

302827

9
2ej

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

Escuela de Química con estudios incorporados

a La Universidad Nacional Autónoma de México

**DESARROLLO DE CULTIVOS BACTERIANOS PARA LA
PRODUCCION DE TRIMETILAMINA DESHIDROGENASA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a:

BLANCA MARCELA PEDROZA LUJAN

**Director de Tesis: Dr. Eduardo Bárzana García.
México, D.F.**

1992



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.

INDICE

		Páginas
CAPITULO I	INTRODUCCION	1
CAPITULO II	ANTECEDENTES	5
CAPITULO III	PARTE EXPERIMENTAL	
	3.1 DIAGRAMA	13
	3.2 MATERIALES Y METODOS	14
	3.2.1 CRECIMIENTO CELULAR	14
	3.2.2 METODOS ANALITICOS	15
	3.2.3 EXTRACCION DE LA ENZIMA	18
	3.2.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA	19
CAPITULO IV	RESULTADOS Y DISCUSION	25
CAPITULO V	CONCLUSIONES	37
	BIBLIOGRAFIA	41

I. INTRODUCCION

Los productos marinos, y fundamentalmente el pescado son uno de los recursos potenciales más importantes para satisfacer las demandas protéicas de la creciente población. Se estima que la captura total mundial podría alcanzar los 150 millones de toneladas métricas, suficiente para alimentar un 30-40% de la población total (2). Sin embargo debido a la falta de recursos para la conservación de productos marinos, se logra llevar al consumidor cantidades mucho menores de las que estos índices señalan, situación que es aún más marcada en países de bajo desarrollo.

Existen varios factores que limitan la explotación de recursos pesqueros en países con bajo nivel de industrialización. Entre ellos se encuentran elementos financieros, técnicos, políticos, sociales y culturales que mantienen una estrecha relación (3). La causa principal por la que existen cuantiosas pérdidas desde la captura hasta el lugar de consumo se debe a la extremadamente baja vida de anaquel del pescado fresco y de otros productos marinos como mariscos. A temperatura ambiente, su vida media es de 24 horas o menos y su consumo en períodos posteriores puede ocasionar serios riesgos para la salud (1).

Para la conservación de la calidad de estos, se tiende, a nivel mundial, al procesamiento inmediato en forma de enlatado, ahumado, secado, y fundamentalmente el congelado. Sin embargo tales métodos requieren de una gran inversión de capital por lo que en países en vías de desarrollo los recursos marinos se comercializan principalmente en fresco con las

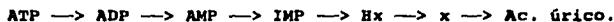
consecuentes pérdidas. Debido al problema que representa la conservación de estos productos es necesario contar con métodos evaluatorios adecuados que permitan estimar el nivel de deterioro o su grado de frescura.

Desde tiempo atrás se han llevado a cabo estudios que permiten determinar la calidad en especies marinas. Por medio de éstos se han establecido escalas de referencia que marcan el grado de descomposición en función a ciertos compuestos que son el resultado del metabolismo bacteriano responsable del deterioro del alimento.

La descomposición de las especies marinas se inicia a partir del término del rigor mortis dando origen a una actividad bacteriana intensa que resulta en la síntesis de un grupo de compuestos amínicos volátiles (17). Con esta base se han desarrollado técnicas cuantitativas que permiten relacionar las concentraciones de estos compuestos liberados con el tiempo de envejecimiento del alimento y por ende de su frescura.

Se ha demostrado que el metabolito central es el óxido de trimetilamina (OTMA), producido durante el proceso digestivo en especies marinas y mariscos, con funciones específicas de osmoregulación (6). En pescado congelado, el OTMA es reducido por enzimas endógenas a dimetilamina (DMA) y formaldehído, mientras que en pescado fresco ó refrigerado éste es reducido a trimetilamina (TMA) por enzimas bacterianas. Esto demuestra que el rápido deterioro del alimento se debe a la acción indirecta de enzimas catabólicas que actúan aún a temperaturas de refrigeración (5). Paralelamente, ocurre la degradación autolítica (con enzimas nativas del pescado) de nucleótidos, desde ATP hasta llegar a ácido úrico de acuerdo con

la siguiente secuencia:



Donde Hx y x indican Hipoxantina y xantina respectivamente.

En consecuencia, los métodos comerciales existentes se basan en la determinación de compuestos intermedios. Al ser productos de reacciones enzimáticas, su concentración depende tanto del tiempo como de la temperatura y por lo tanto se relacionan con el grado de deterioro o el nivel de frescura.

Los métodos enzimáticos establecidos actualmente brindan una marcada ventaja sobre los métodos analíticos convencionales en la determinación de frescura en pescado y productos marinos gracias a su alta especificidad; en el presente trabajo se utiliza la capacidad de la enzima trimetilamina deshidrogenasa para convertir estos sustratos directamente de la fase gaseosa partiendo de la siguiente hipótesis: Si la enzima es capaz de degradar dichos sustratos y puede ser cuantificable por medio de análisis espectrofotométricos se podría utilizar como medida directa en la determinación de frescura en pescado.

Debido a que la enzima no es comercial y tomando en cuenta las limitaciones y dificultades que presentan los microorganismos productores de la misma, en este trabajo se pretende realizar una selección de microorganismos fuente de TMADH y establecer sus condiciones óptimas de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo se inscribe dentro de un proyecto global cuyo objetivo es el desarrollo de un método enzimático simple, basado en trimetil-amino deshidrogenasa, para la determinación rápida, confiable y económica de la frescura en productos marinos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- **Evaluar diferentes bacterias de colección como fuente de la enzima trimetil- amino deshidrogenasa.**
- **Determinar las condiciones óptimas de cultivo que promueven una alta productividad de la enzima.**

II. ANTECEDENTES

En la literatura se encuentran reportados diversos métodos para la valoración de aminas en pescados y productos marinos. En 1974 se desarrolló una técnica para la estimación de aminas volátiles en pescado utilizando sensores de gas (27). El principio en que se basa este estudio es la determinación de la base total de nitrógeno volátil (BTNV) como indicador de frescura. El sensor de gas consiste en un sistema electrónico que muestra una relación lineal entre el cambio de voltaje en el sensor y la concentración de aminas. Este método además de marcar el grado de deterioro del pescado permite determinar las concentraciones de TMA y DMA por separado. Sin embargo, no es de alta precisión y requiere forzosamente de un extracto ácido de pescado obtenido a través de manipulaciones varias sobre el cual se realiza la medición. La sensibilidad y la vida útil del sensor son considerablemente reducidas.

Un método para la determinación analítica de trimetilamina es el conocido método de Dyer que data de 1945 modificado por Tozawa (28). La determinación es basada en la reacción de la TMA con ácido pícrico para la formación de una sal que permite su evaluación colorimétrica en fase acuosa. Desafortunadamente el ácido pícrico reacciona con aminas primarias, secundarias y terciarias, además de ser un reactivo altamente flamable que puede detonar si se expone al calor.

De más reciente implantación son los métodos enzimáticos basados en el uso de trimetilamina deshidrogenasa (TMADH) que puede acoplarse a la reacción

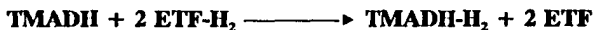
de un compuesto cromóforo. La coloración final puede entonces relacionarse con el contenido de TMA por espectrofotometría. El método es específico para TMA, no presenta interferencias y permite la evaluación con equipo simple de laboratorio. El primer reporte se realizó en 1975 con un método enzimático para la microestimación de TMA (16) empleando TMADH extraída y purificada de *Hyphomicrobium vulgare*. Es un método sensible y específico que permite la determinación de concentraciones micromolares de amina. Sin embargo, es lento y puede presentar interferencias por la presencia de otras enzimas del sistema. Posteriormente se realizaron estudios en donde se encontró una excelente correlación entre el método del ácido pícrico y las técnicas espectrofotométricas. Esto trae como opción el uso de una prueba visual semicuantitativa que permite apreciar un cambio de color en el sistema sin necesidad de utilizar instalaciones de laboratorio (30). Este mismo grupo de investigación desarrolló una prueba de diagnóstico para determinar TMA en extracto de pescado basándose en un papel indicador impregnado de enzima, colorante y el resto de los componentes. La tira de papel se sumerge en el extracto acuoso de pescado y produce un resultado visual cualitativo en menos de 5 minutos (29).

