 \quad (\text{Ecuaci3n F-5})$$

$$R^2 = 0,998$$

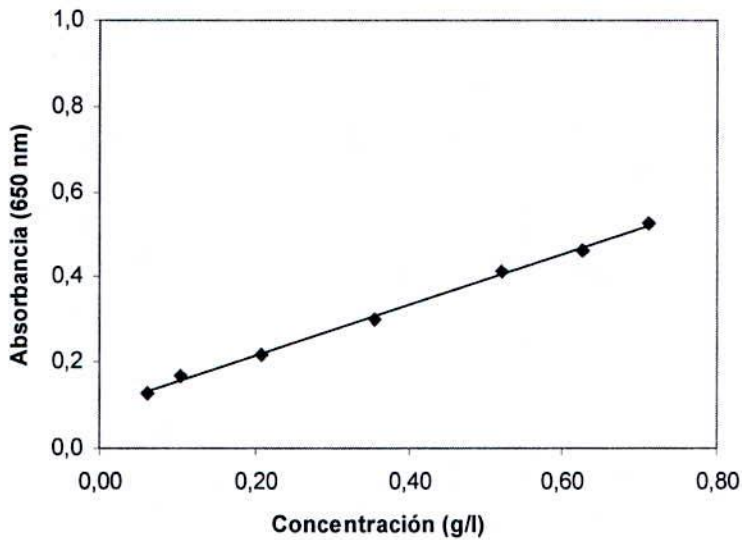


**Figura F.6** Curva de calibrado de *Thermus thermophilus* NR-17

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs (650 \text{ nm}) = 0,8519 \cdot \text{Concentrac ión celular} - 0,0097 \quad (\text{Ecuación F-6})$$

$$R^2 = 0,9981$$



**Figura F.7** Curva de calibrado de *Thermus thermophilus* HNI-11

La concentración celular en g/l se obtiene de:

$$Abs (650 \text{ nm}) = 0,5988 \cdot \text{Concentrac ión celular} + 0,0933 \quad (\text{Ecuación F-7})$$

$$R^2 = 0,9975$$

APÉNDICE G. MEDIO DE CULTIVO THERMUS

**Tabla G.1** Medio Thermus de mantención y propagación

Sustrato	Concentración
Triptona	8 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
NaCl	3 g/l

Disolver en agua mineral Cachantún sin gas. Ajustar pH 7,5 con NaOH 2 N.

**Tabla G.2** Medio thermus de almacenamiento

Sustrato	Concentración
Triptona	8 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
NaCl	3 g/l
Agar agar	30 g/l

Disolver en agua mineral Cachantún sin gas. Ajustar pH 7,5 con NaOH 2 N.

**Tabla G.3** Medio Thermus modificado

Sustratos	Concentración
Triptona	8 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
NaCl	3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,59 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,55 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,23 g/l
CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	0,18 g/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,046 g/l
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,019 g/l
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,032 g/l
CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	0,005 g/l
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,0035 g/l

Disolver en agua destilada. Ajustar pH 7,5 con NaOH 2 N.

**APÉNDICE H. MEDIO DEFINIDO PARA CULTIVO POR LOTE EN MATRAZ DE *Candida tropicalis***

El medio está diseñado para un crecimiento celular máximo de 3 g/l, utilizando glicerol como sustrato limitante y fuente de carbono y energía.

**Tabla H.1** Medio definido para *Candida tropicalis*

<b>Sustrato</b>	<b>Concentración</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,6 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,9 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1,25 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,12 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,09 g/l
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,019 g/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,032 g/l
CoCl <sub>2</sub>	0,003 g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,003 g/l
MoO <sub>3</sub>	0,002 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,005 g/l
Glicerol 87%	6,4 g/l
Pool de vitaminas	4 ml/l

**Tabla H.2** Pool de Vitaminas

<b>Vitaminas</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Ácido fólico	0,01
Ácido Pantoténico	0,10
Biotina	0,0025
Niacina	0,34
Tiamina B1	0,025

El medio es preparado en agua destilada. Ajustar pH 6,0.

APÉNDICE I. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

A continuación se presentan la cinética de crecimiento celular de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* HNI 11, NR 17, PRQ 16 y PRQ 25

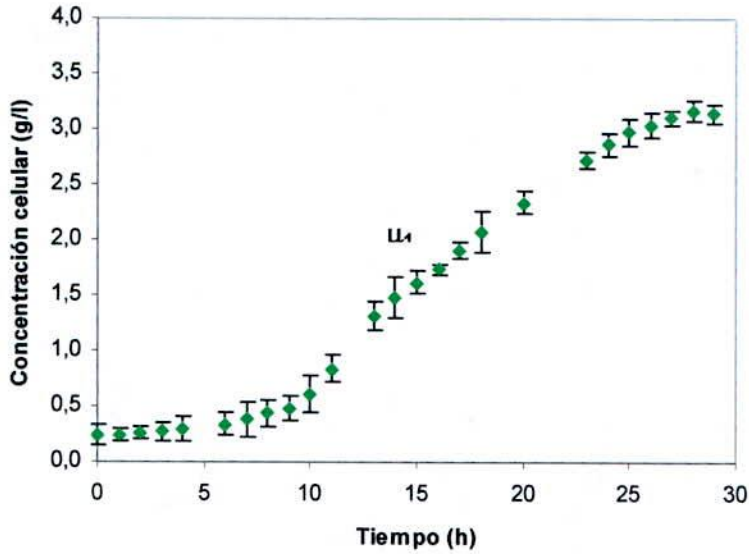


Figura I.1 Cinética de crecimiento celular *Candida tropicalis* ATCC 20336.

