



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

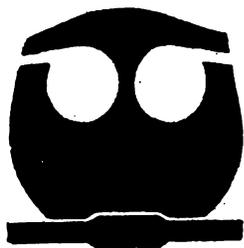
FACULTAD DE QUIMICA

**"CARACTERIZACION CINETICA DE LA
BIOTRANSFORMACION ETANOL:ACETALDEHIDO
EN FASE GAS"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS
(OPCION QUIMICA DE ALIMENTOS).**

**P R E S E N T A :
S A N D R A P E R E Z M U N G U I A**



CD. UNIVERSITARIA,

NOVIEMBRE DE 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A la UNAM

A CONACyT

Jurado Asignado

Presidente:	Dr. Alberto Tecante Coronel
Primer vocal:	Dr. Agustín López-Munguía
Secretario:	Dr. Edmundo Brito de la Fuente
Primer suplente	M. en C. Ma. de los Angeles Valdivia
Segundo suplente	M. en C. Mariano García Garibay

Lugar donde se desarrolló el tema:

Lab. 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,
UNAM.

Asesor del tema:



Dr. Eduardo Bárzana

Sustentante:



Q.F.B. Sandra Pérez Munguía

CONTENIDO

Lista de Tablas	i
Lista de Figuras	ii
INTRODUCCIÓN	iii
1 GENERALIDADES	1
1.1 Enzimología en medio no acuoso	1
1.1.1 Reacciones en fase gas	3
1.1.1.1 Perspectiva histórica	3
1.1.1.2 Ventajas potenciales de la biocatálisis sólido-gas	8
1.2 Bioquímica de las levaduras metilotróficas	10
1.2.1 Biogénesis de los peroxisomas	14
1.2.1.1 Regulación metabólica de la metanol oxidasa	14
1.2.2 Producción, purificación y caracterización de la metanol oxidasa	15
1.3 Mecanismos de inactivación enzimática	18
1.4 Aplicaciones de la metanol oxidasa y sus productos de reacción	20
1.5 Producción de acetaldehído	22
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVOS	26
2 MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Condiciones de cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	27
2.1.1 Microorganismo y conservación de la cepa	27
2.1.2 Preparación del inóculo	27
2.1.3 Producción y cuantificación de biomasa	27
2.2 Producción del biocatalizador	28
2.2.1 Preparación del soporte	28
2.2.2 Inmovilización celular	29
2.3 Determinación de la actividad enzimática	29
2.3.1 Actividad en fase acuosa	29
2.3.1.1 Curva de calibración	30
2.3.2 Actividad en fase gas	30
2.3.2.1 Hidratación del biocatalizador	30
2.3.2.2 Curva de calibración	31
2.3.3 Medición del color formado en el biocatalizador	32

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 Producción del biocatalizador	33
3.1.1 Producción de biomasa con actividad alcohol oxidasa	33
3.1.2 Inmovilización	35
3.1.2.1 Inmovilización celular por adsorción	35
3.1.2.2 Inmovilización por co-liofilización	35
3.2 Bioconversión del etanol a bajos contenidos de agua	35
3.3 Efecto de la disponibilidad de sustrato sobre la reacción en FG	47
3.4 Efecto de la adsorción de acetaldehído sobre la actividad en FG	49
3.5 Efecto de la hidrofiliidad del soporte sobre la actividad en FG	53
3.6 Producción del acetaldehído en función del A_w	56
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

Tabla 1.1	Estabilidad de la alcohol deshidrogenasa de levadura en MNC	7
Tabla 1.2	Propiedades moleculares de la metanol oxidasa	16
Tabla 1.3	Constantes de afinidad de la metanol oxidasa	21
Tabla 2.1	Propiedades fisicoquímicas de la amberlita IRA 402	28
Tabla 3.1	Actividad de la alcohol oxidasa a bajos contenidos de agua en función de la concentración de sustrato	40
Tabla 3.2	Velocidad relativa de la alcohol oxidasa en función del contenido de agua	44

Lista de figuras:	Página
Fig. 1.1 Metabolismo del metanol en <i>Pichia pastoris</i>	13
Fig. 3.1 Resolución cromatográfica de la mezcla gaseosa acetaldehído:etanol	37
Fig. 3.2 Bioconversión del etanol empleando células y enzima comercial inmovilizadas en amberlita	39
Fig. 3.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez inicial de la reacción en fase gas	41
Fig. 3.4 Cinética de adsorción de agua del biocatalizador en cámara sellada con vacío a 4°C y $A_w=0.97$	43
Fig. 3.5a Producción de acetaldehído a diferentes contenidos de agua	45
Fig. 3.5b Efecto del contenido de agua sobre la velocidad relativa en fase gas	45
Fig. 3.6 Cinética de reacción en condiciones de saturación y adición pulsada de sustrato en FG	48
Fig. 3.7 Efecto del tiempo de pre-incubación del biocatalizador con acetaldehído + O ₂ y su control con O ₂ , a temperatura ambiente	51
Fig. 3.8 Producción de acetaldehído empleando el soporte ImmobaSil-G	54
Fig. 3.9 Producción de acetaldehído en función de la actividad acuosa	57
Fig. 3.10 Evaluación del color generado en el biocatalizador en función de la actividad acuosa	58
Fig. 3.11 Resolución cromatográfica al término de la reacción en fase gas	61

Introducción

La consecuencia natural del conocimiento acerca de que las enzimas sean los catalizadores biológicos, fue restringir su actividad a medios acuosos. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que la cantidad de agua necesaria para que una enzima actúe es extremadamente baja, del orden de una monocapa o menor, por lo que las enzimas pueden ejercer su potencial catalítico en medios prácticamente libres de agua. Esta novedosa conceptualización ha sido probada en medios con sustratos disueltos en disolventes orgánicos, en fase gas y en fluidos supercríticos.

