



RECEBIDA EN LA SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA  
 1994 JUN 27 10 12 AM  
 SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
 FACULTAD DE QUIMICA

*EFFECTO DEL OXIGENO SOBRE  
 LA ENZIMA ALCOHOL OXIDASA*

T E S I S



QUE PARA OBTENER EL TITULO DE <sup>EXAMENES PROFESIONALES</sup> FAC. DE QUIMICA  
 QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
 PRESENTA  
 VERONICA ORTIZ SOLIS

México, D.F.

1994.



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

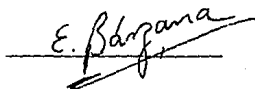
- Presidente : Dr. Eduardo Bárzana García  
Vocal : M. en C. Raúl Genaro Aguilar Caballero  
Secretario : M. en C. Francisca A. Iturbe  
1er. Suplente : Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos  
2o. Suplente : M. en C. María de los Angeles Valdivia

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Alimentos y Biotecnología  
División de Ingeniería, Edificio "E",  
Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México.

**Asesor del tema:**

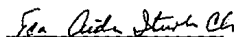
Dr. Eduardo Bárzana García.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "E. Bárzana", is written over a horizontal line.

**Supervisor técnico:**

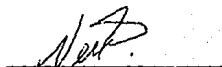
M. en C. Francisca A. Iturbe.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisca A. Iturbe", is written over a horizontal line.

**Sustentante:**

Verónica Ortiz Solís.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Verónica Ortiz Solís", is written over a horizontal line.

---

*A DIOS por ser la piedra fundamental de todo conocimiento.*

*A mis padres ELADIO y RAQUEL por darme  
la oportunidad de ser alguien, por confiar en mí,  
por su comprensión, por ser mis primeros maestros  
... por darme la vida.*

*A mi abuelita Meche por su enorme paciencia y cariño.  
A Yoya por permitirme contar contigo siempre.  
A Pama, Dulce, Gaby, Goya y Karla por sus consejos y apoyo  
en todo momento, por ser hermanos y amigos.  
A Pepis, Mary y Güero, por estar ahí.*

---

*Dr. Eduardo Barzana, gracias por su orientación e interés en el trabajo de tesis.*

*Fanny, gracias por tu amistad y apoyo incondicional.*

*"Por los buenos y los malos momentos,  
Por el pasado y el porvenir,  
Por la amistad."*

## INDICE

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
<b>1. Introducción.</b>	1
<b>2. Antecedentes.</b>	3
2.2 Bioquímica de las levaduras metilotróficas.	5
2.3 Alcohol Oxidasa.	8
2.4 Inmovilización enzimática para A.O. y propiedades.	11
2.5 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas y A.O	16
<b>3. Materiales y Métodos</b>	19
3.1 Inmovilización de la enzima A.O	20
3.2 Determinación de la actividad enzimática de la A.O en fase acuosa.	24
3.3 Desorción de la enzima con NaCl en fase acuosa.	26
3.4 Titulación de los grupos sulfhidrilo nativos en la enzima.	28
3.5 Protección de la A.O inmovilizada en DEAE-celulosa.	32
<b>4. Resultados y Discusión.</b>	35
<b>5. Conclusiones y Recomendaciones.</b>	46
<b>6. Bibliografía.</b>	49

---

## INTRODUCCIÓN

### 1

Al establecer las condiciones óptimas para el uso de biomoléculas tales como las enzimas, se busca identificar métodos para la producción de sustancias identificadas como de origen biológico. Esto evita el procesar compuestos sintéticos que conllevan a la formación de deshechos contaminantes.

Estudiar los cambios bioquímicos producidos por los microorganismos, permite crear sistemas controlables "*in vitro*," que a diferencia de la Industria Química generen subproductos respetuosos del equilibrio ecológico.

Lo anterior es uno de los fines de la Biotecnología, ciencia que en los últimos años ha tenido un gran auge mundial dadas sus diversas aplicaciones en los sectores salud, agropecuario, ambiental, industrial, alimentario.

El aislamiento y purificación de los catalizadores biológicos permite inmovilizarlos sobre matrices sólidas para efectuar catálisis en medios acuosos o bien no acuosos. La aplicación de medios no acuosos como son fluidos supercríticos, disolventes orgánicos y en fase gaseosa aumenta el espectro de uso de las enzimas.

La obtención de compuestos volátiles en escala comercial, tales como el acetaldehído, a partir de la conversión catalítica de sustratos en estado gaseoso en reactores sólido - gas, en principio resulta más rentable que el costo normal que se invierte en una fermentación. Además, la recuperación del producto es simple y éste se obtiene libre de contaminantes (Bárzana, 1989a).

La bioxidación del etanol, es llevada a cabo por la enzima Alcohol Oxidasa, cuya actividad se ve afectada severamente durante su inmovilización, uso y manipulación en general.

Por ello los objetivos de este proyecto son, mediante estudios experimentales:

Determinar los mecanismos principales de inactivación de la Alcohol Oxidasa inmovilizada .

Proponer una forma de atenuar el deterioro de la actividad de la enzima.

Este trabajo no pretende establecer las características y propiedades de la enzima inmovilizada, sino que sólo se limita a establecer, según los antecedentes de la literatura, el efecto del oxígeno sobre la inactivación de la enzima.

El entendimiento del mecanismo de inactivación de la enzima inmovilizada permitirá alcanzar una catálisis estable durante un período continuo de operación en un reactor sólido-gas para la producción de acetaldehído. Este compuesto es de importancia comercial en la industria alimentaria, ya que es el responsable del sabor fresco de jugos y vinos principalmente, además de ser un aditivo y conservador natural de alimentos.

La enzima también cuenta con aplicaciones en el sector salud ya que su empleo permite la fabricación de electrodos o tiras reactivas para determinar de manera rápida y exacta la concentración de alcoholes primarios como etanol y metanol en fluidos biológicos.



---

## CAPITULO

### 2

#### ANTECEDENTES

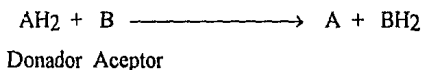
La mayoría de las reacciones químicas que ocurren en los sistemas biológicos son catalizadas por proteínas específicas denominadas enzimas, las cuales pueden ser altamente específicas, tanto en la reacción que catalizan como en su selección de reactantes llamados sustratos.

Estas biomoléculas se clasifican de acuerdo a la función que realizan como:

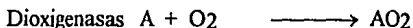
*Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas, Ligasas, y Oxidoreductasas.*

Las enzimas oxidoreductasas catalizan la oxidación o reducción de sustratos. Estas enzimas se distinguen entre sí con base en el aceptor final de electrones que puede ser  $H_2O_2$ ,  $O_2$ , o bien cualquier otra molécula. De acuerdo al aceptor existen cuatro tipos de oxidoreductasas:

a) *Deshidrogenasas.* Este tipo de enzimas catalizan la oxidación del sustrato, donando hidrógeno o un par de electrones a un aceptor que puede ser  $NAD^+$  (nicotinamido adenin dinucleótido),  $NADP^+$  (nicotinamido adenindinucleótido fosfato), ferrocitocromo, ácido lipoico oxidado, principalmente. Este tipo de reacciones se llevan a cabo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. El cofactor reducido del enzima se regenera por la acción de otra enzima.



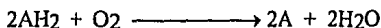
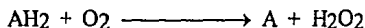
b) *Oxigenasas*. Oxidan el sustrato por la incorporación de uno o más átomos de oxígeno molecular en el sustrato.



donde  $BH_2$  puede ser NADH o NADPH

Dentro de este grupo se encuentran clasificadas las enzimas catalasa y peroxidasa que realizan la oxidación del sustrato debido a la incorporación de oxígeno el cual proviene exclusivamente de  $H_2O$  o del  $H_2O_2$ .

c) *Oxidasa*s. Estas enzimas actúan únicamente en condiciones aerobias, por lo que en la oxidación del sustrato, el aceptor del par de electrones y/o del hidrógeno es el oxígeno molecular ( $O_2$ ). Las oxidasas presentan en su estructura un cofactor que generalmente es el FAD (Flavin dinucleótido) el cual es regenerado al final de la reacción enzimática. Debido a la presencia de este cofactor en la enzima, éstas son conocidas también con el nombre de flavoproteínas. (Huitrón, 1983)(Whitaker,1980).



Dentro de las oxidasas, se encuentra clasificada la enzima Alcohol oxígeno oxidoreductasa (EC.1.1.3.1.3), también conocida como *Alcohol Oxidasa*.

## 2.2 Bioquímica de las levaduras metilotróficas.

La enzima alcohol oxidasa es sintetizada por levaduras metilotróficas tales como *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, y *Torulopsis sp* (Woodward, 1980).