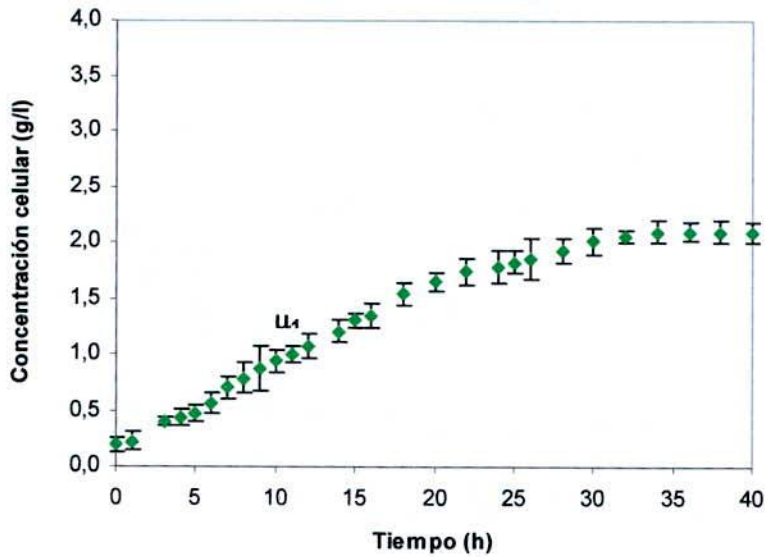


Figura I.2 Cinética de crecimiento celular *Thermus* AB1.

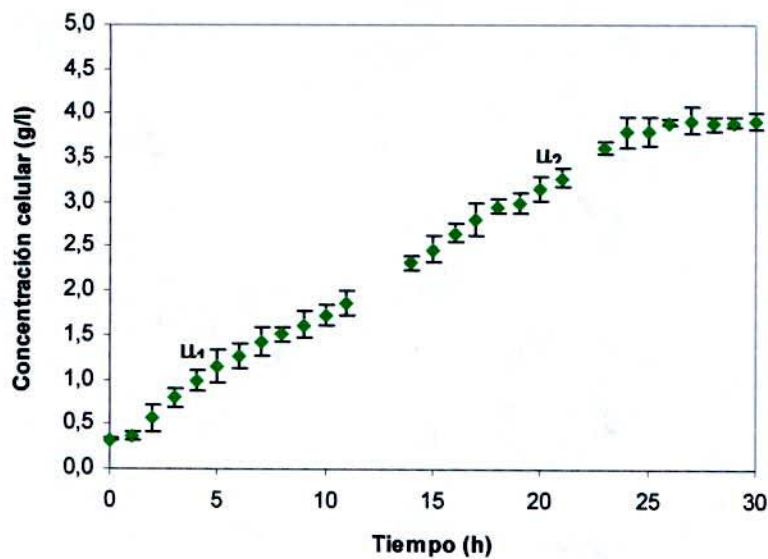


Figura I.3 Cinética de crescimento celular *Thermus thermophilus* HNI 11.

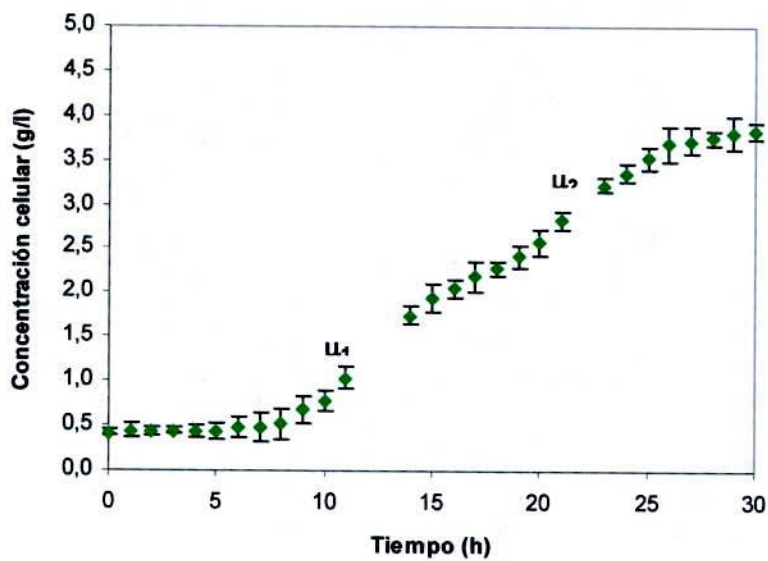


Figura I.4 Cinética de crescimento celular *Thermus thermophilus* NR 17.

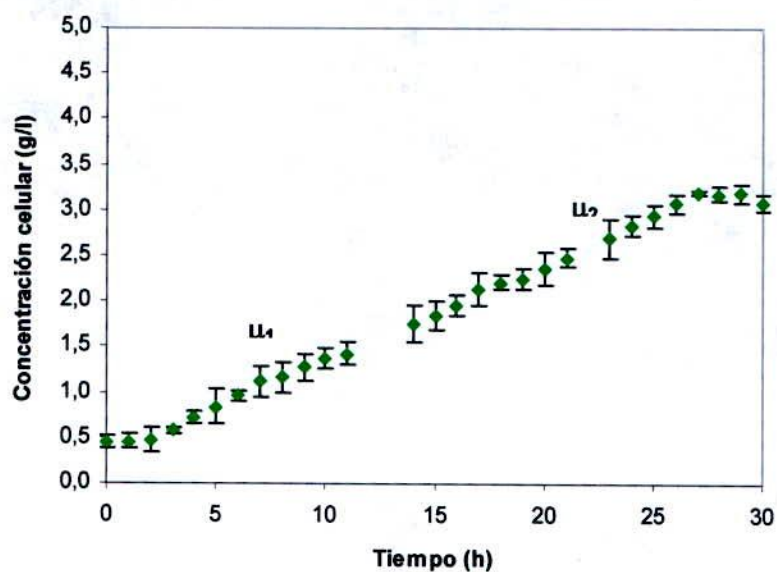


Figura I.5 Cinética de crecimiento celular *Thermus thermophilus* PRQ 16.

