

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICLOHEXANONA MONOOXIGENASA EN  
CEPAS FÚNGICAS Y POSTERIOR OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES  
DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTA ENZIMA.**

**Elaborado por:**

Univ. Juan Pablo Apaza Paco

**Asesores:**

M.sc. Georgina A. Chávez Lizárraga

Lic. Christian R. Espinal Churata

Luis E. Terrazas Siles PhD.

**(TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUÍMICA)**

**La Paz –Bolivia**

**2011**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICLOHEXANONA MONOOXIGENASA EN  
CEPAS FÚNGICAS Y POSTERIOR OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES  
DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTA ENZIMA.**

**Elaborado por:**

Univ. Juan Pablo Apaza Paco

**Área:**

Biología Fúngica

**(TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUÍMICA)**

**La Paz –Bolivia**

**2011**

“La imaginación  
es más importante  
que el conocimiento”

***Albert Einstein.***

“No es que sea inteligente,  
simplemente me estoy con  
los problemas más tiempo”

***Albert Einstein.***

## **AGRADECIMIENTOS.**

A Dios por ser tan generoso conmigo y mi familia.

A la cooperación ASDI/SAREC, por el apoyo económico que brinda al proyecto “Diversidad Microbiana”.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (*mi escuelita*) por haberme permitido formarme como profesional, con el fin de servir a mi sociedad.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco y Bioquímicas, por la dotación de ambientes para la elaboración de este trabajo.

A mi asesora, Georgina Chávez Lizárraga por el apoyo brindado en todo momento.

A mi asesor, Lic. Christian Espinal Churata, gracias, por el apoyo brindado en el laboratorio, por las sugerencias, por compartir su conocimiento y amistad.

A mi asesor, profesor Enrique Terrazas, gracias, por los consejos y por el apoyo desinteresado que me brindo.

A mis tribunales, por los consejos y el ánimo impartido en todo momento.

A la Doctora María Teresa Álvarez y Víctor Hugo Caveró por compartir su amistad y conocimiento.

A mis grandes amigos Cervando Gutiérrez y Darío Ayca, gracias por el apoyo brindado.

A los compañeros del Instituto: Rosalía Limachi, Oscar Cárdenas, Reynaldo Tenorio, Julio Gutiérrez, Julio Vallejos, Crispín, Boris, Irma, Don Primo, gracias, por el apoyo.

A Luis, Eliseo, Edgar, Ismael, Daniel, Max, Germán, Arce; que siempre me dieron ese apoyo moral que uno requiere para seguir adelante cada día, de todo corazón muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

### RESUMEN

### ABSTRACT

	Pág.
<b>I INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>II ANTECEDENTES.</b>	<b>4</b>
<b>III OBJETIVOS.</b>	<b>5</b>
3.1 Objetivo general.	5
3.2 Objetivos específicos.	5
<b>IV JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>6</b>
<b>V MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
5.1 Microorganismos Fúngicos.	8
5.1.1 Estructura.	8
5.1.2 Morfología.	10
5.1.3 Identificación.	10
5.1.4 Metabolismo.	11
5.1.5 Factores que influyen en el crecimiento.	11
5.1.5.1 Fuente de carbono.	11
5.1.5.2 Fuente de nitrógeno.	12
5.1.5.3 pH.	12
5.1.5.4 Temperatura y Actividad de agua.	13
5.1.5.5 Aireación.	14
5.1.5.6 Compuestos xenobióticos.	16
5.1.5.7 Luz.	17
5.2 Utilidad de las enzimas fúngicas.	17
5.2.1 Tecnología enzimática.	17
5.2.2 Las enzimas como catalizadores.	18
5.2.3 Aplicaciones industriales.	18
5.2.3.1 Producción de alimentos.	19
5.2.3.2 Producción de energía.	19
5.2.3.3 Tratamiento de desechos.	20
5.3 Baeyer-Villiger Monooxigenasas.	20
5.3.1 Bayer- Villiger monooxigenasas tipo I y tipo II.	20
5.3.2 Especificidad de las monooxigenasas.	22
5.3.3 Identificación de la actividad Bayer-Villiger monooxigenasa.	23
5.3.3.1 Viraje de indicador.	23
5.3.3.2 Formación de complejos coloreados.	23
5.3.3.3 Depleción de cofactor.	23

5.3.4	Ciclohexanona monooxigenasa y su aplicació	23
5.3.4.1	Generalidades.	24
5.3.4.2	Ciclohexanona.	24
5.3.4.3	Ruta metabólica de asimilación de ciclohexanona por los microorganismos	25
5.3.4.4	Aplicación de $\epsilon$ -caprolactona y ácido adípico en la industria.	25
5.3.4.4.1	$\epsilon$ -Caprolactona.	27
5.3.4.4.2	Ácido Adípico	27
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	29
6.1	Procedencia de las cepas.	30
6.2	Reactivación de cepas fúngicas.	30
6.3	Aislamiento de cepas de levaduras.	30
6.4	Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.	30
6.4.1	Hongos filamentosos.	30
6.4.1.1	Concentración de esporas.	30
6.4.2	Levaduras.	31
6.5	Análisis de la actividad CHMO.	31
6.5.1	Análisis cualitativo por viraje de indicador.	31
6.5.2	Análisis cuantitativo.	31
6.5.2.1	Medición del consumo de ciclohexanona como sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos.	31
6.5.2.2	Medición del consumo de ciclohexanona como sustrato por ensayo colorimétrico en levaduras.	32
6.6	Comparación de diferentes técnicas de lisado.	32
6.6.1	Agitación mecánica con perlas de vidrio.	32
6.6.2	Lisis por ebullición en presencia de álcalis fuerte.	33
6.6.3	Lisis por ebullición en presencia de SDS.	33
6.7	Medición de la depleción de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).	33
6.8	Cálculo de la actividad enzimática (UI).	34
6.9	Comparación de la velocidad de consumo de sustrato.	35
6.10	Identificación macroscópica y microscópica de la cepa seleccionada.	35
6.10.1	Observación macroscópica.	35
6.10.2	Observación microscópica.	36
6.11	Influencia de los parámetros químicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.	36
6.11.1	Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono.	36

6.11.2	Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno.	36
6.12	Influencia de los parámetros físicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.	37
6.12.1	Influencia de la temperatura en la actividad CHMO en esporas.	37
6.12.2	Influencia de la temperatura en la actividad CHMO en biomasa.	37
6.12.3	Influencia de la aireación en la actividad CHMO.	38
6.12.4	Influencia de la agitación por magnetos en la actividad CHMO.	38
6.13	Influencia de inductores fisicoquímicos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.	38
6.13.1	Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes compuestos xenobióticos.	38
6.13.2	Influencia de la luz sobre la actividad CHMO a diferentes longitudes de onda, empleando filtros de color.	39
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.</b>	40
7.1	Cultivo de los hongos filamentosos.	40
7.2	Aislamiento de cepas de levaduras.	40
7.3	Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.	40
7.4	Análisis de la actividad ciclohexanona monooxigenasa.	41
7.4.1	Análisis cualitativo por viraje de indicador.	41
7.5	Análisis cuantitativo.	42
7.5.1	Medición del consumo de sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos y levaduras.	42
7.6	Comparación de diferentes técnicas de lisado.	46
7.7	Medición de la depleción de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).	47
7.8	Identificación de la cepa 177QD	47
7.8.1	Características macroscópicas de la cepa 177QD.	48
7.8.2	Identificación microscópica de la cepa 177QD.	49
7.9	Influencia de los parámetros químicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.	49
7.9.1	Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono.	52
7.9.2	Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno.	55
7.10	Influencia de los parámetros físicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.	55
7.10.1	Influencia de la temperatura en la actividad CHMO con esporas y biomasa en la cepa 177QD.	58
7.10.2	Influencia de la aireación en la actividad CHMO.	60

7.10.3	Influencia de la agitación por magnetos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.	63
7.11	Influencia de inductores fisicoquímicos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.	63
7.11.1	Influencia sobre la actividad enzimática empleando diferentes compuestos xenobióticos.	66
7.11.2	Influencia de la luz sobre la actividad CHMO diferentes longitudes de onda, empleando filtros de color.	68
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	69
<b>IX</b>	<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.</b>	70
<b>X</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	71
	<b>ANEXOS</b>	



## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Características de los grupos/secciones de <i>Aspergillus</i> .	9
Tabla 2.	Temperatura y actividad de agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de <i>Aspergillus</i> .	13
Tabla 3.	Características físico-químicas de la ciclohexanona.	25
Tabla 4.	Ensayo cuantitativo de la depleción de cofactor NADPH.	34
Tabla 5.	Evaluación de la actividad CHMO en cepas fúngicas	41
Tabla 6.	Selección de la mejor cepa con respecto al consumo de ciclohexanona como sustrato en las cepas: 177QD; 14QJG; 7QJR.	43
Tabla 7.	Comparación de técnicas de lisado en biomasa de la cepa 177QD.	44
Tabla 8.	ANOVA de doble vía: Proteínas totales versus Técnicas de lisado; Tiempo.	46
Tabla 9.	Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono en la cepa 177QD.	50
Tabla 10.	ANOVA de doble vía : Actividad enzimática versus Concentración de glucosa; Tiempo.	51
Tabla 11.	Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno en la cepa 177QD.	53
Tabla 12.	ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Fuente de nitrógeno; Tiempo.	54
Tabla 13.	Influencia de la temperatura en el consumo de ciclohexanona como sustrato en propágulos y biomasa de la cepa 177QD.	56
Tabla 14.	ANOVA de doble vía: Consumo de sustrato versus Temperatura; Tiempo (esporas y biomasa).	57
Tabla 15.	Influencia de la aireación sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.	58

Tabla 16.	ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Concentración glucosa; Tiempo.	60
Tabla 17.	Influencia de la agitación con magnetos sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.	61
Tabla 18.	ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Concentración de glucosa en agitación; Tiempo.	62
Tabla 19.	Influencia sobre la actividad CHMO por efecto de compuestos xenobióticos de la cepa 177QD.	63
Tabla 20.	ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Compuestos xenobióticos; Tiempo.	65
Tabla 21.	Influencia de la luz sobre la actividad CHMO por el paso de diferentes longitudes de onda en la cepa 177QD.	67
Tabla 22.	ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Filtros de luz; Tiempo.	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características microscópicas de los <i>Aspergillus</i> .	9
Figura 2. Biotransformación de un compuesto xenobiótico por acción de una monooxigenasa.	14
Figura 3. Mecanismo de la catálisis del citocromo P450.	15
Figura 4. Sustratos específicos para las diferentes Baeyer-Villiger monooxigenasas: ciclohexanona monooxigenasa (CHMO), ciclopentano monooxigenasa (CPMO), 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) y fenilacetona monooxigenasa (PAMO).	21
Figura 5. Regeneración de cofactor por acoplamiento de sustrato.	22
Figura 6. Conversión enzimática de ciclohexanona a caprolactona.	24
Figura 7. Ciclohexanona como producto intermedio, en el metabolismo anaeróbico y aeróbico de compuestos cíclicos en los microorganismos.	26
Figura 8. Análisis cualitativo basado en el viraje de indicador para la detección de lactonas producidas por la cepa 177QD.	42
Figura 9. Comparación de la velocidad de consumo de sustrato entre las cepas 177QD; 14QJG; QGJR.	43
Figura 10. Comparación de técnicas de lisado a diferentes tiempos en biomasa de la cepa 177QD.	45
Figura 11. Depleción de cofactor NADPH a 340 nm de la cepa 177QD.	47
Figura 12. Características macroscópicas en placas de PDA donde se observa el desarrollo de la cepa 177QD y se aprecia la coloración característica del hongo.	48
Figura 13. Características microscópicas cepa 177QD tomada a 100X.	49
Figura 14. Influencia de diferentes concentraciones de glucosa en la actividad CHMO en la cepa 177QD.	50
Figura 15. Superficie de respuesta de la Influencia de diferentes concentraciones de glucosa sobre la actividad CHMO.	51

Figura 16.	Evaluación de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.	53
Figura 17.	Superficie de respuesta sobre la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno (1: Peptona; 2: Control; 3: Nitrato de amonio; 4: Urea; 5: Molibdato de amonio; 6: Extracto de levadura) en la actividad CHMO en la cepa 177QD.	54
Figura 18.	Influencia de la temperatura en el consumo de ciclohexanona como sustrato en la cepa 177QD en esporas y biomasa.	56
Figura 19.	Superficie de respuesta de la influencia de la temperatura (4°C ; 22°C, 37°C ) en el consumo de ciclohexanona en la cepa 177QD.	57
Figura 20.	Influencia de la aireación sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa a diferentes días del desarrollo de la cepa 177QD.	59
Figura 21.	Superficie de respuesta en la influencia de la aireación, sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD a diferentes concentraciones de glucosa (1:15 g/L ; 2:30g/L ; 3:50g/L).	59
Figura 22.	Influencia de la agitación por magnetos sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.	61
Figura 23.	Superficie de respuesta en la influencia de la agitación por magnetos, sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD a diferentes concentraciones de glucosa (1:15 g/L ; 2:30g/L ; 3:50g/L).	62
Figura 24.	Influencia de compuestos xenobióticos sobre la actividad CHMO a diferentes días del desarrollo de la cepa 177QD.	64
Figura 25.	Superficie de respuesta en la actividad CHMO por medio de la inducción por compuestos xenobióticos (1: tabaco; 2: cafeína ; 3:benceno; 4:ácido hexanoico ; 5:éter de petróleo; 6:control) de la cepa 177QD.	65

- Figura 26. Influencia de la luz sobre la actividad CHMO por el paso de diferentes longitudes de onda en la cepa 177QD. 67
- Figura 27. Superficie de respuesta en la actividad CHMO por medio de la influencia de filtros de luz (1: azul; 2:verde; 3:rosado; 4:violeta ; 5:amarillo; 6:oscuridad; 7:transparente ; 8:rojo) de la cepa 177QD. 68

## TABLA DE ABREVIATURAS

**Atm:** átomos.

**°C:** Grados Celsius.

**CHMO:** Ciclohexanona  
monooxigenasa.

**BV:** Baeyer-Villiger.

**BVMO:** Baeyer-Villiger  
monooxigenasa.

**DNB:** Ácido dinitrobenzoico.

**DNS:** Ácido dinitrosalisílico.

**IIFB:** Instituto de Investigaciones  
Fármaco Bioquímicas.

**FCFB:** Facultad de Ciencias  
Farmacéuticas y Bioquímicas.

**FAD:** Flavin Adenina dinucleótido.

**FMN:** Flavin Mononucleótido.

**g:** gramo.

**KDa:** Kilo Dalton.

**NADPH:** Nicotinamida Adenina  
Dinucleótido Fosfato.

**M:** molar (1mol/1litro de disolvente)

**mg:** miligramo.

**mL:** mililitro.

**min:** minutos.

**mM:** milimolar

**nm:** nanómetro.

**PCL:** Policaprolactona.

**PDA:** Agar patata dextrosa.

**PDC:** Caldo patata dextrosa.

**prop:** propágulos.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**UI:** unidades internacionales.

**µl:** microlitro.

**µm:** micrómetro.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**ε :** símbolo épsilon.

**DF:** grados de libertad.

**SS:** sumatoria de cuadrados.

**MS:** media del cuadrado.

**F:** valor del coeficiente de Fisher.



## RESUMEN

Ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) cataliza la oxigenación nucleofílica de las moléculas lineales cetonas cíclicas, obteniendo así sus correspondientes lactonas, estas lactonas a nivel industrial son obtenidas por síntesis química ocasionando daños al medio ambiente. La finalidad del presente trabajo es identificar microorganismos con actividad ciclohexanona monooxigenasa y optimizar las condiciones de cultivo.

Se evaluó la actividad CHMO de 90 cepas fúngicas las cuales fueron divididas en dos grupos: 85 cepas de mohos que fueron obtenidas del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) y 5 cepas de levaduras las cuales fueron aisladas de tierras contaminadas con petróleo, obteniendo de allí 3 cepas con actividad enzimática, de las cuales, por consumo de sustrato se seleccionó la cepa 177QD. Se procedió a identificar la cepa por sus características macroscópicas y microscópicas relacionándose con *Aspergillus flavus*.

Posteriormente se procedió a optimizar las condiciones de cultivo de la cepa 177QD. En los factores químicos de cultivo se determinó que la concentración de glucosa ideal es de 30 g/L, obteniendo una actividad de 91 UI/L al cuarto día de cultivo, además se observó que con molibdato de amonio se obtiene una actividad de 109 UI/L al primer día de cultivo. Sobre los factores físicos se observó que la temperatura ideal para el consumo de ciclohexanona como sustrato es de 22°C y 37°C con propágulos o biomasa indiferentemente; se determinó que el suministro de oxígeno es importante para la actividad enzimática, obteniéndose 152 UI/L al primer día de cultivo al someterlo a un sistema de aireación con la presencia de glucosa a una concentración de 30 g/L. Además se observó que la agitación con magnetos disminuye la actividad enzimática. Por medio de la inducción química se obtuvo 103 UI/L al segundo día de cultivo al añadir cafeína a una concentración 20 µL/mL, 149 UI/L al segundo día de cultivo con el filtro de luz de color amarillo.

**Palabras clave:** Ciclohexanona monooxigenasa, microorganismos fúngicos, parámetros fisicoquímicos.



IIFB.

## ABSTRACT

Cyclohexanone monooxygenase (CHMO) catalyses the nucleophilic oxygen molecules linear or cyclic ketones, thus obtaining the corresponding lactones, these lactones are obtained on an industrial scale by chemical synthesis and damage the environment. The purpose of this study is to identify active microorganisms cyclohexanone monooxygenase and optimize the culture conditions. CHMO activity was evaluated from 90 fungal strains which were divided into two groups: 85 strains of molds that were obtained from Cepari Drug Research Institute Biochemical (IIFB) and 5 yeast strains which were isolated from soil contaminated with oil, and 3 strains obtained with enzyme activity, which by substrate consumption 177QD strain was selected. We proceeded to identify the strain by its macroscopic and microscopic features which were related to *Aspergillus flavus*. Then we proceeded to optimize the culture conditions 177QD strain. Chemical factors in culture was determined that the ideal glucose concentration is 30 g / L, with an activity of 91 IU / L on the fourth day of cultivation, it was observed that ammonium molybdate is obtained an activity of 109 IU / L the first day of culture. On the physical factors was observed that the ideal temperature for consumption of cyclohexanone as substrate is 22 ° C and 37 ° C with propagules or biomass regardless, it was determined that the oxygen supply is important for enzyme activity, resulting in 152 IU / L the first day culture when subjected to an aeration system in the presence of glucose at a concentration of 30 g / L. It was also noted that the agitation with magnets decreases enzyme activity. Through physical and chemical induction was obtained 103UI / L the second day of culture by adding caffeine to a concentration of 20 uL / mL and 149UI / L the second day of culture with filter yellow light.

**Key words:** Cyclohexanone monooxygenase, fungal organisms, physicochemical parameters.





## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.**

La búsqueda de microorganismos que lleven adelante la transformación enzimática (biotransformación) de moléculas de interés industrial, llama la atención de muchos investigadores, porque los procesos mediados por éstos microorganismos no son nocivos para el medio ambiente y los productos obtenidos son biodegradables.

Actualmente en Bolivia, la producción de enzimas viene desarrollándose por los métodos de la biotecnología clásica el cual presenta dos etapas principales: la de fermentación; etapa en la cual el microorganismo se multiplica para concentrar la enzima y, la etapa de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso, este último en plena proyección, cuyo pionero es el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) desde el año 1999.

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, proteínas que tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. El desarrollo de métodos y técnicas para el desarrollo de estos procesos han sido un importante requisito para el avance en la enzimología en las últimas tres décadas y por muchos es considerada un arte.

Una de las aplicaciones en la industria está referido a emplearlos como agentes de biocontrol contra agentes patógenos en sembradíos agrícolas (Espinal et al., 2009), llevar adelante procesos de biorremediación de suelos (Mendoza et al., 2009). Los fermentos de los hongos filamentosos son empleados comercialmente para la producción de analitos de uso farmacéutico y bioquímico (Nandakumar, 1985).

Los mohos (hongos filamentosos) y levaduras, constituyen una clase de microorganismos de gran importancia comercial, por que sintetizan gran cantidad de enzimas así como enzimas Oxido/reductasas, (peroxidasa, lacasa); Hidrolíticas (quitinasa, celulasa, pectinasa) (Calle et al., 2007), son microorganismos eucariotas los cuales realizan la metabolización de los compuestos xenobioticos por medio del



citocromo P450, en el cual se llevan reacción de fase I y reacción de fase II, indicio de la presencia de actividad monooxigenasa.

La reacción de Baeyer-Villiger (BV) es un proceso muy conocido que consiste en la transformación de cetonas en ésteres o lactonas, el interés en la reacción se debe a que las enzimas que catalizan este proceso, son capaces de reconocer una gran variedad de sustratos, teniendo selectividad y especificidad sobre el grupo carbonilo, estas enzimas utilizan oxígeno molecular para mediar la oxigenación nucleofílica de las moléculas lineales o cetonas cíclicas, obteniendo sus correspondientes lactonas, teniendo la dependencia de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido (NADPH); el cual cumple la función de donador los electrones para activar la molécula de oxígeno.

Las monooxigenasas muestran una amplia especificidad de sustratos, cada uno tiene una cierta preferencia por un tipo específico. Mientras ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) y ciclopentano monooxigenasa (CPMO) son de gran actividad con una serie de cetonas cíclicas y alifáticas, 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) y fenilacetona monooxigenasa (PAMO) prefieren sustratos aromáticos (Torres et al., 2007). La monooxigenasa más estudiada hasta el momento es ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) (1.14.13.22) (Brzostowicz et al, 2002), que lleva adelante la oxidación de la ciclohexanona a  $\epsilon$ -caprolactona, como producto intermediario llegando hasta ácido adípico como producto final.

Este proceso es de interés industrial porque el producto formado es ampliamente utilizado en la síntesis de policaprolactona (PCL) el cual es material biodegradable, que puede ser utilizado en la síntesis de bioplástico, material quirúrgico, nanocápsulas, esta última como vehículo de administración de ciertos principios activos contra el cáncer (Amaral et al., 2009).

Se debe de contar con técnicas que nos muestren la acción directa de la enzima o la formación del producto de interés, describiéndose una gran variedad desde muy sencillas y económicas hasta muy complejas y costosas (Watts et al., 2001), las cuales pueden ser: por viraje de indicador, disminución en la absorbancia del



IIFB.

sustrato, decremento en la absorción del cofactor NADPH a 340 nm, formación de complejos fluorescentes, cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), cromatografía gaseosa (GC).

La optimización de las condiciones de cultivo es primordial en cualquier proceso biológico debido al impacto en la economía del proceso y su viabilidad (Steven et al., 2001), a tal razón se deben combinar parámetros físicos y químicos, existiendo la posibilidad de inhibir el proceso o llegar a concentraciones de enzima muy satisfactorias.

El presente trabajo busca encontrar cepas de cultivos fúngicos con actividad ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) y posteriormente optimizar las condiciones de su cultivo para la producción de la enzima, dando inicio a una nueva línea de investigación dentro de nuestro medio.



## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.

La reacción de Baeyer-Villiger monooxigenasa (BVMOs) fue descrita por primera vez en 1899, posteriormente se trabajó a nivel de laboratorio por Carothers (1933), sometiendo a tratamiento químico a la ciclohexanona para producir nylon 6.6.

En el año 1970 se empieza a trabajar con monooxigenasas, Norris logra purificar la enzima ciclohexanona monooxigenasa a partir de *Nocardia globerula* CL1, proponiendo un peso molecular promedio de 53 KDa.