Particularmente, en las reacciones en fase gas se trabaja con la enzima o las células completas deshidratadas, las cuales se ponen en contacto con el sustrato gaseoso; el éxito del proceso radica en el control de la humedad relativa durante la biotransformación. Además, en comparación con los otros métodos no convencionales, presenta las ventajas intrínsecas como la ausencia total de disolventes y la eficiente recuperación de productos por condensación.

Si bien la catálisis enzimática en fase gas es un concepto relativamente novedoso, el desarrollo de esta línea de investigación ha permitido demostrar el papel del agua, evaluado como actividad acuosa, sobre la estabilidad y la actividad enzimática. El presente conocimiento que se tiene en cuanto a la caracterización cinética, la factibilidad técnica de implementarse a mayor escala, así como las particularidades que ofrece con respecto a los otros medios no convencionales, la hacen especialmente atractiva para que los subsecuentes estudios estén enfocados básicamente a cubrir tres áreas de interés biotecnológico: procesos de biorremediación, biotransformaciones y desarrollo de biosensores.

A la fecha, los estudios realizados se han centrado en demostrar la factibilidad de lograr biotransformaciones en fase gaseosa; además han servido

como modelo para intentar elucidar el mecanismo de reacción en ausencia de disolventes líquidos.

En estos sistemas se han empleado las enzimas alcohol oxidasa y alcohol deshidrogenasa para producir aldehídos quienes a su vez pueden ser empleados como precursores de aromas y fragancias; asimismo mediante lipasas se ha logrado la síntesis y modificación enzimática de ésteres en fase gas.

Un ejemplo con gran potencial es la producción de componentes del sabor, como el acetaldehído, generado mediante la alcohol oxidasa. El acetaldehído ocurre de manera natural principalmente en frutas y está asociado sensorialmente con la frescura del producto. Debido a que se encuentra en baja concentración y dada su alta presión de vapor, este aldehído puede perderse fácilmente por evaporación durante el procesamiento, siendo recomendable reconstituirlo posteriormente para mejorar la aceptación del producto final.

Pese a que el acetaldehído es un derivado petroquímico barato, para poder ser utilizado como aditivo en la industria alimentaria se requiere de un producto obtenido de fuentes o métodos naturales, elevando su costo significativamente. En este sentido la mayoría de los estudios sobre la producción de acetaldehído y el actual conocimiento que se tiene sobre los factores ambientales y bioquímicos que afectan los procesos de producción, se han llevado a cabo en medio acuoso empleando células enteras de levaduras metilotróficas.

La enzima clave en estas levaduras es la metanol oxidasa, enzima polimérica compleja que desempeña un importante papel en el metabolismo de compuestos de un sólo carbono en organismos eucariotes. *In vitro* es capaz de oxidar un número significativo de alcoholes a sus correspondientes aldehídos, por lo que también se le conoce como alcohol oxidasa.

Como alternativa a la producción convencional de este aldehído en medio acuoso propuesta en el presente trabajo, consiste en demostrar la biooxidación del etanol en fase gas empleando células enteras de levadura en lugar de trabajar con la alcohol oxidasa purificada.

El uso de células completas elimina la necesidad de ruptura celular y purificación enzimática, permite que la proteína trabaje en su entorno natural, y los cofactores necesarios para la catálisis están “co-inmovilizados” con la enzima. Este último es de particular interés en la oxidación de alcoholes de cadena corta por la alcohol oxidasa debido a que el FAD y la catalasa son necesarios para sostener la actividad enzimática por tiempos prolongados.

El potencial de las reacciones en fase gas en las que el biocatalizador está suspendido en un medio de vapor de agua y sustrato no ha sido estudiado más allá de probar la viabilidad de la transformación. Determinar el grado de hidratación sobre la máxima expresión biocatalítica, así como la influencia de los otros componentes del sistema resulta indispensable para buscar una alta conversión de sustrato y así sentar las bases para el desarrollo de nuevas tecnologías.

Generalidades

1.1 Enzimología en medio no acuoso

La perspectiva de uso y el espectro de acción de las enzimas aumentó considerablemente al descubrir que la actividad enzimática no está limitada a llevarse a cabo en medio acuoso. Tanto las enzimas como las células enteras pueden presentar actividad catalítica en sistemas muy alejados de ser simples soluciones diluidas, pudiendo ser la fracción mayoritaria una fase orgánica, una fase gas o un fluido a alta presión. Estos sistemas se conocen como medios no convencionales (MNC) (Halling, 1994).

El desarrollo de la biocatálisis en MNC se inició en el año de 1966 cuando aparece la primera publicación de una reacción catalizada en fase orgánica (Dastoli y col., 1966). Sin embargo, es hasta la década de los 80's cuando se estudian con mayor intensidad y se dan a conocer la mayoría de los trabajos relevantes.

Una de las publicaciones de mayor impacto biotecnológico fue el trabajo presentado por Zaks y Klivanov (1984), quienes demostraron que la catálisis puede ser llevada a cabo en un medio prácticamente desprovisto de agua a temperaturas significativamente altas (100°C). Para dar un ejemplo de su relevancia, en el periodo de 1985 a junio de 1997, este artículo ha sido referido en la literatura científica un total de 369 veces (Science Citation Index, CD-ROM database).

Los estudios básicos de la catálisis en MNC se han impulsado dado que numerosos compuestos orgánicos de alto valor agregado (farmacéuticas, agrícolas, etc.) son poco solubles en medio acuoso; muchas transformaciones hasta ahora imposibles de llevarse a cabo en fase acuosa como son las reacciones de esterificación (Svensson y col., 1994) y de intercambio de ésteres (Goderis y col.,

1987), se han podido realizar en medios prácticamente anhidros e incluso se ha modificado la especificidad enzimática (Zaks y Klivanov, 1986).