Este tipo de biosensores enzimáticos presenta ciertas limitaciones, destacando que la enzima utilizada (TMADH) no está comercialmente disponible. El microorganismo productor de la enzima (*Hyphomicrobium sp*) no es fácil de crecer, presenta requerimientos nutricionales complejos, una baja tasa de duplicación y manipulación delicada (21). Eliminar estas limitantes aumentaría notablemente su implementación práctica.

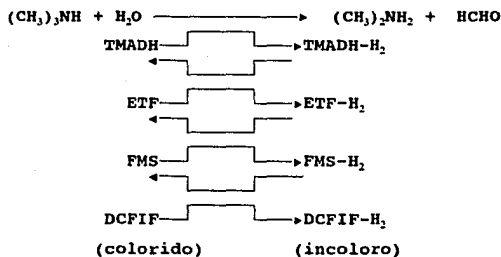
En relación a nuevas metodologías analíticas, en 1989 se desarrolló un método colorimétrico para análisis enzimático de gases, como por ejemplo vapores de etanol y formaldehído, utilizando alcohol oxidasa obtenida de levaduras (4). El sistema se compone de alcohol oxidasa, peroxidasa y dicloro-fenol-indofenol (DCFIF) como indicador de color. El proceso consiste en descomponer el etanol en acetaldehído y peróxido de hidrógeno por intermediación enzimática seguido de la oxidación del DCFIF con peroxidasa que resulta en un cambio de color. Los resultados se evalúan por medio de un espectrofotómetro midiendo la intensidad de color azul del sistema. Este método es rápido, tiene una alta sensibilidad y permite el análisis directo de compuestos presentes en gases y vapores. En principio, este sistema podría emplearse para la determinación de vapores de TMA emitidos por productos marinos en descomposición. Para ello, sin embargo, es menester contar con una fuente apropiada de la enzima TMADH, así como garantizar su producción de manera económica.

La enzima TMADH ha sido detectada y estudiada, según se desprende de una variedad de reportes científicos. A continuación se presenta una revisión de los artículos más relevantes. En 1971 fue aislada de la bacteria 4B6 (8). Estudios electroforéticos reflejaron un peso molecular aproximado de 160,000 daltons además de encontrar que esta proteína puede estar compuesta por dos polipéptidos con un peso molecular aproximadamente entre los 70,000 y 80,000. La enzima alcanza su máxima absorbancia a los 433 nm. Su pH óptimo es de 8.5 y su temperatura óptima oscila entre los 30° y 35°C. La trimetilamina deshidrogenasa (TMADH) comprende una elevada proporción en la proteína total soluble, llegando a cerca del 3% de la masa celular obtenida (9).

En un estudio mas reciente se aisló la enzima trimetilamina deshidrogenasa (TMADH) de una bacteria Gram negativa, facultativa y metilótrofa; la bacteria W3A1 (19). Se encontró que el agente de transferencia electrónica es una flavoproteína (ETF) y que *in vivo* el aceptor es la trimetilamina deshidrogenasa.



Con base en esta transferencia se determinó la actividad enzimática de la TMADH utilizando fenazina metosulfato (FMS) como oxidoreductor (25) y Dicloro-fenol-indofenol (DCFIF) como aceptor final e indicador de color (19) de acuerdo con la siguiente reacción:



También se determinó que la TMADH de la bacteria W3A1 es inhibida por acetaldehído, etilamina, dietilamina, y por cloruro de tetrametilamonio. Además esta sujeta a inhibición por iones de Cu^{++} , Co^{++} , Ni^+ , Hg^+ , Ag^+ , por cloruro de tetrametilsulfonio y otras aminas cuaternarias.

La enzima es estable por años si se almacena a -20°C en una solución al 20% de etilen glicol. La máxima velocidad de reacción está en un rango de 1.1 a 1.4 unidades internacionales por mg de enzima; Las constantes de Michaelis

(24) para TMA son: $K_{TMA} = 2.0 \mu M$, $K_{FMS} = 0.42 \text{ mM}$; y para DMA son: $K_{DMA} = 1.4 \text{ mM}$ y $K_{FMS} = 0.56 \text{ mM}$.

Los microorganismos productores de la trimetilamina deshidrogenasa pueden ser bacterias o levaduras. Dentro de las bacterias se encuentra el Género *Hyphomicrobia* capaz de desarrollarse en sustratos que contengan compuestos de un sólo carbono y NH_4 como fuente de nitrógeno. Existen dos especies capaces de desarrollarse en TMA como fuente de carbono que son: *Hyphomicrobium vulgare* e *Hyphomicrobium methylovorum*.

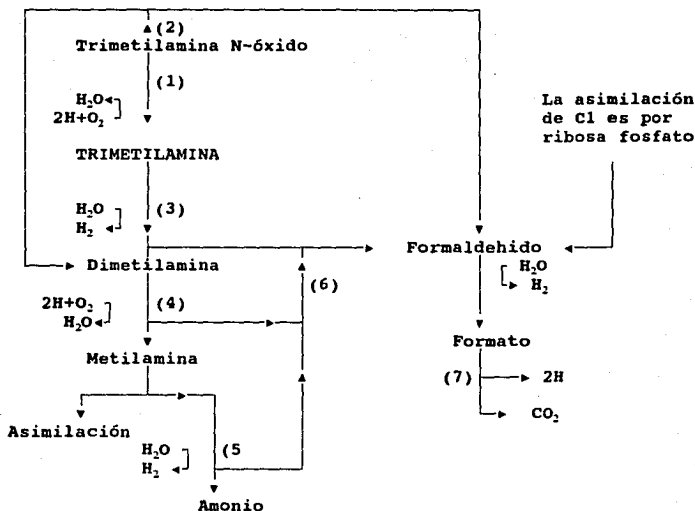
Dentro de la morfología del *H. vulgare* la célula madre presenta forma ovalada con una hifa corta, permitiendo la gemación en la punta de la hifa, formando un ángulo de 90° . Presenta una longitud de 0.6 a $5.0 \mu m$. y un ancho de 0.5 a $1.0 \mu m$. No forma racimos pero se aglomera formando una película en la superficie del líquido. Este crecimiento no ocurre en la superficie del vidrio cuando es expuesto a la luz. En medio sólido las colonias son café grisáceas, brillantes, de superficie irregular con pliegues y a menudo con anillos concéntricos muy cohesivos.

H. vulgare es un microorganismo aerobio cromo-organotrófico, oligocarbofilico. Presenta un buen crecimiento en metanol, hidrócloruro de metilamina, formamida, orina humana diluida, dimetilamina, trimetilamina y acetamida. Su crecimiento es bajo principalmente en etanol, glicerol y bactopectona. Como fuente de nitrógeno utiliza NH_4^+ , NO_3^- y urea. Es inhibido por kanamicina, neo-micina, tetraciclina, eritromicina y estreptomina (26). Presenta un buen crecimiento en NaCl al 3.5%. Su rango de temperaturas es de 5° a $45^\circ C$ y un pH óptimo de 6.5 a 7.5 ; es inhibido

por la luz visible; es citocromo oxidasa y catalasa positivo; no licua la gelatina y presenta un porcentaje molar de Guanina y Citosina de 64.1% (26).

La cinética de crecimiento para *Hyphomicrobium X* (21) se determinó tanto en condiciones aerobias como anaerobias encontrando que el crecimiento es mayor en condiciones aerobias. En anaerobiosis la concentración de nitritos acumulados durante el desarrollo es inhibitoria de la TMADH y produce un desarrollo del microorganismo mucho más bajo.