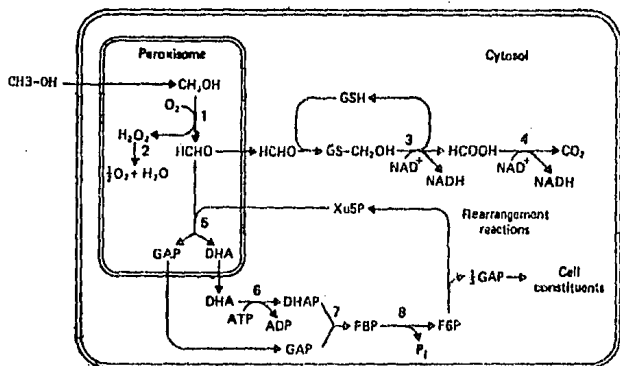
Cuando la levadura crece con metanol como única fuente de carbono desarrolla vesículas subcelulares a través del retículo endoplásmico conocidas como peroxisomas. La estructura y forma de los peroxisomas presentes en la levadura dependen de las condiciones del cultivo. El peroxisoma ocupa la mayor parte del citosol cuando la levadura crece en presencia de metanol (Harder y Veenhuis, 1989).

El monómero de la Alcohol oxidasa (A.O) es sintetizado en el citosol (Woodward, 1980). La membrana del peroxisoma presenta proteínas transportadoras que permiten la entrada del monómero para que dentro de este organelo se lleve a cabo el ensamblaje octamérico de las subunidades para formar la enzima activa.

La síntesis del peroxisoma está regulada en la levadura por la fuente de carbono; es decir, cuando la levadura crece en un medio de cultivo en presencia de carbohidratos simples tales como la glucosa, el microorganismo no sintetiza el organelo y por lo tanto no hay presencia de alcohol oxidasa. La síntesis de A.O está regulada en la célula por represión e inducción catabólica.

La enzima A.O se encuentra empaquetada dentro del peroxisoma en una red cristalina. Debido a que la flavoproteína es susceptible al peróxido de hidrógeno producido en la reacción, la levadura sintetiza catalasa en respuesta a este compuesto, por lo que la catalasa está situada de igual forma en el peroxisoma.

En la figura 2.1 se muestra la metabolización del metanol en la levadura. El metanol atraviesa la membrana celular dentro del peroxisoma para ser oxidado a formaldehído. Este compuesto junto con la xilulosa-5-fosfato son utilizados por la célula para la síntesis de sustancias complejas que permitan la supervivencia de la levadura. La regeneración de la xilulosa-5-fosfato requiere de ATP. Esta pentosa posteriormente es traslocada a través de la membrana peroxisomal; la importancia de este proceso radica en el consumo de energía requerido, por lo que si existe una limitación de ATP, no sería posible la formación de la pentosa y por lo tanto la concentración de formaldehído aumentaría dentro del peroxisoma provocando el paso, por difusión, del formaldehído al citosol. Lo anterior conduce a una desasimilación por oxidación de formaldehído a  $\text{CO}_2$  y por consecuencia la muerte celular. De igual forma si en el medio de cultivo de *P. pastoris* aumenta la concentración de metanol, ocasionaría la muerte de la célula (Harder, 1989).

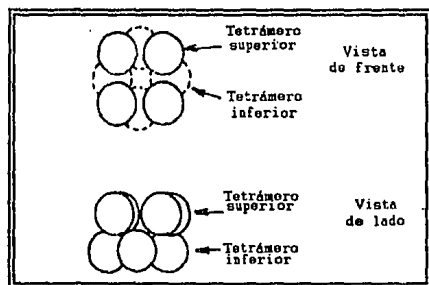


*Figura 2.1 Metabolización de MetOH en P. pastoris. 1.A.O 2.Catalasa 3.Formaldehído deshidrogenasa 4.Formato deshidrogenasa 5.Dihidroxiacetona sintetasa 6.Dihidroxiacetona cinasa 7.Fructosa 1,6-difosfato aldolasa 8. Fructosa 1-6 Difosfato fosfatasa (Douma et al 1985).*

### 2.3 Alcohol Oxidasa

La A.O de *Pichia pastoris* es un polipéptido constituido por ocho subunidades idénticas, las cuales no están unidas por puentes disulfuro (Couderec y Baratti, 1980).

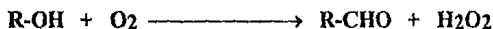
El octámero está formado por dos tetrámeros situados uno frente a otro a 45°. El octámero no ensamblado es inactivo. La figura 2.2 muestra un esquema del octámero.



*Figura 2.2 Representación esquemática de un octámero de la enzima Alcohol Oxidasa (Woodward, 1990).*

La flavoproteína presenta un peso molecular de 675,000 daltons con un punto isoeléctrico de pH=6.3. Como coenzima contiene FAD (flavín adenín dinucleótido), el cual está unido a la proteína por enlaces no covalentes. Cada subunidad contiene un FAD por molécula. Esta coenzima absorbe a 383 y 456 nanómetros (nm). La biomolécula pierde su actividad si el FAD se desambla (Couderec y Baratti,1980).

La enzima cataliza la oxidación de alcoholes primarios de cadena corta a sus aldehídos correspondientes según la siguiente ecuación:



La actividad de la enzima disminuye al aumentar la cadena alifática en el alcohol, no actúa sobre cadenas de cinco carbonos, alcoholes aromáticos, alcoholes alifáticos secundarios y terciarios. Sus mejores sustratos son el etanol y el metanol (Couderec y Baratti,1980). El formaldehído producido durante la reacción enzimática es el único que puede ser oxidado en solución acuosa a formato por la enzima además de los alcoholes primarios. Sin embargo este compuesto puede inhibir la actividad de la enzima por formar enlaces con el sitio activo e impedir así el acceso a su sustrato (Vanderkleij,1990).

De acuerdo a diversos estudios se tienen reportes que la alcohol oxidasa de *P. pastoris* es más sensible a la temperatura comparada con las enzimas obtenidas de otras cepas, como *H. polymorpha* (Harder,1989).

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima varía de acuerdo a la cepa . El pH óptimo para la actividad de la A.O de *P. pastoris* es de 7.5 a una temperatura de 35°C.

La proteína de *P. pastoris* presenta 12 grupos sulfhidrilo (SH) en su estado nativo y 65 grupos SH- por molécula al ser desnaturalizada con UREA 8M. Los grupos SH- son sensibles a una concentración 10 mM de peróxido de hidrógeno producido por la enzima (Couderec y Baratti,1980).

La flavoproteína se inhibe irreversiblemente por los siguientes reactivos:

1,4-butinediol, alcohol acetilénico, alcohol propargílico, los cuales inactivan la proteína por modificaciones covalentes en los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo (Cromartie,1981). El ciclopropanol y la ciclopropanona actúan sobre el FAD produciendo cambios covalentes en su estructura (Sherry,1985).

Los compuestos organomercuriales como p-cloromercuribenzoato actúan sobre los grupos SH- oxidándolos. Este efecto puede ser revertido usando reductores tal como el ácido alfa-mercaptoacético (Sahm y Schtte,1982).

El sitio catalítico en la enzima presenta tioles y residuos de histidina que se modifican por el dietil-pirocarbamato inactivando a la biomolécula (Cromartie,1981).

La estructura química del FAD es de una quinona en su estado oxidado que transfiere un par de electrones del sustrato al aceptor oxígeno para la formación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Se tienen reportes que la hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) afecta la conformación de la coenzima formando una semiquinona, radical catalíticamente inoperante ya que no permite la transferencia de electrones, por lo que la enzima pierde su actividad en un 95% (Page, 1989). Formada la semiquinona no es posible oxidarla para regresar a la forma enzimática activa.

#### **2.4 Inmovilización enzimática de A.O y propiedades**

La catálisis mediada por una enzima pura se lleva a cabo normalmente al solubilizar la proteína en el medio de reacción. La inmovilización de la enzima sobre un soporte permite reducir la pérdida de ésta durante el proceso, lo cual produce que la enzima se encuentre concentrada sobre el soporte y por lo tanto se genera una mejor superficie de contacto con el sustrato. La inmovilización enzimática permite reutilizar el catalizador, así como separar fácilmente los reactantes y productos una vez concluida la catálisis; de igual forma es posible controlar la reacción con mayor precisión y estabilidad.

Las proteínas pueden ser inmovilizadas por diferentes métodos como son: por copolimerización, adsorción en materiales insolubles, en geles o microcápsulas, o por enlazamiento covalente (Srere, 1980).

Para seleccionar el soporte se deben tomar en cuenta los siguientes factores (Porath y Axen, 1980):

1. Propiedades mecánicas tales como rigidez y durabilidad de acuerdo al uso que se le dé al complejo enzima-soporte.
2. Forma física. Granular, geles, microcápsulas.
3. Hidrofilicidad.
4. Precio y disponibilidad.

El DEAE-celulosa (Diethyl-aminoetil-celulosa), es un soporte flexible, hidrofílico; cargado positivamente a  $\text{pH}=7.0$  permite la unión de las enzimas por fuerzas iónicas. Este polisacárido es un intercambiador aniónico cuyo costo es económico. La adsorción consiste en la adhesión de una enzima en la superficie de una matriz que no ha sido atacada por agentes de acoplamiento covalente (Messing,1980). Los enlaces formados entre la enzima y el soporte dependen de las propiedades químicas y superficiales de éste.