La elección del disolvente apropiado es uno de los factores críticos en la biocatálisis en fase orgánica, ya que algunos disolventes (polares) pueden inactivar a las enzimas a través de un proceso de desorción del agua que se encuentra fuertemente "ligada" a la proteína (Gorman y Dordick, 1992). Asimismo los productos de reacción polares tienden a permanecer muy próximos a la enzima, por lo que se podría favorecer la inhibición por producto, mientras que se puede promover la reacción si estos productos son hidrófobos.

La extensión del conocimiento de la catálisis en medio orgánico ha permitido el desarrollo de dos actividades biocatalíticas adicionales: las reacciones en fase gas (FG) y en fluidos supercríticos (FSC).

Una alternativa atractiva al uso de disolventes orgánicos son los fluidos supercríticos y aunque se conocen desde hace más de 100 años, sus propiedades disolventes se aplicaron originalmente a procesos de extracción y eventualmente como disolvente en reacciones químicas.

Randolph y col. (1985) y Hammond y col. (1985) fueron los primeros en publicar la factibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticas en FSC, trabajando específicamente con CO₂ debido a su compatibilidad con el material biológico, su disponibilidad, además de que no es tóxico ni inflamable.

1.1.1 Reacciones en fase gas

El desarrollo de esta línea de investigación ha permitido demostrar claramente el papel del agua, evaluada como actividad acuosa (a_w), sobre la estabilidad y la actividad enzimática. Al igual que en fase orgánica, se ha podido modificar la catálisis donde el agua no es favorable; ha sido relativamente simple implementar reacciones continuas y se ha propuesto como una poderosa herramienta analítica para la detección rápida y directa de vapores y gases dentro del campo de los biosensores. Algunos ejemplos y un breve desarrollo histórico ilustran a continuación sus aplicaciones potenciales.

1.1.1.1 Perspectiva histórica

El primer reporte de una reacción en fase gas fue presentado por Yagi y col. (1969), quienes demostraron que la conversión de p-hidrógeno a o-hidrógeno se podía llevar a cabo mediante la hidrogenasa de *Desulfovibrio desulfuricans* a temperatura ambiente. Diez años más tarde (Kimura y col., 1979) dieron a conocer la segunda publicación sobre la misma reacción en fase gas. Esta línea de investigación buscaba modelar sistemas enzimáticos donde el contenido de agua es mínimo, como en el caso de las membranas biológicas, es decir, donde está restringida la movilidad molecular. Bajo las mismas condiciones de trabajo, con una preparación enzimática más pura, llevaron a cabo también la reacción de intercambio de isótopos y la óxido-reducción reversible del citocromo C₃ aunque a velocidades significativamente menores con relación a la obtenida en fase acuosa.

Una línea de gran interés biotecnológico por su posible aplicación industrial, es la producción de epóxidos a partir de la oxidación de hidrocarburos insaturados, (de Bont y van Ginkel, 1983; Habets-Crützen y col., 1984 y Hou, 1984). Estas investigaciones que incluyeron la búsqueda y selección de cepas capaces de emplear alcanos y alquenos de bajo peso molecular como fuente de carbono, estaban sujetas a dos grandes problemas. El principal era la inhibición del

monooxigenasa involucrada en este proceso. La remoción del producto y la recirculación del sustrato se logró fácilmente llevando a cabo la reacción en un proceso continuo empleando un reactor tubular, siendo requisito indispensable la saturación de la fase gas con agua para evitar la inactivación enzimática (de Bont y van Ginkel, 1983).

Para reacciones similares, Hou (1984), al emplear un reactor tubular empacado con una pasta celular de *Methylosinus* sp. sobre perlas de vidrio, alcanzó un 2.7% de conversión después de 7 horas de reacción. La regeneración del cofactor fue lograda, acoplando la reacción a una deshidrogenasa y su sustrato correspondiente, y con esto mantuvo la reacción por tiempos más prolongados aunque a una velocidad menor.

Uno de los primeros intentos en donde se pretendía resaltar la importancia de la actividad acuosa para la actividad biocatalítica, fue el conducido por Hamstra y col. (1987). Desgraciadamente sus resultados fueron poco satisfactorios pues se presentaba una rápida caída de la actividad oxidativa de los alquenos al disminuir el a_w a un valor de 0.97.

Otros estudios en los que se han empleado células completas, tenían como objetivo la eliminación de productos tóxicos volátiles. Tal es el caso del tricloroetileno (carcinógeno), uno de los contaminantes frecuentemente detectado en aguas subterráneas. Este puede ser continuamente degradado en un reactor de columna por las células de *Methylocystis* sp. M inmovilizadas en alginatos (Uchiyama y col., 1992).

La alcohol deshidrogenasa y la alcohol oxidasa han sido empleadas frecuentemente en estudios de reacciones en fase gas por varios grupos de investigación. Estas enzimas catalizan reacciones de un solo paso de sustratos volátiles por lo que han sido consideradas como modelo de estudio para intentar comprender la interacción enzima-sustrato gaseoso.

La reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa esta controlada por la concentración del cofactor (NAD). Al acoplar la reducción de un aldehído a la oxidación de un alcohol, se ha regenerado el cofactor en un sistema continuo, de tal manera que las reacciones de óxido-reducción en fase gas han sido estables por un lapso de 25 horas a 60°C (Pulvin y col., 1986). Por su parte, la alcohol oxidasa representa una buena opción por su disponibilidad y porque se puede trabajar con las células enteras de *Pichia pastoris*, fuente del producto enzimático comercial. De hecho, en uno de los primeros estudios en fase gas publicados, se reporta la conversión de metanol a formaldehído utilizando células de levadura (Cedeño y Waissblut, 1978).

Sin embargo, no es sino hasta finales de la década de los 80's cuando se dan a conocer los estudios más completos de la catálisis en fase gas, determinantes en tres aspectos fundamentales de la enzimología no acuosa (Bárzana y col., 1987; 1989a; 1989b):

- 1) La importancia de la actividad acuosa en la actividad y estabilidad enzimática.
- 2) La aplicación de la reacción en fase gas como una poderosa herramienta analítica.
- 3) El conocimiento de la interacción Sustrato_{Gas}-Enzima.