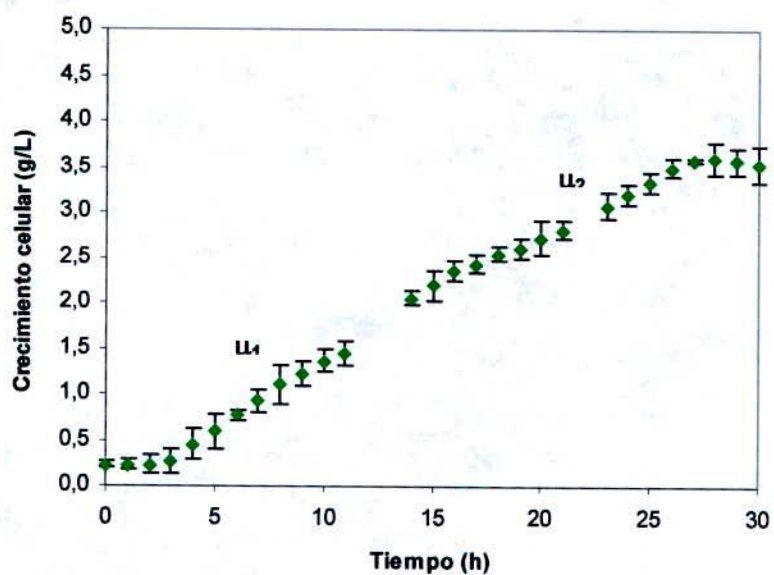


Figura I.6 Cinética de crecimiento celular *Thermus thermophilus* PRQ 25.

**APÉNDICE J. EJEMPLO DE CÁLCULO PARA OBTENER LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

El crecimiento de una población microbiana puede ser representado por (Wang et al., 1979):

$$\frac{dN}{dt} = \mu \times N \quad (\text{Ecuación J-1})$$

Donde:

$N$  = Concentración celular (células/ml)

$t$  = Tiempo (h)

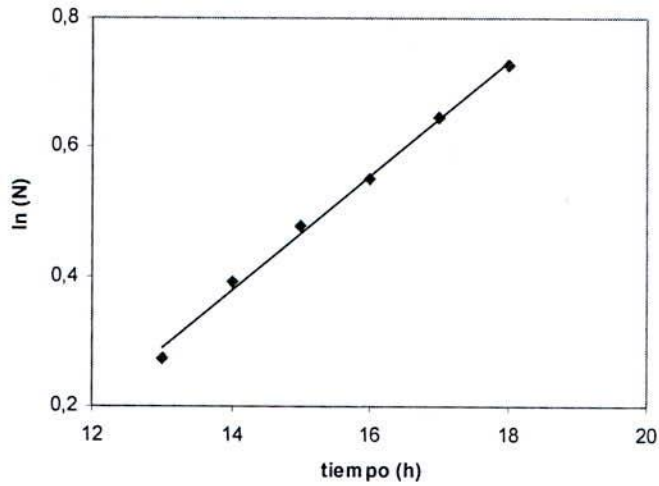
$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )

Durante la fase exponencial es posible integrar la Ecuación J.1, resultando.

$$\ln (N) = \mu \times t - \ln (N_o) \quad (\text{Ecuación J-2})$$

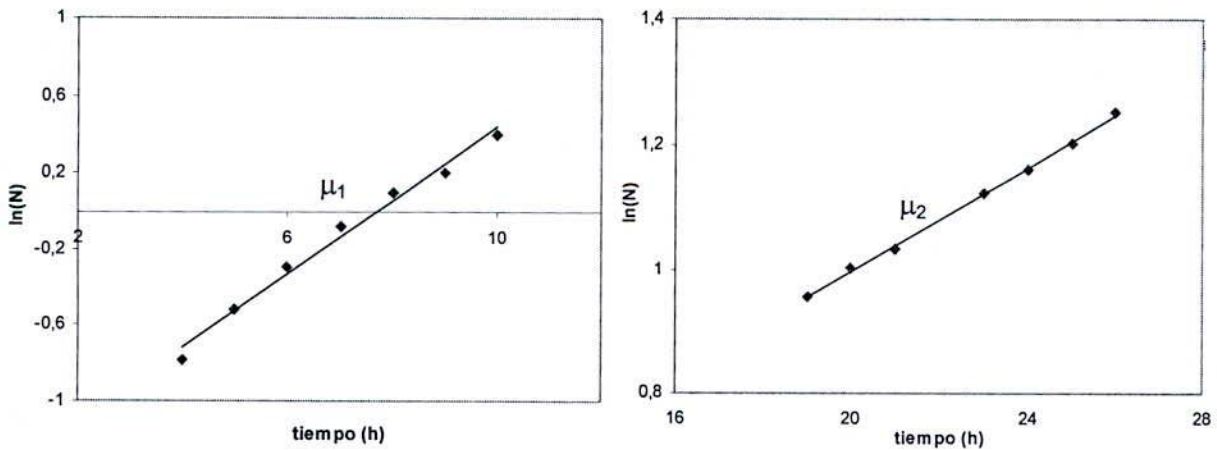
La velocidad específica de crecimiento es la pendiente de la recta descrita en la ecuación anterior, la que corresponde a una curva semilogarítmica.