La bioquímica de los microorganismos metilótrofos facultativos (7) presenta dos vías metabólicas que involucran a varias enzimas, según se describe a continuación:



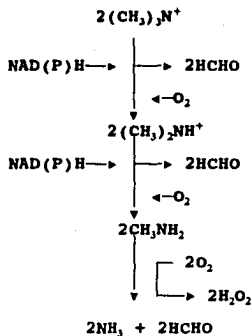
Enzimas: (1) TMA mono oxigenasa; (2) TMA-N óxido demetilasa; (3) TMADH; (4) DMA mono oxigenasa; (5) amina primaria deshidrogenasa; (6) formaldehido deshidrogenasa; (7) formato deshidrogenasa, (ref. 22).

Con base en esto, la ruta metabólica del *Hyphomicrobium X* en aminas metiladas es la oxidación de la TMA por la deshidrogenasa.

La morfología del *Hyphomicrobium methylovorum* presenta células madre con flagelos mono o bipolares; la motilidad de las colonias se lleva a cabo por flagelos laterales. En medio sólido sus colonias son blancas amarillentas, circulares, convexas, lisas y brillantes.

Es un microorganismo aerobio, aminopeptidasa positivo, indol (-), H₂S (-), y catalasa (+). Utiliza como fuente de carbono metanol, metilamina, dimetilamina y trimetilamina. Presenta un crecimiento pobre en formato y formamida. Utiliza como fuente de nitrógeno, NH₄⁺ y l-glutamina. Su rango de temperaturas es de 14° a 33°C, tiene un pH óptimo de 7.0 y no requiere vitaminas. (26).

Por otra parte se han realizado estudios para determinar el metabolismo de levaduras metilótrofas y no metilótrofas en metilaminas. Se ha encontrado la presencia de amino oxidasa que cataliza la oxidación de metilaminas con el oxígeno molecular degradándola hasta NH₃ y peróxido de hidrógeno (12). También se encontró que *Candida utilis* y *Hansenula polymorpha* en medio de sales de amonio como fuente de nitrógeno presentan una elevada actividad de la amino-oxidasa. Un camino posible dentro del metabolismo de la levadura es el siguiente (12):



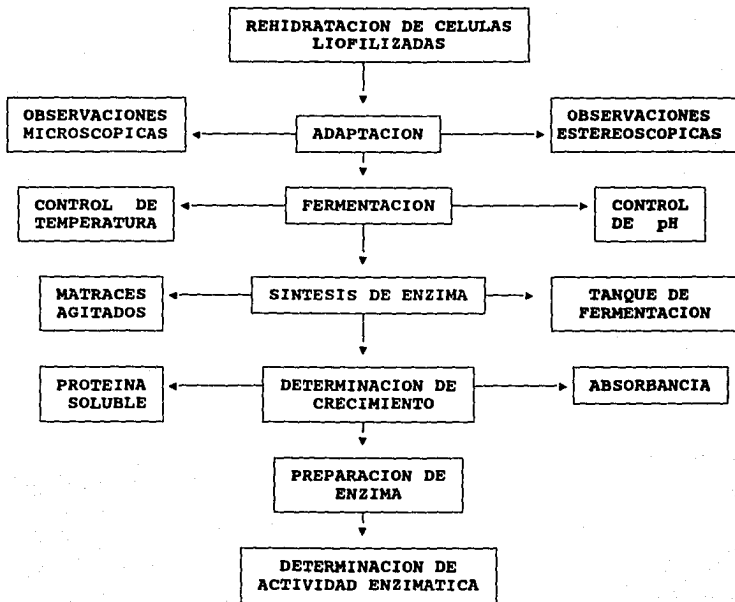
La habilidad para utilizar etilamina u homólogos mas grandes depende de la velocidad de adaptación para desarrollarse en aminas metiladas. Se ha reportado el uso de etilamina y aminas más grandes como DMA y TMA por algunos géneros de levaduras como *Pichia* y *Hansenula* (15).

Las levaduras son generalmente incapaces de crecer en medio de metilaminas como única fuente de carbono y energía. Sin embargo algunas especies pueden utilizar estos compuestos como fuente de nitrógeno para su crecimiento. En el caso de *C. utilis* y *H. polymorpha*, estas especies tienen un buen crecimiento en medio de glucosa como fuente de carbono y metilamina como fuente de nitrógeno y están asociadas con la síntesis de H_2O_2 producidos por la oxidasa; sin embargo su crecimiento es demasiado lento (31).

Todo indica que las enzimas involucradas en el metabolismo de aminas metiladas por levaduras son del tipo oxidasa presentando un catabolismo totalmente diferente al de las bacterias. De igual forma que las deshidrogenasas, las oxidasas también son específicas para cada amina.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA:



3.2 MATERIALES Y METODOS

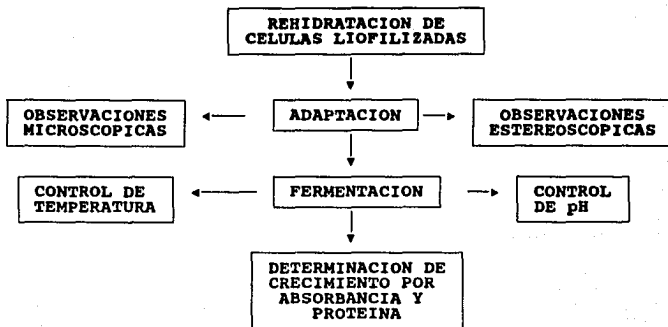
3.2.1 CRECIMIENTO CELULAR:

Los microorganismos estudiados se obtuvieron de la National Collection of Industrial and Marine Bacteria LTD, Aberdeen, Escocia, y del Institute for Fermentation en Osaka, Japón. Estos fueron rehidratados dentro de una campana de flujo laminar con un medio de sales minerales estéril, e incubados en estufa a 30°C utilizando placas con medio solidificado y tubos de rosca con medio líquido igualmente estériles. Se rastreó su crecimiento por observación de células en microscopio de alta resolución marca Carl Zeiss y sus colonias por medio de un estereoscopio de la misma marca.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en incubadoras de agitación orbital (EDISA-COMIT y New Brunswik Scientific) con temperatura controlada. Las fermentaciones de mayor capacidad se realizaron en un fermentador New Brunswick Scientific Bio Flo modelo C-30 con capacidad para 500 ml, esterilizado en autoclave a 15 lbs de presión.

Para la determinación del crecimiento por absorbancia se utilizó un espectrofotómetro marca Bausch and Lomb Modelo 20 a una longitud de onda de 433nm.

PROCEDIMIENTO:



3.2.2 METODOS ANALITICOS.

PROTEINA SOLUBLE por el método de Lowry (17), modificado por Peterson, (23).

SOLUCIONES:

- 1.- DOC: Deaxicolato de sodio al 0.15%**
- 2.- TCA: Ac. tricloracético al 75%**
- 3.- BSA: O-Albúmina 0.5 g/ml (stock)**
- 4.- SDS: Lauril sulfato de sodio al 10%**
- 5.- Solución de NaOH 0.8N**
- 6.- CTC: Solución de carbonato-sulfato de cobre-tartrato**

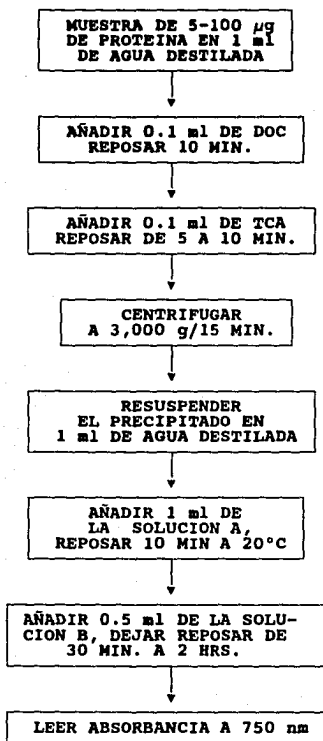
- a) Sol. de carbonato de sodio al 20%
- b) Sol. de tartrato de sodio al 0.4% en 50 ml de agua destilada.
- c) Sol. de sulfato de cobre al 0.2% en 50 ml de agua destilada.

Mezclar la sol. b) y c) lentamente. Para utilizarse en el momento mezclar la sol. a) con la mezcla de las sol. b) y c) en partes iguales.

Reactivo A: Mezclar cantidades iguales de las soluciones stock: CTC, NaOH, SDS.