Sus resultados además han servido de plataforma para llevar a cabo bioconversiones en procesos continuos (Lamare y Legoy, 1995a; Hwang y col., 1993a; Yang y Russell, 1996 a,1996b).

El efecto de la actividad acuosa en MNC ha sido cubierto por varios grupos de investigación (Klibanov, 1986; Goderis y col., 1987; Svensson y col., 1994; Lamare y Legoy, 1993). Sin embargo, Bárzana y col. (1989a) fueron los primeros en reportar el a_w como parámetro clave en la catálisis. Trabajando con una preparación pura de alcohol oxidasa inmovilizada no covalentemente encontraron

que al incrementar el a_w de 0.11 a 0.97, la velocidad de reacción prácticamente aumenta cuatro órdenes de magnitud, mientras que la termoestabilidad se ve afectada negativamente por un factor de cien.

Claramente el agua desempeña un doble papel en las reacciones enzimáticas; modificaciones en a_w generan efectos antagónicos sobre la actividad y la estabilidad enzimática. Si bien un incremento en a_w favorece la velocidad de reacción, la estabilidad bajo las mismas condiciones de hidratación disminuye al trabajar a temperaturas superiores (Bárzana y col., 1989a). En términos conceptuales la remoción del agua siempre promoverá la estabilidad de la enzima ya que la monocapa le confiere a la proteína mayor rigidez; por su parte, un aumento en la dinámica molecular resultante de una mayor hidratación puede promover conformaciones catalíticamente incorrectas, además de procesos químicos de inactivación a través de reacciones de hidrólisis, de desamidación ó β -eliminación. No obstante, hoy en día se acepta que es indispensable una mínima cantidad de agua para mantener la conformación proteínica catalíticamente activa.

El efecto de la actividad acuosa en la actividad y estabilidad de las enzimas está estrechamente relacionado con la curva de sorción del biocatalizador. En ciertos casos la caída de la actividad enzimática conforme se incrementa la actividad acuosa puede ser explicada por la aparición de "agua libre", es decir, al establecer un microambiente similar al que existe en medio acuoso; esto promueve la termodesnaturalización (Lamare y Legoy, 1995a).

Otros estudios cinéticos y modelos de actividad enzimática han confirmado que el grado de hidratación del biocatalizador no sólo afecta su actividad catalítica sino que puede incidir en el equilibrio termodinámico de la reacción. Las lipasas son un buen ejemplo de esto ya que han sido empleadas en reactores por lotes y continuos tanto en fase gas como en medio orgánico. Son capaces de catalizar reacciones de hidrólisis, alcoholólisis, de esterificación y de transesterificación en

función del contenido de agua (Parvaresh y col., 1992; Lamare y Legoy, 1995a; 1995b).

El grupo de trabajo de Russell en Estados Unidos (Yang y Russell, 1996a; 1996b) ha investigado y comparado la actividad de la alcohol deshidrogenasa de levadura (YADH) en fase gas vs otros medios incluidos el acuoso. Los resultados se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1

Estabilidad de la alcohol deshidrogenasa de levadura en MNC

Medio de reacción	$t_{1/2}$	Condiciones de Reacción (30°C)
Fase gas	16 días	Humedad optimizada
Disolvente orgánico	50 horas	Heptano, H ₂ O 0.25% (v/v)
Micelas Invertidas	2 horas	AOT/Ciclohexano, W ₀ =15
	5 min	AOT/Isooctano
Medio acuoso	30 min	pH 8.8

Este mismo grupo ha trabajado en el diseño de un reactor en donde la adsorción continua de agua por la YADH a diferentes temperaturas permite evaluar en cualquier momento el grado de humedad así como el contenido de agua (Yang y Russell, 1996b). Consideran además que la conversión de sustratos gaseosos es el sistema ideal para estudiar el papel de la hidratación sobre la estabilidad, actividad y especificidad enzimática.

1.1.1.2 Ventajas potenciales de la biocatálisis sólido-gas

A continuación se resumen algunas de las ventajas de las reacciones en fase gas con respecto a los sistemas convencionales:

- a) El método de inmovilización del biocatalizador no requiere ser muy complicado o incluso puede obviarse este paso. Es recomendable meramente si se logra incrementar el área superficial.
- b) La transferencia de masa en fase gas es más eficiente que en solución. La difusividad en fase gas es varios órdenes de magnitud superior que en medio acuoso, además de que muchos sustratos gaseosos (como el O_2) presentan baja solubilidad en agua que además, disminuye conforme se incrementa la temperatura.
- c) Productos tóxicos o inhibitorios volátiles pueden removerse continuamente.
- d) Se ha demostrado que el biocatalizador deshidratado o parcialmente hidratado es más resistente a la termoinactivación, lo que permite trabajar a temperaturas significativamente más altas, imprácticas en medios acuosos, con tres beneficios aparejados:
 - Incremento de la velocidad de reacción acorde con la ley de Arrhenius.
 - Disponibilidad de mayor número de sustratos en fase gas.
 - Se minimiza el problema de una posible contaminación microbiana.
- e) Al no existir una fase líquida que funcione como vehículo, se favorece la recuperación del producto y del biocatalizador. Los productos y sustratos residuales en fase gas pueden ser fácilmente separados y recuperados con alta pureza por un proceso de simple condensación fraccionada.

f) Cuantificación ó evaluación visual de los analitos presentes en fase gas, acoplando reacciones de oxidación a un cromóforo que al reducirse exhibe color, sin la necesidad de una pre-solubilización.

g) Si el agua esta limitada en el sistema de reacción, es posible favorecer reacciones reversas, es decir las reacciones de condensación sobre las de hidrólisis.