Normalmente se observan dos tipos de enlaces como son:

- 1) Enlace iónico debido a la interacción carga-carga, tipo coulomb.
- 2) Puentes de Hidrógeno.

El pH y la fuerza iónica son factores que favorecen la desorción de la enzima, por lo que el control de éstos es importante durante las condiciones de aplicación (Messin y Porath, 1980).

Las propiedades físicas de la enzima inmóvil pueden diferir de la enzima nativa, ya que el soporte puede cambiar la conformación enzimática y generar microambientes que varían la estabilidad. Lo anterior permite ampliar el uso de la enzima para la realización de reacciones en medios no acuosos. Se tienen referencias de la posibilidad de realizar este tipo de reacciones con A.O en medios no acuosos como es usando sustratos en fase gaseosa en reactores sólido-gas (Bárzana et al, 1989a y 1989b). Este tipo de reacciones ofrece ventajas sobre aquellas cuyo medio de reacción es una solución acuosa, como:

- 1) Al inmovilizar la enzima y deshidratarla tiene una mayor resistencia a la termoinactivación lo que permite el uso de altas temperaturas.
- 2) Las reacciones en fase gaseosa a temperaturas altas son menos sensibles a los problemas de difusión.
- 3) Los productos pueden ser separados y recuperados con un alto grado de pureza por condensación fraccionaria.

Para estas reacciones en fase gaseosa se ha reportado la disminución de la actividad enzimática de la A.O en un tiempo determinado (Bárzana et al, 1989a).

Para poder continuar y afinar el uso de la enzima inmóvil en reactores sólido-gas es necesario determinar los mecanismos de inactivación de la enzima. Dado a que el oxígeno es uno de los sustratos y existen grupos sulfhidrilo en la proteína, el motivo de la inactivación puede ser derivado de este punto.

Las causas posibles de inhibición enzimática debidas a la presencia de grupos sulfhidrilo son el resultado de la formación de mercáptidos, oxidación, alquilación o de otras reacciones que involucren SH-. Esta inactivación afecta a la enzima de acuerdo a la función de los grupos sulfhidrilo en la biomolécula, las cuales son:

a) Los grupos SH- pueden tener una función en la catálisis, participando como :

- Aceptores de grupos acilos
- Uniéndose con el cofactor, permitiendo los rearrreglos electrónicos que promuevan la catálisis.
- Enlazándose con el sustrato.
- Participando en reacciones Redox.

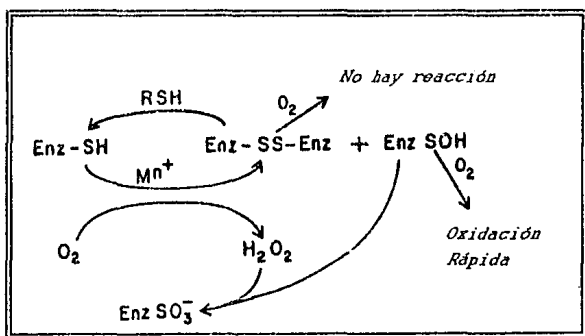
b) Los SH- ayudan a mantener la estructura 3ª de la proteína, siendo el hidrógeno participante en la formación de puentes de hidrógeno débiles contribuyendo así a la estabilización de la estructura terciaria.

Aquellos grupos sulfhidrilo que no estén involucrados en las funciones anteriores, pueden reaccionar con sustancias como el iodoacetato que podrían interferir durante la catálisis por impedimento estérico debido a la proximidad con el sitio activo por lo que disminuiría la actividad enzimática. De la misma manera un oxidante puede provocar la formación de puentes disulfuros intermoleculares o intramoleculares afectando así la estructura de la proteína y por consecuencia la actividad de la misma.

Los hidroxilos en residuos de tirosina y serina, las cadenas de hidrocarburos de la leucina, el indol de la histidina y quizás los grupos amino también son susceptibles a la oxidación por determinados oxidantes.

La oxidación de tioles por el oxígeno es acelerada por la presencia de iones metálicos (Whitesides,1978). Esta oxidación puede formar puentes disulfuro dependiendo de la conformación de la proteína así como de la orientación de los residuos de cisteínas (Wetflauter,1984).

Estos grupos SH- pueden ser oxidados a ácido sulfinico o bien sulfonatos. La figura 2.3 muestra un esquema de oxidación de los grupos sulfhidrilo en una enzima (Whitesides,1978).



**Figura 2.3** Oxidación de grupos sulfhidrilo en una enzima (Whitesides,1978).

## 2.5 Aplicaciones de enzimas inmovilizadas

En general, las enzimas inmovilizadas presentan diversas aplicaciones. A continuación se citan algunos usos:

En el sector salud, se lleva a cabo la administración de enzimas, por vía parenteral u oral de acuerdo a la presentación del soporte, en aquellos pacientes cuyo metabolismo se vea alterado ya sea por errores genéticos donde no exista la producción de una determinada enzima o bien por enfermedades supresoras del sistema inmune como son SIDA y cáncer .

Se ha reportado la posibilidad de inmovilizar anhidrasa carbónica y catalasa en silicona en una proteína tal como albúmina o hemoglobina con el fin de permitir el intercambio de oxígeno y CO<sub>2</sub> de tal forma que funcione como un eritrocito artificial. El éxito de este estudio permitiría evitar las infecciones por vía sanguínea, así como eliminar las reacciones antígeno - anticuerpo que existen normalmente (Chibata, 1980).

En el sector industrial, específicamente alimentario, se ha desarrollado la utilización de enzimas en la producción de aditivos, edulcorantes, modificación de almidón, fabricación de cerveza, productos lácteos, etc. Se ha investigado la inmovilización de papaína para su uso en la clarificación de cerveza. Normalmente cuando la cerveza se almacena por largos periodos a baja temperatura, presenta cierta turbidez. Esto es debido a la reacción de polifenoles y polipéptidos contenidos en la cerveza, por lo que la papaína actúa sobre éstos. Sin embargo el contacto de la enzima con su sustrato durante un tiempo amplio produce una proteólisis indeseable.

La inmovilización de este catalizador junto con polifenol oxidasa en una columna de vidrio permite la eliminación de polipéptidos en la cerveza (Chibata, 1980).

### *2.5.1 Aplicaciones de la Alcohol Oxidasa*

Se han realizado diversos estudios para utilizar el  $H_2O_2$  producido "in situ" durante la reacción enzimática realizada por la enzima A.O para la preparación de detergentes biológicos. En los ensayos se ha observado que la actividad de la enzima se ve afectada sólo por detergentes catiónicos. Sin embargo debido al costo de la enzima, esta aplicación no es económicamente factible (Woodwar, 1990).

Se han hecho pruebas para usar la enzima como un antimicrobiano utilizando el peróxido de hidrógeno producido "in situ". Se ha observado que la efectividad del  $H_2O_2$  obtenido biológicamente es mejor comparado con el efecto producido por adición directa de peróxido de hidrógeno. Sin embargo su aplicación comercial para cocinas y baños no se ha investigado ampliamente (Woodwar, 1990).

El área más activa para la aplicación de la A.O es en la detección rápida de alcohol en productos biológicos. De aquí se han desarrollado diversas formas de acoplar la enzima a electrodos para la detección de alcoholes primarios, conocidos como biosensores. Este tipo de electrodos consisten en contener a la A.O y un transductor que detecte la producción de  $H_2O_2$  (Woodwar, 1990).

Las tiras reactivas, permiten la detección cualitativa de diversos metabolitos, acelerando el diagnóstico de enfermedades. En este caso la utilidad de la A.O radica en la determinación de etanol en sangre lo cual es de gran interés en Química Legal. Esta tira reactiva está compuesta por una tira de plástico en la que se une una almohadilla de celulosa impregnada de una solución amortiguadora que contiene a la enzima inmovilizada además de tener acoplado un reactivo cromógeno, el cual sirve para detectar indirectamente al sustrato. Sin embargo el uso de estas tiras está limitado por la estabilidad de la enzima y de los cambios de color del cromógeno que pueden variar durante su almacenamiento (Woodwar,1990).



---

## CAPÍTULO

### 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los experimentos realizados para determinar la causa principal de la inactivación de la enzima Alcohol Oxidasa durante su inmovilización en el soporte DEAE-Celulosa. Los reactivos usados para este efecto son de pureza analítica y adquiridos en casas comerciales.

Las etapas seguidas fueron:

- 3.1. Inmovilización de la enzima Alcohol Oxidasa.
- 3.2. Determinación de la actividad enzimática de la Alcohol Oxidasa en fase acuosa.
- 3.3. Desorción de la enzima con cloruro de sodio en fase acuosa.
- 3.4. Titulación de los grupos sulfhidrilo nativos en la enzima.
- 3.5. Protección de la Alcohol Oxidasa inmovilizada en DEAE-celulosa

### 3.1. Inmovilización de la enzima Alcohol Oxidasa

La enzima alcohol oxidasa (A.O) fue adquirida en los Laboratorios Moldowan (Philomath, Oregón, E.U.A.) con las siguientes características:

Actividad 1283 EU/ml.