Reactivo B: 1 volumen del reactivo de Folin-Ciocalteau-Fenol comercial (Merk) por 5 volúmenes de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:



FUNDAMENTO:

Cuantificación de proteína a partir de dos reacciones:

a) **Reacción de Biuret:** (interacción de la proteína con el reactivo cúprico formando un complejo colorido).

Se basa en la cuantificación de enlaces peptídicos y su interacción con la sal cúprica formando un complejo colorido, el cual presenta máxima absorción entre 740-760 nm.

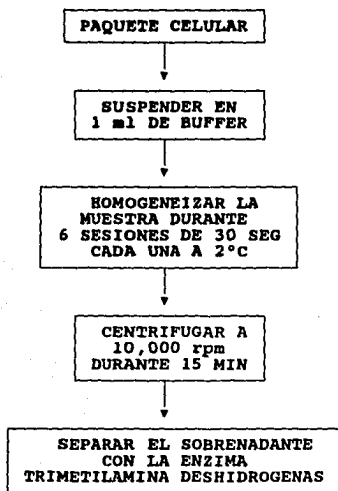
b) **Reacción fosfomolibdico-fosfotúngstico con tirosina y triptofano** presentes en la proteína-cobre (donador de electrones).

3.2.3 EXTRACCION DE LA ENZIMA

Ya que la enzima trimetilamina deshidrogenasa es intracelular, suspender el material celular en buffer de fosfatos (10) y pasar a través de un homogeneizador marca KIKA-WERK durante 6 sesiones de 30 seg para romper las células. Entre cada sesión, mantener la suspensión en hielo a 2°C para evitar la inactivación de la enzima por sobrecalentamiento.

La muestra homogeneizada se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 min a 2°C; la enzima trimetilamina deshidrogenasa se encuentra en el sobrenadante obtenido.

PROCEDIMIENTO:



3.2.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA

a) TRIMETILAMINA DESHIDROGENASA (TMA-DH)

La actividad de la TMA-DH se midió de acuerdo con la metodología descrita por Colby y Zatman (7). Una unidad de enzima se define como la cantidad que se requiere para catalizar la reducción de un μmol de 2,6 dicloro-fenol-indofenol (DCFIF) por minuto a pH 7.5 utilizando hidrocloreuro de trimetilamina (TMA-HCl) como sustrato.

Los reactivos empleados fueron:

1) Metasulfato de fenacina (MSF) el cual es un aceptor y acarreador de electrones; presenta un tono amarillo cuando esta oxidado e incoloro cuando esta reducido, pero en algunas ocasiones se observa la formación de semiquininas de tonalidad verde.

El compuesto reducido es rápidamente oxidado por oxígeno, además de ser inestable a la luz (expuesto a la luz solar se descompone en 5-10 min.).

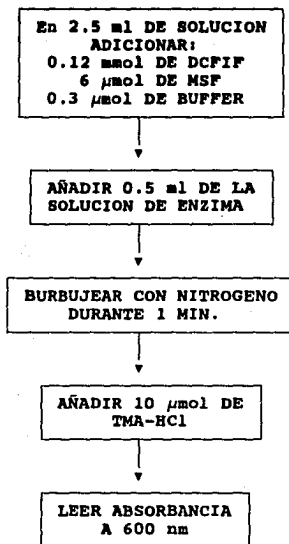
2) 2,6-Dicloro-fenol-indofenol (DCFIF) cuando está oxidado presenta un color azul a pH neutro y a pH ácido un color rosa; cuando está reducido es incoloro. Se emplea como acarreador de electrones. Este compuesto es estable por algunos años almacenado en la obscuridad y en estado sólido.

3) Buffer de fosfatos de pH 7.5, 0.2M.

4) Hidrocloruro de trimetilamina (TMA-HCl).

Para la determinación de la trimetilamina se siguió el siguiente protocolo: En 2.5 ml de solución adicionar 0.3 mmol de buffer de fosfatos de pH 7.5; 0.12 μ mol de 2,6 DCFIF; 6 μ mol de MSF, extracto crudo homogeneizado y 10 μ mol de TMA-HCl. Leer a 600 nm a un tiempo predeterminado. Incubar la muestra a 25°C y para evitar la oxidación de la mezcla de reacción se burbujea con nitrógeno durante 1 minuto, antes de adicionar el sustrato.

PROCEDIMIENTO:



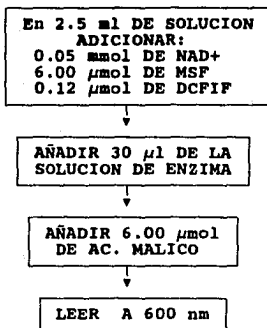
b) MALICO-DESHIDROGENASA.

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo con Segel (24) utilizando NAD^+ como agente oxidante.

Para la estimación del ácido oxalacético se utilizó el siguiente método: En 2.5 ml de solución adicionar los siguientes reactivos: 0.05 mmol de NAD^+ ; 0.12 μmol de DCFIF; 6.0 μmol de MSF; 30 μl de solución de enzima y 6 μmol

de ác. málico. La reacción se inicia al momento de adicionar el sustrato (ác. málico). Leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

PROCEDIMIENTO:



MEDIOS DE CULTIVO

A: Colby y Zatman (7)

K_2HPO_4	1.2g
KH_2PO_4	0.62g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.05g
$MgSO_4 \cdot 5H_2O$	0.20g
NaCl	0.10g
$(NH_4)_2SO_4$	0.50g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5.0 μg
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	10.0 μg

Na₂MoO₄·2H₂O	10.0µg
H₃BO₃	10.0µg
ZnSO₄·7H₂O	70.0µg
CoCl₂·6H₂O	5.0µg
Agua destilada	1.0 l
TMA-HCl	0.1%
Agar bacterio- lógico	20.0%

B: Kanamarú (14)

Na₂HPO₄	1.8g
KH₂PO₄	1.2g
MgSO₄·7H₂O	0.4g
KNO₃	1.0g
FeCl₃·6H₂O	5.0mg
CuCl₂·2H₂O	0.3mg
ZnSO₄·7H₂O	0.1mg
CuSO₄·5H₂O	0.2mg
MnSO₄·H₂O	0.1mg
CoCl₂·6H₂O	0.2mg
Biotina	2.0µg
Tiamina	400.0µg
TMA-HCl	10.0 mM
Agar bacterio- lógico	20.0%

**C: Mezcla de Vitaminas:
(Colby y Zatman; (7))**

Hidrocloruro de tiamina	0.5mg
Pantotenato de calcio	0.5g
Ac. nicotínico	0.5mg
Biotina	1.0µg
Riboflavina	0.5mg
Vit. B₁₂	2.5µg
Ac p-amino benzoico	10.0µg
Ac. fólico	10.0µg
Hidrocloruro de piridoxal	2.0mg

**D: Medio completo desproteinado de extracto de malta
(Eger y Eden; (11))**

Extracto de malta	20.0g
Agua destilada	250.0ml
CaCl₂	1.4 g
TMA-HCl	0.1%

E: Medio 233; IFO

(NH₄)₂HPO₄	3.0g
NaCl	1.0g
MgSO₄·7H₂O	0.2g
FeSO₄·7H₂O	10.0mg
MnSO₄	5.0mg
MEZCLA DE VIT.	5.0ml (indicada arriba)
AGUA DESTILADA	1.0l
TMA-HCl	0.1%

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

En la primera parte del estudio el microorganismo empleado correspondio al 11052 del catálogo de la NCIMB (National Collection of Industrial and Marine Bacteria LTD, Aberdeen Escocia); conocido como *Hyphomicrobium aestuarii*. Otros autores reconocen este microorganismo como *Hyphomicrobium vulgare* NQ 521 con el mismo número de catálogo de la NCIMB (16).

Se empleó como medio de rehidratación y cultivo el medio Colby y Zatman. El microorganismo en medio líquido no produjo turbidez pero presentó una película opaca en la superficie; ésta con agitación se precipitó y se apreció la formación de una especie de goma. Las observaciones al microscopio permitieron, únicamente, detectar pequeñas células hialinas con una longitud aproximada de 0.5 micras.