No obstante, el desarrollo de reactores sólido-gas debe de superar el problema del reducido número de sustratos volátiles disponibles. Si la catálisis se pudiera llevar a cabo a presiones reducidas, se alcanzaría la P_{vapor} de compuestos que a la presión atmosférica presentan un alto punto de ebullición (200-300°C), permitiendo así la transformación de compuestos de baja volatilidad (Lamare y Legoy, 1995a).

Si bien técnicamente se ha probado la factibilidad de las reacciones en fase gas, es importante profundizar en estudios sistemáticos que definan los fenómenos determinantes en estos sistemas y así aspirar a un mayor número de aplicaciones.

1.2 Bioquímica de las levaduras metilotróficas

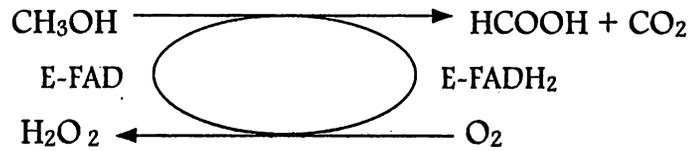
El estudio de los organismos metilotróficos ha sido estimulado al emplear el metanol como sustrato para la producción de proteína unicelular (PUC). Los procesos de fermentación de alta productividad se han desarrollado paralelamente al diseño de fermentadores de alta capacidad de transferencia de oxígeno y calor para que puedan ser empleados en procesos de gran escala. Por ejemplo Phillips Petroleum ha patentado varias cepas metilotróficas, principalmente levaduras, así como los procesos de fermentación más eficientes para la producción de PUC (75 ton PUC/año) y de la alcohol oxidasa (Klausner, 1984).

A finales de la década de los 60's, sólo se atribuía a los procariotes la capacidad de asimilar compuestos de un sólo carbono (C_1). Es hasta 1969 que se aísla el primer microorganismo eucariote capaz de utilizar al metanol como fuente de carbono y de energía (Ogata y col., 1969). Tres años más tarde, este mismo grupo de investigación dio a conocer un amplio estudio sobre la purificación y caracterización de la enzima responsable de la asimilación del metanol: la metanol oxidasa (EC.1.1.3.13) obtenida a partir de la levadura *Kloeckera* sp. No. 2201 (Tani y col., 1972a; 1972b).

A la fecha, se han reportado varios estudios sobre regulación metabólica de la metanol oxidasa y de los procesos para su purificación. Incluso el gen de la enzima ha sido clonado en otros organismos y elucidada su secuencia nucleótida. Sin embargo, todavía se desconocen varios aspectos bioquímicos, sobre todo lo concerniente a la topogénesis y cinética de las enzimas involucradas en el metabolismo de C_1 .

La asimilación del metanol difiere según la complejidad evolutiva del organismo, pues se sabe que en las bacterias la enzima principal es la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD que está asociada a la cadena respiratoria.

En las levaduras, la conversión de metanol a formaldehído es mediada por una flavoproteína, siendo el oxígeno molecular el último aceptor de electrones:



Al igual que otras oxidasas (glucosa oxidasa y ureato oxidasa) la metanol oxidasa muestra poca afinidad al O_2 *in vivo*; el valor de K_m (1-2 mM) reportado es dos órdenes de magnitud superior al de la alcohol deshidrogenasa, por lo que la velocidad oxidativa del metanol depende significativamente de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (van Dijken y col., 1982). Por su parte, la actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa en bacterias es independiente de la concentración de oxígeno disuelto, debido principalmente a la alta afinidad de la citocromo oxidasa por el O_2 . Lo anterior se ve reflejado en el rendimiento celular siendo el de los procariotes de aproximadamente el doble al obtenido con levaduras.

Cuando la levadura crece con metanol como única fuente de carbono desarrolla vesículas subcelulares a través del retículo endoplásmico conocidos como peroxisomas. Tres enzimas son esenciales para el metabolismo del metanol: la metanol oxidasa, la catalasa (compartimentalizadas en los peroxisomas) y la dihidroxiacetona sintetasa. De hecho, las mutantes que pierden la capacidad de expresar estas enzimas, son incapaces de crecer en medios con metanol (Giuseppin y col., 1988).

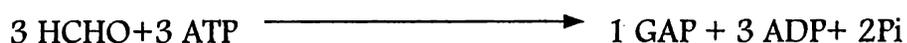
La metanol oxidasa está siempre asociada a la catalasa, que protege a las células de la acción nociva del peróxido de hidrógeno. El formaldehído generado en los peroxisomas es catabolizado a través de dos rutas metabólicas: por un lado es oxidado mediante las enzimas citosólicas y por otro la dihidroxiacetona sintetasa conduce a los constituyentes de los componentes celulares (van Dijken y col., 1982).

Todo el poder reductor necesario para la síntesis de ATP se obtiene extramitocondrialmente a expensas de la oxidación del formaldehído en el citoplasma mediante las enzimas formaldehído y formato deshidrogenasas, aunque se desconoce aún el mecanismo por el cual la mitocondria puede oxidar el NADH exógeno.

El metabolismo de compuestos de C₁ obedece por lo general a rutas cíclicas (Fig. 1.1). En el caso específico de las levaduras, la vía de la xilulosa monofosfato (también conocida como vía de la dihidroxiacetona), es la responsable de la asimilación. Inicia con la reacción de condensación de una molécula de xilulosa-5-fosfato (XMP) con una molécula de formaldehído para dar lugar a una molécula de gliceraldehído fosfato (GAP) y dihidroxiacetona.

La dihidroxiacetona es fosforilada por una triocinasa y subsecuentemente condensada con una molécula de GAP produciendo una molécula de fructosa-1,6-difosfato (FBP) que vía la acción de la FBPfosfatasa da lugar a la fructosa-6 fosfato. Dos moléculas de fructosa-6-fosfato y una de GAP reaccionan y producen mediante la acción de transaldolasa, transcetolasa, pentosafosfato isomerasa y epimerasa, tres moléculas de XMP reestableciéndose el ciclo y generando GAP, el corazón del metabolismo que va a dar origen a los constituyentes celulares.