En la Figura J.1 y J2 se observa la curva semilogarítmica de la cinética de crecimiento de *Candida tropicalis* y *Thermus thermophilus* PRQ 25.



**Figura J.1** Curva semilogarítmica para la determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Candida tropicalis* cultivada en medio definido.

Se obtiene que la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  es de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  con una regresión lineal ( $R^2$ ) de 0,994.



**Figura J.2** Curvas semilogarítmica para la determinación de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu_1$  y  $\mu_2$ ) de *Thermus thermophilus* PRQ 25 en medio Thermus en agua mineral.

Se obtiene que las velocidad específica de crecimiento  $\mu_1$  y  $\mu_2$  de  $0,18$  y  $0,04 \text{ h}^{-1}$ . Con valores de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0,997 y 0,999 respectivamente.

**APÉNDICE K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA SIMPLE**

Resumen del Procedimiento:

Variable dependiente: Columna 2 (microorganismo con su inductor y sustrato enzimático)

Factor: Columna 1 (actividad específica sobre el sustrato enzimático)

Número de observaciones: 212

Número de niveles: 106

Este procedimiento realiza un análisis de la varianza simple para la Columna 2. Compara los valores medios de la Columna 2 para los 106 diferentes niveles de la Columna 1. El cociente-F en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.

**Tabla K1** ANOVA (Análisis de Varianza) para Columna 2 según Columna 1:

Fuente	Sumas de cuadrados	grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	173669,0	105	1653,99	1571,42	0,0000
Intra grupos	111,57	106	1,05255		
Total (Corr.)	173780,0	211			

La tabla ANOVA descompone la varianza de la Columna 2 en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El cociente -F, que en este caso es igual a 1571,42, es el cociente de la estimación entre grupos y dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la Columna 2 de un nivel de la Columna 1 a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar si las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se realizó el Tests de Rangos Múltiples de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

Una vez que se sabe que las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar que medias que son significativamente diferentes unas de otras con un 95% de confianza. La tabla K2 presenta los resultados de la comparación múltiple, dentro de cada columna los niveles que tienen signo x forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas, de esta forma se identificaron 57 grupos homogéneos según la alineación del signo x en la columna.

Este Test de Rangos Múltiples ordena los microorganismos inducidos en forma ascendente, desde el microorganismo inducido que generó la enzima con menor velocidad de oxidación al microorganismo inducido que generó la enzima con mayor velocidad de oxidación sobre tetradecanol, docosanol y tetracosanol. Observando que *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 y son los microorganismos que producen alcohol deshidrogenasa con mayor capacidad de oxidación sobre los tres sustratos de interés (tetradecanol, docosanol y tetracosanol) en relación al resto de los microorganismos estudiados, y que los mejores agentes inductores para *Candida tropicalis* ATCC20336, *Thermus* AB1 y *Thermus thermophilus* PRQ 25 son hexadecanol, docosanol (C22OH) y eicosanol respectivamente.

**Tabla K2** Contraste Múltiple de Rango para Columna 2 según Columna1

**Método: 95,0 porcentajes LSD**

Columna 1 (Microorganismo, inductor, Sustrato enzimático)	Columna 2 (media) (actividad específica) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína	Grupos homogéneos
PRQ16 eicosanol, tetradecanol	1,1	x
NR17 tetradecano, docosanol	1,5	xx
HB27 tetracosanol, docosanol	1,6	xx
AB1 docosanol, tetradecanol	1,9	xxx
AB1 heptadecano, docosanol	2,2	xxxx
NR17 tetradecano, tetradecanol	2,3	xxxx
PRQ16 docosanol, tetradecanol	2,6	xxxxx
HB27 octadecano, docosanol	3,2	xxxxx
AB1 eicosanol, docosanol	3,8	xxxxx
NR17 heptadecano, docosanol	4,1	xxxxx
ATCC tetracosanol, docosanol	4,2	xxxxxx
AB1 etanol, docosanol	4,4	xxxxxx
PRQ16 docosanol, tetracosanol	4,5	xxxxxx
ATCC tetracosanol, tetracosanol	5,0	xxxxxx
NR17 octadecanol, tetracosanol	5,0	xxxxxx
NR17 octadecanol, docosanol	5,2	xxxxxxx
ATCC docosanol, tetradecanol	5,3	xxxxxxx