En el mismo medio solidificado con agar y después de un tiempo de incubación de 192 horas, se observó un crecimiento pobre con colonias café amarillentas lisas. Sin embargo, después de un período de adaptación prolongado y varias resiembras, el microorganismo logró desarrollarse mejor en este medio.

Para la primera fermentación en matraces se realizó un pre-inóculo utilizando el medio de cultivo Kanamarú. La cinética de crecimiento observada, reportada como las variaciones en absorbancia a 433 nm se presenta en la Figura 1. Comparando las absorbancias con las observaciones microscópicas se confirma que el microorganismo mostró un desarrollo pobre y una etapa de extinción anticipada ya que su máximo crecimiento ocurrió a

los tres días seguido de una reducción notable (21). Si bien la dispersión en las determinaciones fue grande, la tendencia observada fue confirmada en matraces independientes.

Con el objeto de promover la propagación del microorganismo, para la segunda fermentación se tomó el inóculo directo de las cajas sin hacer pre-inóculo, realizándose éste por azada (1) y por adición de cubitos de agar (2) obtenidos de la placa. Se preparó un matraz con medio de cultivo Kanamarú (A) y dos con medio Colby and Zatman (B) enriquecido con la mezcla de vitaminas (Colby y Zatman). Los resultados se presentan en la Figura 2.

Se observan concentraciones de células similares para los dos medios. Sin embargo, se observó un crecimiento notable en la superficie de los cubitos de agar empleados como vehículo de inoculación y por lo tanto de biomasa neta en el cultivo sumergido.

De acuerdo con las observaciones microscópicas el número de células aumentaba periódicamente. Sin embargo, haciendo una comparación con las absorbancias reportadas, aparentemente el microorganismo presentó un desarrollo pobre; con base en esto se realizó un barrido de absorbancias encontrando que el rango óptimo está entre 420 y 450 nm, comprobando así que la longitud de onda utilizada es la adecuada.

La siguiente fermentación se realizó inoculando directamente con cubitos de agar y se desarrolló la prueba de Lowry (17) para determinación de proteína soluble, como parámetro adicional indicativo del crecimiento.

Los medios de cultivo empleados se citan a continuación:

- a) Medio mínimo Colby and Zatman.**
- b) Medio completo de extracto de malta desproteinado**

Los resultados para esta fermentación se indican en las Figura 3 y Figura4.

De acuerdo con estos resultados, aparentemente hubo mejores resultados en el medio completo, pero en la Fig 4 la absorbancia y los μg de proteína no presentan congruencia ya que la absorción reportada en los 3 últimos días muestra una etapa de extinción mientras que la proteína va en aumento; en

cambio la gráfica de medio mínimo (Fig 3) sí presenta similitud entre ellas. Puede ser que la naturaleza del medio completo haya presentado interferencias en las determinaciones turbidimétricas.

Por otro lado las observaciones microscópicas mostraron un buen desarrollo del microorganismo durante la fermentación. Esto demuestra que la determinación de crecimiento por absorbancia no es confiable. Probablemente lo hialino de sus células y su distribución heterogénea en el medio, aún con agitación constante, contribuyen de manera importante a invalidar este método.

La siguiente fermentación se realizó sin medir ningún parámetro de crecimiento; únicamente se evaluó la actividad enzimática de Trimetilamina deshidrogenasa (7) al sexto día de fermentación, encontrando no detectable esta actividad. Es posible que el microorganismo produzca oxidasas como en-

zimas degradadoras de la trimetilamina como fuente de carbono permitiendo así su desarrollo. Sí es ésta la causa, sería necesario montar técnicas evaluatorias de esta enzima; sin embargo, para los fines de este estudio resulta conveniente encontrar bacterias productoras de TMA deshidrogenasa.

En consecuencia, se estudió otro microorganismo conocido como *Hyphomicrobium methylovorum* IFO (Institute for Fermentation, Osaka) 14180, KM-146 (1480) capaz de desarrollarse en medio de TMA-HCl como fuente de carbono (26). Se utilizó el medio de crecimiento No. 233 del IFO.

El microorganismo en medio líquido se desarrolló adecuadamente en 120 horas formando una película en la superficie y un precipitado de color rosa sin enturbiar el medio. En medio sólido se observaron colonias lisas, rosas, brillantes teniendo un mejor crecimiento y un tiempo de adaptación mucho más corto, en comparación con el microorganismo anterior.

Las observaciones microscópicas indicaron la presencia de células con una longitud promedio de 1 micra, con una coloración rosa y la presencia de una película transparente semejante a una goma alrededor de algunas colonias. La primera fermentación en matraces se realizó con los siguientes medios de cultivo:

A: Medio mínimo (233,IFO)

B: Medio completo desproteinado (11)

El inóculo se realizó por azada directo de las cajas. Los resultados de

crecimiento obtenidos por absorbancia se presentan en la **Figura 5**. Sin embargo, de nuevo, no se detectó actividad enzimática de **TMADH**.

Para comprobar si el método analítico funcionaba apropiadamente, el **MSF** y el **DCFIF** se evaluaron con ácido ascórbico para reducirlos y con **KMnO₄** para re-oxidarlos y ambos funcionaron correctamente.

Por su parte, el crecimiento del microorganismo fue favorable y la densidad celular concordó con las observaciones microscópicas realizadas durante la fermentación; con base en esto, el motivo por el que la actividad enzimática era no detectable podría deberse al bajo número de células cultivadas y por consiguiente a una mínima concentración de enzima, inferior al umbral requerido por el método.

Buscando una mayor biomasa celular se decidió efectuar el cultivo en fermentador. El medio de fermentación empleado fue el medio mínimo **IFO** con **TMA-HCl** como fuente de carbono y **(NH₄)₂HPO₄** como fuente de nitrógeno, utilizando un fermentador **New Brunswick** de 500 ml con los siguientes parámetros de operación:

Temperatura 30°C

Agitación 400 rpm

Aereación 1.0 vvm

Tiempo de fermentación: 46 hrs.

pH del medio 7.0

Con el fin de cosechar un mayor número de células, el pre-inóculo se realizó

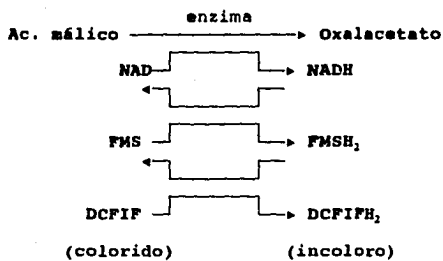
haciendo 6 resiembras y de ésta última se tomaron 30 ml para inocular. En este caso, para la determinación de actividad enzimática el rompimiento celular se realizó por:

- a) Homogeneizador.
- b) Mortero con perlas de vidrio.
- c) Sonicador.

El preinóculo se hizo con el fin de aumentar el número de células pero se observó que conforme aumentan las resiembras disminuye la concentración de éstas. Es probable que esto se deba a que la resiembra se hizo durante la fase de acostumbramiento lo que impide que el microorganismo se desarrolle normalmente, volviendo a reiniciarse esta fase en cada resiembra. Consecuentemente, ninguna muestra obtenida del fermentador a lo largo del experimento presentó actividad enzimática.

De nuevo se rectificó el método analítico para la actividad enzimática encontrando que el FMS se descompone por la oxidación del aire en 5 minutos aproximadamente, dando una coloración verde, resultado de la formación de semiquinonas. Esta coloración verde enmascara probablemente la actividad, sí es que existe, ya que la combinación del DCFIF (azul) y FMS (amarillo) da una tonalidad verde oscuro, pero el FMS descompuesto da una tonalidad semejante. Esto se concluyó al observar una tonalidad verde en soluciones de FMS a pesar de burbujear nitrógeno previamente para evitar la oxidación.

Intentando probar la validez del método usado para evaluar la actividad enzimática se probó la enzima comercial málico deshidrogenasa de acuerdo con la siguiente reacción (13):



La reacción se llevó a cabo en fracciones de segundo, comprobando así que la técnica es efectiva y procede mucho más rápido que la oxidación del FMS con oxígeno del aire.