En 1997 Willetts, llegó a la conclusión por medio de la cuidadosa inspección de todos los datos disponibles sobre la bioquímica de estas enzimas, que existen dos tipos de monooxigenasas que catalizan la reacción de Baeyer-Villiger (BV); las de tipo I y Tipo II. Posteriormente en el año 2002, Brzostowicz identifica dos agrupaciones de genes los cuales se relacionan con la actividad en la oxidación de la ciclohexanona.

En el año 2005, Artur F. Keppler evalúa la actividad enzimática de diferentes cepas de *Aspergillus* por biotransformación de cetonas cíclicas.

Los primeros estudios sobre las diferentes actividades en cepas fúngicas en nuestro medio, se llevaron adelante en el Instituto de Investigaciones Farmacológicas Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) a partir del año 1999.

A partir del año 2005, Calle, optimiza las condiciones de cultivo para la evaluación de la actividad oxido/reductasa (lacasa, peroxidasa) en mohos, hasta la fecha no se tiene reportes sobre estudios sobre la actividad de la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) en cepas fúngicas en nuestro medio.



## **CAPÍTULO III. OBJETIVOS.**

### **3.1 Objetivo general.**

Evaluar la actividad ciclohexanona monooxigenasa en cepas fúngicas y posteriormente optimizar las condiciones de cultivo para la producción de esta enzima.

### **3.2 Objetivos específicos.**

1. Seleccionar la mejor cepa capaz de utilizar ciclohexanona como sustrato.
2. Identificar macroscópicamente y microscópicamente la cepa seleccionada.
3. Determinar si los parámetros químicos: concentraciones de fuente de carbono, fuentes de nitrógeno, influyen en la actividad CHMO.
4. Establecer si los parámetros físicos de: temperatura, aireación y agitación del medio de cultivo en batch influyen en la actividad CHMO.
5. Inducir la actividad CHMO por medio de filtros de luz y la presencia de compuestos xenobióticos durante su cultivo.



## CAPÍTULO IV. JUSTIFICACIÓN.

Uno de los mayores problemas en estos tiempos, es por una parte la contaminación producida por el ser humano, porque todo proceso de la vida cotidiana lleva consigo la generación de basura, que puede ser orgánica o inorgánica, siendo la segunda una enfermedad silenciosa que daña al medio ambiente poco a poco. En un segundo plano aun más nocivo es el empleo de agentes químicos los cuales son utilizados en la producción de muchos materiales, en especial el plástico (Grados et al., 2009).

Debemos recordar que los procesos industriales de producción en general no deben ser agresivos con el medio ambiente, por otro lado se debe buscar que sean ventajosos desde el punto de vista de los costos de operación (Cavero et al., 2009). Teniendo la necesidad de paliar el incrementado del uso de agentes químicos por medio de la denomina “química verde” que evitaría erosionar los suelos, contaminar las aguas, etc.

Este proceso presenta rentabilidad y viabilidad debido a que las enzimas que son producidas por cepas fúngicas poseen muchas ventajas comparadas con los reactivos químicos tradicionales, lo que se busca es reemplazar la síntesis química por la síntesis enzimática, debido a que los reactivos químicos son inestables y tóxicos para el medio ambiente. Dichas enzimas fúngicas pueden ser intracelular o extracelular, en el caso de la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO), esta es una proteína intracelular, ventaja que puede ser utilizada para conservar la forma nativa de la proteína ante las modificaciones del medio, como ser la combinación de parámetros fisicoquímicos como ser: temperatura, pH, inducción por el paso de diferentes longitudes de onda (filtros de luz), agitación, aireación, empleo de diferentes concentraciones de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno.

Por lo anterior es posible ¿económicamente y en bien del medio ambiente, la incorporación del proceso de la biotransformación de compuestos orgánicos como la ciclohexanona de la que se pueden obtener productos tales como:  $\epsilon$ -caprolactona la cual puede ser empleada en la industria para formar



IIFB.

policaprolactona (plástico biodegradable obtenido por síntesis química), dentro del campo de la química farmacéutica en la síntesis de nanocápsulas, las que pueden ser utilizadas como vehículo de ciertos principios activos; también se puede dar aplicabilidad al uso de esta enzima en el ámbito del tratamiento de enfermedades crónicas, esto por el hallazgo de que la actividad monooxigenasa se encuentra implicada en la ruta biosintética de la mitramicina, una droga antitumoral (Fernández et al., 1999).





## CAPÍTULO V. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Microorganismos Fúngicos.

Los microorganismos fúngicos (mohos y levaduras) se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, debido a que su crecimiento es lento, se manifiestan en niveles variados de pH, los cuales pueden ir desde un medio ácido a uno ligeramente alcalino, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura; pueden utilizar ciertos sustratos como: pectinas, polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos (Blanc et al., 1998).

#### 5.1.1 Estructura.

Las células fúngicas son células eucariotas, que poseen una pared celular formada por capas o extractos constituidos por diversos polímeros: quitina (polímero de  $\beta$ -1,4 N acetilglucosamina), la celulosa (polímero  $\beta$ -1,4 de glucosa ) y por estructuras amorfas como otros glucanos (polímeros  $\beta$ -1,6 ramificados de glucosa) y mananos (polímeros  $\alpha$ -1,6 ramificados de manosa). La pared es un exoesqueleto rígido que cumple el papel de proteger a la célula y condiciona la nutrición del microorganismo. Desde el punto de vista morfológico los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos; por un lado están los unicelulares (levaduras) y se encuentran constituidas por células aisladas, ovals, de 3-10  $\mu$ m de diámetro. Otros son pluricelulares (mohos) y están constituidos por células alargadas, de 3-12  $\mu$ m, formando unas estructuras filamentosas denominadas hifas (Nandakumar et al., 2002). El término moho se suele emplear para designar a los hongos filamentosos pluricelulares cuyo crecimiento en la superficie suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado (Carrillo, 1996).

#### 5.1.2 Morfología.

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*, poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas





IIFB.

básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (figura 1) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz 1989).

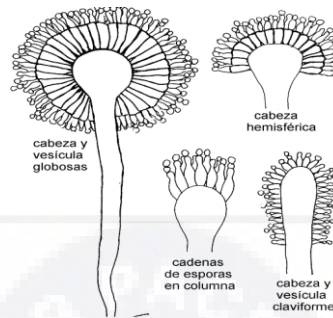


Figura 1. Características microscópicas de los *Aspergillus* (Peterson, 1995).

Las características macroscópicas y microscópicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los *Aspergillus* en secciones o grupos descritas por Klich (1992).

Tabla 1. Características de los grupos/secciones de *Aspergillus* (Klich y Pitt 1992, Kozakiewicz 1989)

SECCIÓN	GRUPO	CONIDIOS	MÉTULA	VESÍCULA	CONIDIÓFORO	OTROS
<i>Aspergilli</i>	<i>A. glaucus</i>	verde, rugoso	no	globosa a espatulada	liso	cleistotecio amarillo o anaranjado, osmófilo
<i>Candidii</i>	<i>A. candidus</i>	blanco	si	globosa	liso	esclerocio
<i>Cervisi</i>	<i>A. cervinus</i>	anaranjado	no	globosa	liso	-
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	amarillo	si	globosa	liso o rugoso,	esclerocio amarillo
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	verde claro	no	claviforme	liso	-
<i>Cremsi</i>	<i>A. cremoiflavus</i>	verde, pardo	si/no	globosa	liso	cleistotecio crema, osmófilo
<i>Flavipes des</i>	<i>A. flavipes</i>	pálido, canela	si	espatulada	liso, pardo	células de Hülle
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	verde, pardo	si/no	globosa	rugoso	esclerocio
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	verde azulado	no	espatulada	liso	-
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	verde obscuro	si	espatulada	liso, pardo	ascosporos rojos, células de Hülle
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	negro	si/no	globosa	liso	esclerocio
<i>Ornati</i>	<i>A. ornatus</i>	aceituna, verde amarillento	no	espatulada	liso	-
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	verde obscuro, no forma de tonel	no	piriforme	liso	osmófilo
<i>Sparsi</i>	<i>A. sparsus</i>	aceituna, pardo	si	globosa a piriforme	rugoso	-
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	canela, pardo	si	globosa	liso	-
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	gris aceituna	si	oval	liso, pardo	-
<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	verde	si	variable	liso	células de Hülle
<i>Wentii</i>	<i>A. wentii</i>	beige	si	variable	liso a rugoso	-



### **5.1.3 Identificación.**

Tradicionalmente se hace en base a las características macroscópicas y microscópicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas (Klich & Pitt 1992). Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos en granos y otros productos vegetales (Banks *et al.* 1992) y técnicas moleculares en base al polimorfismo del ADN nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra- e inter-específico (Rath, 2002).

### **5.1.4 Metabolismo.**

Conforme las células microbianas crecen, rompen fuentes de energía complejas y de alto peso molecular a través de la acción de enzimas catabólicas (Salmon *et al.* 1999). Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo aerobio, quimioheterótrofo, porque obtienen la energía de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos, este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales (Mihovilovic *et al.*, 2001).

Los microorganismos fúngicos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de endo y exoenzimas por las cuales asimilan nutrientes complejos, por la activación de rutas metabólicas alternativas. Según Luckner (1977) cuando se marcan algunos nutrientes, o por la presencia de compuestos xenobióticos, dejan de usarse las vías de metabolismo primario y se activan las rutas del metabolismo secundario. Algunos mohos producen metabolitos secundarios sin que les falte ningún nutriente, por medio de la estimulación por factores externos como la radiación.



### **5.1.5 Factores que influyen en el crecimiento.**

Son varios los factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento de los microorganismos fúngicos tales como fuente de carbono, fuente de nitrógeno, compuestos xenobióticos, pH, temperatura, luz, aireación.

#### **5.1.5.1 Fuente de carbono.**

La glucosa normalmente es la fuente de carbono por excelencia para el crecimiento de los microorganismos (Ryan et al., 2004). Los polisáridos, oligosacáridos y aceites minerales son también a menudo utilizadas como fuente de carbono, por la capacidad del microorganismo en la producción de enzimas hidrolíticas para asimilar estos compuestos (Casablanca et al., 2009).

Normalmente los microorganismos tienen la capacidad de asimilar con facilidad la glucosa como fuente de carbono, antes que otros compuestos orgánicos, también puede ser utilizado paralelamente como sustrato auxiliar; ya que la oxidación de esta molécula, proporciona los electrones necesarios para la regeneración del cofactor (Wong et al. 1985).

#### **5.1.5.2 Fuente de nitrógeno.**

La fuente de nitrógeno es imprescindible para la síntesis de aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos; la mayoría de las fuentes de nitrógeno entran directamente dentro de la célula, no hace falta que sean degradados, con excepción de las proteínas (Ward & Packter 1974).

Los hongos pueden usar fuentes inorgánicas u orgánicas de nitrógeno, las más estudiadas son los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ); se observó que la presencia de concentraciones relativamente elevadas inhiben el desarrollo de algunos hongos, también se ha observado que la represión en la fuente de nitrógeno está relacionada con la expresión algunos genes los cuales codifican proteínas con actividad catalítica (Roseñeda et al., 1992).



IIFB.

Las sales de amonio cuaternario ( $\text{NH}_4^+$ ) son utilizados como fuente de nitrógeno por casi todos los hongos, esta es asimilado por mecanismos de transporte activo (Daymara et al., 2009). Las fuentes orgánicas más habituales son la urea y la peptona, en el primer caso el microorganismo debe poseer la enzima ureasa la cual hidroliza la molécula hasta  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ , siendo la ureasa una de las enzimas más frecuentes en géneros de hongos filamentosos (Lindström et al., 2003).

### **5.1.5.3 pH.**

El pH es considerado de acuerdo con Jackson (1970) como una de las propiedades químicas más importantes del cultivo, debido al significativo efecto que ejerce tanto sobre las características físicas, químicas y biológicas del rendimiento de los cultivos. Los microorganismos fúngicos son capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de pH comprendido entre (2 y 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido; sin embargo son igualmente afectados por variaciones en el pH, ya que la asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas, síntesis de metabolitos primarios y secundarios depende de cuan ácido o alcalino sea el medio (Aguilar 1999).

### **5.1.5.4 Temperatura y Actividad de agua.**

La temperatura de incubación es un factor primordial para el crecimiento y metabolismo de las células. A medida que la temperatura aumenta, las reacciones bioquímicas al interior de la célula se aceleran. Según Córdova (1996) describe los mohos podrían considerarse mesófilos, es decir, que son capaces de crecer a temperaturas dadas en un rango de (22-30°C), aunque algunos son psicrófilos y algunos son termófilos, el incremento en la temperatura es beneficioso, pues propiedades como la tensión superficial, transferencia de masa y viscosidad son afectados de manera positiva para el consumo de nutrientes por parte del microorganismo (Nyns 1986).



IIFB.

Dependiendo del tipo de microorganismo el incremento de la temperatura puede ser o no ser beneficioso, ya que microorganismos adaptados a temperatura ambiente pueden sufrir daños a nivel estructuras (desnaturalización de proteínas) por incremento de la misma. La gran capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad es una característica que resalta a los hongos filamentosos (tabla 2).

Tabla 2. Temperatura y actividad de agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de *Aspergillus* (Lacey 1989).

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMO	ÓPTIMO
<i>A. flavus, A. parasiticus</i>	6 - 45	35 - 37	0,78	0,95
<i>A. candidus</i>	3 - 44	25 - 32	0,75	0,90 - 0,98
<i>A. fumigatus</i>	10 - 55	40 - 42	0,85	0,98 - 0,99
<i>A. restrictus</i>	9 - 40	30	0,71	0,96
<i>A. versicolor</i>	4 - 39	25 - 30	0,78	0,95
<i>E. amstelodami</i>	5 - 46	33 - 35	0,71 - 0,73	0,93 - 0,96
<i>E. chevalieri</i>	5 - 43	30 - 35	0,71	0,93 - 0,95
<i>E. repens</i>	7 - 40	25 - 27	0,75	0,93 - 0,95
<i>E. rubrum</i>	5 - 40	25 - 27	0,70	0,93

#### 5.1.5.5 Aireación.

Es un requisito nutricional esencial para la mayoría de los organismos vivos, dada su dependencia del proceso de respiración aeróbica para la generación de energía y para la movilización del carbono en la célula. Además, el oxígeno es importante en los procesos de: fotosíntesis, oxidación-reducción, solubilidad de minerales y la descomposición de materia orgánica. Por otro lado, existe una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios) para los cuales el oxígeno no es indispensable (anaerobios facultativos), otros no lo utilizan, siendo indiferentes a su presencia (aerotolerantes) e incluso, para algunos el oxígeno resulta ser tóxico o inhibitorio para el crecimiento (anaerobios estrictos) (Packard, et al., 1969).



IIFB.

Como se mencionó anteriormente, el oxígeno es utilizado no solo para la producción de energía, sino también para mediar reacciones de óxido/reducción, ya que en el proceso de biotransformación con células enteras, en particular para llevar adelante la reacción de Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs), el oxígeno molecular presente en un sistema cerrado de cultivo depende de la interacción entre la densidad celular y el suministro de oxígeno, en el cual la molécula de oxígeno será el aceptor de electrones (Hilker et al., 2005).

#### 5.1.5.6 Compuestos xenobióticos.

Los microorganismos, como todo ser vivo, poseen estrategias de defensa, al tener contacto con compuestos los cuales pueden ser tóxicos e incluso letales para la célula. Según Castell (2002) se activan sistemas de defensa por medio de complejos enzimáticos, los cuales oxidan, reducen o hidrolizan estos compuestos, por ejemplo: las monooxigenasas incorporan una molécula de oxígeno en la estructura; figura 2, la molécula de la derecha es más hidrosoluble que la de la izquierda, esto hace que sea más fácil de ser eliminada del microorganismo.

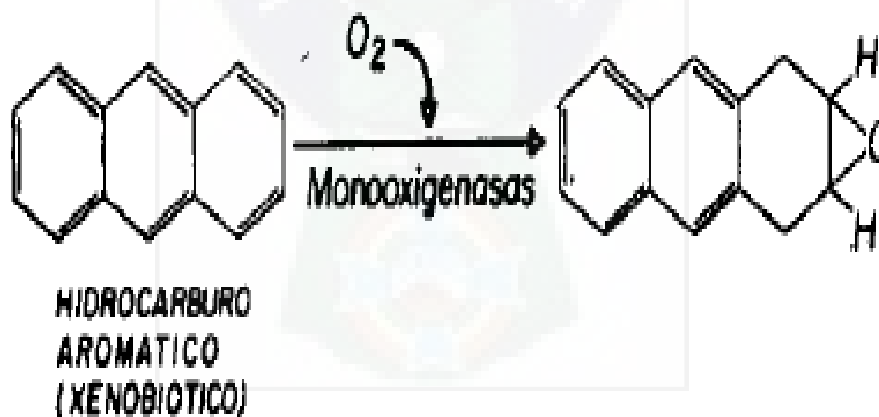


Figura 2. Biotransformación de un compuesto xenobiótico por acción de una monooxigenasa (Castell et al., 2000).

El sistema de monooxigenasas conocido como citocromo P450 es un grupo de proteínas que presentan un grupo hemo. Se caracterizan por utilizar el NADPH ó NADH para reducir el oxígeno molecular hasta H<sub>2</sub>O y la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> al sustrato.

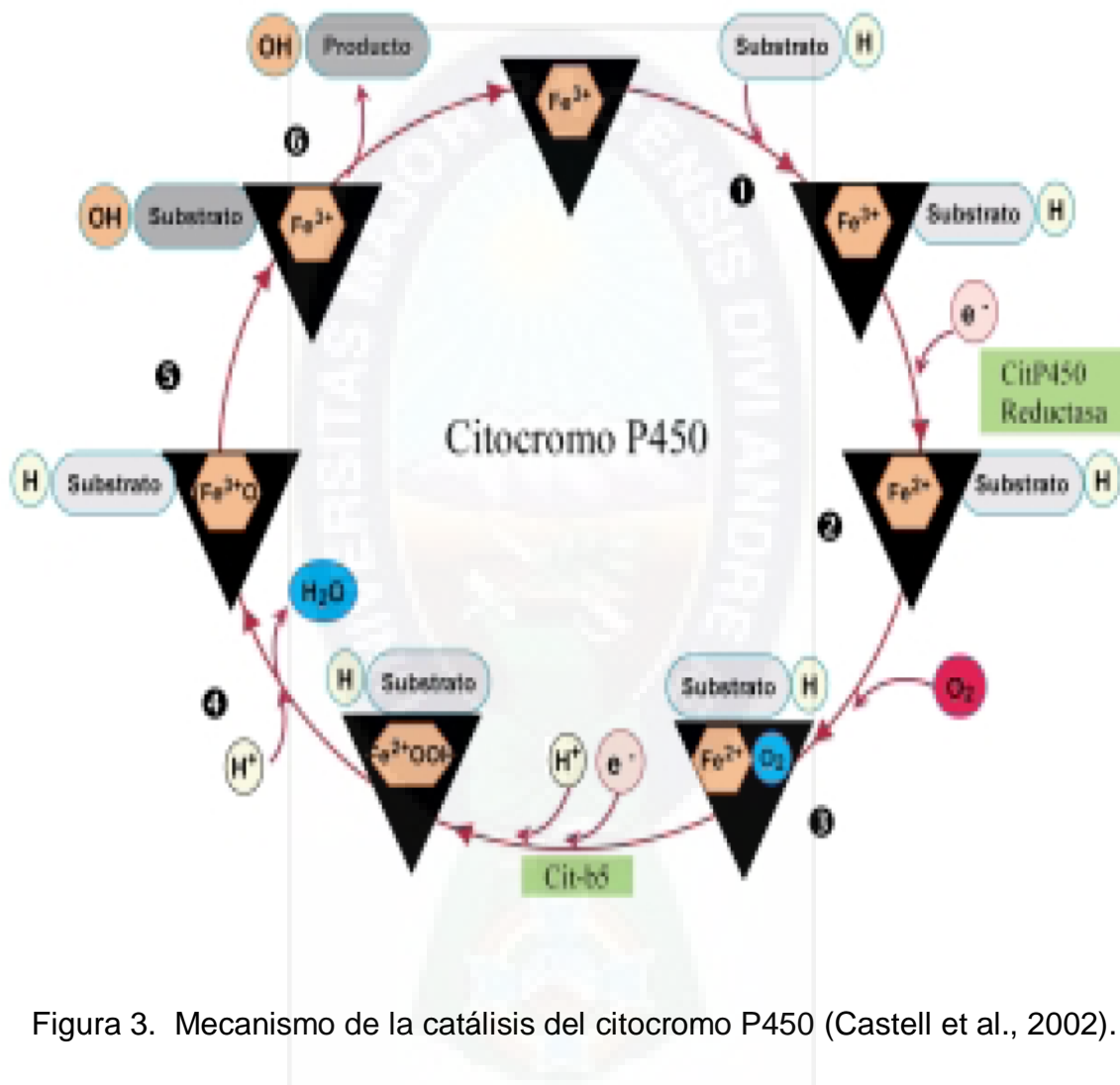


Figura 3. Mecanismo de la catálisis del citocromo P450 (Castell et al., 2002).

La figura 3 muestra el mecanismo por el que se lleva adelante la reacción de monooxigenación catalizada por el citocromo P450, el cual implica varios pasos sucesivos; el citocromo se encuentra en estado Fe<sup>3+</sup>, y en estas condiciones se une el xenobiótico (1); el citocromo es reducido (Fe<sup>3+</sup> → Fe<sup>2+</sup>) gracias al citocromo P450 reductasa que recibe los electrones a partir de NADPH (2). Es en ese



momento cuando el oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo (3). Un segundo electrón canalizado a través del citocromo b5, permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida que, junto con un  $H^+$ , libera uno de sus átomos en forma de  $H_2O$  (4). El otro átomo de oxígeno oxida al xenobiótico que se encuentra en el centro catalítico de la enzima (5) y finalmente se libera de la enzima (6) (Castell et al., 2002).

#### **5.1.5.7 Luz.**

En ciertos casos existe controversia cuando se menciona que la luz ocasiona inhibición o inducción en la actividad enzimática de los microorganismos fúngicos. Al respecto Espinal (2009) observó que al someter los sistemas de cultivo a diferentes longitudes de onda incrementó la actividad biocontroladora por mayor síntesis de enzimas líticas; sin embargo González (2000) observa que la exposición del hongo a la luz solar tiene no una influencia significativa para el crecimiento del mismo, ocurriendo lo contrario para la esporulación, donde las colonias incubadas recibiendo luz presentaron mayor número de esporas y de mejor calidad, resultado este de gran importancia para ser aplicado en aquellos procesos fermentativos sobre soporte sólido, donde se requiere de grandes cantidades de esporas en el más corto tiempo de fermentación.

### **5.2 Utilidad de las enzimas fúngicas.**

#### **5.2.1 Tecnología enzimática.**

A mediados de los años 50, la tecnología de las enzimas vivió su época de gran esplendor, creciendo a un ritmo desenfrenado. La bioquímica reveló una mejor comprensión de la gran variedad de enzimas presentes en las células vivas, así como un mejor conocimiento acerca de su modo de acción (Alphand et al., 2003).

Su eficacia se puede aumentar extrayéndolas de los microorganismos y manteniéndolas aisladas. Las enzimas purificadas a través de este sistema no pierden sus propiedades; al contrario, estas preparaciones "sin células" son incluso más eficaces. (Dunnill, 1980; Kristiansen et al., 1985).





IIFB.

La tecnología enzimática es una alternativa biotecnológica basada en que las industrias desarrollen productos de calidad homogénea, aprovechen óptimamente sus materias primas, aceleren sus procesos de producción, minimicen desperdicios y disminuyan el deterioro del medio ambiente.