# APÉNDICE

## Continuación Tabla K2

Método: 95,0 porcentaje LSD

Columna 1 (Microorganismo, inductor, Sustrato enzimático)	Columna 2 (media) (actividad específica) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína	Grupos homogéneos
NR17 heptadecano, tetracosanol	5,4	xxxxxx
ATCC docosanol, docosanol	5,4	xxxxxx
NR17 docosano, tetracosanol	5,5	xxxxxx
HB27 eicosanol, docosanol	5,8	xxxxxx
NR17 tetradecano, docosanol	5,9	xxxxxxx
HB27 tetracosanol, docosanol	6,2	xxxxxxx
ATCC docosanol, tetracosanol	6,4	xxxxxx
AB1 eicosanol, tetracosanol	6,9	xxxxxx
NR17 docosano, docosanol	7,0	xxxxxxx
NR17 tetracosano, tetracosanol	7,1	xxxxxxx
HB27 tetradecanol, tetracosanol	7,7	xxxxxxx
AB1 etanol, tetracosanol	7,7	xxxxxxx
NR17 docosanol, docosanol	7,8	xxxxxxxx
NR17 docosanol, tetracosanol	7,8	xxxxxxxx
HB27 tetracosano, docosanol	7,9	xxxxxxxx
HB27 tetracosanol, tetracosanol	7,9	xxxxxxxx
PRQ25 tetradecano, tetracosanol	8,1	xxxxxxx
AB1 octadecano, docosanol	8,5	xxxxxxx
PRQ16 tetracosanol, docosanol	8,8	xxxxxxxx
HB27 docosanol, docosanol	8,8	xxxxxxxx
NR17 tetracosanol, docosanol	8,8	xxxxxxxx
PRQ25 tetracosanol, tetradecanol	8,9	xxxxxxxx
HB27 docosano, docosanol	8,9	xxxxxxxx
PRQ16 tetradecano, docosanol	9,0	xxxxxxx
PRQ16 tetradecano, tetracosanol	9,1	xxxxxxx
PRQ16 docosanol, docosanol	9,4	xxxxxxx
PRQ16 tetracosano, docosanol	9,7	xxxxxxxx
PRQ16 tetracosanol, tetracosanol	9,7	xxxxxxxx
PRQ16 heptadecano, tetracosanol	9,8	xxxxxxx
PRQ16 heptadecano, docosanol	9,8	xxxxxxx
HB27 heptadecano, docosanol	9,9	xxxxxx
PRQ16 eicosanol, tetracosanol	10,4	xxxxx
NR17 eicosanol, docosanol	10,5	xxxxxx
PRQ16 octadecano, docosanol	10,5	xxxxxx
NR17 eicosanol, tetracosanol	10,8	xxxxxx
PRQ16 docosano, docosanol	10,8	xxxxxx
PRQ16 octadecano, tetracosanol	11,1	xxxxx
AB1 tetradecano, tetradecanol	11,1	xxxxx
AB1 octadecano, tetracosanol	11,3	xxxxx
PRQ25 docosanol, tetradecanol	11,6	xxxx
AB1 heptadecano, tetracosanol	12,5	xxxx
HB27 octadecano, tetracosanol	12,8	xxx
HNI 11 docosanol, docosanol	13,4	xxx
HB27 heptadecano, tetracosanol	14,0	xxx
HB27 docosano, tetracosanol	14,5	xxxx
<b>PRQ25 eicosanol, tetradecanol</b>	<b>15,0</b>	<b>xxxx</b>
HNI 11 docosanol, tetracosanol	15,1	xxxx
AB1 tetracosanol, docosanol	15,5	xxx
PRQ16 tetracosano, tetracosanol	15,5	xxx
PRQ16 docosano, tetracosanol	15,6	xxx
<b>AB1 tetracosanol, tetradecanol</b>	<b>15,7</b>	<b>xxx</b>

Continuación Tabla K2

Método: 95,0 porcentaje LSD

Columna 1 (Microorganismo, inductor, Sustrato enzimático)	Columna 2 (media) (actividad específica) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína	Grupos homogéneos
PRQ25 docosanol, tetracosanol	15,7	xxx
PRQ25 docosano, docosanol	15,7	xxx
AB1 tetracosano, docosanol	16,2	xxx
HNI 11 octadecano, tetracosanol	16,3	xxxx
PRQ16 eicosanol, docosanol	16,4	xxxx
AB1 docosano, tetracosanol	16,8	xxxx
HB27 eicosanol, tetracosanol	16,8	xxxx
HNI 11 tetradecanol, docosanol	17,8	xxxx
HB27 tetracosano, tetracosanol	18,1	xxxxx
PRQ25 octadecano, docosanol	18,3	xxxx
AB1 tetradecano, tetracosanol	18,7	xxxx
HNI 11 octadecano, docosanol	18,8	xxxx
PRQ16 eicosanol, tetradecanol	19,0	xxxx
HNI 11 tetracosanol, tetracosanol	19,3	xxxx
HNI 11 tetracosano, docosanol	19,7	xxxxx
HNI 11 docosano, tetracosanol	20,1	xxxx
AB1 docosanol, docosanol	20,4	xxxx
PRQ25 tetracosanol, docosanol	20,9	xxx
HNI 11 tetracosano, tetracosanol	21,0	xxx
HNI 11 docosano, docosanol	21,4	xx
PRQ25 tetracosanol, tetracosanol	21,6	xx
PRQ25 octadecano, tetracosanol	22,2	xx
PRQ25 docosanol, docosanol	24,1	xx
PRQ25 tetradecano, docosanol	25,2	xx
AB1 tetracosanol, tetracosanol	25,8	xxx
PRQ25 heptadecano, docosanol	26,8	xx
PRQ25 tetracosano, docosanol	27,2	xxx
PRQ25 eicosanol, docosanol	27,4	xx
AB1 docosano, docosanol	29,2	xx
PRQ25 tetracosano, tetracosanol	30,1	xx
PRQ25 heptadecano, tetracosanol	31,3	xx
PRQ25 docosano, tetracosanol	32,4	xx
PRQ16 hexadecanol, tetradecanol	33,5	x
PRQ25 eicosanol, tetracosanol	36,4	x
AB1 docosanol, tetracosanol	42,9	x
ATCC hexadecanol, tetradecanol	86,6	x
ATCC hexadecanol, docosanol	196,9	x
ATCC hexadecanol, tetracosanol	218,8	x

APÉNDICE L. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LAS ELECTROFORESIS SDS PAGE

La densitometría de las electroforesis fue realizado por análisis de imagen con programa Gel Pro 3.0 analyzer.