Concentración de proteína 67 mg/ml.

Actividad específica 19.2 EU/mg.

Esta enzima se encuentra en una solución amortiguadora de fosfatos 1 mM (pH=8.0). Es necesario almacenar la enzima a temperaturas inferiores a 0 °C para conservar su estabilidad con un 60% de sacarosa.

El catalizador biológico se inmovilizó en el soporte Dietilamino-etil-celulosa (DEAE-celulosa), el cual es un soporte flexible, con cargas positivas en su superficie, lo que permite la inmovilización de la enzima por interacciones electrostáticas.

Este soporte fue adquirido de SIGMA Chemical CO (St. Louis, Ma).

### 3.1.1 Lavado del soporte.

- a) El soporte fue suspendido en una solución amortiguadora de fosfatos 1mM pH = 7.5, con agitación durante 15 minutos.
- b) Se filtró la solución y el soporte fue lavado tres veces con la solución amortiguadora, como se indicó en el inciso anterior.
- c) El soporte se lavó con una solución básica de KOH 10 mM a un pH aproximado de 11 y posteriormente se lavó con ácido diluido (HCl 10 mM) con el fin de eliminar iones unidos al soporte.
- d) La mezcla anterior se filtró y se lavó con agua desionizada hasta obtener un pH aproximado de 6 en el filtrado.
- e) Al soporte se le agregó solución amortiguadora de fosfatos 1 mM preparada a diferentes pH's. La mezcla se agitó durante 15 minutos, se verificó y ajustó el pH con el potenciómetro para así obtener soportes a los siguientes pHs: 7.0, 7.5, 8.5, 9.0, 10.0.
- f) Los soportes a los diferentes pHs se filtraron y se secaron por filtración al vacío. Finalmente se almacenaron en refrigeración.

Una vez lavado el soporte se procedió a inmovilizar la enzima. La técnica que se utilizó para la inmovilización de cada una de las muestras fue la misma:

- a) Se pesaron tres gramos de soporte previamente lavado y secado.
- b) Se mezclaron 3 ml de A.O. con 7 ml de agua desionizada.
- c) La mezcla A.O./agua desionizada se añadió poco a poco al soporte mezclándolos hasta formar una pasta homogénea.
- d) Una vez formada la pasta, se procedió a secarla. Las formas de secado fueron las siguientes:

- *Liofilización.* Para este efecto la pasta se sometió a congelación para después introducirla a un aparato de sublimación de agua. Se utilizó la Liofilizadora RP2V de SERAIL con las siguientes condiciones:

Presión de vacío = 0.09 mbar

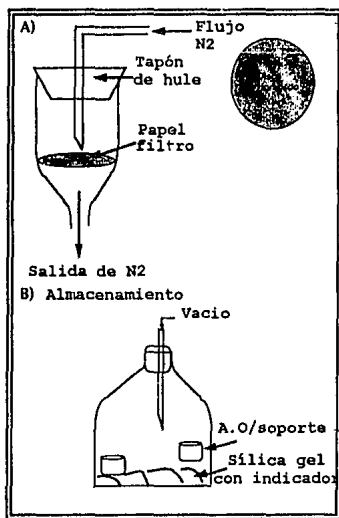
Temperatura de la cámara de presión baja =  $-45^{\circ}\text{C}$

Temperatura del producto =  $-37^{\circ}\text{C}$

Esta operación duró aproximadamente 24 horas hasta que se obtuvo un polvo enzimático unido al soporte completamente seco. El polvo se almacenó al vacío y a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

- *Secado por flujo de  $\text{N}_2$ .* Este sistema de secado consta de un embudo de filtración el cual presenta perforaciones en el fondo. Un papel filtro se colocó en la zona inferior del embudo y sobre éste la pasta.

El embudo se tapó y se conectó a un tanque de nitrógeno, de tal forma que se dejó pasar un flujo del gas inerte sobre la pasta durante 60 minutos a una presión de 100 psia, hasta obtener un polvo seco el cual se almacenó al vacío y a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ . La Figura 3.1 muestra un esquema de este sistema de secado por flujo de nitrógeno.



**Figura 3.1** A) Sistema de secado por flujo de Nitrógeno y B) Equipo de Almacenamiento de las muestras de A.O. inmovilizadas.

- *Secado en presencia de O<sub>2</sub>*. En esta técnica la pasta se colocó en una caja de Petri y se introdujo dentro de una campana de laboratorio para la extracción de gases, permitiendo que la pasta entrara en contacto con el oxígeno del medio ambiente. La pasta se removió constantemente con una espátula para evitar la formación de grumos. El tiempo que duró la pasta en secarse fue de 12 horas, para almacenarla posteriormente en refrigeración a -5°C.

Cabe mencionar que las tres formas de secado mencionadas para la inmovilización del catalizador se llevaron a cabo sobre los soportes a los pH's: 7.0, 7.5, 8.5, 9.0, 10.0.

### **3.2. Determinación de la actividad enzimática de la A.O en fase acuosa.**

De cada una de las muestras del catalizador-soporte se pesaron 0.05 gramos y se suspendieron en 2.7 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 1 mM pH = 7.5.

Para iniciar la reacción se agregaron 0.3 ml de etanol 50 mM. La muestra se agitó vigorosamente y las curvas de velocidad inicial fueron obtenidas a partir de las concentraciones de acetaldehído formado. Para ello se hicieron inyecciones cada cinco minutos en un cromatógrafo de gases SIGMA II de Perkin Elmer.

La columna empleada fue: 10% Carbowax 20 M Chromosorb W HP de 6 ft y 1/8 inn. Las condiciones del cromatógrafo fueron:

Temperatura detector = 90°C

Temperatura inyector = 120°C

Temperatura detector = 120°C

Flujo Nitrógeno (N<sub>2</sub>) = 10 ml/min (gas acarreador)

El proceso descrito se realizó por triplicado para cada una de las muestras. De igual forma se evaluó la actividad de la A.O. en solución tomando ésta como control: 0.05 ml de A.O. concentrada, se diluyeron en 2.7 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1 mM a los pH's en estudio y se agregaron 0.3 ml de etanol 50 mM.

Para valorar cuantitativamente el área obtenida en los cromatogramas de acetaldehído producido por la enzima A.O. fue necesario preparar una curva patrón de acetaldehído en un rango de 0-10 mM. A partir de ésta se determinó el factor de respuesta (FR) a las condiciones de trabajo. Cada concentración de acetaldehído se preparó por triplicado dentro de un cuarto frío para evitar la evaporación del compuesto. La inyección de una misma muestra se hizo seis veces.

### 3.3. Desorción de la enzima A.O con NaCl en fase acuosa.

La desorción de la enzima sólo se realizó en las muestras inmovilizadas en el soporte DEAE-celulosa a pH = 7.5 y secadas por liofilización, flujo de nitrógeno y presencia de oxígeno.

El soporte DEAE-celulosa por ser un intercambiador aniónico permite la liberación del catalizador enzimático al agregar NaCl en solución acuosa. Para determinar la concentración exacta de NaCl se hizo una curva la cual muestra la liberación del catalizador a medida que aumenta la concentración de NaCl.

Las concentraciones de cloruro de sodio que se manejaron están dentro del rango de 0-300mM.

Los grupos aromáticos presentes en la proteína absorben a 280 nm, longitud de onda en la que se determina la presencia de la biomolécula libre en solución acuosa. La turbidez en la solución indica coagulación de la enzima la cual es debida a una alta concentración de cloruro de sodio, por lo que es necesario verificar la turbidez de las muestras a 650 nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un Espectrofotómetro Beckman-DU.

El procedimiento para la desorción de la enzima del soporte fue el siguiente:



- a) Se pesaron 0.1 g de DEAE celulosa-A.O y se suspendieron en 2.4 ml de solución amortiguadora 1 mM pH = 7.5.
- b) A la suspensión anterior se le agregaron hasta 1.6 ml de NaCl 500 mM y se dejó reposar durante 15 minutos con agitaciones ligeras e irregulares.
- c) Terminado el tiempo de liberación de la enzima, la muestra se centrifugó durante 15 minutos a 1500 r.p.m.
- d) El sobrenadante se extrajo con pipeta Pasteur cuidadosamente, para evitar que los sedimentos se mezclaran con la solución.
- e) La lectura de absorbancia de las soluciones obtenidas se realizaron en las longitudes de onda de 280 nm y 650 nm.
- f) El blanco de la muestra se preparó pesando 0.1 g de DEAE-celulosa lavada y secada en solución amortiguadora de fosfatos 1 mM pH =7.5; el manejo experimental del blanco fue el mismo que el de la muestra.
- g) La lectura de absorbancia de todas las muestras incluyendo el blanco de éstas se realizó contra la lectura de 2.4 ml de la solución amortiguadora y 1.6 ml de NaCl 500 mM.