### **5.2.2 Las enzimas como catalizadores.**

Las enzimas son catalizadores de origen biológico los cuales cumplen los requisitos necesarios para impulsar el reemplazo de la síntesis química. Son catalizadores muy activos en medios acuosos o en soportes sólidos; en condiciones muy variadas de temperatura y de pH, claro dependiendo del microorganismo del cual se obtienen las mismas, tienen la capacidad de modificar un único sustrato en una mezcla de sustratos muy similares e incluso pueden discernir entre dos isómeros de una mezcla racémica de un compuesto que posee átomos de carbono asimétricos, presentan la capacidad de modificar un único enlace o un único grupo funcional en una moléculas que tenga varias posiciones modificables (Torres et al., 2007).

A pesar de esas excelentes propiedades catalíticas, las enzimas han ido evolucionando a través del tiempo para cumplir mejor las necesidades fisiológicas de los microorganismos y no para ser utilizadas en sistemas químicos industriales (Wackett et al., 1989). Por ello las enzimas son catalizadores solubles, generalmente muy inestables y que sufren inhibiciones por sustratos y productos.

### **5.2.3 Aplicaciones industriales.**

En los últimos años su uso en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia, la enzimología o ciencia encargada del estudio de las enzimas siempre será un tema de actualidad en la biotecnología. En los últimos años, esta ciencia ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, detergentes, panadería, papelera, entre otras. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos, estos procesos pueden ser llevados a cabo a pequeña escala, como por ejemplo en la producción



de esteroides, o bien a gran escala como sería la utilización de una invertasa para la obtención de jarabes fructosados (Montes et al., 2002).

### **5.2.3.1 Producción de alimentos.**

Las enzimas presentan muchas aplicaciones dentro del campo de la producción de alimentos, sus características específicas permiten a los industriales ejercer un control de calidad más estricto, con un menor consumo de energía y unas condiciones de tratamiento más ligeras. Su eficacia favorece el entorno, pueden utilizarse para tratar los desechos biológicos resultantes de la fabricación de alimentos, puesto que las propias enzimas son biodegradables. Mediante una rápida absorción natural, las enzimas son el típico ejemplo de la química verde (Duta et al., 2006).

Para garantizar la seguridad de su uso deben tenerse en cuenta no obstante algunas consideraciones: en aquellos enzimas que sean producidos por microorganismos, estos no deben ser patógenos ni sintetizar a la vez toxinas, antibióticos, etc. Los microorganismos ideales son aquellos que tienen ya una larga tradición de uso en los alimentos (levaduras de la industria cervecera, fermentos lácticos, etc.) (Ranua et al., 1987).

### **5.2.3.2 Producción de energía.**

Otra actividad dentro de las aplicaciones biotecnológicas es la producción de energía, siendo la ventaja de las fuentes orgánicas con respecto a los combustibles fósiles al ser renovables. Cada año crecen unas 200 mil millones de toneladas de biomasa (madera, cereales, desperdicios agrícolas), de las cuales los humanos usamos sólo un 3%. Por lo tanto, este rubro ofrece un enorme potencial que puede ser aprovechado; un ejemplo clásico de biocombustible es el alcohol obtenido por fermentación mediado por enzimas hidrolíticas de material rico en azúcares y almidón (Ríos et al., 2008) o de varios residuos orgánicos, incluyendo los forestales; la producción de biodiesel a partir de los desechos de aceites de freír. El principal obstáculo para la viabilidad de esta propuesta es el costo, puesto que el



IIFB.

petróleo sigue siendo más barato; sin embargo, los avances tecnológicos están permitiendo acortar la brecha para alcanzar este propósito.

### **5.2.3.3 Tratamiento de desechos.**

Las grandes potencias mundiales invierten aproximadamente 400 mil millones de dólares al año para combatir la contaminación que generan los 600 millones de toneladas de desechos industriales que contaminan aire, suelos y aguas. En este aspecto la biotecnología tiene un mayor impacto por los procesos de biorremediación a diferentes escalas a nivel mundial.

Bacterias, microalgas, levaduras, hongos y plantas han mostrado una notable eficiencia para metabolizar residuos orgánicos, xenobióticos y metales pesados (biorremediación y fitorremediación), reduciendo hasta 20 veces el costo involucrado en la incineración de dichos residuos. Por otra parte, se han hecho grandes avances en el tratamiento de derrames de petróleo con microorganismos (Mendoza et al., 2007).

## **5.3 Baeyer-Villiger Monooxigenasas.**

La reacción de Baeyer-Villiger (BV) es una reacción bien conocida, este proceso consiste en la transformación de cetonas en ésteres o lactonas, todas las monooxigenasas de Baeyer-Villiger se caracterizan por contener un cofactor de flavina, que es crucial para la catálisis, mientras que nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) o nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) es necesario como donador de electrones. Una observación interesante es el hecho de que la mayoría de las monooxigenasas reportados son proteínas solubles (Torres et al., 2007), datos disponibles sobre la bioquímica de las monooxigenasas, refieren la existencia de monooxigenasas de tipo I y tipo II.

### **5.3.1 Bayer- Villiger monooxigenasas tipo I y tipo II.**

Las Bayer-Villiger Monooxigenasa (BVMO) tipo I, está constituida por una sola cadena polipeptídica, está conformada por dos cofactores (FAD o NADPH); el



IIFB.

cofactor Flavin Adenina Dinucleotido (FAD) está relacionado directamente con la proteína, en cambio el cofactor NADPH se encarga de activar al oxígeno.

Las BVMO tipo II emplea a Flavin Mononucleotido (FMN) como cofactor de flavina y NADH como donador de electrones y, están compuestas por dos subunidades diferentes (Rodríguez et al., 2003).

### 5.3.2 Especificidad de las monooxigenasas.

El potencial catalítico de las BVMOs, se debe a la gran especificidad que presentan estas enzimas con su sustrato. En los últimos años, la atención se ha centrado en el uso de las células que expresan sobre todo CHMO como biocatalizador, también podemos nombrar otras monooxigenasas que muestran una amplia especificidad de sustratos, sin embargo cada una tiene una cierta preferencia por un tipo específico de sustrato (figura 4).

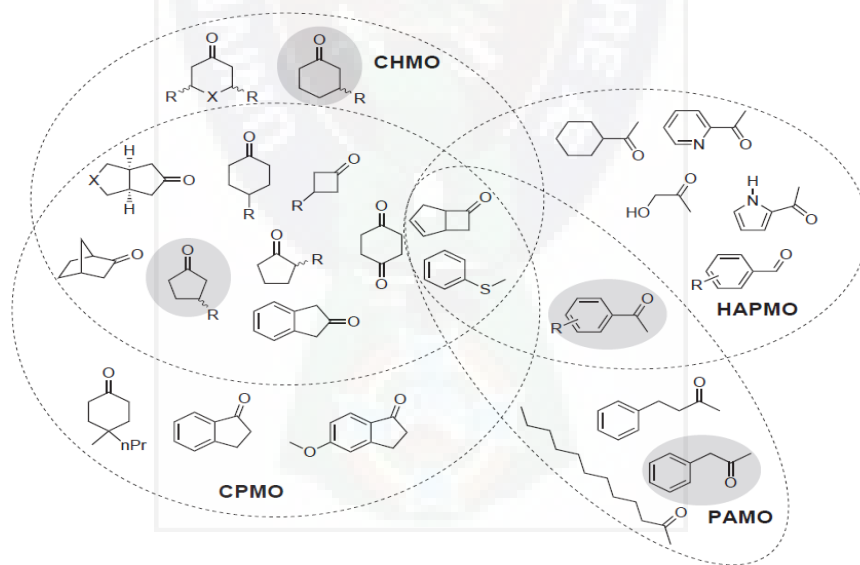


Figura 4. Sustratos específicos para las diferentes Baeyer-Villiger monooxigenasas ciclohexanona monooxigenasa (CHMO), ciclopentano monooxigenasa (CPMO), 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) y fenilacetona monooxigenasa (PAMO) (Torres et al., 2007).

Una de las limitaciones en el empleo de las monooxigenasas que catalizan la reacción de BV, es la dependencia del donador de electrones que de acuerdo al tipo de monooxigenasa, puede ser NADH o NADPH, razón por el cual no es conveniente la purificación de la enzima debido a la inestabilidad y al elevado costo del cofactor para utilizarla en cantidades estequiométricas (Woodyer et al., 2000). Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) es un cofactor sintetizado y regenerado como parte del metabolismo celular en los sistemas biológicos de los microorganismos; a los que en la fase fermentativa que llevan a cabo esta les proporciona las enzimas necesarias para poder regenerar el cofactor, por medio de la oxidación de un sustrato auxiliar y posterior reducción del cofactor, como se observa en la Figura 5.

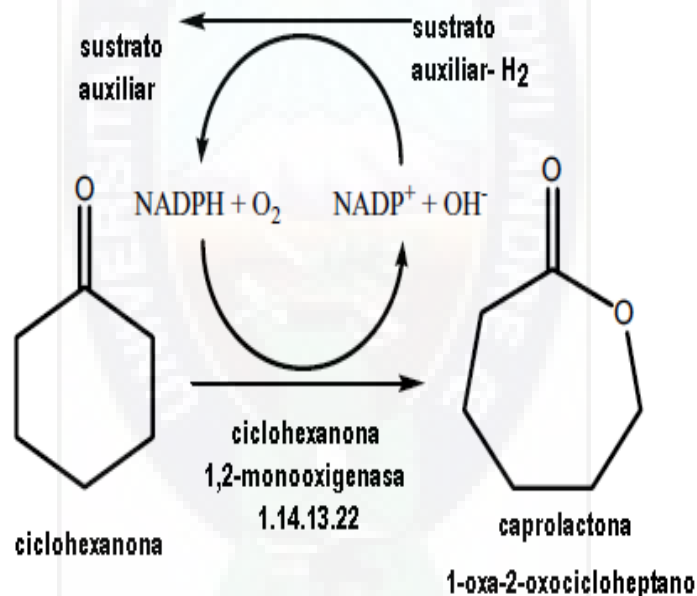


Figura 5. Regeneración de cofactor por acoplamiento de otro sustrato ( Carballeira et al., 2004).

### 5.3.3 Identificación de la actividad Bayer-Villiger monooxigenasa.

Para realizar la medición de la actividad BVMO se describen una gran variedad de técnicas desde muy sencillas y económicas hasta muy complejas y costosas (Watts et al 2001), como ser: viraje de indicador, disminución en la absorbancia del sustrato, decremento en la absorbancia de NADPH a 340 nm, formación de



complejos fluorescentes, detección de sustratos y productos por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y cromatografía gaseosa (GC).

#### **5.3.3.1 Viraje de indicador.**

Una de las formas de identificar la actividad enzimática es la detección de los productos de la ruta metabólica del compuesto de interés, en el caso de las monooxigenasas lo que se busca es monitorear la acidificación por la síntesis de lactonas en el medio, estos compuestos tienden a reducir el pH lo que ocasionará que ocurra el viraje del indicador.

#### **5.3.3.2 Formación de complejos coloreados.**

Son ensayos cuantitativos basados en la formación de complejos los cuales presentan coloración, donde la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Según Linares (2010) el ensayo colorimétrico que plantea consiste en el solapamiento de la cetona con el ácido dinitrobenzoico a pH alcalino, formando un complejo de color violeta.

#### **5.3.3.3 Depleción de cofactor.**

Esta prueba consiste en el monitoreo del consumo de NADPH a 340nm, según Secundo (2005) el primer decremento indica la oxidación del cofactor; al añadir el sustrato existe otro decremento el cual indica que si existe actividad enzimática. Esta prueba se considera confirmatoria para la evaluación de la actividad CHMO, debido a que en el ensayo solo participa el cofactor, la enzima y el sustrato, de manera que la reacción cruzada por contaminación queda descartada.

#### **5.3.4 Ciclohexanona monooxigenasa y su aplicación.**

El proceso que lleva adelante la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) es de mucho interés por la obtención de lactonas ópticamente activas con una alta estereoselectividad, bajo condiciones amigables con el medio ambiente (Keppler et al., 2005).

### 5.3.4.1 Generalidades.

Dentro del grupo de las enzimas Baeyer-Villiger Monooxigenasa, fue la primera monooxigenasa descrita y por el momento la más estudiada (Torres et al., 2007). Al ser una oxido/reductasa al igual que las transferasas es dependiente del cofactor NADPH, esta enzima presenta un gran potencial de síntesis, ya que cataliza la reacción con una notable estereoselectividad, la conversión de cetonas en ésteres o lactonas (Reacción de Baeyer-Villiger) es la rotura oxidativa de un enlace carbono-carbono adyacente a un carbonilo, dando lugar a la conversión de cetonas cíclicas a lactonas, como se observa en la Figura 6.

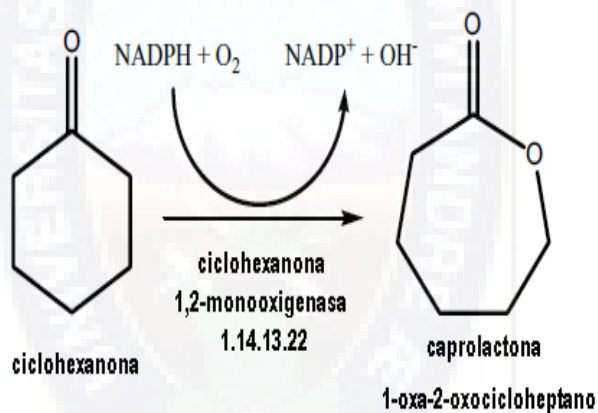


Figura 6. Conversión enzimática de ciclohexanona a caprolactona (Carballeira et al., 2004)

Ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) fue descrita por primera vez en *Acinetobacter Calcoaceticus* NCIMB 9871, teniendo el inconveniente de que este microorganismo es un patógeno de tipo II, razón a la cual no puede ser cultivado a escala industrial; sin embargo por biología molecular se llegó a secuenciar el gen el cual codifica a la proteína; por la aplicación de la tecnología del DNA recombinante el gen fue clonado y sobre expresado en microorganismos más fácilmente manejables como *E.coli*, controlando su expresión por medio de lactosa u otro carbohidrato (Devrim et al., 2004).



### 5.3.4.2 Ciclohexanona.

Molécula orgánica cíclica constituida por seis átomos de carbono con un grupo funcional cetona, pertenece al grupo de las cetonas cíclicas, es soluble en agua y miscible con los solventes orgánicos más comunes (tabla3) ([sanambi@listas.carm.es](mailto:sanambi@listas.carm.es)).

Tabla 3. Características físico-químicas de la ciclohexanona

<b>Ciclohexanona</b>	<b>Nombre IUPAC</b>
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
<b>Masa molecular</b>	98,14 g/mol
<b>Estado físico/Color</b>	Líquido/Incoloro
<b>Densidad</b>	0,9478 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C
<b>Punto de fusión</b>	-31 °C (242 K)
<b>Punto de ebullición</b>	155,6 °C (428,8 K)
<b>Solubilidad en agua</b>	~90 g/L a 20 °C

Fuente: ([sanambi@listas.carm.es](mailto:sanambi@listas.carm.es)).

Presenta gran importancia en el campo industrial por ubicarse como intermediario central en la síntesis aerobia y anaerobia de compuestos que poseen un gran valor económico, como  $\epsilon$ -caprolactona y ácido Adípico (Figura 7), compuestos empleados en la síntesis de policaprolactona y nylon 6.6 respectivamente.

### 5.3.4.3 Ruta metabólica de asimilación de ciclohexanona por los microorganismos

La figura 7 muestra la ruta metabólica en condiciones aerobias y anaerobias del metabolismo que realiza el microorganismo en presencia de ciclohexanona, que es punto central de varias moléculas de mucho interés industrial, como:  $\epsilon$ -caprolactona y ácido adípico y, desde otra perspectiva, tenemos la biorremediación de aguas contaminadas con compuestos aromáticos como el fenol y catecol. Sabiendo que los derivados de fenol se usan como desinfectantes, antisépticos, fungicidas e insecticidas; y en diferentes soluciones, las cuales no son tratados debidamente al



momento de su desecho, ya que son eliminados directamente a los drenajes contaminando las aguas. Los fenoles como los cresoles, actúan precipitando proteínas, de donde se deduce su poder germicida y su toxicidad; las intoxicaciones crónicas pueden deberse a ingestión o absorción percutánea o mucosa, los derivados cresólicos y fenólicos pueden causar también corrosión de los epitelios (Islas et al., 1978).

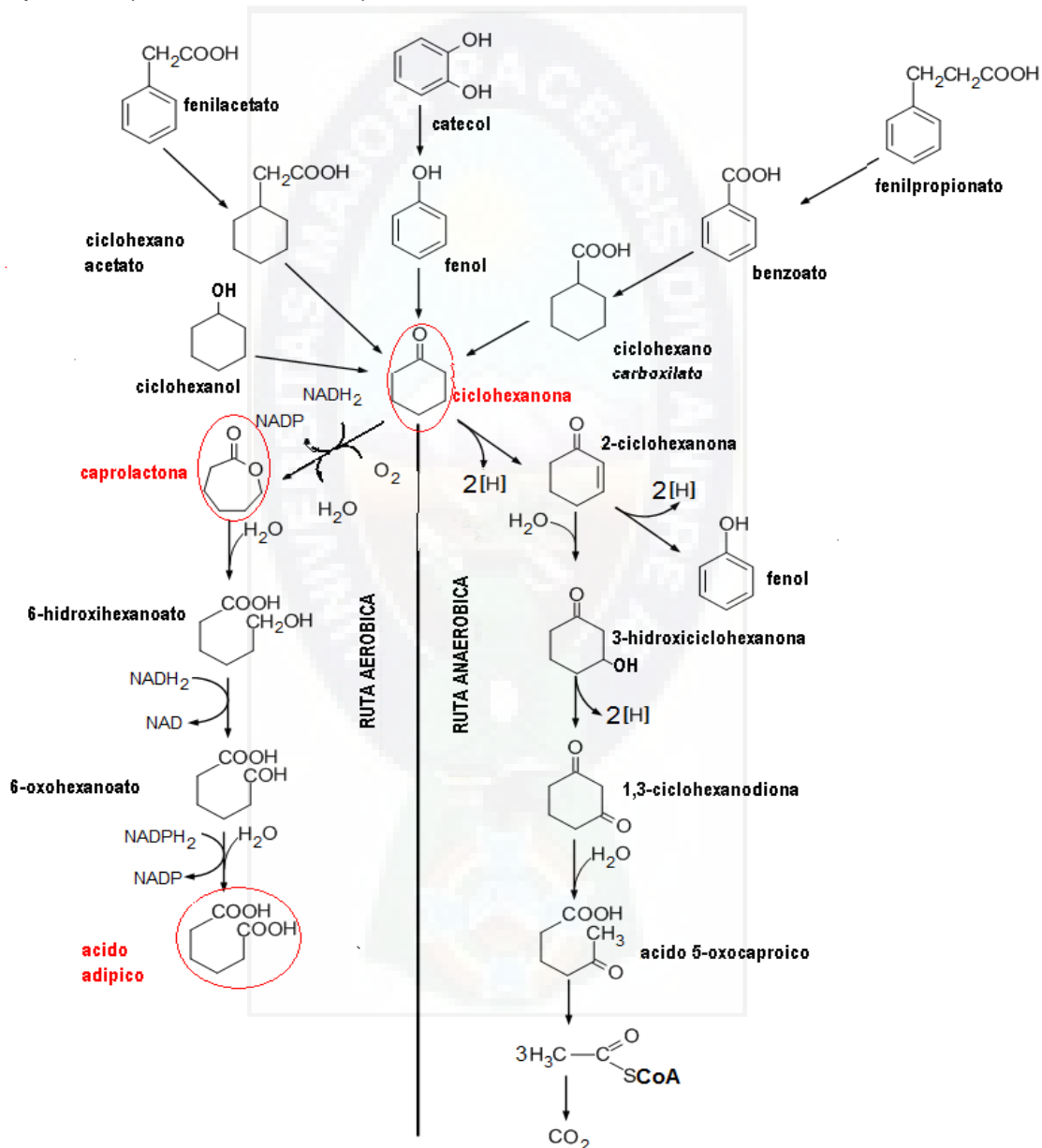


Figura 7. Ciclohexanona como metabolito intermediario, en el metabolismo anaeróbico y aeróbico de compuestos cíclicos en los microorganismos (Linares et al., 2010).



#### 5.3.4.4 Aplicación de $\epsilon$ -caprolactona y ácido adípico en la industria.

##### 5.3.4.4.1 $\epsilon$ -Caprolactona.

La mayoría de los plásticos sintéticos se obtienen de productos petroquímicos (fuentes no renovables), no son biodegradables y por lo tanto perduran en la naturaleza por largos períodos de tiempo, acumulándose y generando grandes cantidades de residuos sólidos, produciendo en consecuencia, un importante daño al medio ambiente. Como alternativa a esta problemática surgieron los plásticos biodegradables, que en determinados procesos biológicos aeróbicos (compostaje) se convierten en agua, dióxido de carbono y humus, productos no nocivos (Cavero et al., 2009). Ciclohexanona se metaboliza por CHMO a  $\epsilon$ -caprolactona (Figura 7); este producto es polimerizado químicamente para formar policaprolactona (PCL), obteniendo plástico biodegradable similar a 3-hidroxibutirato (PHB) pero con limitación en la elasticidad (Oda et al., 1997). Se demostró que el cultivo con *Fusarium moniliforme* hidroliza PCL, sin embargo las enzimas implicadas en este proceso no están estudiadas a detalle. Estos materiales son poliésteres sintetizados por microorganismos que en condiciones limitantes de crecimiento (altas concentraciones de carbono y ausencia de otros nutrientes esenciales como nitrógeno), acumulan estos materiales en gránulos intracitoplasmáticos como fuente de reserva de carbono y energía (Murphy et al., 1996).

A diferencia de los plásticos convencionales, los plásticos biodegradables pueden generarse de fuentes renovables como los hidratos de carbono. Los residuos agrícolas, de la industria azucarera y alimenticia, constituyen la opción de suministro más prometedora, no solo son baratos, sino que su utilización resuelve otros problemas ambientales.