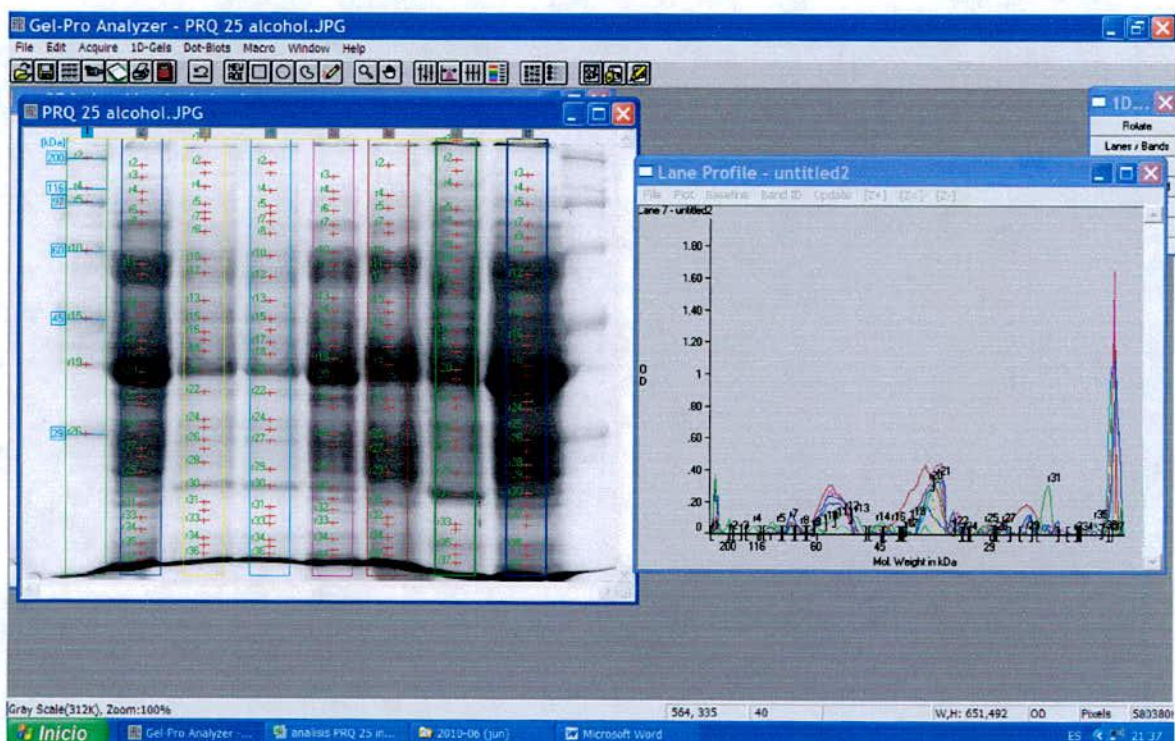
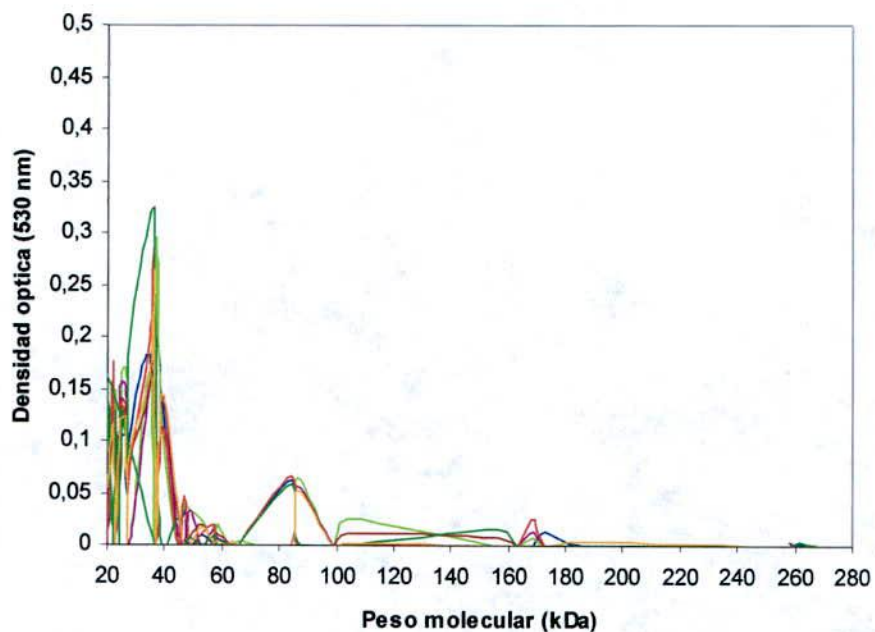
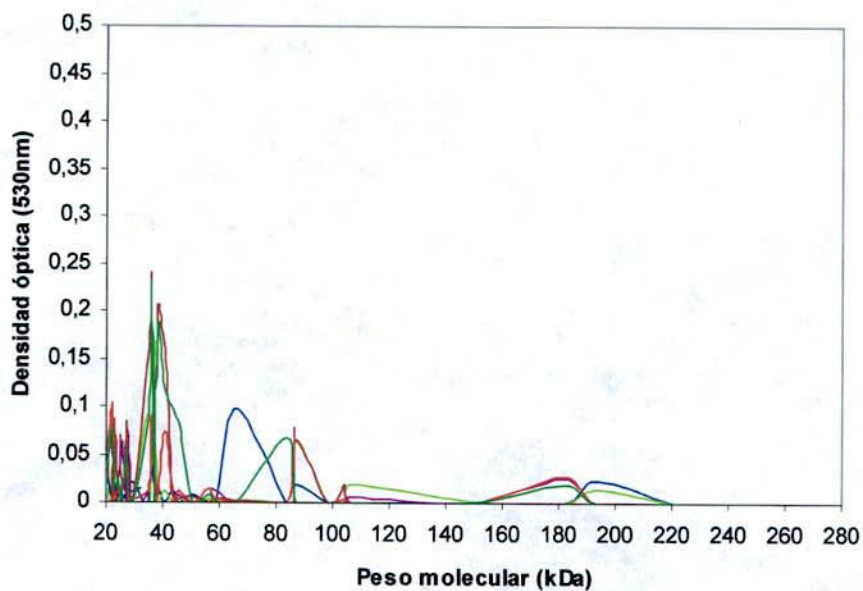