### 3.4. Titulación de los grupos sulfhidrilo en la enzima A.O

Los grupos SH- se cuantificaron en las muestras de A.O. que fueron desorbidas del soporte DEAE-celulosa preparado a pH= 7.5 y que se secaron por liofilización, flujo de nitrógeno y en presencia de oxígeno.

La cuantificación de grupos sulfhidrilo se realizó utilizando el reactivo de Ellman, cuya fórmula es Ácido 5-5'-Dithiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).

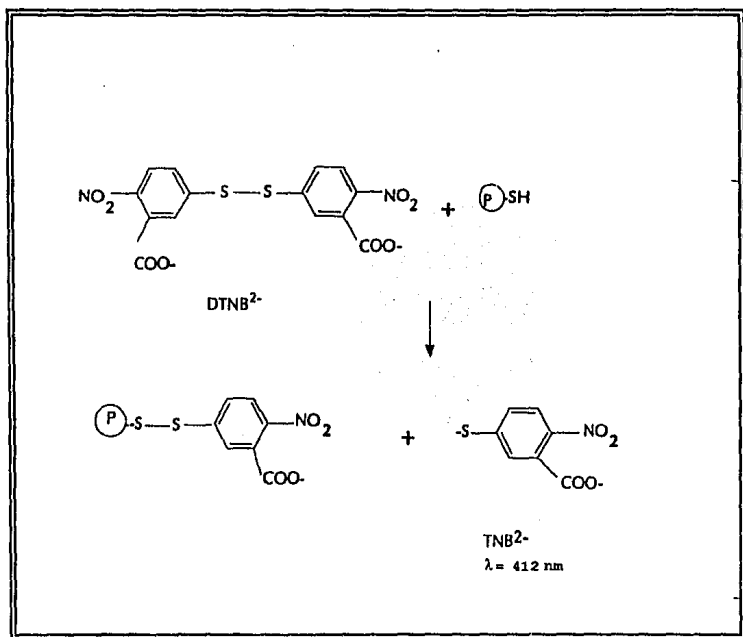
El DTNB es un compuesto que reacciona con los grupos sulfhidrilo para formar puentes disulfuro, mediante una reacción de simple sustitución, lo que permite la liberación del anión conocido como TNB<sup>2-</sup> (2-nitro-5-tiobenzoato).

Este anión presenta un color amarillo teniendo un máximo de absorción en la región visible a 412 nm . El TNB<sup>2-</sup> siendo de carácter ácido (pka=5.1) permite su cuantificación a partir de pH neutros, ya que a este pH se asegura la presencia del del compuesto colorido en un 99% ionizado en solución acuosa.

La lectura de la muestras se llevó a cabo en un Espectrofotómetro DU-65 Beckman en celdas de cuarzo.

El peso molecular del compuesto es 396.35 g/mol; el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) se midió experimentalmente y se calculó mediante la preparación de una curva patrón teniendo como estándar a la cisteína ( $\epsilon = 13,600$ ).

La reacción entre el DTNB y los grupos SH- presentes en la proteína depende de factores ambientales como electrostáticos, estéricos, por la presencia de trazas de metales pesadas en la solución ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) que impiden la reacción por formación de enlaces iónicos directos con el sulfuro (Habeeb, 1980).



Reacción entre los grupos SH- libres en la proteína y el DTNB (Habeeb, 1980).

El proceso experimental para la cuantificación de cisteínas libres en la proteína fue el siguiente:

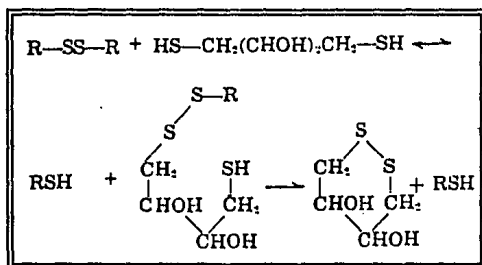
- a) Se tomaron 3 ml de la solución de A.O. separada del soporte y se le agregaron 0.02 ml de DTNB 1 mM (preparado en solución amortiguadora 100 mM pH = 7.5).
- b) Se mezclaron levemente y la muestra se sometió a calentamiento en Baño María a 37°C durante 15 minutos. Esto permitió el desarrollo de un color amarillo en la solución.
- c) Terminado el tiempo de incubación, se realizaron las lecturas de absorbancia de cada muestra a 412 nm.
- d) Para la preparación del blanco de la muestra se mezclaron 2.4 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1 mM pH = 7.5 y 1.6 ml de NaCl 500 mM, de esta solución se tomaron 3 ml y se le agregaron 0.02 ml de DTNB 1 mM. El blanco se sometió al mismo tratamiento de la muestra.
- e) Todas las muestras así como el blanco se leyeron contra una solución amortiguadora 1 mM pH = 7.5 a 412 nm.

Como control se titularon las cisteínas presentes en la flavoproteína sin inmovilización previa, para este efecto se tomaron 0.1 ml de A.O. concentrada y se diluyeron en 2.9 ml de solución amortiguadora 1 mM pH = 7.5, los incisos a, b, c, se repitieron para el manejo de este control enzimático.

La titulación de los grupos sulfhidrilo para cada muestra se realizó por triplicado.

### 3.5 Protección de la A.O con DTT inmovilizada en DEAE-celulosa.

El Dithiothreitol (DTT) cuyo peso molecular es de 154.3 g/mol, es también conocido como reactivo de Cleland. Este reactivo es un reductor por lo que permite proteger a la flavoproteína del efecto oxidativo del oxígeno. A continuación se describe la reacción que se lleva a cabo entre los grupos SH<sup>-</sup> y el DTT (Konigsberg, 1972).



Se experimentaron diferentes concentraciones de DTT de tal forma que se determinó la cantidad mínima y la máxima de DTT para la total protección de la enzima evitando que el reactivo reductor afectara la naturaleza del catalizador biológico.

La inmovilización de la enzima se realizó en presencia de las diferentes concentraciones de DTT y se secaron con oxígeno ambiental. El procedimiento es el siguiente:

- a) Se prepararon 4 ml de DTT 0.18 mM y se mezclaron con un volumen constante de A.O. (0.3 ml) de acuerdo a la tabla siguiente:

[DTT] (mMolar)	A.O. (ml)	DTT (ml)	Buffer fosfatos pH=7.5 1 mM (ml)
90	0.3	1.0	0.7
72	0.3	0.8	0.9
36	0.3	0.4	1.3
16.4	0.3	0.183	1.517
1.64	0.3	0.0183	1.681

- b) A cada una de las soluciones anteriores se le agregaron 0.3g de DEAE-celulosa y se mezclaron hasta la formación de una pasta homogénea.
- c) La pasta se depositó en una caja de Petri y se dejó secar en presencia del oxígeno ambiental durante 12 horas, se removió con espátula de vez en cuando para evitar la formación de grumos.
- d) Una vez seca la pasta se almacenó en refrigeración.

Para determinar la efectividad de protección a la enzima se procedió a medir la actividad de la alcohol oxidasa-DTT inmovilizada por cromatografía de gases, evaluando la producción de acetaldehído .



---

## CAPITULO

### 4

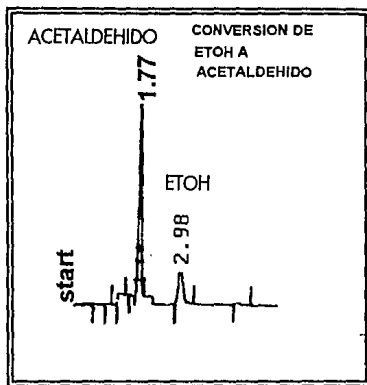
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta investigación fue determinar la causa de inactivación de la enzima alcohol oxidasa durante su inmovilización.

El primer paso fue establecer si el pH del soporte influía sobre el acomodo de las subunidades enzimáticas de tal forma que la actividad de la enzima aumentara al ser inmovilizada en soportes preparados a pH's básicos.

Inicialmente se determinó la actividad de la enzima libre en solución acuosa.

A continuación se presenta el cromatograma (fig. 4.1) de una muestra, obtenida durante la determinación de la actividad enzimática a los 60 minutos de reacción. En éste se pueden apreciar los picos que representan el acetaldehído formado (primer pico) cuyo tiempo de retención fue 1.77 min., y el etanol consumido (2o. pico) con un tiempo de retención de 2.98 min.



*Figura 4.1* Cromatograma que indica la separación de acetaldehído y etanol.

La figura 4.2 presenta la velocidad inicial de conversión de una de las muestras. Se observa el aumento en la concentración de acetaldehído y por lo tanto representa la velocidad inicial de la actividad enzimática, cuando la enzima inmóvil está expuesta al sustrato. El valor del tiempo localizado en las abscisas corresponde al tiempo de reacción una vez suspendida la enzima en medio acuoso con el sustrato.

Los datos se obtuvieron hasta los 60 minutos, ya que después de este tiempo el catalizador mantiene constante su actividad.