##### 5.3.4.4.2 Ácido Adípico

Como se puede observar en la figura 7, se muestra que el último producto del metabolismo de la ciclohexanona es el ácido adípico, el cual es utilizado en la síntesis de nylon, prendas de vestir, velas de navegación, alfombras, hasta llantas



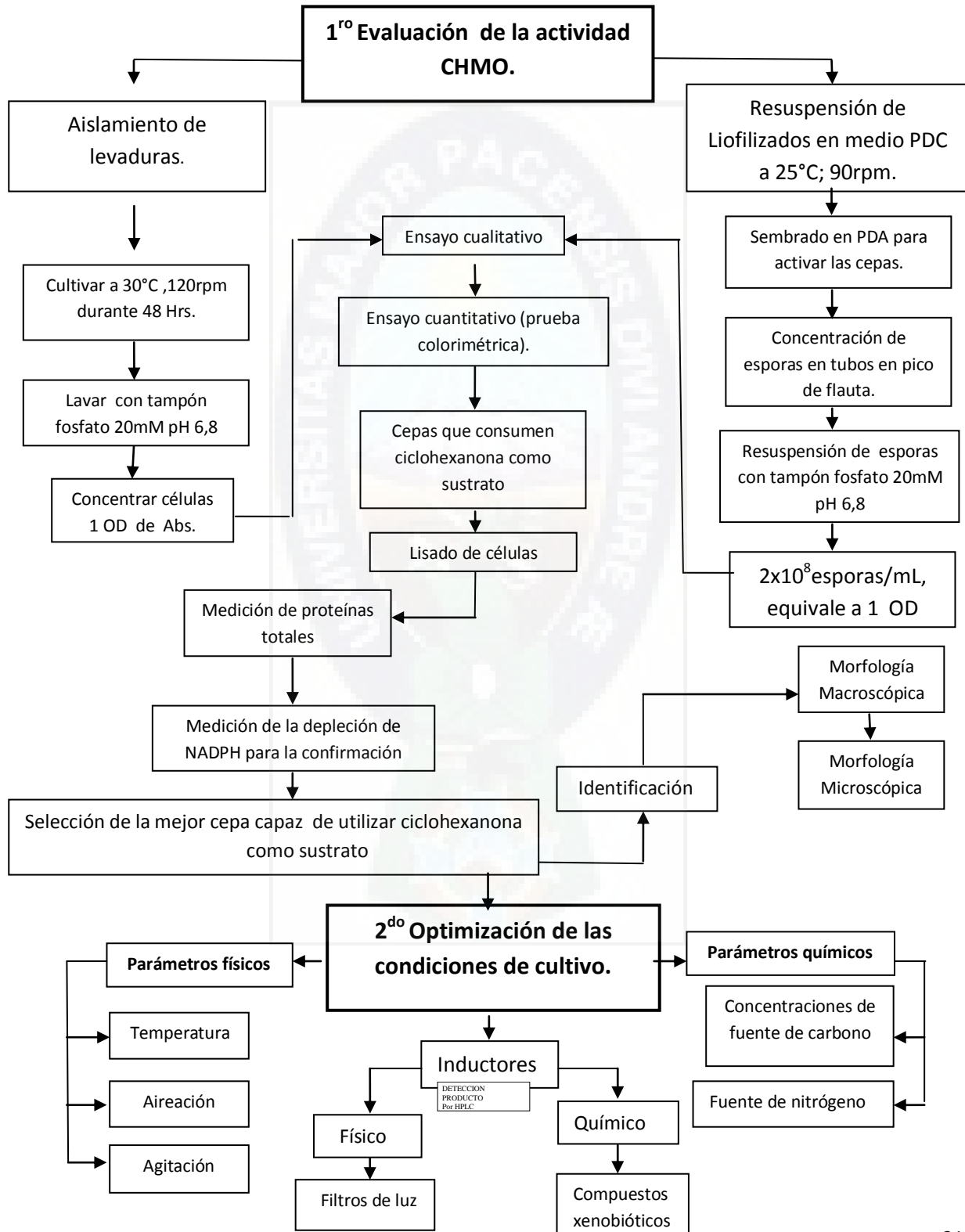
IIFB.

de automóviles (Lindström et al., 2004). En la actualidad, en la mayoría de los procesos industriales de síntesis de nylon 6.6, el ácido nítrico es utilizado para mediar la oxidación de la ciclohexanona y/o ciclohexanol para obtener ácido Adípico, sin embargo el uso de este oxidante genera daños severos al medio ambiente (Shuiying et al., 2008).



## CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

El siguiente esquema, indica la metodología que se siguió en el desarrollo del presente trabajo.



## **6.1 Procedencia de las cepas.**

Las 85 cepas de hongos filamentosos que fueron obtenidas del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), paralelamente se aislaron cepas de levaduras de muestras de tierra contaminadas con petróleo, las muestras de tierra fueron gentilmente suministradas por estudiantes de Ingeniería Ambiental de la UMSA; dichas muestras fueron recolectadas en la población de Sanandita, del Departamento de Tarija.

## **6.2 Reactivación de cepas fúngicas.**

Las cepas se encontraban en estado de conservación por la técnica de liofilizado, a las que se les añadió 2 mL de medio de cultivo Caldo Patata Dextrosa (CPD) (composición anexo 1), pH 6,8 a una temperatura de 22°C durante 5 días, al cabo de este tiempo se evidenció desarrollo. Se tomaron 200 µL del cultivo para sembrarlos en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) (composición anexo 2) siendo cultivadas en las mismas condiciones de temperatura y pH durante el lapso de 7 días.

## **6.3 Aislamiento de cepas de levaduras.**

Se tomaron 2 g de tierra contaminada con petróleo, a la cual se le añadieron 2 mL solución fisiológica, posteriormente se incubó a 25 °C durante 24 horas a 100 rpm, se procedió a la siembra de 100 µL en medio de cultivo PDA, a una temperatura de 22°C durante 48 horas.

## **6.4 Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.**

### **6.4.1 Hongos filamentosos.**

Para el acondicionamiento se procedió primeramente a la concentración de esporas.

#### **6.4.1.1 Concentración de esporas.**

Para llevar adelante el ensayo cualitativo (viraje de indicador) y posteriormente el ensayo cuantitativo (consumo de sustrato) previamente se procedió a concentrar esporas por medio del sembrado en tubos con medio PDA en pico de flauta, los



cuales fueron incubados a 22°C durante 15 días, pasado este tiempo se procedió al lavado de esporas con tampón fosfato (20 mM pH 6,8); alcanzando una concentración de  $2 \times 10^3$  prop/mL el cual equivale a densidad óptica (DO) igual a 0,6 (Watts et al. 2001).

#### **6.4.2 Levaduras.**

Se procedió a inocular a las cepas de levaduras en medio de cultivo Dextrosa Peptona Extracto de Levadura YEPD (Carballeira et al., 2004), el cual fue incubado a 25°C durante 48 horas a 150 rpm. Posteriormente se realizaron lavados con tampón fosfato 20 mM; pH 6,8. Hasta llegar a obtener un saturado de células con una DO de 0,6 (Watts et al., 2001).

#### **6.5 Análisis de la actividad CHMO.**

Se empleó primeramente una técnica cualitativa y posteriormente dos técnicas cuantitativas para evaluar la actividad CHMO.

##### **6.5.1 Análisis cualitativo por viraje de indicador.**

Se prepararon soluciones de ciclohexanona a una concentración de 50 mM en tampón fosfato (20 mM pH 6,8); a las cuales se le añadieron 100  $\mu$ l de púrpura de bromocresol como indicador, la reacción tuvo tres mediciones de tiempo a las 0; 6; 12 horas respectivamente con un control; la reacción es positiva cuando existe reducción en el pH, el cual era monitoreado por el cambio de color de la solución (Watts et al., 2001).

##### **6.5.2 Análisis cuantitativo.**

###### **6.5.2.1 Medición del consumo de ciclohexanona como sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos.**

Se cultivaron las cepas fúngicas en medio PDA en pico de flauta hasta que hayan alcanzado un desarrollo de 15 días, posteriormente se lavaron y se resuspendieron en tampón fosfato (20 mM pH 6.8) hasta una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^3$  prop/mL. A 5 viales pequeños, uno para el blanco, uno para tiempo cero y tres viales para las repeticiones de la prueba; se añadió 200  $\mu$ L de la suspensión fúngica



y 14  $\mu\text{L}$  de una solución de ciclohexanona 1M en cada vial, posteriormente se procedió a la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro (Varían Cary 50 Bio UV-visible) del tubo de tiempo cero y se dejó los otros tubos a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm durante 12 horas, transcurrido este tiempo se añadió 143  $\mu\text{L}$  de 3.5 ácido dinitrobenzoico (DNB) al 1% por 3 min y 143  $\mu\text{L}$  de hidróxido de potasio (KOH) 0.2 N (preparados en etanol a 96° GL) se dejó en reposo durante 15 min, finalmente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; y se realizó la lectura del sobrenadante a 540 nm (Linares et al., 2010).

#### **6.5.2.2 Medición del consumo de ciclohexanona como sustrato por ensayo colorimétrico en levaduras.**

Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio YEPD hasta que alcanzaron un desarrollo de 48 horas, se recolectó 1 mL de cultivo, se resuspendieron las células en tampón fosfato (20 mM pH 6.8) hasta que la muestra presente una absorbancia de 0,6; posteriormente se procedió de la misma manera que el apartado (6.5.2.1) para realizar la medición del consumo de ciclohexanona.

### **6.6 Comparación de diferentes técnicas de lisado.**

Para llevar adelante la evaluación de las técnicas de lisado se procedió a la siembra de las cepas en frascos de 100 mL en medio de cultivo CPD, durante 7 días a 22°C en agitación a 100 rpm. Al cabo de este tiempo se sometieron las muestras a las diferentes técnicas de lisado: agitación mecánica con perlas de vidrio, lisis por ebullición en presencia de álcalis fuerte, lisis por ebullición en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS).

#### **6.6.1 Agitación mecánica con perlas de vidrio.**

Se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y, en el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de  $2 \times 10^8$  prop/mL, a lo cual se agregó solución de lavado (PBS) (0,9 % p/v NaCl en 0,1 M de tampón fosfato, pH 7) con el fin de remover proteínas o remanentes extracelulares. Posteriormente se agregó perlas de vidrio acidificadas con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N en tampón de lisis (20mM tris-HCl pH 7,6; 10 mM; NaCl) la mezcla fue agitada



en un vortex (V-UM100 united product and instruments, Inc.) durante 8 minutos (se repitieron ciclos de agitación por vortex durante el lapso de 1 minuto e incubadas en hielo) (Nandakumar et al., 2002). Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos a 5°C, se midió la concentración de proteínas totales por la método de Bradford (anexo 5).

#### **6.6.2 Lisis por ebullición en presencia de álcalis fuerte.**

Se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y para el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de  $2 \times 10^8$  prop /mL. Se lavó con PBS y se adicionó 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 N; la solución fue llevada a ebullición durante 5 minutos (Jeng et al,1989) posteriormente la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm 10 minutos a 5°C, finalmente se midió la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

#### **6.6.3 Lisis por ebullición en presencia de SDS.**

Se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y para el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de  $2 \times 10^8$  prop /mL, a las que se efectuó lavados con PBS con el fin de remover proteínas o remanentes extracelulares, se adicionaron 3 mL de tampón de lisis SDS (1 % p/v SDS en 100 mM de Tris -HCl, pH 7,6); la solución se llevó a ebullición durante 5 minutos (Morris et al,1978).La suspensión fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos a 5°C, se midió la concentración de proteínas totales por la método de Bradford.

### **6.7 Medición de la depleción de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).**

Se sometieron las esporas de los hongos filamentosos, al igual que las células de las levaduras a un proceso de lisado para obtener una concentración de 0,5-1mg/mL de proteínas totales. Luego de haber obtenido la concentración requerida de proteínas totales se conservó la muestra a 0°C, mediante el uso de baño de hielo para evitar la inactivación de la enzima, la tabla 4 muestra las cantidades que se usaron en el ensayo.





Tabla 4. Ensayo cuantitativo de la depleción de cofactor NADPH.

Componentes	Blanco	Prueba
Muestra	-	400 $\mu$ L
Tampón glicina	1000 $\mu$ L	200 $\mu$ L
NADPH 30 $\mu$ M	-	200 $\mu$ L
ciclohexanona 30 $\mu$ M	-	200 $\mu$ L
TOTAL	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

La absorbancia inicial debe encontrarse entre 0.5 y 0,8; con el fin de conservar la linealidad de la técnica (Secundo et al., 2005); si la concentración es mayor diluir la muestra. Se controló la disminución de la absorbancia del NADPH durante 1 minuto; cuando ya no hubo cambio en la absorbancia se añadió 200  $\mu$ L del sustrato de la enzima y se esperó hasta los 5 minutos.

### 6.8 Cálculo de la actividad enzimática (UI).

1 unidad de enzima cataliza la conversión de 1  $\mu$ mol de sustrato a producto por minuto. Para el cálculo de las unidades de los ensayos basados en espectrofotometría, se utilizó la ley de Lambert y Beer. (Secundo et al., 2005).

$$A = \epsilon l C$$

Donde A = absorbancia ( $M^{-1} cm^{-1}$ ),

l = longitud de la celda de la cubeta (1 cm),

c = concentración de la especie absorbente (M)

$\epsilon$  = el coeficiente de extinción molar de NADPH ( $6.2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ )

$$\Delta c / \text{min} = (\Delta A / \text{min}) / (6.2 \times 10^3 \times 1)$$

## 6.9 Comparación de la velocidad de consumo de sustrato.

Para esta prueba se prepararon viales que contenían ciclohexanona a una concentración de 50 mM, procediendo a la medición de la velocidad de consumo de sustrato de las cepas que presentaron actividad CHMO a diferentes tiempos durante 30 horas. La medición se la realizó por medio del ensayo colorimétrico (Linares et al., 2010).

## 6.10 Identificación macroscópica y microscópica de la cepa seleccionada.

La identificación se realizó observando las características macroscópicas y microscópicas de la cepa que presentó la mejor actividad CHMO.

### 6.10.1 Observación macroscópica.

Se determinaron las características de desarrollo morfológicas y de pigmentación en el medio de cultivo para la discriminación de la cepa seleccionada.

Se tomó los micelios de las cajas petri, donde se presentó desarrollo con ayuda de una lupa; se consideraron las siguientes características:

- *Anverso de la caja.*

Aspecto del frente hifal: velloso, seco, algodonoso, etc.

Formación de macro estructuras sexuales.

Color: de la especie fúngica.

- *Reverso de la caja.*

Aspecto del frente hifal: rugoso, liso

Pigmento: Presencia/ ausencia.



### **6.10.2 Observación microscópica.**

Para la observación en el microscopio se utilizó la técnica de la cinta adhesiva en portaobjetos, para luego observar e identificar las características del hongo (conidios, hifas de la cepa).

### **6.11 Influencia de los parámetros químicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.**

Los parámetros químicos que fueron evaluados en la inducción de la actividad fueron: concentración de fuente de carbono, fuente de nitrógeno.

#### **6.11.1 Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono.**

Se preparó medio CPD a concentraciones de glucosa de: 15 g/L, 30g/L y 50 g/L; los mismos fueron autoclavados (120°C. 1,5 atm durante 20 minutos); se inoculó 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop/mL de la cepa; la cual fue incubada a 22°C en agitación a 100 rpm; se procedió a la medición de la actividad enzimática por depleción de cofactor, cada día durante un periodo de tiempo de 7 días (Lee et al., 2007), el consumo de glucosa fue medido por medio de la técnica de DNS (composición anexo 4).

#### **6.11.2 Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno.**

Se utilizó medio CPD, al cual se adicionó diferentes fuentes de nitrógeno (molibdato de amonio, nitrato de amonio, extracto de levadura, peptona, urea) a una concentración final de 1g/L; como control se empleó el medio CPD sin la adición de ninguna fuente de nitrógeno; las mismos fueron posteriormente autoclavadas. Seguidamente se inoculó 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop/mL de la cepa 177QD; las cuales fueron incubadas a 22°C en agitación a 100 rpm; luego se procedió a la medición de la actividad enzimática por medio de la depleción de cofactor, cada día durante un periodo de tiempo de 7 días (Pereira et al., 2006).



## **6.12 Influencia de los parámetros físicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.**

Los parámetros físicos evaluados en la inducción de la actividad fueron: temperatura, aireación y agitación por magnetos,

### **6.12.1 Influencia de la temperatura en la actividad CHMO en esporas.**

Para esta prueba se prepararon viales pequeños a los cuales se pusieron 200 uL de suspensión de  $10^6$  prop /mL, en tampón fosfato (20 mM pH 6,8); posteriormente se añadió 14  $\mu$ L de ciclohexanona 1M, fueron incubados a diferentes temperaturas: 4°C, 22°C, 37°C, la medición de consumo de sustrato se lo realizó por disminución en la absorbancia a 540 nm por el ensayo colorimétrico descrito por Linares (2010), en intervalos de 3 horas en un lapso de tiempo de 30 horas.

### **6.12.2 Influencia de la temperatura en la actividad CHMO en biomasa.**

Para esta prueba primero se cultivaron a los hongos en medio de cultivo CPD en frascos de vidrio de volumen de 100 mL, se tomó la biomasa formada al lapso de 2 días de cultivo y se realizó lavados continuos con tampón fosfato (20mM pH 6,8); la biomasa fue depositada en matraces Erlenmeyer de 250 mL los cuales contenían ciclohexanona 50mM previamente filtrada con filtro Millipore 0,25  $\mu$ m, los mismos fueron sellados con silicona con el fin de proporcionar un cierre hermético. Se llevó a incubación a diferentes temperaturas: 4°C, 22°C, 37°C, la medición de consumo de sustrato se lo realizó por disminución en la absorbancia a 540 nm por el ensayo colorimétrico descrito por Linares (2010), en intervalos de 3 horas en un lapso de tiempo de 30 horas.

### **6.12.3 Influencia de la aireación en la actividad CHMO.**

Primeramente se preparó un sistema de aireación estéril (fotografía 1), el sistema contó con dos bombas de pecera, el cual descargaba el aire a una presión de 10 PSI (medido por un barómetro Cole-Parmer) sobre un matraz que contenía ácido



clorhídrico (HCl) 0,1N, este a su vez estaba conectado a tres matraces por medio de tubos de plástico, la salida del aire era filtrado por medio de filtros Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , con la finalidad de evitar contaminar el ambiente de trabajo.

Posteriormente se añadió el medio de cultivo previamente esterilizado, se inóculo 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop /mL de la cepa 177QD; el sistema fue incubado a 22°C. Se procedió a la medición de la actividad CHMO por medio de la depleción de cofactor, cada día, durante un periodo de tiempo de 7 días.

#### **6.12.4 Influencia de la agitación por magnetos en la actividad CHMO.**

Para realizar esta prueba se emplearon matraces Erlenmeyer de una capacidad de 250 mL, los cuales contenían magnetos (VWR, 12x3mm); el medio de cultivo CPD contenía concentraciones de glucosa de 15 g/L, 30g/L y 50 g/L, previamente esterilizados, se inoculó 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop/mL de la cepa 177QD; el sistema fue incubado a 22°C en agitación a 70 rpm posteriormente se procedió a la medición de la actividad enzimática por medio de la depleción de cofactor, cada día durante un periodo de tiempo de 7 días.

#### **6.13 Influencia de inductores fisicoquímicos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.**

##### **6.13.1 Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes compuestos xenobióticos.**

Se procedió a preparar medio CPD estéril, se añadieron los diferentes compuestos xenobióticos: cafeína, tabaco, benceno, ácido hexanoico, éter de petróleo a una concentración final de 20  $\mu\text{L/mL}$ , los cuales fueron esterilizados por filtración con filtros Millipore de 0,25  $\mu\text{m}$ ; como control se empleo el medio CPD sin la adición de ningún compuesto xenobiótico; se inoculó 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop/mL de la cepa 177QD; fueron incubados a 22°C en agitación a 100 rpm; posteriormente se procedió a la medición de la actividad enzimática por medio de la depleción de cofactor, cada día durante un periodo de tiempo de 7 días.



IIFB.

### **6.13.2 Influencia de la luz sobre la actividad CHMO a diferentes longitudes de onda, empleando filtros de color.**

Se procedió a la evaluación de la influencia de la luz a diferentes longitudes de onda por medio de filtros de color; se utilizaron frascos de vidrio de 100 mL los cuales contenían 30 mL del medio de cultivo CDP estéril, se procedió a inocular 1 mL de suspensión de  $10^6$  prop/mL de la cepa; posteriormente se procedió a forrar los frascos con papel celofán: violeta, rojo, verde, amarillo, rosado, azul, papel aluminio (oscuridad), como controles se trabajo con frascos sin filtro; los cuales fueron incubados a 22°C en agitación a 100 rpm; se procedió a la medición de la actividad enzimática por medio de la depleción de cofactor, cada día durante un periodo de tiempo de 7 día.

## **CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.**

### **7.1 Cultivo de los hongos filamentosos.**

Tras el sembrado en medio PDA, se observó que las cepas se encontraban totalmente libres de contaminación, sin embargo no se encontraban en condiciones de ser sometidas a evaluación enzimática por la baja concentración de propágulos. Observaciones realizadas por (Abarca, 2000) muestran que concentraciones bajas y altas de propágulos muestran resultados con muy poca reproducibilidad de la prueba, aconsejando una concentración intermedia de  $2 \times 10^3$  prop/mL.

### **7.2 Aislamiento de cepas de levaduras.**

Se logró aislar 5 cepas de levaduras, procedentes de muestras de tierras contaminadas con petróleo, según Castell (2000), los microorganismos que se encuentren rodeados por compuestos como hidrocarburos (compuestos xenobióticos) presentan mayor posibilidad de poseer actividad monooxigenasa; sin embargo se debe recordar que el citocromo P450 que poseen los microorganismos eucariotas, no solo llevan la adelante reacciones de oxidación sino también la de reducción e hidrólisis, como mecanismo de defensa ante estos compuestos (Shader et al., 2000).

### **7.3 Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.**

Se obtuvo una concentración final de  $1,6 \times 10^8$  prop/mL, Watt (2004) sugiere que la evaluación de la actividad debe ser realizada con una concentración de  $2,6 \times 10^3$  prop/mL; este valor equivale a una DO de 0,6, el cual conserva la linealidad requerida para la evaluación de la actividad (Secundo et al., 2005). Con respecto a las levaduras al ser hongos unicelulares su desarrollo es similar a la de las bacterias, a una temperatura de 30°C, favorecida con agitación, se obtuvo un desarrollo óptimo a las 72 horas de incubación, resuspendiendo las células y ajustando a una DO igual a 0,6.

## 7.4 Análisis de la actividad ciclohexanona monooxigenasa.

### 7.4.1 Análisis cualitativo por viraje de indicador.

En la tabla 5 se muestra que sólo 1 de 85 hongos filamentosos y 2 de 5 levaduras presentaron actividad CHMO. Según Watt et al., (2001) sugiere que la prueba idónea para la determinar la actividad en este proceso enzimático debe ser por medio de la detección de productos formados; sin embargo Miyazawa (1999) sugiere la depleción de cofactor a 340 nm, debido a que en este proceso solo interviene componentes como enzima, cofactor y sustrato.

Tabla 5. Evaluación de la actividad CHMO en cepas fúngicas.

Microorganismos	Negativos	Positivos	Código
Hongos Filamentosos	84	1	177 QD
Levaduras	3	2	7 QJR 14 QJR
<b>Total</b>	87	3	

El mecanismo por el cual la enzima lleva su acción sobre su sustrato (Figura 6) y la ruta de asimilación (Figura 7), son puntos clave para aseverar que si existe la presencia de actividad monooxigenasa por la formación de lactonas (Torres et al., 2007).

En la figura 8 podemos observar el viraje del indicador a tres diferentes tiempos, de una de las muestras sometidas al ensayo cualitativo, observando la producción de derivados de la ciclohexanona, esto por la reducción del pH, el cual fue monitoreado



por el viraje del indicador púrpura de bromocresol, que presenta un color violeta a pH ligeramente alcalino y vira a color amarillo a pH ácido (Lange's Handbook 1952).

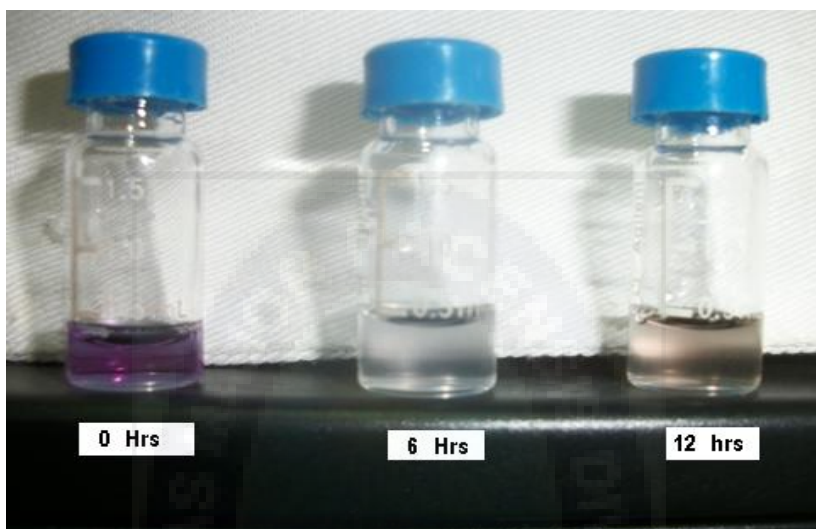


Figura 8. Análisis cualitativo basado en el viraje de indicador para la detección de lactonas producidas por la cepa 177QD.