**FIGURA 1: CURVA DE CRECIMIENTO:
Primera fermentación**

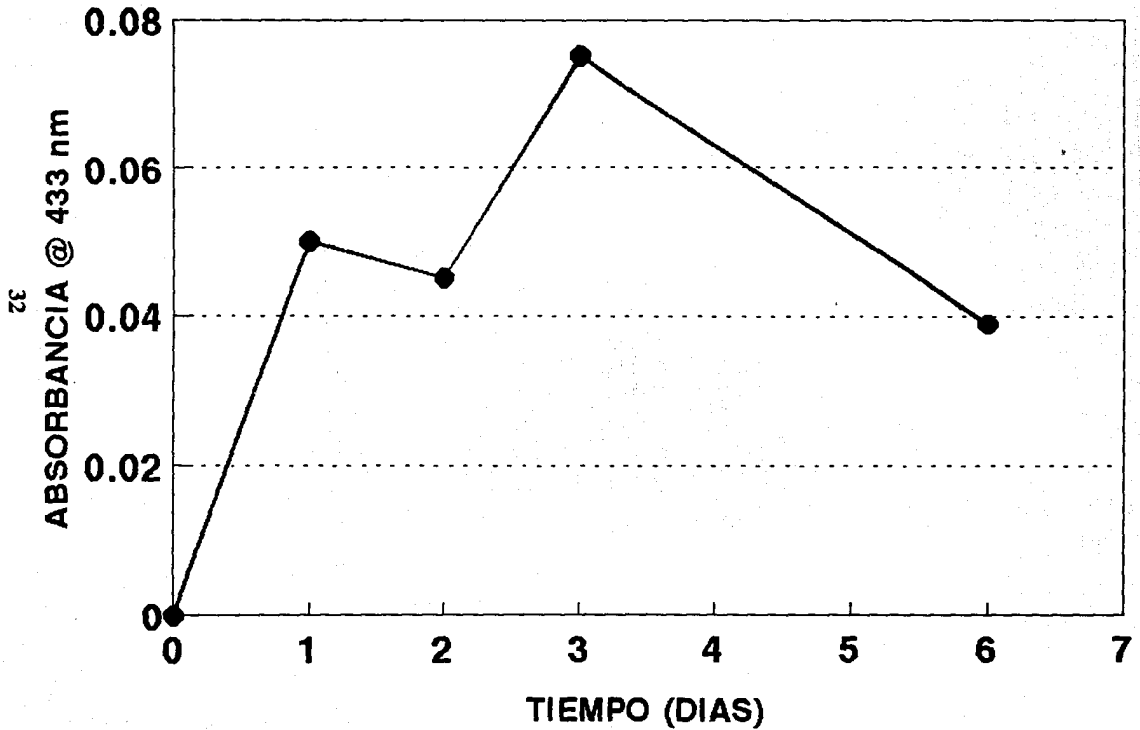
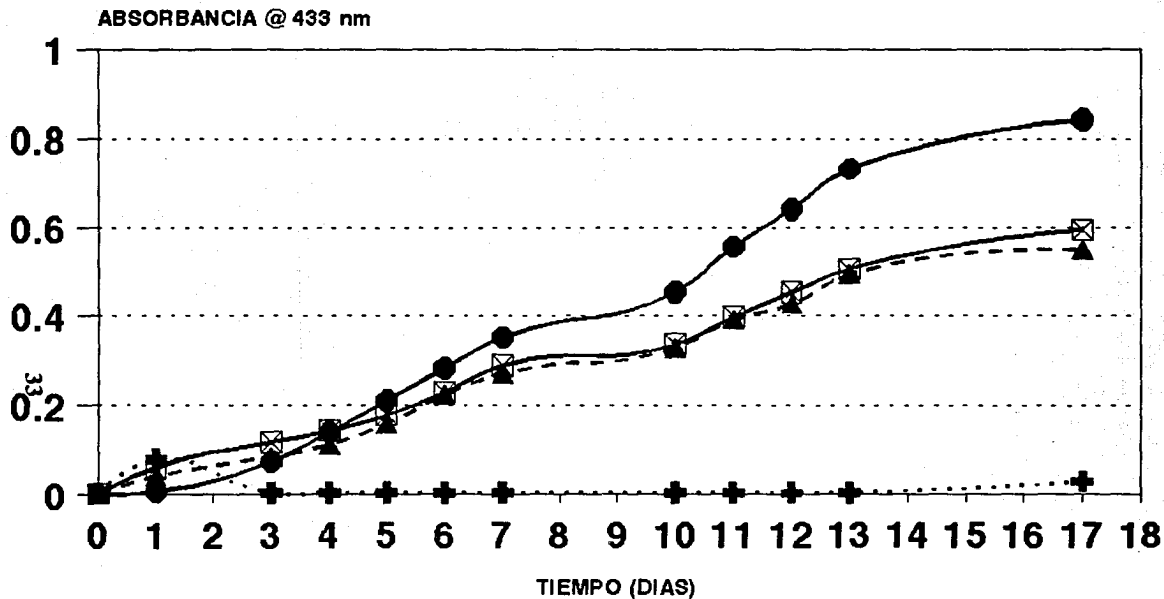


FIGURA 2: CURVA DE CRECIMIENTO

Segunda fermentación



+

▲

⊠

●

A1 (Kanamarú-azada)

B1 (Colby-azada)

A2 (Kanamarú-sólido)

B2 (Colby-sólido)