La pendiente de esta curva graficada contra el tiempo de exposición permite calcular una actividad relativa, dato que es comparable con los obtenidos de cada enzima sometida a las condiciones ya descritas.

# CURVA DE VELOCIDAD DE REACCIÓN A.O EN SOLUCIÓN pH=7.5

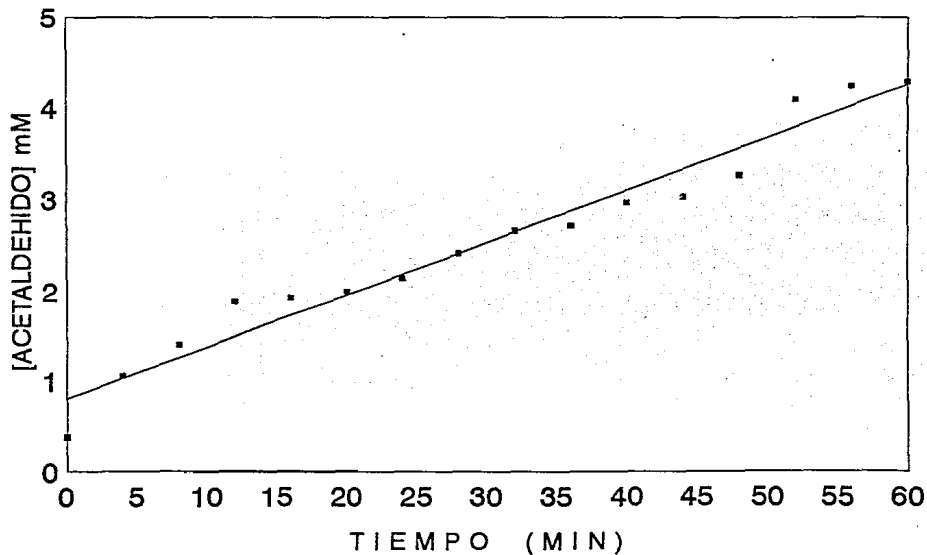


FIGURA 4.2

$m=0.05770$

Los resultados de la actividad enzimática relativa de la A.O en solución a diferentes pH's se muestran en la figura 4.3.

En solución acuosa la enzima nativa presenta una excelente oxidación de etanol a pH 7.5, llegando a consumirse el 90% del sustrato en un tiempo de 60 minutos. Esta actividad decae a pH's ácidos. Debido a esto no se realizó la inmovilización en soportes preparados a pH's menores a 7.0.

El intervalo de mejor actividad de la enzima nativa es de 7.3-8.5. A pH's mayores a 8.5 y menores de 6.8 hay una pérdida del 70% en la actividad de la enzima.

Como se explicó en el capítulo anterior la enzima fue inmovilizada en el soporte DEAE-celulosa preparada a los pH's 7.0, 7.5, 8.5, 9.0 y 10.0. Cada producto se secó mediante tres diversos métodos como son liofilización, por flujo de N<sub>2</sub> y en presencia de O<sub>2</sub>.

## EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA A.O EN SOLUCION ACUOSA

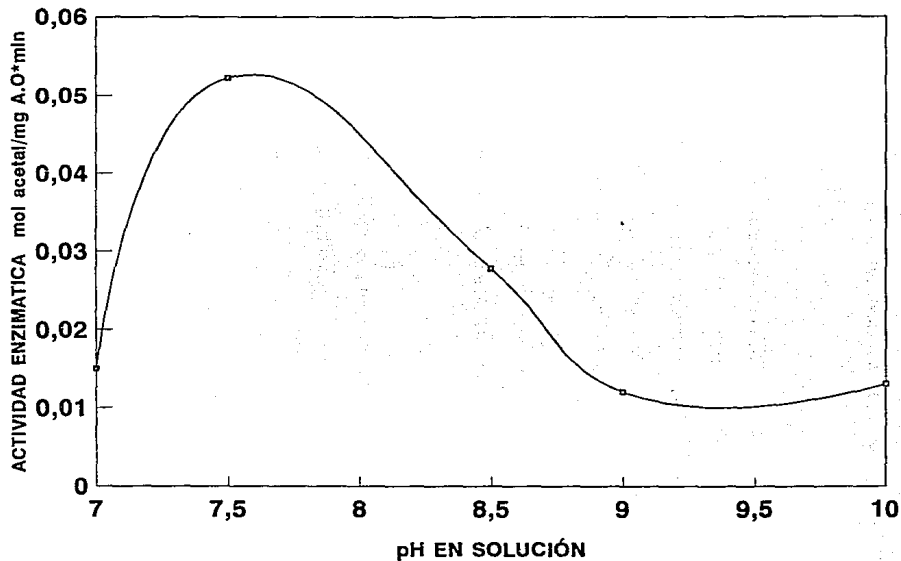


FIGURA 4.3

La actividad de estos preparados enzimáticos se determinó en solución amortiguadora de fosfatos 1 mM a pH 7.5.

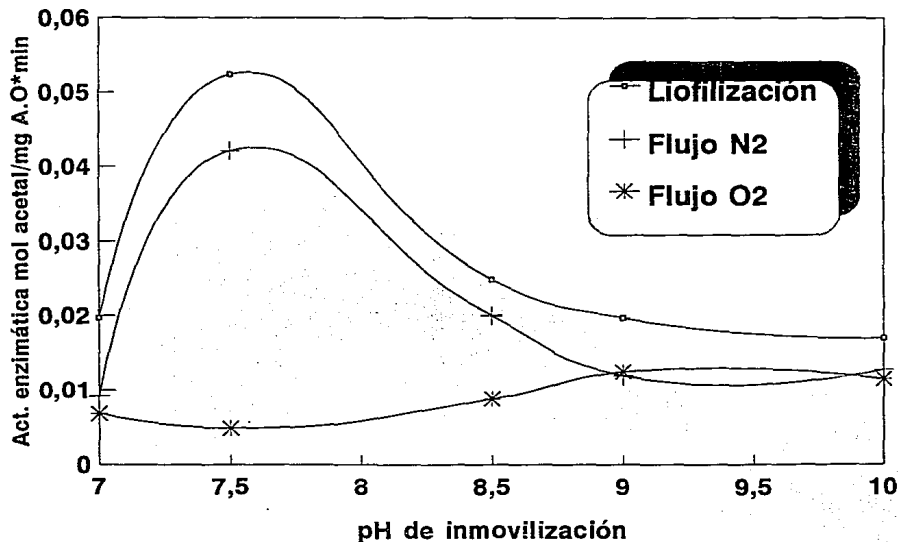
La figura 4.4 muestra las actividades relativas de la enzima inmóvil a los diferentes pH's del soporte secados por los tres métodos ya mencionados. De acuerdo a este estudio el rango de pH para la inmovilización de la enzima es de 7.4-8.0, obteniéndose una actividad satisfactoria con un máximo a 7.5. Lo anterior se aprecia en aquellos preparados secados por liofilización y por flujo de nitrógeno.

De acuerdo a esta figura 4.4, el pH del soporte resulta ser un factor importante para la actividad enzimática, la cual se ve seriamente afectada a pH's básicos.

Respecto a la enzima que fue secada con flujo de nitrógeno, la pérdida de la actividad comparada con el producto liofilizado se puede deber a la pérdida de material enzimático durante el manejo de ésta.

Por otro lado al hacer una comparación entre la actividad presentada por la enzima nativa y la enzima inmóvil a pH's diferentes se puede observar que la pérdida de actividad es menor al 30% comparada con la enzima nativa en solución. Sin embargo, a pH 7.5 la enzima nativa y la inmovilizada por liofilización presentan la misma producción de acetaldehído.

# EFFECTO DEL pH DEL SOPORTE SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA A.O INMOVILIZADA



La actividad enzimática se midió en sol. acuosa pH=7.5  
Figura 4.4

#### 4.2 A.O inmovilizada y secada en presencia de O<sub>2</sub>.

La presencia de oxígeno durante el secado de la enzima afecta dramáticamente la vida media de ésta, independientemente del pH presente en el soporte. Según la literatura la alcohol-oxidasa tiene 12 grupos sulfhidrilos en su forma nativa y 8 grupos SH- por subunidad (64 grupos en total) (Couderc et al, 1980), por lo que es posible que el sitio activo de la enzima se vea afectado por la oxidación de sus grupos sulfhidrilo al estar en contacto con el oxígeno.

Para comprobar la hipótesis anterior se cuantificaron los grupos sulfhidrilo de los preparados enzimáticos inmóviles así como de la enzima nativa.

Dado que la inmovilización a pH 7.5 resultó ser la mejor en cuanto a producción de acetaldehído, fue seleccionado este pH para realizar las titulaciones de cisteínas.