## 7.5 Análisis cuantitativo.

### 7.5.1 Medición del consumo de sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos y levaduras.

En la búsqueda de nuevos microorganismos que presentan actividad CHMO, nosotros evaluamos a 90 microorganismos de los cuales fueron divididos en dos grupos: 85 hongos filamentosos y 5 levaduras, observar (anexo 9), la evaluación cuantitativa fue llevada por medio del consumo de ciclohexanona como sustrato, todas las pruebas fueron repetidas a tres tiempos. Obteniendo tres cepas con actividad CHMO.

Torres (2007), quien trabajó con genes putativos de BVMOs tipo I, observó que los hongos presentan menor frecuencia existe una menor frecuencia de actividad monooxigenasa, sin embargo Keppler et al., (2005) confirma que cepas de *Aspergillus* presentan actividad CHMO; al igual que Carballeira (2005) que evaluó la actividad CHMO en levaduras por medio de la biosíntesis de caprolactona.



IIFB.

En la tabla 6 y figura 9 se puede observar que a las 12 horas, las tres cepas difieren muy poco en relación al consumo de ciclohexanona, sin embargo la cepa 177QD presentó mayor adaptación llegando a consumir 41 mM de sustrato. Al respecto Norris (1978) plantea que esto ocurrió por la forma esporulada de la cepa 177QD en comparación con la forma vegetativa de las levaduras.

Tabla 6. Selección de la mejor cepa con respecto al consumo de ciclohexanona como sustrato en las cepas: 177QD; 14QJG; 7QJR.

Tiempo(Horas)	Cepa 177QD [mM]	Cepa14QJG [mM]	Cepa 7QJR [mM]
0	50	50	50
12	33	35	40
18	28	30	38
24	15	28	32
30	9	26	25

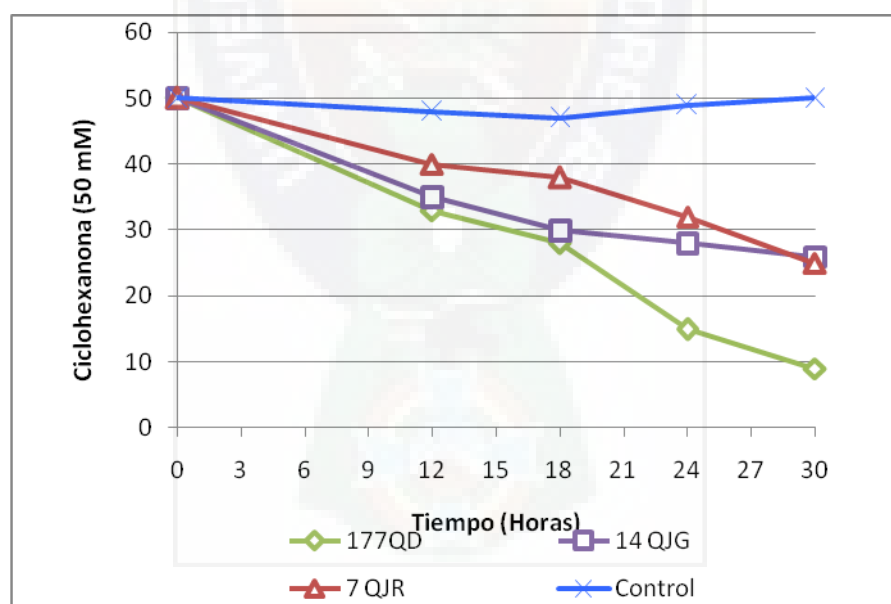


Figura 9. Comparación de la velocidad de consumo de sustrato entre las cepas 177QD; 14QJG; 7GJR.

La cepa 177QD presentó el mejor consumo de ciclohexanona como sustrato al cabo de 30 hrs, sin embargo las otras cepas también presentaron consumo, pero inferior al

cabo del mismo tiempo; no obstante no se descarta el uso de levaduras en este proceso. Los hongos filamentosos al ser organismos pluricelulares pueden ser manipulados con mayor comodidad por su desarrollo lento, también se puede aprovechar el que se puede utilizar su propia biomasa como soporte (Doig et al., 2001), en comparación con las levaduras las cuales tienen un desarrollo rápido, similar al de las bacterias (Mihovilovic et al., 2001).

### 7.6 Comparación de diferentes técnicas de lisado.

Para realizar la confirmación de la actividad CHMO nosotros primeramente comparamos diferentes técnicas de lisado, para poder llevar adelante la cuantificación de la enzima por medio de la depleción de cofactor, es así que la mejor técnica, con la cual se obtuvo 125 ug/ml de proteína a los 5 minutos, fue con la técnica de lisis mecánica con perlas de vidrio (tabla 7 y figura 10).

Tabla7. Comparación de técnicas de lisado en biomasa de la cepa 177QD.

Tiempo (min)	Técnica de lisado de proteínas totales (ug/mL)		
	Ebullición con SDS	Ebullición con álcalis fuerte	Lisis mecánica con perlas de vidrio
0	0	0	0
1	82	0	42
2	60	20	62
3	80	38	80
4	51	35	97
5	18	30	125
6	41	16	95
7	15	0	82
8	22	0	62



IIFB.

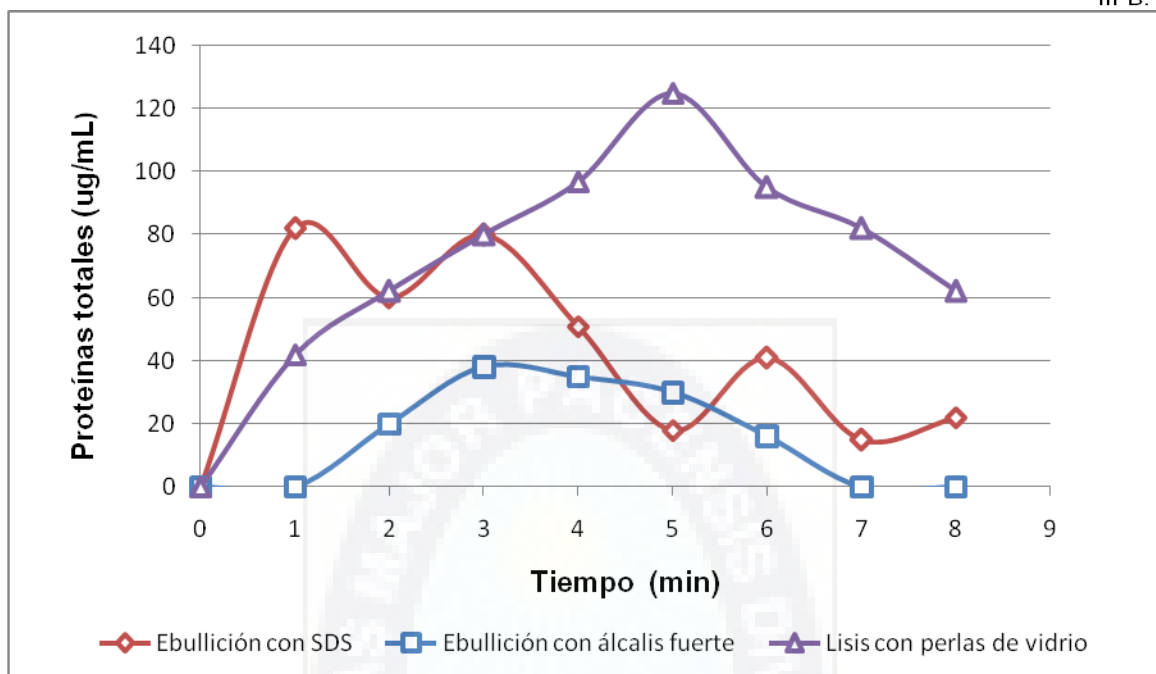


Figura 10. Comparación de técnicas de lisado a diferentes tiempos en biomasa de la cepa 177QD.

En la figura 10 podemos apreciar las diferentes concentraciones de proteínas totales obtenidas tras someter la biomasa formada a lisis, teniendo como segunda alternativa la técnica ebullición con SDS con la cual se pudo obtener 80 ug/ml de proteínas totales al someter al proceso la muestra durante 1 minuto. Según Wild (1975) la lisis mecánica es una técnica física que no altera la forma nativa de la molécula de interés, pero a tiempos prolongados se produce el incremento de la temperatura por la energía cinética liberada tras los golpes de las perlas de vidrio. A comparación con los procesos que incluyen el uso de compuestos químicos como las técnicas de ebullición con SDS, o ebullición en álcalis fuerte, combinan el calor con la acción de un detergente o el incremento del pH respectivamente; estas condiciones incrementa la posibilidad de desnaturar la proteína (Bussel et al., 1975), sin embargo Morris (1978) indica que la técnica de mejor rendimiento es la de ebullición con álcalis fuerte; debido quizás a que le interesaba obtener material genético y eliminar proteínas, efecto que si sucede con los resultados obtenidos en presente trabajo.



Tabla 8: ANOVA de doble vía: Proteínas totales versus Técnicas de lisado; Tiempo

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Técnica	3	60099	20033,2	1549,70	0,000
Proteína	7	17146	2449,4	189,48	0,000
Interacción	21	34545	1645,0	127,25	0,000
Error	64	827	12,9		
Total	95	112618			

La tabla 8 muestra el análisis estadístico en el cual podemos observar que existe diferencia estadísticamente significativa para un  $(p \leq 0.05)$ . Además se muestra que se calculó un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.

### 7.7 Medición de la depleción de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).

Se confirmó la actividad CHMO de la cepa seleccionada, por medio del monitoreo de la oxidación de NADPH (figura 11). Para confirmar la actividad CHMO y cuantificar la misma, se realizó el seguimiento del componente esencial del mecanismo de reacción de la monooxigenasa en estudio, NADPH se encarga de activar la molécula de oxígeno en una reacción oxido reducción, donde se oxida y reduce al oxígeno, quedando activa para ser incorporada en al grupo carbonilo por acción de la enzima. Secundo (2005) aconseja en las pruebas preliminares para llevar adelante la identificación de la actividad CHMO, por ensayos cualitativos como viraje de indicador, o cuantitativos como ser formación de cromógenos y compuestos fluorescentes, por el bajo costo de operación; pero en procesos donde ya interese netamente el producto a formarse, debe ser hecho por cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

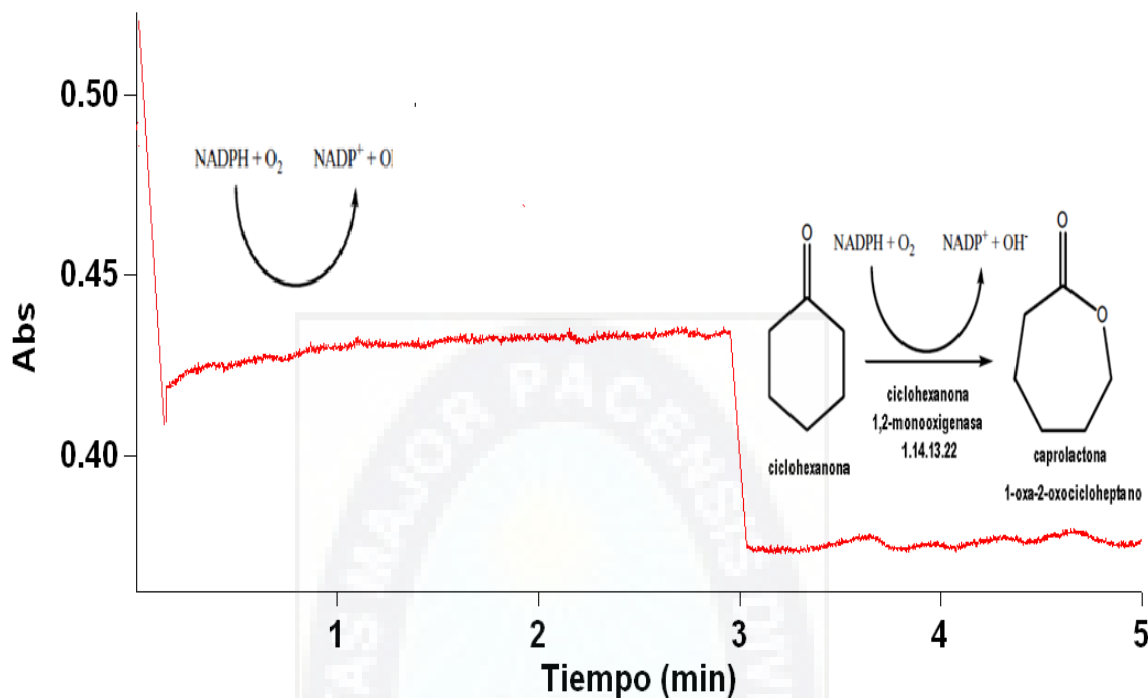


Figura 11. Depleción de cofactor NADPH a 340 nm de la cepa 177QD.

## 7.8 Identificación de la cepa 177QD

### 7.8.1 Características macroscópicas de la cepa 177QD.

En el cultivo la cepa 177QD presentó un color oliváceo y ocasionalmente verde oscuro como se muestra en la figura 12, los micelios eran blancos, apenas visible; esclerocios y en ocasiones presentaban un color marrón a negro, el tamaño y su forma era variable; en el reverso de la placa generalmente era incoloro y en ocasiones era amarillo pálido. Inicialmente la cepa presentaba un aspecto algodonoso (hasta el tercer día de incubación), sin embargo en algunas placas se observó la variación de un aspecto granuloso por la esporulación (a partir del quinto día de incubación), observaciones similares fueron obtenidas por Abarca. (2000).

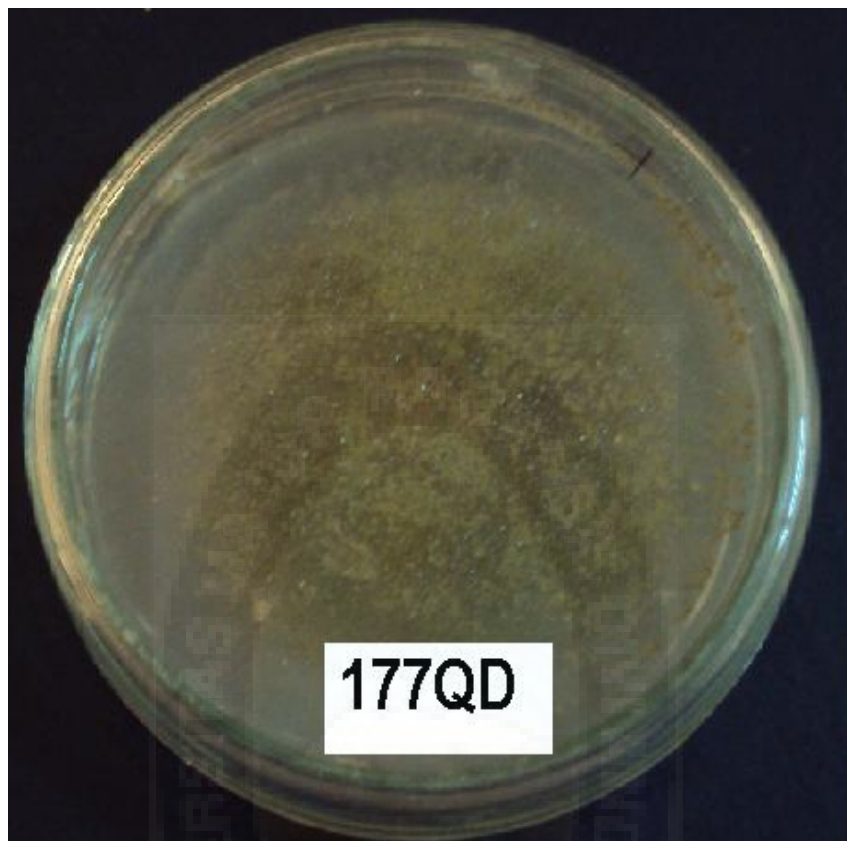


Figura 12. Características macroscópicas en placas de PDA donde se observa el desarrollo de la cepa 177QD y se aprecia la coloración característica del hongo.

### **7.8.2 Identificación microscópica de la cepa 177QD.**

Las características observadas al microscopio son cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales; estipes normalmente rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Como se observa en la figura 13, los Conidios globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos. La descripción morfológica encaja con lo expuesto por Bucio (2001).



Figura 13. Características microscópicas cepa 177QD tomada a 100X.

## **7.9 Influencia de los parámetros químicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.**

### **7.9.1 Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono.**

La tabla 9 y figura 14 muestran que se obtuvo una actividad enzimática de 91 UI/L al cuarto día de cultivo, con un consumo de 18 g/L de glucosa. Resultados similares fueron obtenidos por Carballeira (2004), además podemos observar que con las tres concentraciones de glucosa con las que se trabajaron, en la concentración intermedia se obtiene una mayor actividad enzimática. Al respecto Wong (1985) observó que al trabajar con concentraciones muy elevadas de glucosa se ocasiona la inhibición de la actividad, por un desarrollo muy rápido del microorganismo, incrementándose la biomasa y ocasionando que la captación de oxígeno se haga más difícil. Condiciones descritas anteriormente sobre la saturación por biomasa, poca captación de oxígeno conducirían al cambio en el comportamiento de





metabolismos del microorganismo llevando adelante la reducción de su sustrato y no así la oxidación, debido a la expresión de genes específicos (Brzostowicz et al., 2002).

Tabla 9. Influencia sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de fuente de carbono en la cepa 177QD (IIFB-2011).

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/L)			consumo de glucosa g/L		
	glucosa 15g/L	glucosa 30g/L	glucosa 50g/L			
0	0	0	0	0	0	0
1	27	36	51	5	9	12
2	50	56	50	6	12	18
3	68	82	62	7	16	22
4	58	91	50	11	18	29
5	49	58	39	11	19	30
6	38	38	36	12	21	33
7	26	26	34	13	24	40

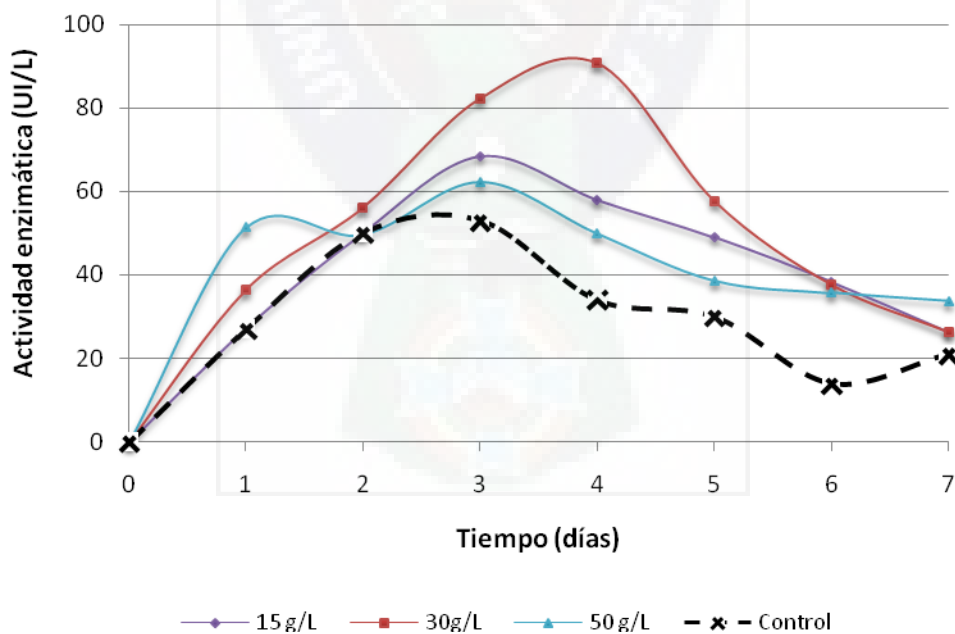


Figura 14. Influencia de diferentes concentraciones de glucosa en la actividad CHMO en la cepa 177QD.



IIFB.

La figura 14 muestra que al tercer y al cuarto día de cultivo se obtienen 82 y 91 UI/L respectivamente; sin embargo decrece al quinto día con un cultivo que contenía inicialmente 30g/L de glucosa, además podemos observar que la actividad enzimática incrementó con relación al control.

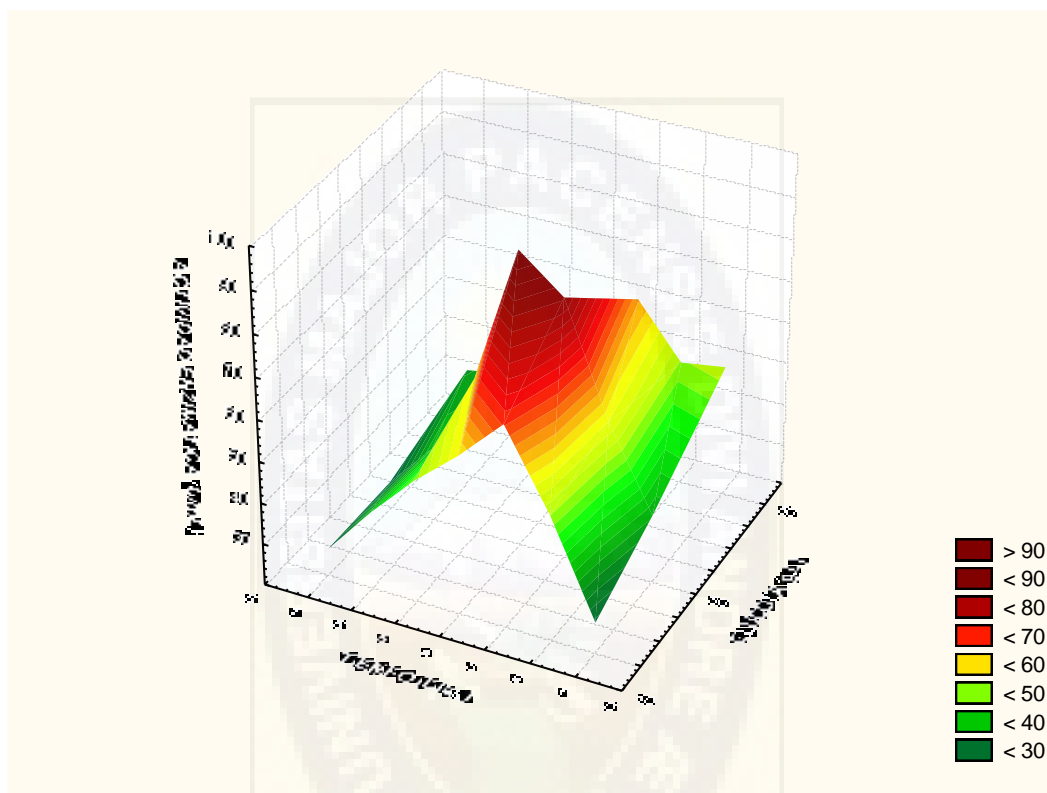


Figura 15. Superficie de respuesta de la Influencia de diferentes concentraciones de glucosa sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.