FIGURA 3. CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO

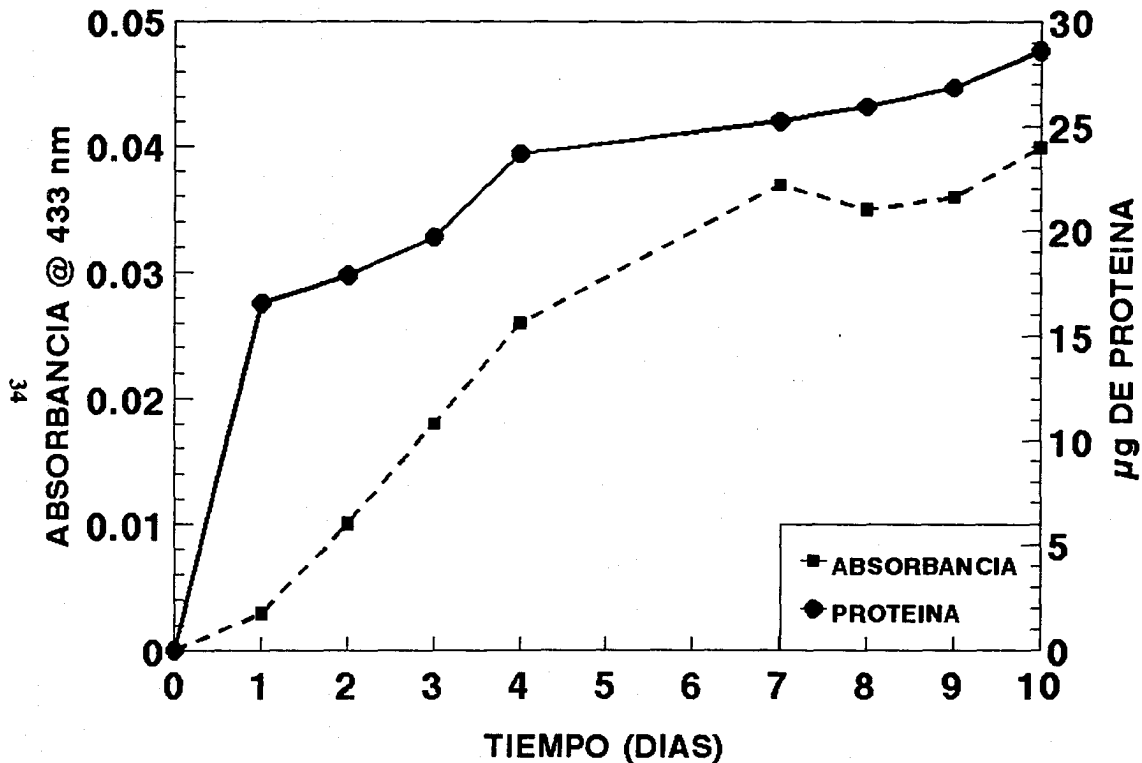


FIGURA 5. CINETICA DE CRECIMIENTO:
Hyphomicrobium methylovorum

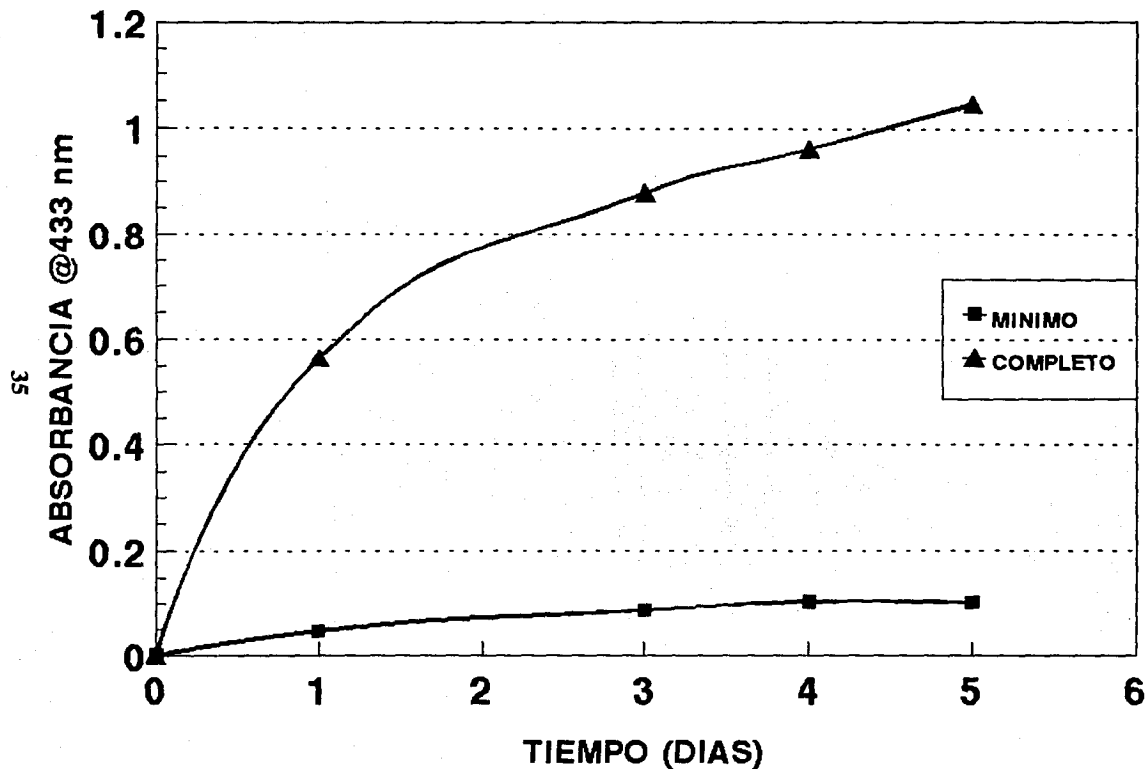
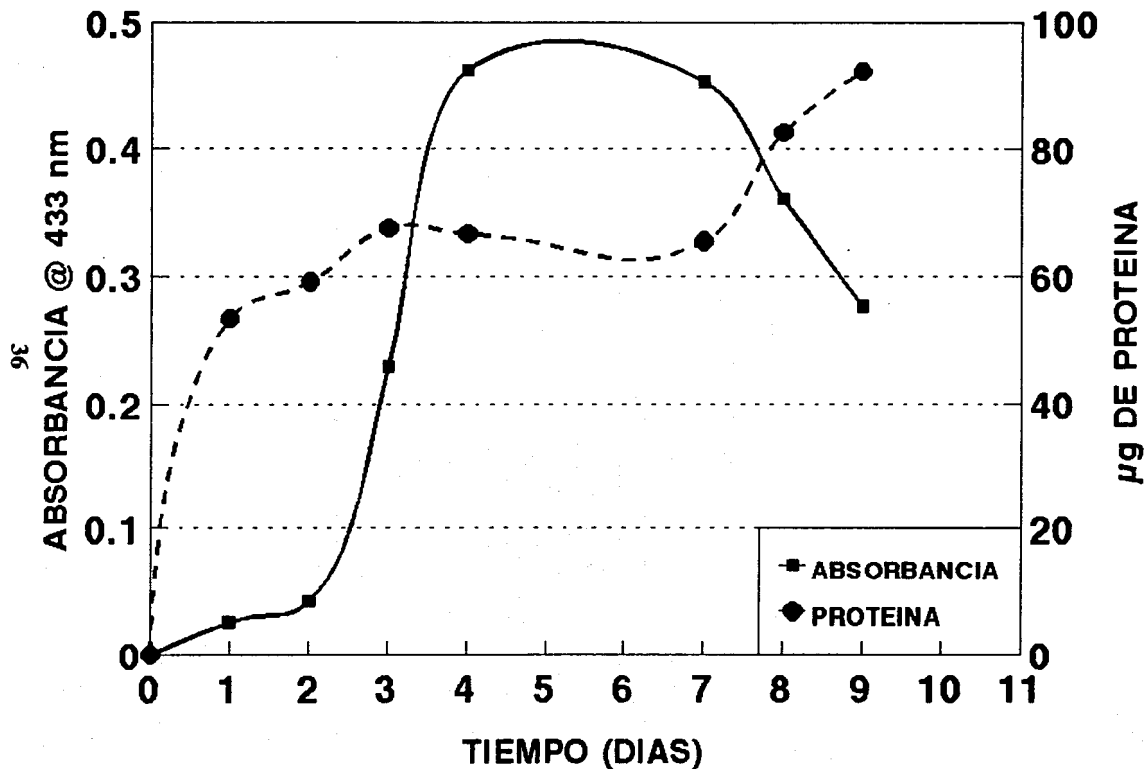


FIGURA 4. CRECIMIENTO EN MEDIO COMPLETO



V. CONCLUSIONES.

Los compuestos de un sólo carbón permiten el desarrollo de un grupo selecto de microorganismos llamados metilótrofos; entre ellos se encuentra el género *Hyphomicrobia* capaz de utilizarlos como única fuente de carbono y energía. Sin embargo se observó un crecimiento lento y escaso ya que es necesario un período de incubación de 5 a 7 días para lograr su máximo desarrollo.

Otros problemas complican el cultivo. Por ejemplo, algunas especies de este género como la *aestuarii* son inhibidas por la luz visible lo que hace más difícil su crecimiento. El fin con el que se desarrolló este género fue la obtención de la enzima trimetilamina deshidrogenasa.

Con base en esto, tanto el *Hyphomicrobium aestuarii* como el *methylovorum* fueron cultivados en un medio de sales minerales utilizando como única fuente de carbono trimetilamina.

Para que los microorganismos pudieran desarrollarse en este medio fue necesaria la inducción de enzimas degradadoras del sustrato. Sin embargo, estos microorganismos presentan dos vías metabólicas, dando la posibilidad de tomar la vía de las oxidasas permitiendo la degradación del sustrato y por consiguiente su desarrollo. Si fue ésta la vía, las técnicas para actividad enzimática fueron inadecuadas.

Por otra parte, la escasa concentración de células cosechadas podría dificultar su detección si es que hubieran tomado la vía de las deshidrogenasas y por esta razón la actividad enzimática resultaría no detectable con el método usado.

Recientemente otros autores purificaron la bacteria W3A1 (clasificada como *Methylophilus* pero no se ha reconocido legítimamente este género) encontrando que tiene un buen crecimiento en aminos metilados como fuente de carbono y produciendo trimetilamina deshidrogenasa como enzima degradadora (19). Esta bacteria se desarrolló en jarras de fermentación con capacidad de 12 litros con aereación constante, alcanzando una densidad óptica de 0.9 en 16 a 20 horas. El rendimiento fue de 20 a 22 g de células, lo que permitió aislar una concentración de enzima significativa para su estudio. A pesar de ajustar los cultivos a condiciones ambientales similares, las densidades microbianas obtenidas con las cepas de colección empleadas fueron sensiblemente menores.