### 4.3 Titulación de grupos SH- en la enzima Alcohol-Oxidasa

Para la realización de esta parte del proyecto, fue necesario determinar la dilución exacta de alcohol oxidasa nativa en la cual los grupos sulfhidrilo sean sensibles al reactivo DTNB y por tanto cuantificables. De acuerdo a la metodología expuesta en el Capítulo 3, se eligió la dilución 1:30 donde la concentración de A.O era igual a 3.3  $\mu\text{M}$ , debido a que la enzima sola presentaba una absorbancia menor a 0.2 a 412 nm, lo que permitía la cuantificación de los grupos sulfhidrilo en la enzima desnaturalizada con Urea.

La desnaturalización de la enzima nativa se hizo con el fin de tener un control comparable con el reportado en la literatura y con las muestras inmovilizadas. La concentración de Urea que se manejó fue 5M. Debido a la dificultad de determinar los grupos sulfhidrilo directamente en la enzima inmovilizada en el soporte, fue necesario desorber la biomolécula con NaCl. La concentración óptima de NaCl en la cual no hay coagulación de la enzima y se permite la máxima liberación de ésta fue de 200 mM (Figura 4.5).

En los resultados obtenidos (Tabla 4.1), se observa que sólo es posible titular la mitad de los grupos sulfhidrilos tanto en la enzima nativa como en la desnaturalizada con Urea. Sin embargo esta analogía no afecta el propósito del estudio.

# DESORCIÓN DE LA ENZIMA ALCOHOL OXIDASA CON CLORURO DE SODIO (NaCl)

ABSORBANCIA 280 nm

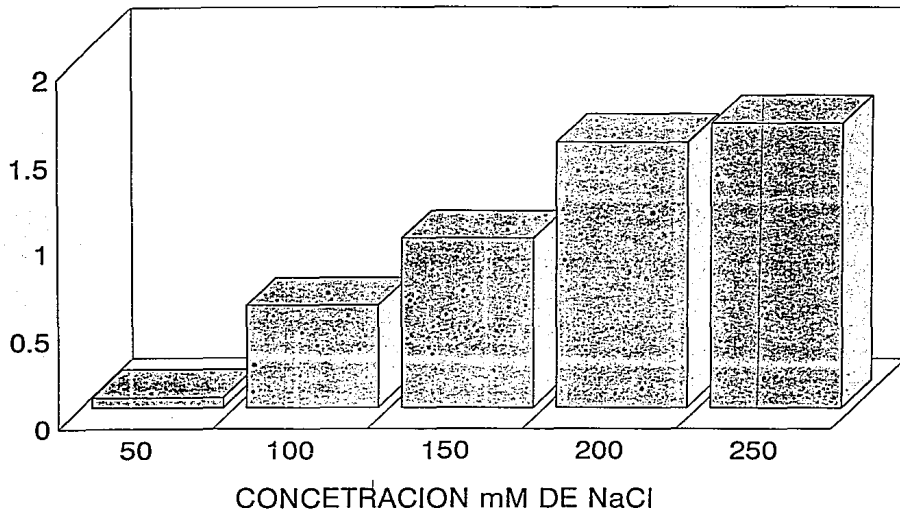


Figura 4.5

**Grupos sulfhidrido para A.O en solución**

Bibliografía	A.O. Solución experimental
12 grupos SH <sup>-</sup> nativos 64 grupos SH <sup>-</sup> A.O. desnaturalizada 8 grupos SH <sup>-</sup> /subunidad A.O desnaturalizada	5-6 grupos SH <sup>-</sup> /mmol 40-32 SH <sup>-</sup> /mmol 5-4 SH <sup>-</sup> /subunidad

*Tabla 4.1 Comparación de los grupos SH- presentes en la enzima nativa y desnaturalizada con Urea 5M a pH 7.5 con los reportados en la bibliografía (Couderc y Baratti, 1980).*

El número de cisteínas tituladas en la enzima desorbida de los preparados enzimáticos secados por liofilización y flujo de nitrógeno es mayor comparado con los SH- presentes en la enzima secada en presencia de oxígeno.

Esto se relaciona con la actividad enzimática al observar que la conversión de etanol a acetaldehído se afectó seriamente debido a la oxidación de grupos SH- por el oxígeno (Tabla 4.2).

Se cuantificaron los SH<sup>-</sup> en la enzima soluble la cual contenía la misma concentración de NaCl que la enzima que se desorbió del soporte, esto buscando tener un control del microambiente en el que se encontraba la enzima.

	SH <sup>-</sup> /mmol A.O
A.O Liofilizada	7.0
A.O N <sub>2</sub>	6.0
A.O O <sub>2</sub>	2.0
A.O en solución con 200 mM NaCl	7.0

*Tabla 4.2 Titulación de los grupos SH<sup>-</sup> con DTNB 0.01M  
(en solución amortiguadora de FOSFATOS 1 mM pH=7.5)  
de los diferentes preparados enzimáticos  
sin desnaturalizar.*

Estos resultados también descartan la posibilidad de que la oxidación de cisteínas sea una de las causas de inactivación enzimática cuando la biomolécula es secada por flujo de nitrógeno.

De hecho es posible indicar que el número de SH<sup>-</sup> presentes en el catalizador biológico es el mismo en su forma nativa como en el producto inmovilizado y secado por flujo de nitrógeno ó liofilizado.

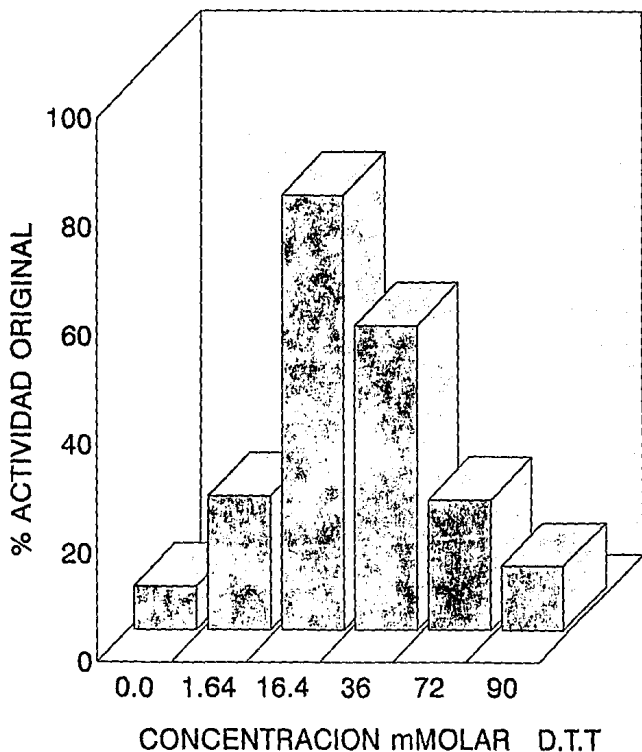
Los datos obtenidos nos conducen a tratar de establecer una forma de protección de la enzima A.O. durante el proceso de secado en presencia de oxígeno.

#### ***4.4 Protección de las cisteínas con DTT en la enzima A.O.***

Para evitar la inactivación enzimática producida por el oxígeno durante el secado, se propone la utilización de un reductor como es el DTT. Este se aplicó a la enzima antes de mezclarlo con el soporte, buscando mantener los grupos SH-reducidos. Se evaluaron concentraciones de DTT con el propósito de establecer la concentración máxima que evita una inactivación y la desnaturalización de la enzima, la cual se manifiesta como una turbidez en la solución enzimática, así como la cantidad mínima con la que las cisteínas del catalizador biológico permanecen en su estado reducido. Para comprobar la eficiencia del protector enzimático, se midió la actividad del complejo enzimático monitoreando la conversión de etanol a acetaldehído por cromatografía de gases.

## EFEECTO DEL DTT

### EN LA ACTIVIDAD DE A.O INMOVILIZADA



**Figura 4.6** Determinación de acetaldehído por C.G. pH=7.5  
A.O secada en presencia de oxígeno.  
Actividad original es previa a la inmovilización

La concentración óptima de DTT fue de 16.4 mM según los resultados presentados en la figura 4.6. Con dicha concentración se logra obtener una actividad enzimática semejante a la que presenta la enzima inmóvil secada por flujo de nitrógeno.

Esto es debido a que la manipulación de ambos secados enzimáticos es muy semejante por lo que la pérdida de material provocó la disminución de la actividad en un 20%, comparada con la enzima liofilizada.

La actividad de la enzima disminuye con altas concentraciones de DTT debido a que el reactivo provoca una coagulación de la enzima, la cual se apreciaba a simple vista en el medio de reacción.



---

## CAPÍTULO

### 5

#### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ♦ El pH del soporte influye sobre la actividad enzimática de la enzima inmóvil. La mejor producción de acetaldehído se presenta en el soporte preparado a pH 7.5, ya sea secada por liofilización o por flujo de nitrógeno.
- ♦ La actividad enzimática del catalizador inmovilizado secado por liofilización se mantiene constante comparada con la que presenta la enzima nativa en solución acuosa.
- ♦ El oxígeno afecta la vida media de la enzima por oxidación de las cisteínas presentes en los protómeros de la A.O.
- ♦ La concentración óptima para la desorción de la enzima del soporte DEAE-celulosa sin que exista desnaturalización de la misma es de 200 mM NaCl.