Tabla10. ANOVA de doble vía: actividad enzimática versus concentración de glucosa; tiempo

Fuente	DF	SS	MS	F	P
(C) glucosa	2	1311,7	655,83	43,26	0,000
Tiempo	6	13054,6	2175,77	143,53	0,000
Interacción	12	3725,5	310,46	20,48	0,000
Error	42	636,7	15,16		
Total	62	18728,4			

La figura 15 muestra la superficie de respuesta de la interacción de diferentes concentraciones de glucosa y el tiempo de cultivo con respecto a la actividad enzimática, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa para un



( $p \leq 0.05$ ), además en la tabla se muestra que se calculó un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.

### **7.9.2 Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno.**

En el metabolismo de todo microorganismo fúngico es muy importante la presencia de nitrógeno, ya que, algunos de los compuestos químicos con actividad biológica que son sintetizados por estos microorganismos, presentan en su estructura moléculas de nitrógeno, en tal razón se adicionó diferentes fuentes de nitrógeno a los medios de cultivo PDC, siendo este medio un medio basal para el crecimiento de hongos filamentosos (Espinal et al., 2009).

En el presente trabajo se obtuvo una actividad de 109 UI/L al primer día de cultivo utilizando molibdato de amonio como fuente de nitrógeno; sin embargo la peptona como la urea también incrementan la actividad con respecto al control al quinto día lo cual puede ser observado en la tabla 6 y figura 16.

Además en la tabla podemos observar otros parámetros que fueron medidos al momento de la medición de la actividad enzimática del cultivo: presentó un peso húmedo de 3 g; un peso seco de 0,9 y un pH de 6,4; según Lacey (1989), estos parámetros indican que a ese tiempo de cultivo el microorganismo está metabólicamente activo.

Al respecto Espinal (2009), observó que existe influencia sobre la actividad enzimática al emplear diferentes fuentes de nitrógeno, la síntesis de enzimas hidrolíticas se incrementaba con nitrato de amonio a una concentración final de 1g/L; sin embargo en nuestro caso con nitrato de amonio a la misma concentración obtenemos la actividad más baja en comparación con las otras fuentes de nitrógeno, obteniendo solamente 55 UI/L

Tabla 11. Influencia sobre la actividad CHMO empleando diferentes fuentes de nitrógeno en la cepa 177QD.



IIFB.

Fuente de nitrógeno (1 g/L)	Tiempo de incubación (día)	Actividad enzimática (UI/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	pH
Control	0	0	0	0	0	6,8
	4	67	10	3,4	1	7,4
Peptona	5	88	12	2,8	1,2	7,7
Nitrato de amonio	4	55	14	4,5	2,1	7
Molibdato de amonio	1	109	6	3	0,9	6,4
Urea	5	88	13	2,4	0,4	8,9
Extracto de levadura	2	77	8	3,1	1,4	6,2

También podemos observar en la figura 16 que con extracto de levadura obtenemos la actividad más baja al primer día, pero llega a ser la actividad más alta al segundo día de cultivo con 77UI/L.

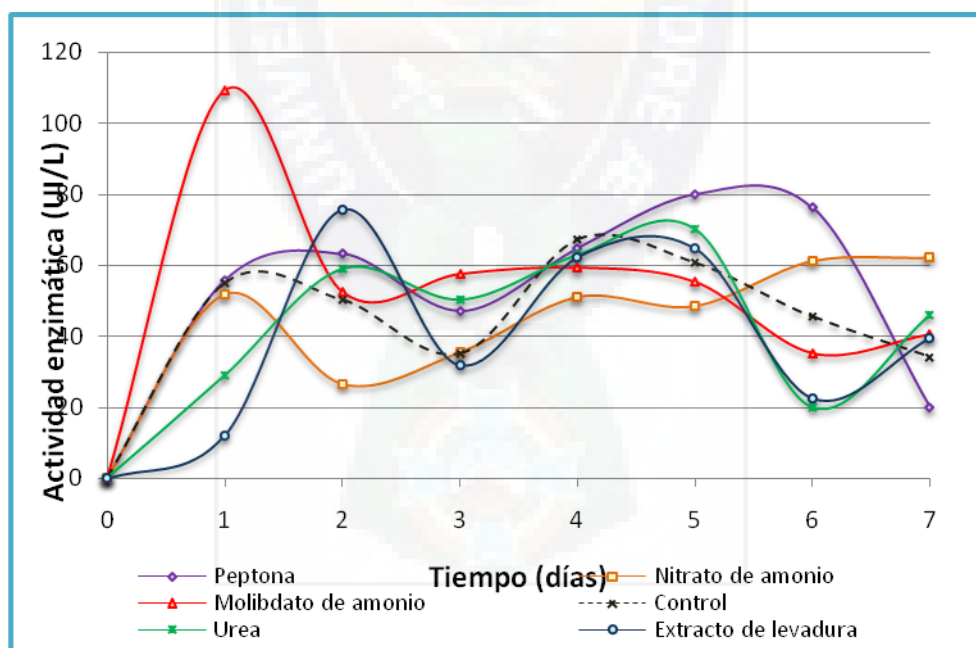


Figura 16. Evaluación de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.



IIFB.

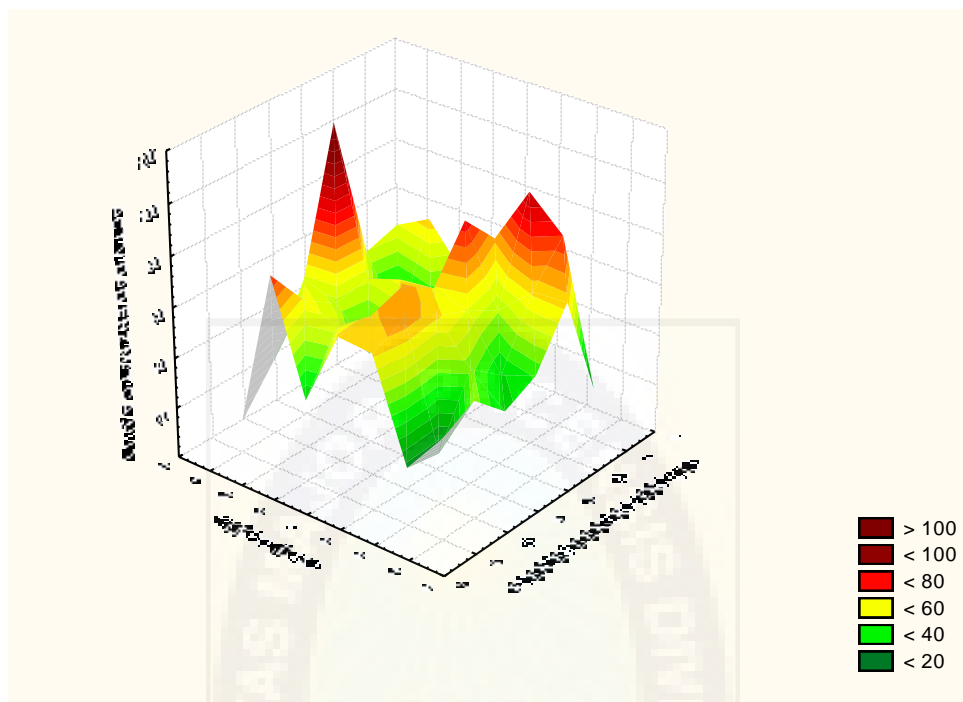


Figura 17. Superficie de respuesta sobre la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno (1: Peptona; 2: Control; 3: Nitrato de amonio; 4: Urea; 5: Molibdato de amonio; 6: Extracto de levadura) en la actividad CHMO en la cepa 177QD.

Tabla 12: ANOVA de doble vía: Actividad enzimática versus Fuente de nitrógeno;

Tiempo					
Fuente	DF	SS	MS	F	P
Fuente de N <sub>2</sub>	5	3947,6	789,52	22,02	0,000
Tiempo (días)	6	11128,9	1854,82	51,74	0,000
Interacción	30	31819,8	1060,66	29,59	0,000
Error	84	3011,3	35,85		
Total	125	49907,7			

La figura 17 muestra la superficie de respuesta de la interacción de diferentes fuentes de nitrógeno y el tiempo de cultivo con respecto a la actividad enzimática, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa para un ( $p \leq 0.05$ ); al respecto podemos observar que la actividad CHMO depende de la fuente de nitrógeno y del tiempo de cultivo, además se obtuvo un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.



## **7.10 Influencia de los parámetros físicos sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD.**

### **7.10.1 Influencia de la temperatura en la actividad CHMO con esporas y biomasa en la cepa 177QD.**

La tabla 13 y figura 18 muestran el consumo de ciclohexanona por propágulos y biomasa, a temperaturas de: 4°C; 22 °C; 37 °C, obteniendo un mayor consumo a 22°C y 37°C indiferentemente en propágulos o biomasa, también podemos observar que el consumo de sustrato es inhibido a la temperatura de 4°C en ambos casos. Resultados similares se obtuvieron por Lacey (1989), la cual describe que la temperatura ideal para estos microorganismos está dada entre 22 y 37°C. Sin embargo según Mandakumar (2002) sugiere que la temperatura ideal de incubación de mohos filamentosos esta entre (22°C- 30°C), al trabajar con la cepa 177QD, esta se desarrolló de manera similar a 37°C. Al respecto Nyns (1986) propone que el incremento en la temperatura es beneficioso, pues propiedades como la tensión superficial, transferencia de masa y viscosidad son afectados de manera positiva para el consumo de nutrientes por parte del microorganismo. Sin embargo Goldman (1994), plantea que el uso de microorganismos que requieren temperaturas fuera de las temperaturas ambientales incrementan los costos en la producción a niveles industrial de la enzima por incorporación de sistemas de calefacción en los biorreactores.No obstante, la relación inversa entre temperatura y la concentración de oxígeno disuelto puede verse alterada en ambientes naturales por efecto del proceso de respiración.

Tabla 13. Influencia de la temperatura en el consumo de ciclohexanona como sustrato en propágulos y biomasa de la cepa 177QD.

Muestra	Tiempo (hrs)	Temperatura					
		4 °C		22 °C		37 °C	
		Esporas	Biomasa	Esporas	Biomasa	Esporas	Biomasa
1	0	42,46	42,52	42,5	42,52	42,6	44,04
2	6	42,4	42,34	40,6	40,46	42,5	41,55
3	12	42,4	42,40	31,4	31,13	32,1	32,10
4	18	42,6	42,40	25,1	24,70	21,6	21,01
5	24	42,3	42,22	16,3	16,82	13,9	14,16
6	30	42,3	42,40	9,1	9,85	11,0	11,61

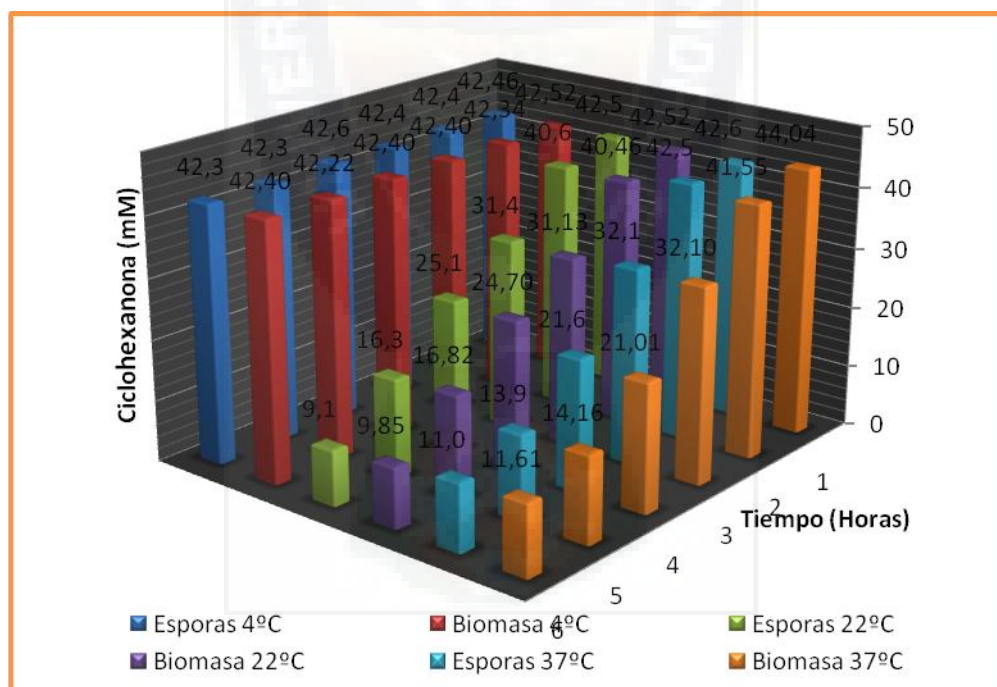


Figura 18. Influencia de la temperatura en el consumo de ciclohexanona como sustrato en la cepa 177QD en esporas y biomasa.



IIFB.

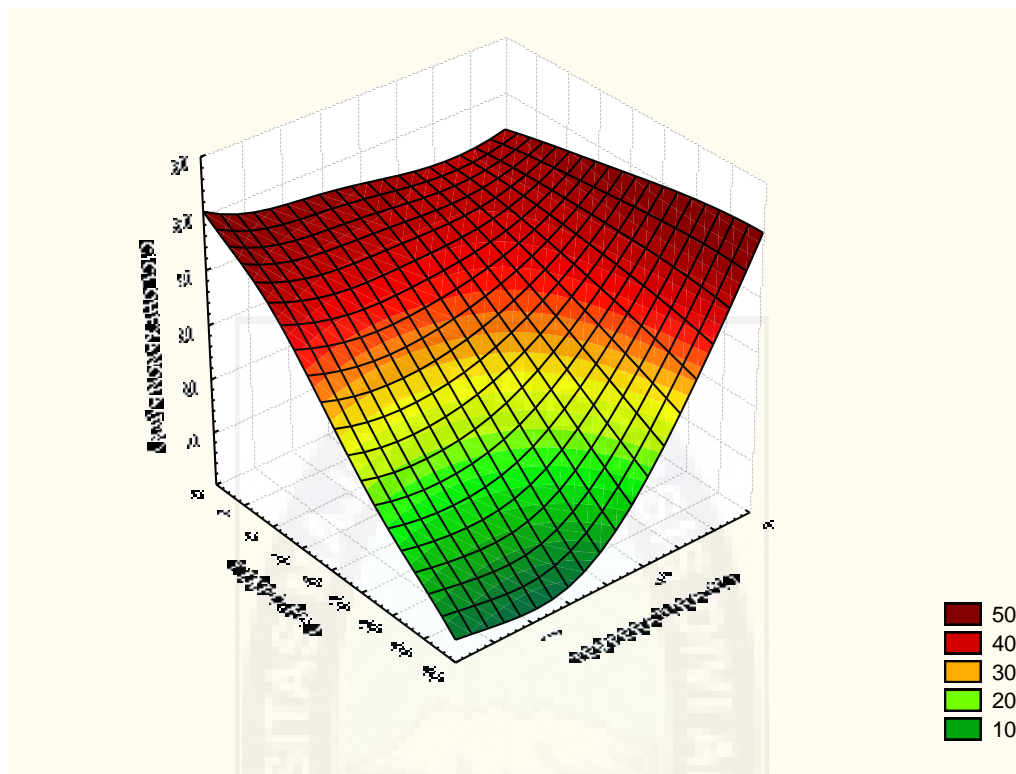


Figura 19. Superficie de respuesta de la influencia de la temperatura (4°C; 22°C, 37°C) en el consumo de ciclohexanona en la cepa 177QD.

Tabla 14. ANOVA de doble vía: Consumo de sustrato versus Temperatura; Tiempo (esporas y biomasa)

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	2	2750,25	1375,12	5839,07	0,000
Tiempo	5	3645,83	729,17	3096,20	0,000
Interacción	10	1894,19	189,42	804,31	0,000
Error	36	8,48	0,24		
Total	53	8298,74			

La figura 19 muestra la superficie de respuesta de la interacción de diferentes temperaturas y el tiempo de cultivo con respecto al consumo de sustrato, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa para un ( $p \leq 0.05$ ); al respecto podemos observar que el consumo de sustrato se ve afectado por la variación en la temperatura, además se obtuvo un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.

### 7.10.2 Influencia de la aireación en la actividad CHMO.



Para que se lleve a delante la reacción en la cual participa una monooxigenasa, se requiere la presencia de oxígeno, el cual es activado por la oxidación del cofactor NADPH (Woodyer et al., 2000).

La tabla 15 y figura 20 muestran que se obtuvo una actividad de 152 UI/L al segundo día de cultivo, con un consumo de 12 g/L de glucosa. Se trabajó con diferentes concentraciones de glucosa acopladas a un sistema de aireación que proporcionaba aire continuo estéril (fotografía 1). Al respecto Goldman (1994) describe que el oxígeno es un requisito nutricional esencial para la mayoría de los organismos vivos, por su participación en procesos oxidación-reducción, solubilidad de minerales y la descomposición de materia orgánica.

Tabla 15. Influencia de la aireación sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/L)			Consumo de glucosa g/L		
	glucosa 15g/L	glucosa 30g/L	glucosa 50g/L			
0	0	0	0	0	0	0
1	37	52	34	5	8	14
2	69	152	59	6	12	15
3	88	101	89	7	16	18
4	70	91	74	11	18	20
5	61	69	60	12	20	22
6	46	51	51	13	22	25
7	38	37	41	13	17	32

En la figura 20 se muestra la influencia de la aireación sobre la actividad CHMO al segundo día y posterior decremento al transcurrir el tiempo de cultivo. Resultados parecidos se obtuvieron en la prueba de agitación con concentraciones iguales de glucosa (tabla 15); sin embargo en este caso existe un incremento en la actividad a un menor tiempo de incubación. Resultados similares fueron reportados por Carballeira (2005). Según Martíne (2002), la disminución de la actividad enzimática se debe a que la concentración de sustrato es fácilmente asimilable, por tanto el microorganismo se reproduce de manera acelerada ocasionando un incremento de



IIFB.

biomasa, de manera que el oxígeno, el cual es un sustrato esencial para la monooxigenasa, no esta disponible con facilidad.

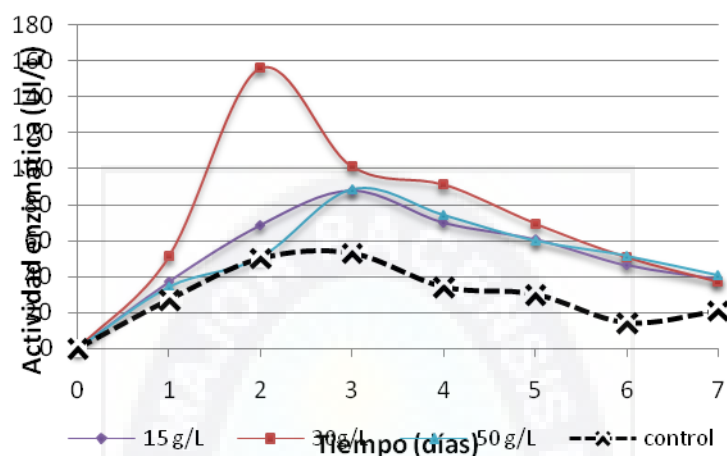


Figura 20. Influencia de la aireación sobre la actividad ciclohexanona monooxigenasa a diferentes concentraciones de glucosa, a los diferentes días del desarrollo de la cepa 177Q.

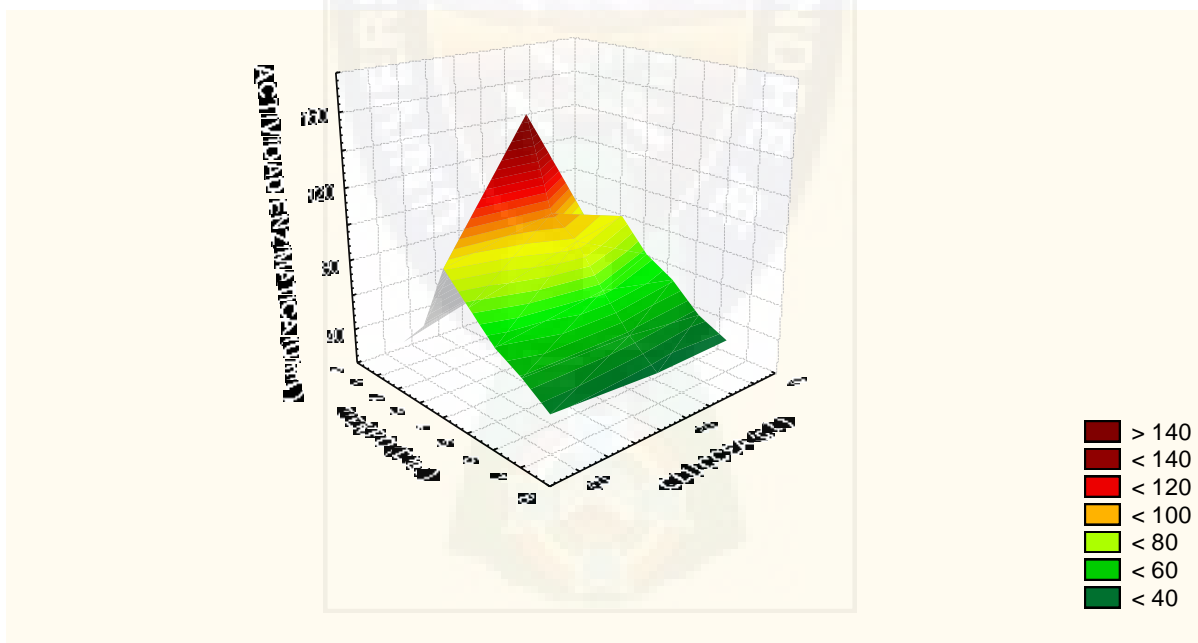


Figura 21. Superficie de respuesta en la influencia de la aireación, sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD a diferentes concentraciones de glucosa (1:15 g/L; 2:30g/L; 3:50g/L).

Tabla 16. ANOVA de doble vía: actividad enzimática versus concentración glucosa; tiempo.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---



Aireación	2	6405,8	3202,90	132,06	0,000
Tiempo	6	27921,4	4653,57	191,87	0,000
Interacción	12	13075,5	1089,63	44,93	0,000
Error	42	1018,7	24,25		
Total	62	48421,4			

Los resultados obtenidos muestran que existe una clara diferencia estadísticamente significativa para un  $(p \leq 0.05)$ . Según Woodyer et al., (2000), el suministro de oxígeno en un medio lleva adelante un buen desarrollo del microorganismo; sin embargo concentraciones elevadas pueden ser tóxicas, llegando a inhibir el desarrollo del mismo. Además en la tabla se muestra que se calculó un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.

### 7.10.3 Influencia de la agitación por magnetos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.

Por medio de la agitación se pretendió incrementar la interacción del microorganismo con el sustrato y la captación de oxígeno en un sistema de cultivo discontinuo o en batch, en esta prueba se propone un sistema de agitación por medio de magnetos (fotografía 2).

La tabla 17 y la figura 22 muestran que se obtuvo una actividad de 63 UI/L con un consumo de 13g/L de glucosa al tercer día de cultivo, se observó que no hubo la formación de biomasa en la superficie del medio de cultivo (fotografía 3).

Se pudo observar que la combinación de diferentes concentraciones de glucosa y agitación mediada por magnetos ocasiona un decremento drástico de la actividad.

Tabla 17. Influencia de la agitación con magnetos sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.

Tiempo	Actividad enzimática (UI/L)			Consumo de glucosa (g/L)
	glucosa	glucosa	glucosa	



IIFB.

(días)	15(g/L)	(30g/L)	(50g/L)			
0	0	0	0	0	0	0
1	18	36	22	6	10	15
2	50	51	32	8	12	18
3	53	63	42	11	13	20
4	49	51	36	11	18	24
5	31	38	27	12	22	26
6	27	29	24	13	24	28
7	16	23	17	13	26	29

Podemos observar que no existió un incremento en la actividad enzimática, con respecto al control, el cual no fue sometido a agitación mediada por magnetos.