El resultado neto se puede expresar como la siguiente reacción química:



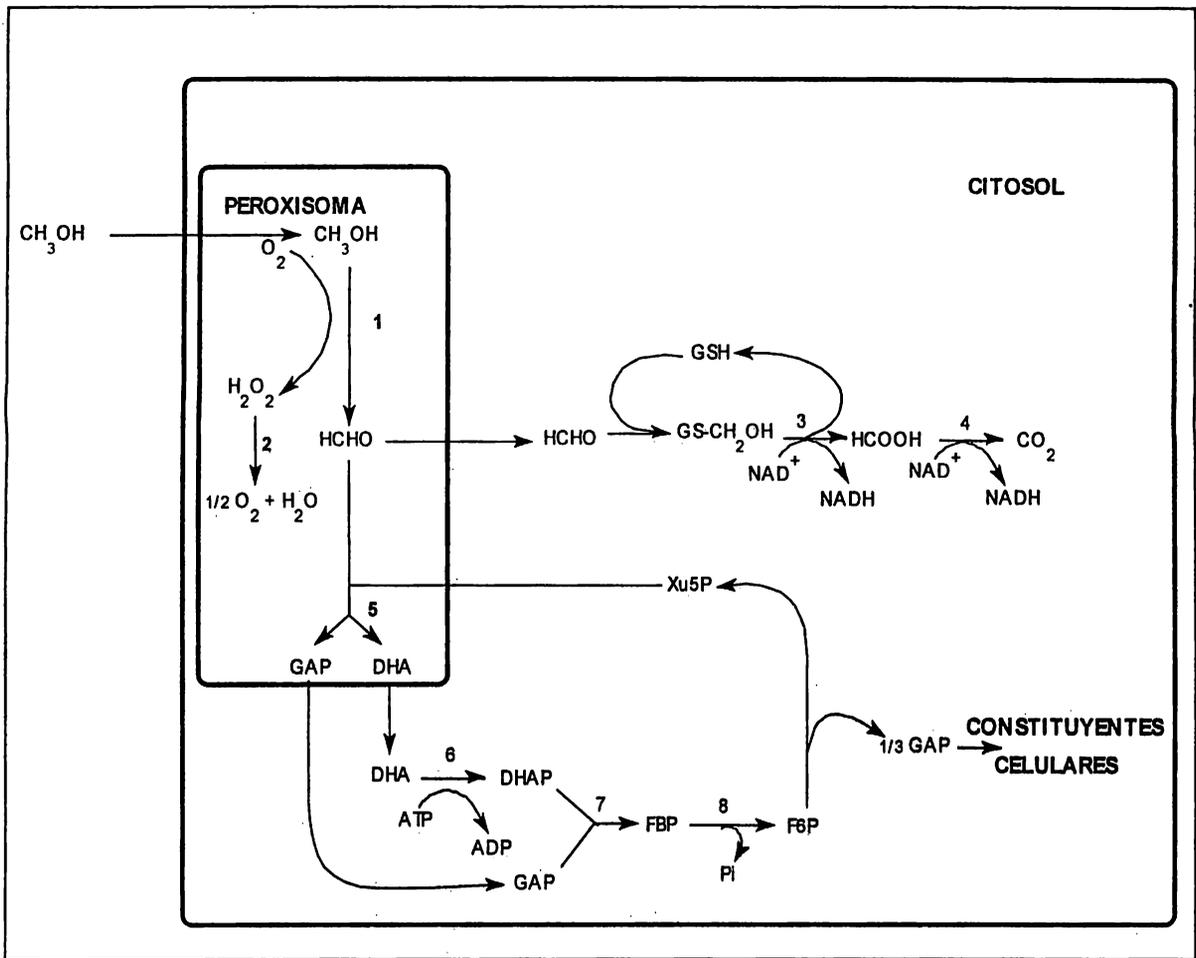


Fig. 1.1 Metabolismo del Metanol en *Pichia pastoris*. 1.Alcohol oxidasa; 2.Catalasa; 3.Formaldehído deshidrogenasa; 4.Formato deshidrogenasa; 5.Dihidroxiacetona sintetasa; 6.Dihidroxiacetona cinasa; 7.Fructosa 1,6-difosfato aldolasa; 8.Fructosa 1,6-difosfato fosfatasa.

1.2.1 Biogénesis de los peroxisomas

La biogénesis de los peroxisomas está regulada por la fuente de carbono mediante mecanismos de represión e inducción catabólica. La proliferación de estos corpusculos es compleja, el número y forma difieren de una cepa a otra y depende del estado metabólico de la célula. La biogénesis no es exclusiva de la asimilación del metanol, ya que se han detectado en cultivos de levaduras en medios conteniendo aminas alquiladas, alquenos o ácidos grasos como fuentes de carbono y nitrógeno (van Dijken y col., 1982).

La mayoría de los estudios sobre la producción de los peroxisomas se han llevado a cabo en *Hansenula polymorpha* y en *Candida boindinii*. Mediante pruebas citoquímicas se ha revelado que cultivos de levaduras en un medio con glucosa pueden contener un organelo por célula, localizado muy próximo a la pared celular; se caracteriza por ser unimembranal, presentar forma irregular y volumen reducido. Estudios *in vitro* indican que la membrana peroxisomal es porosa, por lo que es permeable a pequeñas moléculas solubles en agua (van Veldhoven y Mannaerts, 1994).

1.2.1.1 Regulación metabólica de la metanol oxidasa

Cuando las células se transfieren a un medio con metanol, el tamaño y número de peroxisomas se incrementa significativamente y aparece la formación de estructuras cristalinas en su matriz; de hecho la metanol oxidasa es una de las pocas proteínas peroxisomales que se presentan en forma cristalina. El número de peroxisomas se incrementa gradualmente mediante la separación de pequeñas vesículas del organelo maduro, de manera tal que esta enzima puede llegar a representar aproximadamente el 40% de la proteína total soluble (Müller y col., 1992).