- ♦ El número de grupos sulfhidrilo detectados en la enzima liberada del catalizador secado por liofilización y flujo de nitrógeno es el mismo (6-7 mmol SH-/ mmol A.O). Los grupos sulfhidrilo titulados provenientes del catalizador secado en presencia de O<sub>2</sub> son menores (2 mmol SH-/mmol A.O).
- ♦ La oxidación es un mecanismo de inactivación enzimática en la A.O. que se puede evitar haciendo uso del reactivo DTT en concentraciones 10 veces mayores a la concentración de la enzima (16.4 mM DTT).
- ♦ La actividad enzimática del catalizador tratado con DTT y expuesto a oxígeno es semejante a la que se obtuvo con la enzima secada por flujo de nitrógeno.

## RECOMENDACIONES

Los estudios realizados establecen los mecanismos de inactivación enzimática durante el secado en la inmovilización de la enzima. De acuerdo a los resultados, existe la posibilidad de realizar la catálisis enzimática usando sustratos gaseosos ya sea protegiendo a la enzima mediante un mantenimiento de los SH<sup>-</sup> en estado reducido con el reactivo DTT, o bien secando la enzima por liofilización, lo que permite alargar la vida media de la enzima. Sin embargo para continuar con la línea de investigación referente a los mecanismos de inactivación sería conveniente incubar la biomolécula con mezclas de nitrógeno/oxígeno variando la concentración de O<sub>2</sub> y determinar así la concentración mínima de oxígeno para inactivar la enzima ya que en este estudio se utilizó aire con un 21% de oxígeno .

De igual forma sería interesante realizar estudios tales como electroforesis o espectrofotométricos a la coenzima, en aquellos preparados enzimáticos secados por flujo de nitrógeno, simplemente para eliminar la posibilidad de que el FAD se encuentre como una semiquinona lo que impediría el transporte de electrones.

Por otro lado, se propone determinar la potencialidad de protección del DTT; con el fin de establecer si éste reactivo protege a la enzima de oxidantes fuertes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo se pueden realizar experimentos para probar otro tipo de reductores tal como el β-mercaptoetanol.

---

## CAPÍTULO

### 6

## BIBLIOGRAFÍA

Bárzana E., Karel M., Klibanov A.M. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 1178-1185 (1989 a).

Bárzana E., Klibanov A.M., Karel M.A. Colorimetric method for the enzymatic analysis of gases. The determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidasa. *Analytical Biochemistry* 82, 109-115 (1989 b).

Chibata I. Applications of immobilized enzymes and microbial cells. Cap.4,148-214, En: *Immobilized Enzymes Research and Development*. Halsted Press, Japan (1978).

Clealand W.W. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH- Groups *Biochemistry* 3 (4), 480-484 (1964).

Couderc R. y Baratti J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural Biological Chemistry* 44(10), 2279-2289 (1980).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cregg J.M. y Maden K.R. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. En: **Developments in Industrial Microbiology** 29, 33-39. Ed. Pierce G., Society for Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam, Holland (1988).

Cromartie T. H. Sulfhydryl and Histidinyl Residues in the Flavoenzyme Alcohol Oxidase from *Candida boidinii*. **Biochemistry** 20, 5416-5423 (1981).

Cromartie T. H. Suicide Inactivation of the Flavoenzyme Alcohol Oxidase by Cyclopropanone. En: **Flavins and Flavoproteins**. Ed. Massey V. y William C., Elsevier, Amsterdam, Holland (1982).

Ellman G.L. A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 74, 443-450 (1958).

Geissler J. y Hemmerich P. Yeast methanol oxidases: An unusual type of flavoprotein. **FEBS Letters** 126(2), 152-156 (1981).

Geissler J., Ghisla S., Kroneck M.H. Flavin-dependent alcohol oxidasa from yeast. Studies on the catalytic mechanism and inactivation during turnover. **FEBS Letters** 160(2), 93-100 (1986).

Guilbault G.G. Enzymes Electrodes and Solid Surface Fluorescence Methods. **Methods in Enzymology XLIV (41)**, 579-591 (1980).

Habeeb A.F.S.A. Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Ellman's Reagent **Methods in Enzymology XV (37)**, 457-461 (1980).

Harder W. y Veenhuis M. Metabolism of one-carbon compounds. **Cap.8**, 289-215 En: **The yeasts**. Academic Press, N.Y., U.S.A (1989).

Herman D. y Penner C. Coenzyme Chemistry. **Cap.7**, 387-419. En: **Biorganic Chemistry**. Ed. Springer-Verlang, N.Y., U.S.A (1981).

Hopkins T.R. y Muller F. Biochemistry of Alcohol Oxidase. En: **In Microbial Growth on C1 compound**. 107, 150-157, Ed. Van Verseveld, Duine H.W.; Nijhoff. Dordnecht, Holland (1987).

Huitrón C. Biotecnología de Enzimas. En: **Simposio Interamericano sobre Biotecnología de enzimas**, 219-229, Ed. Huitrón C., UNAM, México (1983).

Janssen W., Kerwin M. y Ruelius W. Alcohol oxidasa from Basidiomycetes. **Methods in Enzymology XLI (79)**, 364-369 (1975).

Kato N., Omari Y., Tani Y. y Ogata K. Alcohol Oxidases of *Kloeckera sp.* and *Hansenula polymorpha*. Catalytic Properties and subunit structures. **Eur. J. Biochem** 64, 341-350 (1976).

Keith J.L. The oxidative Enzymes. Cap. 5, 78-101 En: **Introduction to the Chemistry of Enzymes**. Ed. McGraw-Hill, N.Y. U.S.A (1970).

Kendall P.E. y Chance B. Investigation of the Physical Properties of Immobilized Enzymes. **Methods in Enzymology** 44 (26), 356-372 (1980).

Konigsberg W. Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol. **Methods in Enzymology** XXV (13), 185-188 (1972).

Lehninger A. Cap. 7,8,9. En: **Bioquímica** 2a. Edición. Woth Publishers Inc. N. Y. U.S.A (1975).

Lilly M.D. Enzymes Immobilized to Cellulose. **Methods in Enzymology** 44 (4), 46-53 (1980).

Messing R. Adsorption in Inorganic Bridge Formations. **Methods in Enzymology**. 44(11), 148-161 (1980).

Page M. I. y Williams A. Oxido-reductases-Flavoenzymes. Cap.25, 506-520. En: **Enzyme mechanisms**. The Royal Society of Chemistry (1989).

Patel W. R., Hou C.T., Laskip A.I. y Derlenko P. Microbial Oxidation of Methanol: Properties of Crystallized Alcohol Oxidase from *Pichia sp.* Cap. 32, 196-201, En: **Flavins and Flavoproteins**. Ed. Massey V. y Williams C. Elsevier North Holland, Inc. (1972).

Porath J., Axén R. Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose and Sephadex Supports. **Methods in Enzymology XLIV** (3) 19-45 (1980).

Riddles W.P., Blakeley R.L. y Zerner B. Reassessment of Ellman's Reagent. **Methods in Enzymology 91**(8), 49-61 (1984).

Sahm H. y Schtte H. Alcohol Oxidasa from *Candida Boidinii*. **Methods in Enzymology 89** (72), 424-428 (1982).

Sherry B. y Abeles R.H. Mechanism of action of Methanol Oxidase, reconstitution of Methanol Oxidase with 5-Deazoflavin, and inactivation by cyclopropanol. **Biochemistry 24**, 2594-2605 (1986).



Sheldon J.B y Murray D.W. Production and Application of Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering** 31, 44-49 (1988).

Srere A. y Uyeda K. Functional Groups of Enzymes Suitable for Binding to Matrices. **Methods in Enzymology** XLIV(2), 11-17 (1980).

Stryer L. Conformación. Parte 1, 11-151, En: **Bioquímica**, 3a. Edición. Ed. Reverté. Barcelona, España (1979).

Vanderklei J., Bystrykh V. y Harder W. Alcohol Oxidasa from *Hansenula polymorpha*. **Methods in Enzymology** 188(65), 420-427 (1990).

Wetlauter B.D. Non enzymatic Formation and Isomerization of Protein Disulfides. **Methods in Enzymology** 107 (18), 301-331 (1984).

Whitaker R.J. Introducción a las Oxidoreductasas. **Principios de Enzimología**, 545-548. Academic Press, N.Y., U.S.A (1980).

Whitesides G.M. Organic synthesis using cofactor requiring enzymes, 16-25. **Conference on Enzyme Economics. Enzymes. The Interface between Technology and Economics.** Ed. Danahey J.P., Wolmak B.y Dekker M., Inc. Chicago, U.S.A (1978).

Woodward R.J. Biochemistry and Applications of Alcohol Oxidase from Methylophilic Yeasts. Cap.8, 193-225 En: **Advances in Autotrophic Microbiology and one carbon metabolism.** Ed. Cood G.A. et al, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht in the Netherlands (1990).