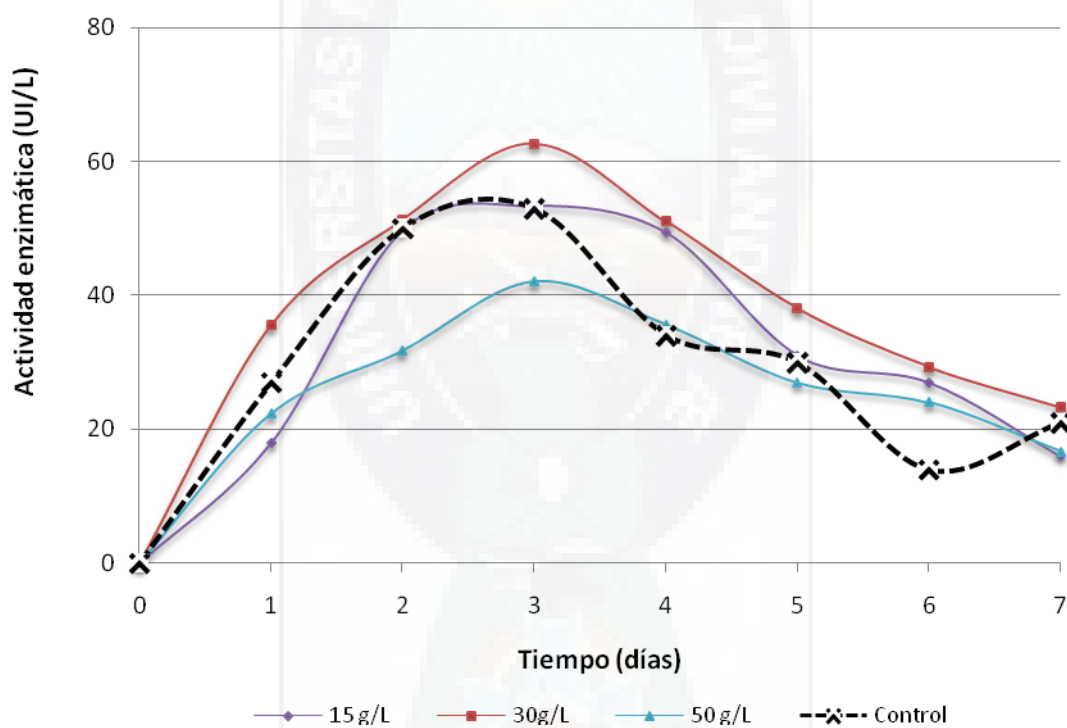


Figura 22. Influencia de la agitación por magnetos sobre la actividad CHMO a diferentes concentraciones de glucosa en la cepa 177QD.



IIFB.

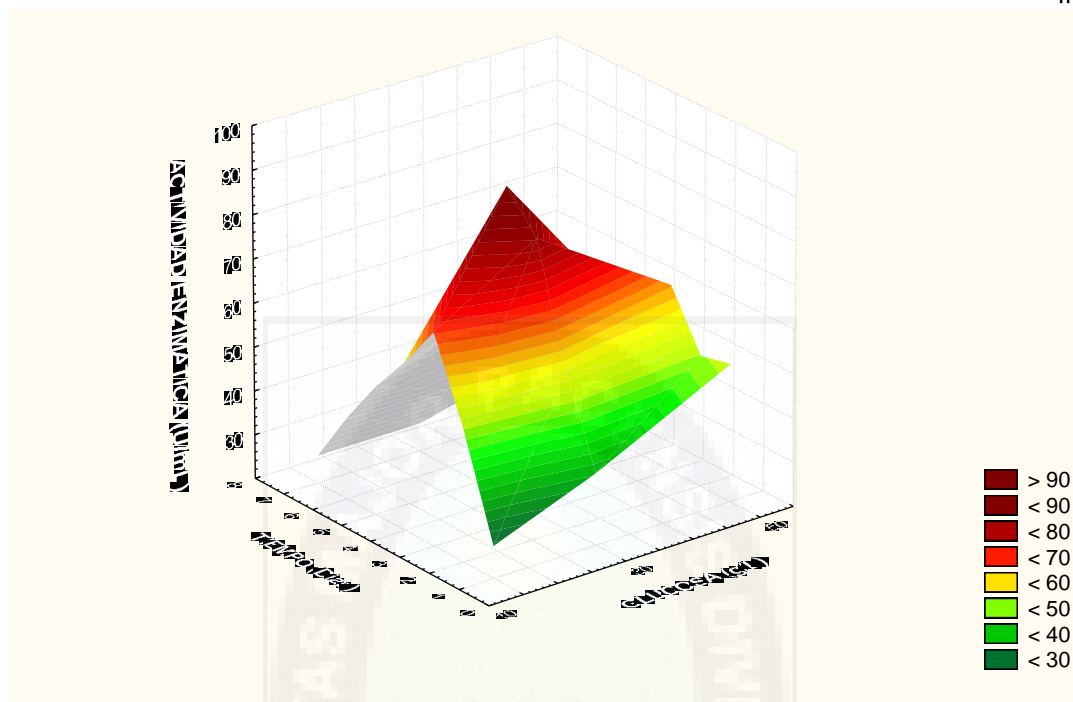


Figura 23. Superficie de respuesta en la influencia de la agitación por magnetos, sobre la actividad CHMO en la cepa 177QD a diferentes concentraciones de glucosa (1:15 g/L; 2:30g/L; 3:50g/L).

Tabla 18. ANOVA de doble vía: actividad enzimática versus magnetos; tiempo.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
(c) glucosa	2	1814,0	907,00	72,98	0,000
Tiempo	6	8466,9	1411,15	113,54	0,000
Interacción	12	803,1	66,93	5,38	0,000
Error	42	522,0	12,43		
Total	62	11606,0			

La figura 23 muestra la superficie de respuesta de la interacción de diferentes concentraciones de glucosa y el tiempo de cultivo, bajo la influencia de la agitación mediada por magnetos; sin embargo, los resultados no varían cuantitativamente uno del otro con respecto al control, no obstante presenta una diferencia estadísticamente significativa para un  $(p \leq 0.05)$ . Además se obtuvo un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a la tasa de diferencia entre los grupos. Al respecto podemos observar que hubo baja actividad, esto posiblemente debido a la interferencia en el desarrollo de la biomasa por la agitación producida por los magnetos.



## 7.11 Influencia de inductores fisicoquímicos en la actividad CHMO en la cepa 177QD.

### 7.11.1 Influencia sobre la actividad enzimática empleando diferentes compuestos xenobióticos.

La tabla 19 y la figura 24 muestran que hubo un incremento en la actividad enzimática, por la presencia de compuestos xenobióticos en el medio de cultivo, obteniendo así con la cafeína 103 UI/L al segundo día de cultivo con un peso húmedo de 5,5 y un peso seco de 2,1; el medio de cultivo presentaba un pH de 7,2 al momento de la medición de la actividad. Sin embargo, no todos los compuestos utilizados en esta prueba incrementaron la actividad; se observó que el éter de petróleo actúa como inhibidor de la actividad, acompañado de un bajo desarrollo del microorganismo al solo obtenerse un peso húmedo de 1,5 g y un peso seco de 0.5 g.

Tabla 19. Influencia sobre la actividad CHMO por efecto de compuestos xenobióticos de la cepa 177QD.

compuesto xenobiótico (20uL/mL)	Tiempo de incubación (día)	Actividad enzimática (UI/L)	peso húmedo (g)	peso seco (g)	pH
Control	0	0	0	0	6,8
Cafeína	4	53	3	1,8	5,3
Cafeína	2	103	5,5	2,1	7,2
Tabaco	4	26	3,1	1,4	7,3
Benceno	1	56	2,1	1	6,8
Ácido hexanoico	2	66	1,8	0,8	7,3
Éter de petróleo	2	56	1,5	0,5	6,8

Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones hechas por Ziegler (1993) quien sugiere una concentración de 100uL/ml del xenobiótico en el medio de



IIFB.

cultivo, al respecto nosotros trabajamos con una concentración de 20uL/mL obteniendo resultados similares. Según Castell (2002) se activan sistemas de defensa por medio de complejos enzimáticos los cuales oxidan, reducen o hidrolizan estos compuestos.

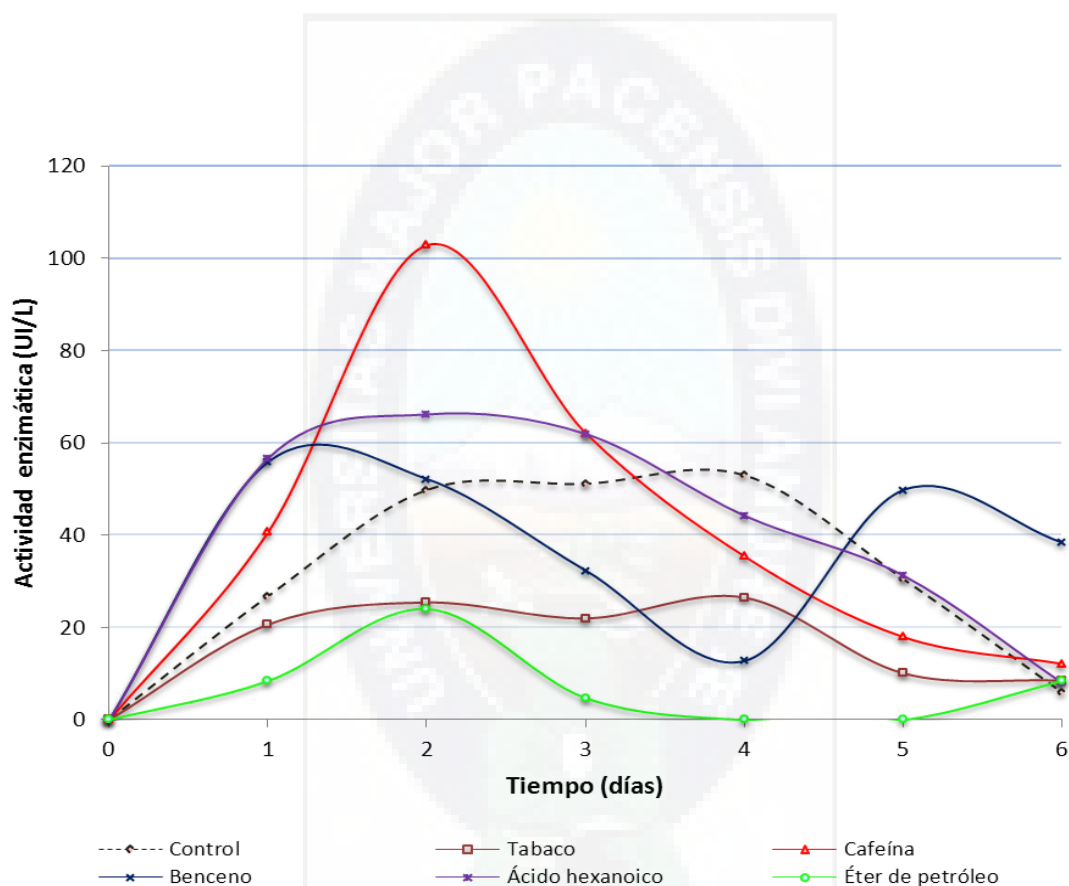


Figura 24. Influencia de compuestos xenobióticos sobre la actividad CHMO a diferentes días de desarrollo de la cepa 177QD.



IIFB.

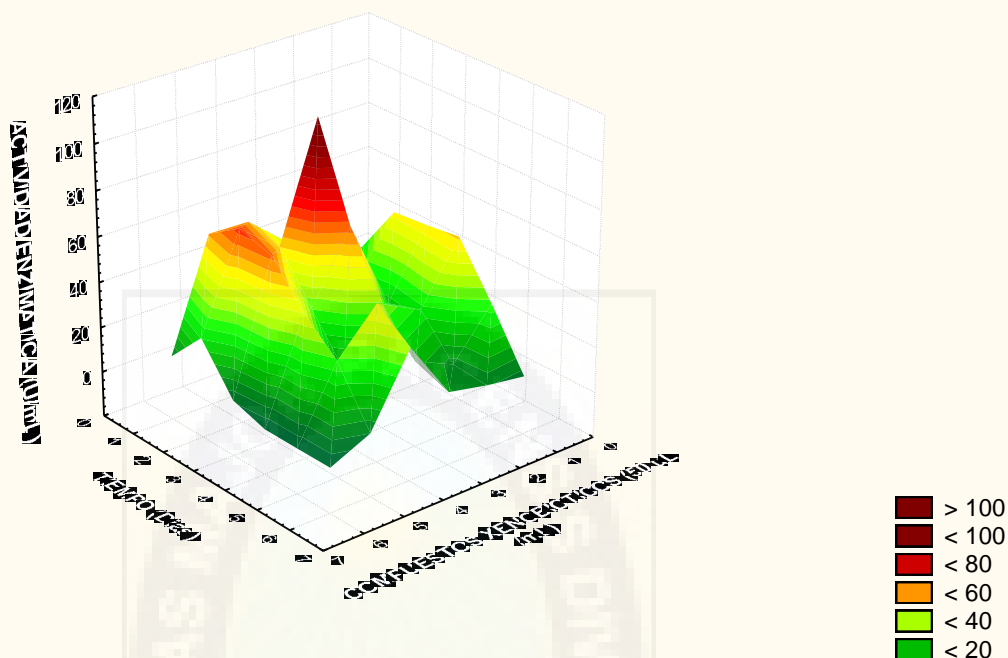


Figura 25. Superficie de respuesta en la actividad CHMO por medio de la inducción por compuestos xenobióticos (1: tabaco; 2: cafeína; 3: benceno; 4: ácido hexanoico; 5:éter de petróleo; 6:control) de la cepa 177QD.

Tabla 20. ANOVA de doble vía: actividad enzimática versus compuestos xenobióticos; Tiempo.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Xenobióticos	5	22664,4	4532,88	185,16	0,000
Tiempo (días)	5	17882,8	3576,56	146,09	0,000
Interacción	25	17338,0	693,52	28,33	0,000
Error	72	1762,7	24,48		
Total	107	59647,9			

En la figura 20 muestra la superficie de respuesta de la interacción de compuestos xenobióticos y el tiempo de cultivo con relación sobre la actividad CHMO, el análisis estadístico muestra una diferencia significativa para un ( $p \leq 0.05$ ); además tenemos un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos. Al respecto Bladeren (2000), observó que la presencia de estos compuestos en el medio de vida de los microorganismos induce la expresión de genes los cuales





codifican proteínas con actividad catalítica como ser: monooxigenasas, hidrolasas, reductasas etc., como mecanismo de defensa ante los xenobióticos los cuales pueden inhibir el crecimiento del microorganismo o ser tan tóxicos al grado de matarlos.

### **7.11.2 Influencia de la luz sobre la actividad CHMO a diferentes longitudes de onda, empleando filtros de color.**

Dentro de la inducción del efecto de la luz, mediante esta prueba buscamos establecer si la luz ejerce un efecto de foto inducción sobre la actividad CHMO y el desarrollo de la cepa 177QD.

La tabla 21 y la figura 26 muestran que se obtuvo una actividad de 149 UI/L al segundo día de cultivo con el filtro de color amarillo, con un peso húmedo de 2,4 y un peso seco de 0,4; el medio de cultivo presentaba un pH de 6,8 al momento de la medición de la actividad, resultados similares fueron reportaron por Espinal (2009). Al respecto Gonzales (2000) tras la evaluación de la influencia de la luz sobre la síntesis de enzimas hidrolíticas en cepas de *Trichoderma viride* concluye que el crecimiento y síntesis de enzimas no se ve influenciado por efecto de la luz, esto quizá se deba a que se expuso las cepas a la luz solar de forma directa, sabiendo que la luz solar cubre todo el espectro electromagnético de la luz visible, parte de la región del UltraVioleta (UV) y parte del infrarrojo, en contraste a esto nosotros por medio del forrado de los frascos con diferentes colores de papel celofán (fotografía 4) hicimos que pase una determinada longitud de onda del espectro electromagnético obteniendo un incremento en la actividad CHMO. Al respecto Wild (1992) afirma que los hongos dependen de las condiciones locales, especialmente luz, pH y del contenido de humedad.

Tabla 21. Influencia de la luz sobre la actividad CHMO por el paso de diferentes longitudes de onda en la cepa 177QD.

Filtros de color	Tiempo (día)	Actividad enzimática (UI/L)	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	pH
	0	0	0	0	6,8
Transparente	2	73	3,4	2,1	5,3
Azul	1	80	2,8	0,9	4,8
Verde	2	55	4,1	0,4	6,4
Rosado	2	45	3	2,1	7,2
Violeta	1	60	2,6	0,9	7,3
Amarillo	2	149	2,4	0,4	6,8
Rojo	2	59	3,5	1,3	5,2
Oscuridad	2	59	1,5	0,7	5,4

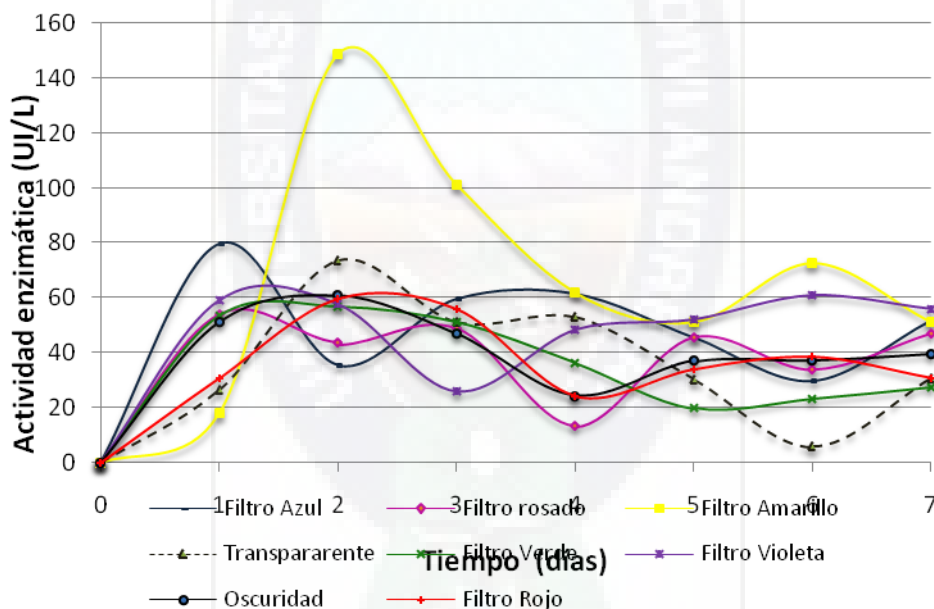


Figura 26. Influencia de la luz sobre la actividad CHMO por el paso de diferentes longitudes de onda en la cepa 177QD.

También se pudo observar que no todas las longitudes de onda inducen un incremento de la actividad, en el caso del filtro rosado, este inhibe la actividad obteniendo valores menores incluso con los cultivos que fueron sometidos a oscuridad, que si presentaron actividad enzimática; pero inferior a la del control (frascos sin filtro de luz) acompañado de un desarrollo igualmente bajo.



IIFB.

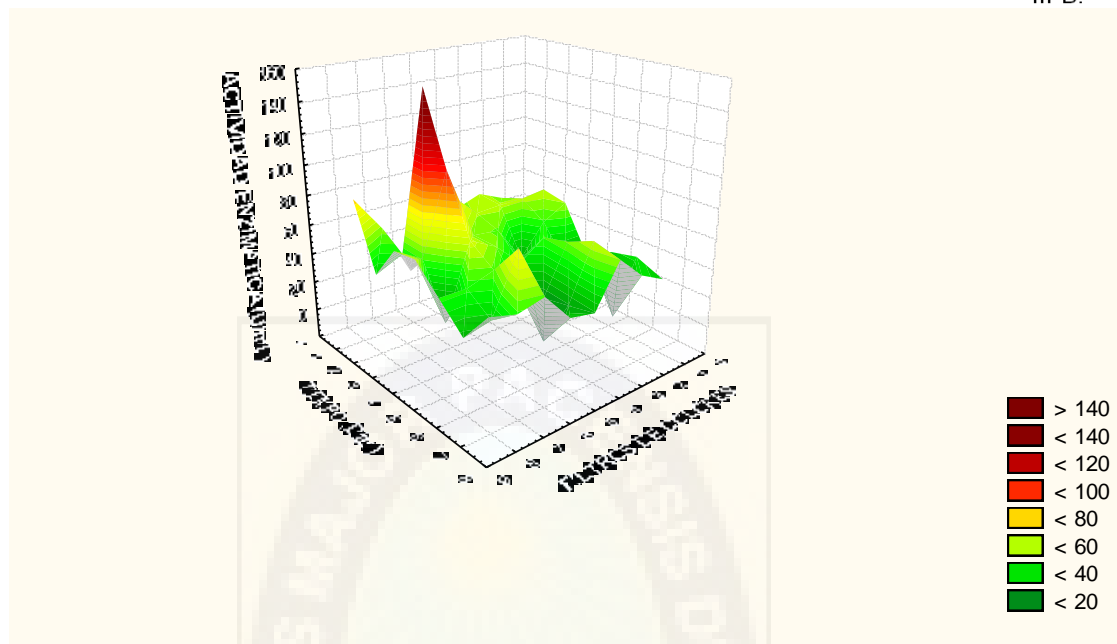


Figura 27. Superficie de respuesta en la actividad CHMO por medio de la influencia de filtros de luz ( 1: azul; 2:verde; 3:rosado; 4:violeta ; 5:amarillo; 6:oscuridad; 7:transparente ; 8:rojo) de la cepa 177QD.

Tabla 22. ANOVA de doble vía: actividad enzimática versus Filtros de luz; Tiempo

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Filtros de luz	7	21067,3	3009,62	33,01	0,000
Tiempo	6	18308,7	3051,44	33,46	0,000
Interacción	42	47291,6	1125,99	<b>12,35</b>	0,000
Error	112	10212,7	91,18		
Total	167	96880,3			

La figura 27 muestra la superficie de respuesta de la interacción de filtros de luz y tiempo de cultivo con relación en la actividad enzimática, el análisis estadístico muestra una diferencia significativa para un ( $p \leq 0.05$ ), además tenemos un valor de  $F \geq 3$  que corresponde a una elevada tasa de diferencia entre los grupos analizados.

## CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la actividad ciclohexanona monooxigenasa por medio de un screening de 90 microorganismos fúngicos, obteniendo 3 cepas con actividad



enzimática. Respecto a la optimización del medio de cultivo se evidenció que la actividad enzimática de la cepa seleccionada es influenciada por la variación de los factores fisicoquímicos de cultivo.

- ✓ Se evidenció que la cepa 177QD presenta la mejor capacidad de asimilación de la ciclohexanona como sustrato, identificándola por medio de las características macroscópicas y microscópicas que presentaba, cumpliendo con las características de *Aspergillus flavus*.
- ✓ Se determinó que la mejor fuente de nitrógeno para la inducción es molibdato de amonio, obteniendo una actividad de 109 UI/L al primer día de cultivo. Con respecto a la concentración de glucosa, la ideal es la de 30 g/L, obteniendo una actividad de 91 UI/L al cuarto día de cultivo.
- ✓ Con respecto a los parámetros físicos, se estableció que la temperatura ideal para el consumo de ciclohexanona como sustrato es de 22°C y 37°C, obteniendo un consumo de 41 mM de sustrato al cabo de 30 horas. con propágulos o biomasa indistintamente. Además se estableció que el suministro de oxígeno es importante para la actividad enzimática, obteniéndose 152 UI/L con la presencia de glucosa a una concentración de 30 g/L al primer día de cultivo. Por otro lado se observó que la agitación por magnetos disminuye la actividad enzimática.
- ✓ Dentro de la inducción por filtro de luz, se evidenció que el filtro de luz de color amarillo ejerce un efecto fotoinductor en la cepa 177QD, obteniéndose una actividad de 149UI/L al segundo día de cultivo. También en el presente



IIFB.

trabajo se evidenció que al añadir al medio de cultivo PDC cafeína a una concentración 20uL /ml se obtuvo una actividad de 103UI/L al segundo día de cultivo.