Figura L.1 Programa Gel Pro 3.0 analyzer

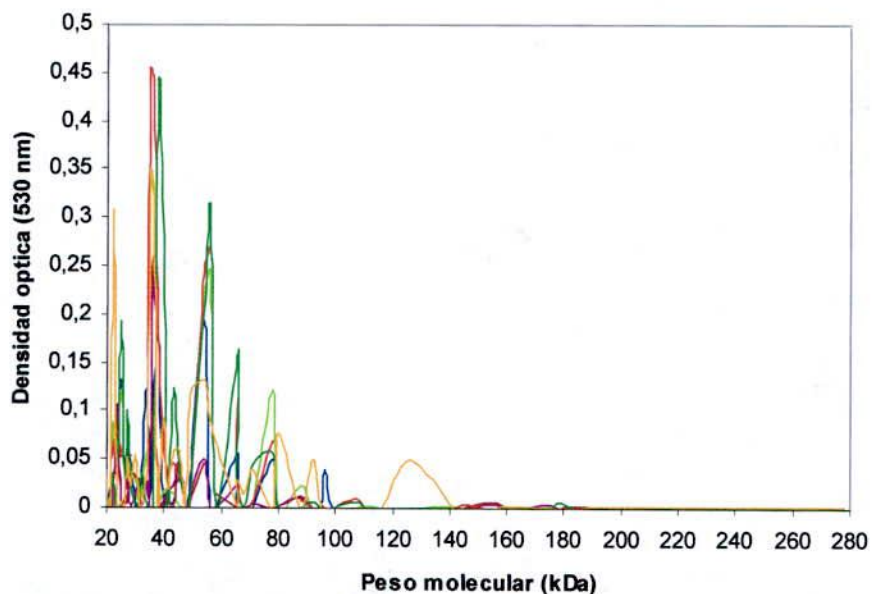
La Figuras L.2 a la L.7, muestran las curvas del análisis densitométrico del perfil proteico del extracto crudo de *Candida tropicalis* ATCC 20336, *Thermus thermophilus* PRQ 25 y *Thermus* AB1 inducidos con alcoholes y alcanos.



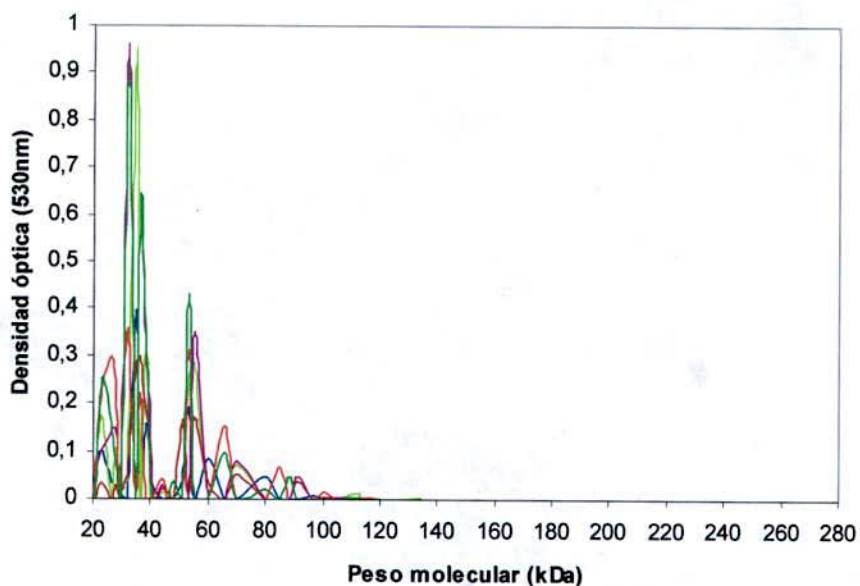
**Figura L.2** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Candida tropicalis* inducido con alcoholes (—) sin inductor, (—) etanol, (—) tetradecanol, (—) hexadecanol, (—) eicosanol, (—) Docosanol, (—) tetracosanol.



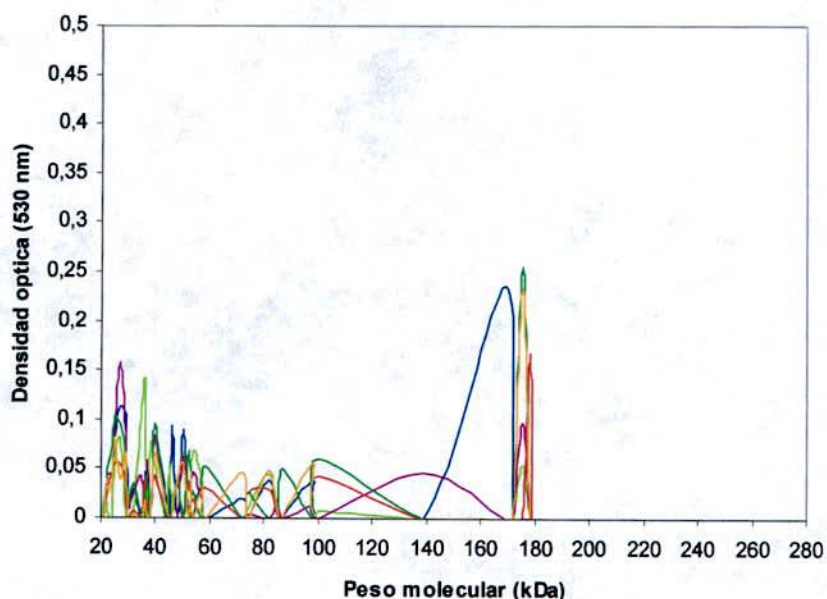
**Figura L.3** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Candida tropicalis* inducido con alcanos (—) sin inductor, (—) tetradecano (—) heptadecano, (—) octadecano, (—) docosano, (—) tetracosano.