Tomando en cuenta la cantidad de medio utilizado para el número de células cosechadas es posible que los microorganismos estudiados en el presente trabajo necesiten de una cantidad similar de medio para poder obtener una concentración de células que permita detectar actividad enzimática.

Con base en esto se podría determinar cual es su vía metabólica. Si utilizan la vía de las oxidasas se necesitaría encontrar los mecanismos para bloquearla y obligar a la bacteria a iniciar la vía de las deshidrogenasas o bien encontrar técnicas que permitan cuantificar sus productos de reacción ya sea por otros reactivos cromofóricos, por técnicas cromatográficas, o similares.

Por otro lado sí tomaran la vía de las deshidrogenasas sería mucho más sencilla su detección y se podría aislar una cantidad suficiente de ellas para caracterizarlas.

Otra opción son las levaduras y en particular algunos géneros como *Pichia*, *Hansenula* y *Candida* que pueden utilizar aminos metiladas como fuente de nitrógeno (12). Pero de igual manera se necesitaría encontrar un método de identificación que indique concentraciones de productos de reacción.

Las levaduras presentan condiciones más simples de crecimiento, son más readaptables que las bacterias, más se necesitaría estudiar cual es realmente su metabolismo para poder identificar el tipo de enzima que produce.

El camino más adecuado sería montar técnicas de fermentación con mayor capacidad para desarrollar las bacterias productoras de la enzima trimetilamino deshidrogenasa, por su capacidad de sintetizarla. Esto bajo la base que esta enzima es crucial para los fines de la línea de investigación a la cual pertenece este estudio.

Del presente estudio se desprenden las siguientes recomendaciones:

- 1- Montar técnicas de fermentación para mayor capacidad (Mínimo 12 litros).
- 2- Resembrar las cepas periódicamente para evitar su envejecimiento (máximo 1 mes).
- 3- Utilizar pre-inóculos con un período de incubación de 3 días.
- 4- Evaluar otras técnicas para determinación de crecimiento.
- 5- Rectificar la técnica para actividad enzimática de deshidrogenasa.

- 6- Comprobar las técnicas de rompimiento celular con observaciones microscópicas.**
- 7- Determinar TMA y DMA por cromatografía de gases para comprobar con el método analítico.**
- 8- Montar técnicas para determinación de actividad enzimática de oxidasas.**
- 9- Desarrollar la bacteria W3A1 (19), como fuente de trimetilamina deshidrogenasa.**
- 10- Desarrollar levaduras del género *Pichia*, *Hansenula*, o *Candida* en medio de TMA como fuente de enzimas específicas de este sustrato.**

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Anónimo, National Academy of Sciences Food Science in Developing Countries: A Selection of Unsolved Problems; p:63. National Research Council, Nat. Acad. Sci. Washington, D.C. (1974).
- (2) Aylward, F. and Jul, M., Protein and Nutrition Policy in Low-Income Countries. Charles Knight and Co. Londres.(1975).
- (3) Bardachy J.E. and Pariser, E.R., Aquatic proteins. En "Protein Resources and Technology", p:427-484. Editores, Milner, M; Scrimshaw, N; and Wang, D.I.C. The AVI Pub. Co. Westport Connecticut. (1978).
- (4) Bárzana, E.; Klibanov, A.M. y Karel, M., A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases: The determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidase. Anal.Biochem.182:109. (1989).
- (5) Birch, G.G.; Cameron A.G.; Spenser, M., Food Science, p:111 Pergamon Press, New York. (1978).
- (6) Castell, C.H.; Smith, B; Neal, W., Production of dimethylamine in muscle of several species of gold fish during frozen storage. J. Fish Res. Board Can; 28:1. (1971).
- (7) Colby and Zatman, L.J., The purification and properties of a bacterial trimethylamine dehydrogenase. Proceedings of the Biochem. Society 4, 9. (1971).
- (8) Colby and Zatman, L.J., Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. Biochem. 132, 101-112. (1973).
- (9) Colby, J and Zatman, L.J., Purification and properties of the trimethylamine dehydrogenase of Bacterium 4B6. Biochem.J. 143, 555-567. (1974).
- (10) Dawson, R.M.C; Elliott, D.C; Elliott, W.H; Jones, K:M., Data for Biochemical Research; 2da. Edición; Clarendon Press. Oxford. (1969).

- (11) Eger, G; Eden, G; Wissig, E., Pleurotus ostreatus. Breeding potential of a new cultivated mushroom. Theoret. Appl. Genet. 47: 155-63. (1976).
- (12) Haywood, W and Large, P.J., Microbial oxidation of amines. Biochem. J. 199, 187-201. (1981).
- (13) Irwin, H, Segel; Biochemical calculations. 2nd. Edition Edit. John Wiley and Sons; Inc. Pag 164. (1976).
- (14) Kanamarú, K; Hieda, T; Iwamaru, Y., Isolation and characterization of Hyphomicrobium sp and its polisaccharide formation from methanol. Agric. Biol. Chem. 46 (10) 2411-2417. (1982).
- (15) Large, P.J., Degradation of Organic Nitrogen Compounds by yeast vol 2: 1-34. (1986).
- (16) Large, P.J and McDougall, H. An Enzymatic method for the microestimation of trimethylamine. Analytical Biochem. 64, 304-310. (1975).
- (17) Lowry, O.H; Rosebrough, N.J; Farr, A. L. and Raudall, R. J., A protein assay method. J. Biol. Chem 193, 256-275. (1951).
- (18) Lundstrom, R. C and Frederick, F., Enzymatic dimethylamine and formaldehyde production in minced American Plaice and Blackback Founder mixed with a Red Hake TMA-ase Active fraction. J. Food Sci 47:1305.(1982).
- (19) McIntire, W.S., Thesis, Trimethylamine dehydrogenase from Bacterium W3A1. University of California, Berkeley. (1983).
- (20) McIntire W.S., Trimethylamine dehydrogenase from Bacterium W3A1. Methods in Enzymology (188):250-260. (1990).
- (21) Meiberg J.B; Bruinenberg, P.M; Harder, W., Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in Hyphomicrobium X in the absence and presence of nitrate: Evidence for "Aerobic" denitrification. J. Gen Microbiol. 120,453-463. (1980).

- (22) Meiberg J.B.M. and Harder, W., Aerobic and anaerobic metabolism of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in *Hyphomicrobium* X. J. Gen. Microbiol. 106:265. (1978).
- (23) Peterson; Gary, L. A Simplification of the protein assay method of Lowry et al, which is more generally applicable. Analytical Biochemistry. 83, 346-356. (1977).
- (24) Segal, I.H; "Enzyme Kinetics" p:170 Wiley, New York. (1975).
- (25) Singer, T.P and Kearney, E.B., in "Methods of Biochemical Analysis" (D.Glick, ed.) vol. 4, p:307 Wiley, New York. (1957).
- (26) Staby, J.T; Bryant, M.P; Pfenning, N; Holt, J.G.,. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. vol.3; Williams Wilkins, U.S.A. (1989).
- (27) Storey, R.M; Davis, H.K; Owen, O. and Moore, L., Rapid approximate estimation of volatile amines in fish; J. Food Technol. 19,1-10. (1984).
- (28) Tozawa, H; Enokihara, K; Amono, K., Proposed modification of Dyer's methods for trimethylamine determination in cod fish. In "Fish Inspection and Quality control", p:187. Fishing News (Books) LTD; London. (1971)
- (29) Wong, K; Bartlett, F; and Hil, T.A., A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. J. Food Sci. 53:1653. (1988).
- (30) Wong, K; and Hill, T.A., Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality. J. Food Sci. 52:1-6. (1978).
- (31) Zwart, K; Veenhuis, M; Van Dijken, J.P; Harder, W., Development of amine oxidase-containing peroxisomes in yeast during growth on glucose in the presence of methylamine as the sole source of nitrogen. Arch. Microbiol. 126, 117-126. (1980).