## CAPITULO IX. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.

Dentro de las perspectivas futuras que nos planteamos, tenemos:

- Continuar con la optimización de las condiciones de cultivo de la cepa 177QD, con la finalidad de incrementar la actividad CHMO, combinando todas las variables que tienen influencia sobre la misma en un solo sistema de cultivo.
- Construir sistemas químicos de regeneración de cofactor.
- Construir un biorreactor a escala laboratorial para la producción específica de caprolactona.
- Identificar molecularmente la cepa 177QD.
- Trabajar con mutantes de la cepa 177QD, que no tengan la dependencia del cofactor NADPH sino de NADH.
- En las pruebas futuras a realizar se sugiere estandarizar curvas de caprolactona y ácido adípico en cromatografía líquida de alta precisión, para su fácil detección y cuantificación.

Dentro de las recomendaciones tenemos que:

- Con respecto a la agitación con magnetos, si se quiere trabajar sobre este punto tener cuidado de no generar muchas rpm, debido a que interfiere con la formación de biomasa; se sugiere aplicar un sistema de aireación.
- Al realizar las mediciones de actividad enzimática procurar hacerlo durante el primer hasta el cuarto día, debido que la formación de biomasa interfiere en la captación de oxígeno, disminuyendo la actividad enzimática, existiendo la posibilidad de reportar actividades enzimáticas bajas.



## CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA

Agnieszka C., Adam B., 2008. Viscosimetric studies of aqueous solutions of dicarboxylic acids. *Journal of Molecular Liquids*, 137; 116–121.

Alphand F., Giacomo C., 2004, Mechanism of Oxidative Inactivation of *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 Cyclohexanone Monooxygen *Undergraduate. Research*. 6; 38-42.

Alphand F., Giacomo C., Wohlgemuth R., Furstoss M., Woodley M., 2003. Towards large-scale synthetic applications of Baeyer-Villiger Monooxygenases. *TRENDS in Biotechnology* . 21; 318-323.

Mandal A., Ahmadb, M.I. Khanb, R. Kumara ,2002. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 181, 237–241.

Blanc 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *J. Agric. Food Chem.* 46; 673-675.

Brzostowicz, P. C., Blasko, M. y Rouvière, P. E. 2002. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58; 781–789.

Caballeira J., Álvarez E., Sinisterra J., 2004. Biotransformation of cyclohexanone using immobilized *Geotrichum candidum* NCYC49: Factors affecting the selectivity of the process. *Jornal of molecular catalysis*, 28; 25-32.

Calle J., Villegas R., 2007. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas Redox por *Aspergillus niger* QD y *Pestalotia sp* 2i QJR. *Biofarbo*, 7 29-36.

Casablanca E., Ríos N., 2009. Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *Biofarbo*, 17(2); 51 -59.

Córdova M., González S., 1999. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de hongos termófilos y termotolerantes. dep. de ing. Química IV congreso latinoamericano de biotecnología y bioingeniería.



Daymara I., Vaillant F., Gómez I., 2009. Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. *Agricultura Técnica en México*.35; 219-223.

Devrim Ç., Emine B., Ülkü M., 2004. Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochemical Engineering Journal*, 17; 5–13.

Doig S., Lisa M. O'Sullivanb, Sejal P., John M., Woodley M., 2001. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *E.coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology*, 28; 265–274.

Francesca Z., Stefano R., Piero P., Giacomo Carrea, Nicoletta Gaggero, John Woodley M., 2004. Comparison of cyclohexanone monooxygenase as an isolated enzyme and whole cell biocatalyst for the enantioselective oxidation of 1,3-dithiane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* .31; 165–171.

Giovanna T., Pac E., Sisto R., Pignini D., 2008. Validation of an HPLC/MS/MS method with isotopic dilution for quantitative determination of *trans,trans*-muconic acid in urine samples of workers exposed to low benzene concentrations. *Journal of Chromatography B*, 867; 26–31.

González D. 2007. Complejo enzimático citocromo P450. *Ambient*, 23; 177-183.

González M., Siannah D., Dainelis Cabeza Pullés, Melek C., 2000. Influencia de la luz solar en el crecimiento y esporulación del biofungicida *Trichoderma viride*. *Tecnología química*, 20; Vol. XX, No. 1, 2000 92-97.

Gutiérrez Y., Dustet J., Martínez J., 2008. Obtención de una lipasa de *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido de salvado de trigo. Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería.

Hilker I., Baldwin C., Alphand V., Furstoss R., 1970. Análisis químico de suelos. Barcelona, España. Omega. 662.

Jeng I. Lin I. Hervey, 1990. Importance of ultrasonication conditions in recovery of microbial contamination from material surfaces. *Journal Applied Bacteriology*. 68; 479-484.





IIFB.

Keppler L., Porto H., Schoenlein-Crusius, João V. Comasseto y Leandro H. Andrade, 2005. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones, *Enzyme and Microbial Technology* , 36; 1967-975.

Linares G., Chavéz G., 2010. Rapid Colorimetric Assay for Cycloketones: A new Method for Analysis of Whole Cell Baeyer-Villiger Monooxygenase Activity, *Department of Biotechnology, Lund University*.

Lindström, Albertsson A., Hakkarainen M., 2004. Development of a solid-phase extraction method for simultaneous extraction of adipic acid, succinic acid and 1,4-butanediol formed during hydrolysis of poly(butylene adipate) and poly(butylene succinate). *Journal of Chromatography A*, 1022; 171–177.

Islas P., Valenzuela B., Jerardino S., 1987. Intoxicación aguda por fenoles. *Pediatría*, 58; 402-404.

Mendoza A, Ahmadb A., Khanb I., Kumara R., 2007. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 18; 237–241.

Montes C., Magaña I., 2009. Enzimas con aplicación industrial. XXX Aniversario de biotecnología y bioingeniería.

Morris y Nicholls, 1978. An evaluation of optical density estimate fungal spore concentration in water suspensions. *phytopathology*. 68 ; 1240-1242.

Nandakumar N., Marten R., 2002. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two- dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins *Electrophoresis*.23 ; 2216–2222.

Norris y Trudgill august, 1970. The metabolism of cyclohexanol by *Nocardia globerula* GL-1. *Journal biochem*. 121 ; 363-370.

Pereira D., 2006. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. *Journal of Biotechnology*, 9; 48-53.

Pereira, Jaime Herrera, Angela Machuca, Manuel Sánchez, 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata* *Bosque*28; 215-219.



Ray, Stephen R. McDow. 2005. Dicarboxylic acid concentration trends and sampling artifacts *Atmospheric Environment*, 39; 7906–7919.

Reyes C., Morales G., 2007. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* de *Phytophthora parasitica* en aguacate , en la zona aguacatera de michoacan, Mexico. *Facultad de Agrobiología* , 17; 978-956.

Roland Wohlgemuth. 2006. On the Influence of Oxygen and Cell Concentration in an SFPR Whole Cell Biocatalytic Baeyer–Villiger Oxidation. *Process InterScience*, 27; 1139-1144.

Roseñeda, M., 1962. Catálogo de enfermedades de plantas cubanas. Serie Agrícola, Academia de Ciencias de Cuba; Instituto de Investigaciones Tropicales, 5; 27-78.

Schulz F., Leca F., Hollmann. F. y Manfred T. Reetz. 2005. Towards practical biocatalytic Baeyer-Villiger reactions: applying a thermostable enzyme in the gram-scale synthesis of optically-active lactones in a two-liquid-phase system *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 25; 111-120.

Shou-Feng C., Mowery R., Castleberry G., Walsum P., 2006. High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates. *Journal of Chromatography A*, 1104; 54–61.

Shuiying R., Zhengfeng C., Xiaopeng X., Gaofei Q., 2009. Clean synthesis of adipic acid catalyzed by complexes derived from heteropoly acid and glycine. *Catalysis Communications*, 10; 464–467.

Torres M., Gutiérrez M., Aroca G., Huerta S., 2007. Modelado de la cinética de biotransformación tipo baeyer-villiger mediante el uso de *E. coli* TOP10 pQR239. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería.

Vázquez A., García S., Estrada A., 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos . *Botánica*, 73: 1-15.

Watts J., Beecher C., Whitche J., 2002. A method for screening Baeyer-Villiger Monooxygenase Activity Against Monocyclic Ketones. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 ; 209 – 215.



Yonghyun K., Nandakumar M., Mark R., 2008. Proteomics of filamentous fungi, *Trends in Biotechnology*, 25 ; 396-400.

Yoshihiro M., Yutaka Y., Noriaki M., Shigeru F., Fumiaki ., 2004. Efficient oxidation of cycloalkanols by sodium nitrite with molecular oxygen in trifluoroacetic acid *Tetrahedron. Letters*, 45; 8221–8224.





IIFB.

# AneXOS

## ANEXO 1

### Composición del medio de cultivo agar-PDA

composición del medio	cantidad
Papa	250,00 g/L
Glucosa	10,00 g/L
Agar	15,00 g/L
Agua destilada	1000,00 mL

Para la preparación se procede de la siguiente manera:

Pelar la papa, posteriormente cortarla en trozos pequeños y hervir en 1000mL de agua destilada, una vez hervida esperar que enfrié y filtrar, añadir agar y glucosa; autoclavar a 121°C durante 15 minutos a 1,5 atm.

## ANEXO 2

### Composición del medio de cultivo Caldo-CPD

composición del medio	cantidad
Papa	250,00 g/L
Glucosa	5,00 g/L
Agua destilada	1000,00 mL

## ANEXO 3

### Composición del medio de cultivo YPDE

Composición	Cantidad
Extracto de malta	3 g/L
Peptona	3 g/L
dextrosa	5 g/L
Agua destilada	1000,00 mL

**ANEXO 4****Composición química y preparación del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico)**

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Fenol	0,20 g
Sulfito de sodio	0,50 g
Ácido dinitrosalicílico	10,00 g
hidróxido de sodio	10,00 g
Tartrato doble de sodio-potasio	200,00 g
Agua destilada csp.	1000,00 mL

- Disolver el hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada.
- Anadir 100 mL de agua y disolver el sulfito de sodio.
- Añadir el fenol y enrasar a 500 mL.
- Añadir el tartrato de sodio-potasio y adicionar una alícuota de agua.
- Adicionar el ácido dinitrosalicílico, disolver completamente, enrasar a 1000 mL.
- Todo el proceso anteriormente descrito debe llevarse a cabo en un matraz ámbar, empleando un agitador magnético, una vez concluida la preparación se debe trasvasar aun frasco ambar para su conservación.

**ANEXO 5****Composición química y preparación del reactivo de Bradford para proteínas totales**

<b>Compuesto químico</b>	<b>Cantidad</b>
Azul de Coomassie G250	5 mg
Etanol	2,5 mL
Ácido fosfórico	5 mL
Agua destilada cps	50 mL



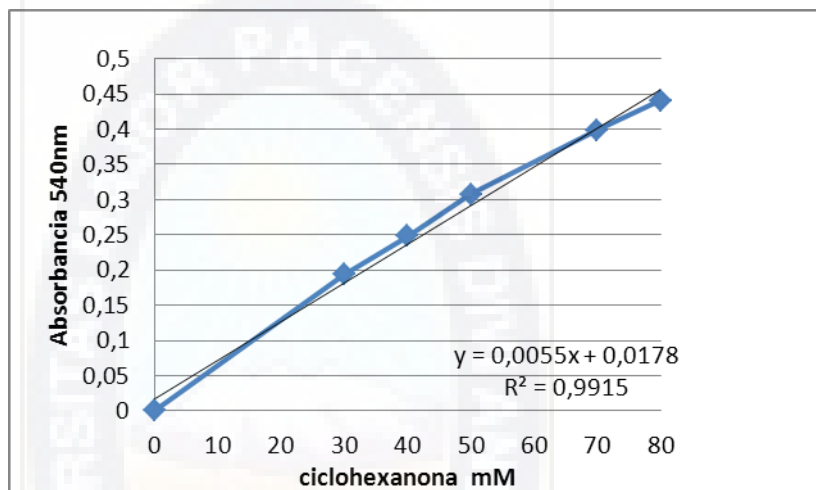
IIFB.

- Disolver el azul de Coomasie G250 en etanol "muy importante no confundir el Coomasie G250 con el Coomasie R250". Anadir todos los reactivos en el orden indicado y filtrar posteriormente.
- Guardar en frasco ámbar para su conservación.

#### ANEXO 6

##### Curva de calibración de ciclohexanona

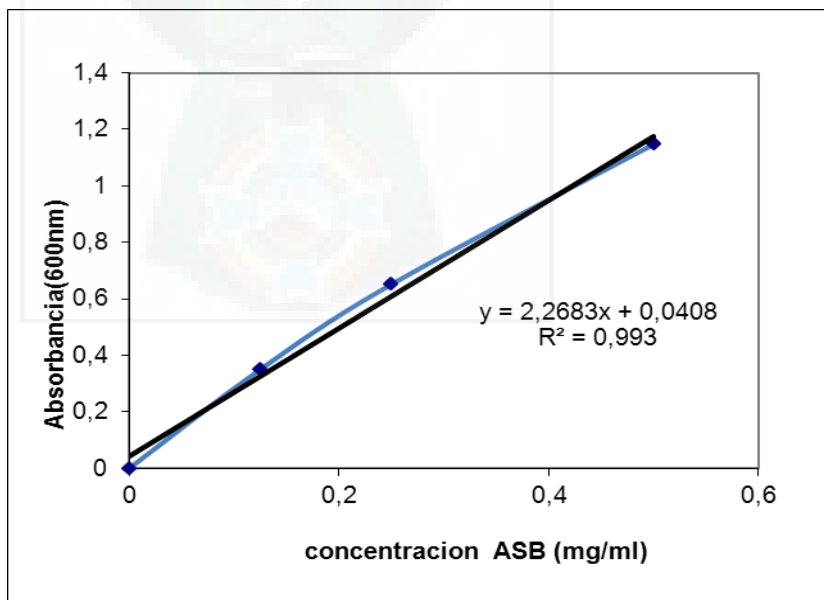
[C]mM	Abs
0	0
20	0,159
30	0,1941
40	0,248
50	0,308
60	0,386
70	0,399
80	0,441



#### ANEXO 7

##### Curva de calibración de proteínas totales

[C]mg/ml	Abs
0	0
0,125	0,35
0,25	0,651
0,5	1,147



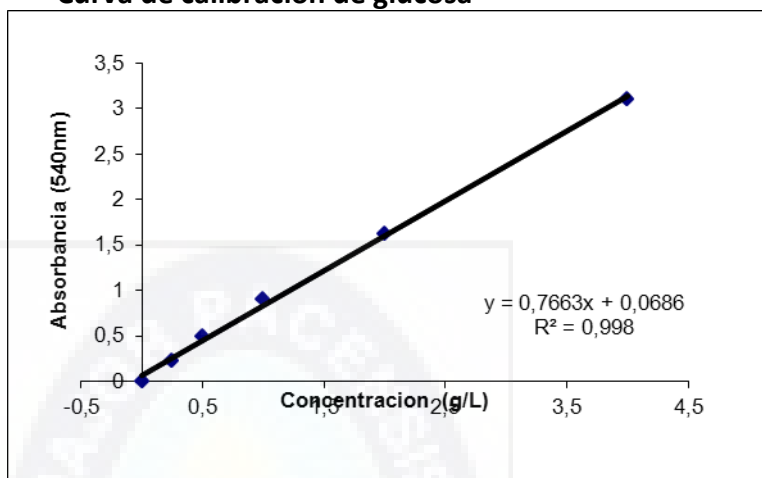


IIFB.

## ANEXO 8

### Curva de calibración de glucosa

[C] g/L	Abs
0	0
0,25	0,23
0,5	0,49
1	0,9
2	1,63
4	3,1



## ANEXO 9

### Ensayo colorimétrico de hongos filamentosos (consumo de ciclohexanona como sustrato)

	código	[esporas /mL]	Blanco	Abs.T' "0"hrs	Abs T'"12"hrs	Inicio [mM]	Final [mM]
1	11QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,265	50,4	49,6
2	12QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,265	50,4	49,6
3	68QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,26	50,4	48,6
4	152QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,262	50,4	49
5	152QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,26	50,4	48,6
6	162QD	$2 \times 10^3$	0,268	0,269	0,266	50,4	49,8
7	170QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,26	50,4	48,6
8	170QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
9	170QD-2	$2 \times 10^3$	0,269	0,268	0,261	50,4	48,8
10	171QD	$2 \times 10^3$	0,268	0,268	0,266	50,4	49,8
11	171QD-1	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,261	50,4	48,8
12	176QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
13	176QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
14	177QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,195	50,4	35,6
15	179QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8





IIFB.

16	179QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,262	50,4	49
17	180QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
18	190QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,259	50,4	48,4
19	200QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
20	207QJ	$2 \times 10^3$	0,266	0,269	0,262	50,4	49
21	212QD	$2 \times 10^3$	0,266	0,269	0,266	50,4	49,8
22	212QD-1	$2 \times 10^3$	0,266	0,269	0,266	50,4	49,8
23	22QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,262	50,4	49
24	22QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
25	237QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,259	50,4	48,4
26	238QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
27	259QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,262	50,4	49
28	279QD	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,262	50,4	49
29	288QD-1	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,266	50,4	49,8
30	296QD	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,262	50,4	49
31	298QD	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,266	50,4	49,8
32	298QD-1	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,262	50,4	49
33	299QD	$2 \times 10^3$	0,265	0,269	0,266	50,4	49,8
34	300QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
35	313QD	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,266	50,4	49,8
36	315QD	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,262	50,4	49
37	317QD	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,266	50,4	49,8
38	320QD	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,258	50,4	48,2
39	323Qj-1	$2 \times 10^3$	0,267	0,269	0,266	50,4	49,8
40	330QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
41	335QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8



IIFB.

42	340QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
43	341QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
44	350QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,259	50,4	48,4
45	352QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
46	352QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
47	366QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
48	372QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
49	383QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
50	387QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
51	387QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
52	390QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
53	400QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
54	410QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
55	410QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
56	414QJ-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
57	60QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
58	60QD-1	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
59	66QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
60	77QD-2	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
61	77QJ	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
62	85QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
63	96QD-2	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,26	50,4	48,6
64	68QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,255	50,4	47,6
65	Alternaria Spp	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
66	Aspergillus niger	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
67	Botritis fava	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8



IIFB.

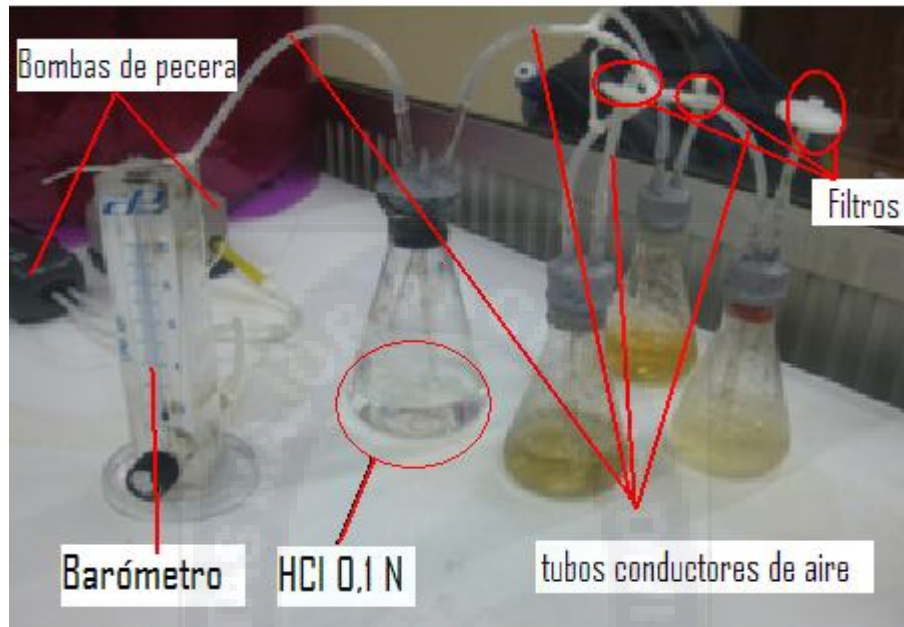
68	590QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
69	Fusarium	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
70	307QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
71	PenicilliumSp	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
72	393QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,255	50,4	47,6
73	Pestalotia	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
74	112QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
75	590QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
76	287QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
77	325QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
78	306QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
79	22QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,255	50,4	47,6
80	336QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
81	431QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
82	435QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,255	50,4	47,6
83	327QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8
84	389QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,258	50,4	48,2
85	141QD	$2 \times 10^3$	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8

#### ANEXO 10

#### Ensayo colorimétrico (consumo de ciclohexanona como sustrato) en levaduras aisladas en nuestras ambientales (tierra contaminada con petróleo)

	código	D O	Blanco	Abs.T´ "0"hrs	Abs T´"12"hrs	Inicio [mM]	Final [mM]
1	7 QJR	1	0,269	0,269	0,192	50,4	35
2	14 QJG	0,9	0,269	0,269	0,198	50,4	36,2
3	21 QJW	1	0,269	0,267	0,266	50,4	49,8
4	28 QJY	0,9	0,269	0,265	0,258	50,4	48,2
5	35 QJB	0,9	0,269	0,269	0,266	50,4	49,8

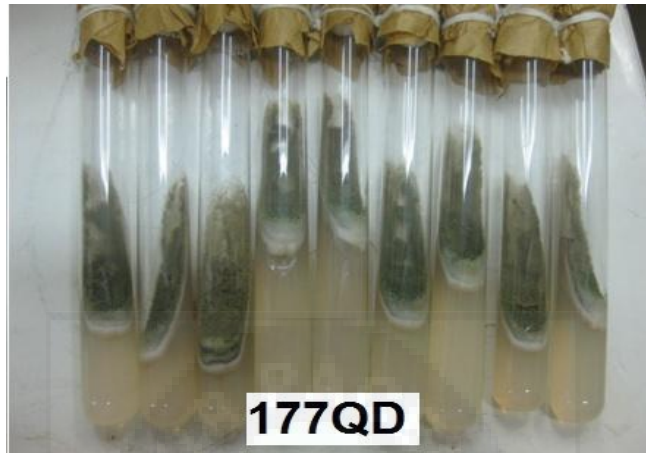
## FOTOGRAFIAS



Fotografía 1. Partes del sistema de aireación.



Fotografía 2. Resuspensión de las cepas liofilizados en caldo papa dextrosa.



**Fotografía 3. Concentración de esporas de la cepa 177QD.**



**Fotografía 4. Filtros de luz utilizados en la inducción.**



**Fotografía 5. Inducción de la cepa 177QD por medio del paso de diferentes longitudes de onda utilizando diferentes filtros de luz.**



**Fotografía 5.- Crecimiento de la cepa 177QD bajo el sistema de aireación.**



**Fotografía 7.- Crecimiento de la cepa 177QD bajo agitación por magnetos**



**Fotografía 8.- Crecimiento de la cepa 177QD bajo agitación.**