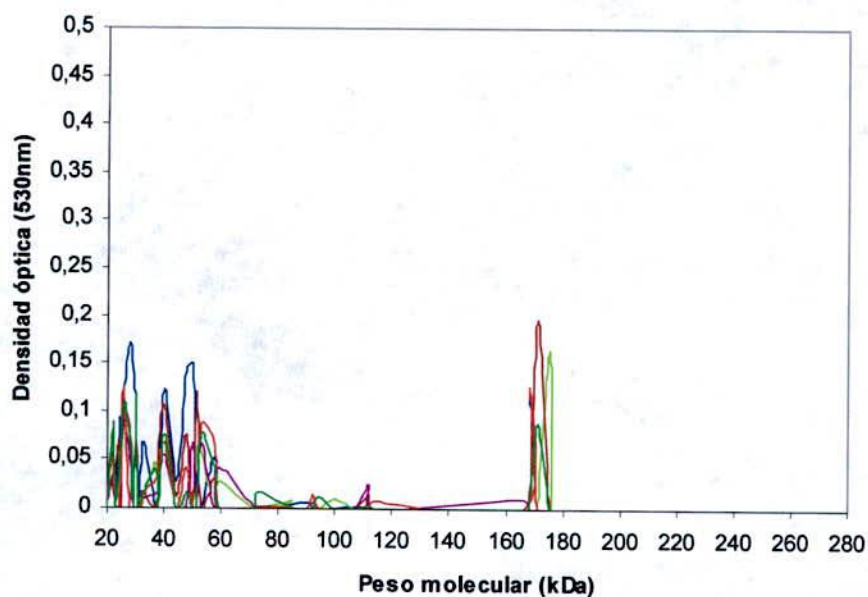
**Figura L.4** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducido con alcoholes (—) sin inductor, (—) etanol, (—) tetradecanol, (—) hexadecanol, (—) eicosanol, (—) docosanol, (—) tetracosanol.



**Figura L.5** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Thermus thermophilus* PRQ 25 inducido con alcanos (—) sin inductor, (—) tetradecano (—) heptadecano, (—) octadecano, (—) docosano, (—) tetracosano.



**Figura L.6** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Thermus* AB1 inducido con alcoholes (—) sin inductor, (—) etanol, (—) hexadecanol, (—) eicosanol, (—) docosanol, (—) tetracosanol.

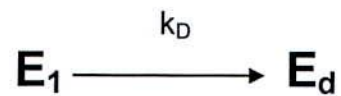


**Figura L.7** Densitometría del perfil electroforético de extracto crudo *Thermus* AB1 inducido con alcanos (—) sin inductor, (—) tetradecano (—) heptadecano, (—) octadecano, (—) docosano, (—) tetracosano.

**APÉNDICE M. MODELO DE INACTIVACIÓN**

**Modelo de inactivación de primer orden (Monofásico):**

Este modelo es el más utilizado para describir el comportamiento de inactivación de enzimas en solución. Esta cinética se atribuye a la ruptura en un solo paso de los enlaces que sostienen la estructura espacial de la proteína (Henley y Saldana 1985) y es representada según el siguiente mecanismo, que considera un estado final completamente inactivo ( $E_d$ )



**Figura M.1** Esquema de inactivación enzimática de primer orden.

La ecuación que modela este comportamiento está dada por:

$$\frac{e}{e_0} = \exp(-k_D \cdot t) \quad (\text{Ecuación M-1})$$

Donde:

$E_i$  = especie enzimática

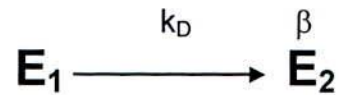
$e$  = actividad enzimática al tiempo  $t$ .

$e_0$  = actividad enzimática inicial o a tiempo cero.

$k_D$  = constante de velocidad de inactivación de primer orden ( $h^{-1}$ ).

**Modelo de inactivación de primer orden con actividad residual:**

El mecanismo de inactivación considera que el biocatalizador se inactiva siguiendo un modelo de primer orden, donde la actividad enzimática final ( $E_2$ ) es distinta de cero (Ladero *et al*, 2005). La enzima sufre una rápida inactivación inicial, para luego estabilizarse en un valor de actividad mayor que cero. Este mecanismo sigue el siguiente esquema:



**Figura M.2** Esquema de inactivación enzimática de primer orden con actividad residual.

La ecuación que modela este comportamiento está dada por:

$$\frac{e}{e_0} = (1 - \beta) \cdot \exp(-k_D \cdot t) + \beta \quad (\text{Ecuación M-2})$$

Donde:

$E_i$  = especie enzimática

$e$  = actividad enzimática al tiempo  $t$ .

$e_0$  = actividad enzimática inicial o a tiempo cero.

$k_D$  = constante de velocidad de inactivación de primer orden ( $h^{-1}$ ).

$\beta$  = actividad específica molar, especie  $E_2$ .