El monómero de la alcohol oxidasa es transportado a los peroxisomas postraduccionalmente. De hecho, la proteína se importa del citoplasma en su forma madura a los peroxisomas preexistentes en donde se lleva a cabo el ensamblaje octamérico de las subunidades para construir la enzima catalíticamente activa (Roa y Blobel, 1983; Goodman y col., 1984; Müller y col., 1992).

Cuando las células de levadura se transfieren a un medio con glucosa o etanol como fuente de carbono, ocurre una rápida degradación de los peroxisomas en un proceso de dos etapas. Primero se lleva a cabo la inactivación de la metanol oxidasa y de la catalasa asociada a la pérdida de la estructura cristalina, seguido de una visible desintegración de los peroxisomas en donde intervienen activamente las proteasas vacuolares (Hill y col., 1985).

Paralelamente a la pérdida gradual de la actividad de la metanol oxidasa, se ha detectado una mezcla extracelular de flavinas siendo el flavín mononucleótido (FMN) su principal componente (Hill y col., 1985).

1.2.2 Producción, purificación y caracterización de la metanol oxidasa

Hasta el momento, cuatro géneros de levaduras metilotróficas han sido identificados: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* (*Kloeckera*) y *Torulopsis* (Klausner, 1984). El presente conocimiento indica que cada subunidad de la metanol oxidasa tiene un peso molecular de 70 a 80 kDa y está asociada no-covalentemente a una molécula de FAD responsable del color amarillo de las preparaciones puras, como se muestra en la tabla 1.2.

La purificación de la metanol oxidasa puede ser realizada en pocas etapas, que incluyen básicamente la obtención de un extracto libre de células, seguida de una precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel o algún otro método cromatográfico de separación.

Tabla 1.2

Propiedades moleculares de la metanol oxidasa

Fuente	Peso molecular (kDa)	No. Subunidades
Hongos		
<i>Polyporus</i> sp.	300	4
<i>Poria contigua</i>	610	8
Levaduras		
<i>Kloeckera</i> sp.2201	570-673	8
<i>Hansenula polymorpha</i>	616-669	8
<i>Candida boidinii</i>	600	8
<i>Candida</i> N16	210 y 600*	4 y 8*
<i>Candida</i> 25A	520	8
<i>Pichia pastoris</i>	675	8
<i>Pichia</i> sp.	300	4

*Se reportan ambos valores.

Tani y col. (1972a; 1972b) purificaron y caracterizaron la metanol oxidasa a partir de un cultivo de *Kloeckera* sp. Los pasos para la obtención de un extracto libre de células incluyeron: proceso de desintegración celular por medio de sonicación, centrifugación y diálisis. La purificación posterior de la enzima se logró mediante: precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía con DEAE-celulosa y SEPHADEX G-200, seguido de la cristalización de la enzima con sulfato de amonio. Bajo este mismo esquema de trabajo Sahm y Wagner (1973) lograron purificar 10.5 veces la alcohol oxidasa de *Candida boidinii* con un rendimiento del 35 por ciento.

Las condiciones de cultivo y el método usado para preparar el extracto libre de células son al parecer determinantes en el rendimiento de la metanol oxidasa. Se han realizado estudios en *Hansenula polymorpha* sobre la estabilidad de la

pared celular en medio de cultivo continuo. Los resultados indican que la resistencia de la pared celular a ser lisada depende de la composición química del medio de cultivo y de la velocidad de dilución (Müller y col., 1982).

En la producción de la metanol oxidasa a gran escala, la ruptura celular se logra a través de medios mecánicos ó con disolventes. Para incrementar la estabilidad de la enzima el proceso de lisado se lleva a cabo en presencia de azida de sodio ya que forma un complejo estable con la proteína. El extracto libre de células se obtiene por centrifugación, microfiltración o por sedimentación. El pH del sobrenadante se ajusta a un valor de 6.3 y se precipita la proteína por incremento de la fuerza iónica del medio. Bajo estas condiciones se obtiene un rendimiento de aproximadamente 80% con una pureza evaluada por electroforesis del 95 % (Müller y col.,1982).

La preparación enzimática es inestable a pH's ácidos y a altas temperaturas; por ejemplo, la actividad residual en medio acuoso es mínima a 60 °C (Tani y col., 1972b). El pH óptimo *in vitro* para la actividad y estabilidad catalítica se ubica en el intervalo de 6.5-9.0. Couderc y Baratti (1980) reportan 8.5 como pH óptimo de la enzima de *Hansenula polymorpha* y de 7.5 para la enzima de *Pichia pastoris* a 35°C.

1.3 Mecanismos de inactivación enzimática

Algunas publicaciones indican que el formaldehído y el peróxido de hidrógeno, productos de la oxidación del metanol, pueden participar en la inactivación de la enzima.

Los azúcares reductores, los compuestos carbonilo generados durante la reacción de Maillard, los aldehídos de cadena corta y larga y cetonas provenientes de la oxidación de los lípidos, son capaces de reaccionar reversiblemente con los grupos ϵ -amino libres de los residuos de lisina, formando bases de Schiff e incluso formar enlaces cruzados intra e intermoleculares, cuando los aldehídos que participan son bifuncionales (Wong, 1989).

Sin embargo, son pocos los estudios en donde se sugiere que la inactivación enzimática ocurra por reacciones de condensación cuando el producto o sustrato de la reacción es un aldehído. Si bien la pérdida de la actividad de la alcohol deshidrogenasa ha sido evaluada durante la biosíntesis de aldehídos (Yang y Russell, 1994), a la fecha no se ha reportado que la formación de bases de Schiff y su extensión hasta la producción de melanoidinas sea responsable de la inactivación de la metanol oxidasa.

Al parecer, en el caso de la metanol oxidasa, las reacciones de condensación entre la enzima y el formaldehído tienen un sentido fisiológico. Se ha demostrado, en preparaciones puras de metanol oxidasa de *Pichia pastoris*, que el 25% del total de los grupos ϵ -amino libres de lisina forman bases de Schiff (Müller y col., 1992).

La formación de las bases de Schiff puede explicar en parte la sobreproducción fisiológica de la alcohol oxidasa, ya que permite controlar la concentración del formaldehído. La oxidación posterior de este metabolito ocurre mediante la forma del complejo glutatión-formaldehído por lo que depende de la concentración del glutatión intracelular, que bajo condiciones fisiológicas es baja.

Por lo tanto, el formaldehído puede ser almacenado temporalmente unido a la proteína en espera de un ambiente más reductor.

El peróxido de hidrógeno, a su vez, puede participar en reacciones de inactivación por oxidación siendo los sulfhidrilos (SH) los grupos más vulnerables. Couderc y Baratti (1980) determinaron los SH de la metanol oxidasa de *Pichia pastoris*. En condiciones desnaturalizantes obtuvieron un valor de 64-SH/molécula. Después de exponer a la proteína desnaturalizada a una solución de peróxido de hidrógeno, este valor se redujo a 36. Este mismo grupo de investigación encontró que la proteína es sensible a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (10mM) y que la presencia de altas concentraciones de catalasa co-inmovilizada no garantizaba mantener la actividad por tiempos de reacción prolongados. Demostraron que la reacción se reactiva sólo si se pone en contacto a la enzima con un agente reductor como el β -mercaptoetanol.

Los resultados anteriores sugieren que existe al menos un grupo-SH esencial para la catálisis. *In vivo* la célula cuenta con dos mecanismos que minimizan el daño oxidativo del H_2O_2 : la presencia de la catalasa y la síntesis del glutatión que provee un medio reductor próximo a la enzima.

Para abatir completamente la actividad oxidativa es necesario modificar todos los grupos sulfhidrilo de la enzima nativa. Por su parte, compuestos organomercuriales como el p-cloromercuribenzoato y reactivos como el 5,5'-ditio(bis)-2-nitrobenzoato y iodoacetato son potentes inhibidores de la enzima por su acción directa sobre los grupos SH (Patel y col., 1981).

La enzima es inactivada también por los siguientes metales: Hg(II), Cu(II) y Ag(I) (Cromartie, 1981), mientras que ningún catión estimula su actividad (Tani y col., 1972b).

La metanol oxidasa de *Candida boidinii* contiene aproximadamente 20 residuos de histidina. Cuatro de éstos reaccionan con el dietilpirocarbonato inactivando completamente a la metanol oxidasa. Cromartie (1981) reportó que en presencia de inhibidores competitivos, el dietilpirocarbonato reacciona sólo con tres equivalentes de histidina de la enzima, lo que sugiere que uno es esencial para la catálisis. En resumen los residuos de cisteína e histidina parecen ser críticos para la expresión de la actividad alcohol oxidasa.

1.4 Aplicaciones de la alcohol oxidasa y sus productos de reacción

Recientemente la actividad biológica se ha empleado como una herramienta en análisis, básicamente en la detección de analitos en fase acuosa. La metanol oxidasa es capaz de oxidar a un número significativo de alcoholes (C₁-C₅) a sus correspondientes aldehídos, por lo que también se le conoce como alcohol oxidasa. El metanol es, sin embargo, el sustrato más afín a la enzima según se observa en la tabla 1.3.

La alcohol oxidasa se ha involucrado en un significativo número de aplicaciones que incluyen: La determinación colorimétrica de alcoholes en fluidos biológicos, determinación y producción de formaldehído empleado para la esterilización de material sensible al calor o a la radiación, producción de peróxido de hidrógeno utilizado en procesos de blanqueado y la remoción de O₂ en algunos procesos (Duff y Murray, 1988).

También se ha desarrollado un biosensor con la alcohol oxidasa co-inmovilizada con la α -quimotripsina utilizado para la detección de aspartamo (Chou, 1996).

Tabla 1.3

Constantes de afinidad de la metanol oxidasa

Fuente	Sustrato	K_m (mM)
<i>Candida boidinii</i>	Metanol	2.0
	Etanol	4.5
<i>Kloeckera</i> sp, No. 2201	Metanol	1.25
	Etanol	2.5
<i>Pichia</i> sp.	Metanol	0.5
	Formaldehído	3.5

Dentro de las aplicaciones potenciales e innovadoras surge una de interés industrial, la conversión enzimática de sustratos gaseosos, para la síntesis de precursores de aromas y fragancias y la producción y modificación de ésteres y aldehídos. En este sentido se ha reportado la producción de acetato de etilo en fase gaseosa a partir de etanol y ácido acético empleando la lipasa pancreática porcina a 25 °C (Hwang y Park, 1994).

Específicamente con las células de levaduras metilotróficas en estado latente, ricas en alcohol oxidasa se obtiene una gama de aldehídos cuando se exponen a un alcohol diferente del metanol. El primer producto de la oxidación se acumula y es excretado al medio debido a que la segunda enzima que participa en el metabolismo, la formaldehído deshidrogenasa, exhibe un alto grado de especificidad por el formaldehído como su sustrato.

Entre los aldehídos de interés comercial alimentario está el acetaldehído, importante producto en la industria química. Es intermediario en la síntesis de numerosos compuestos tales como: ácido acético, anhídrido acético, alcohol butílico, butiraldehído, piridinas etc., y se le atribuye la sensación de "frescura" en ciertas frutas. Dado que se encuentra en baja concentración y dada su alta volatilidad, este aldehído puede perderse fácilmente durante el procesamiento, por lo que se utiliza como aditivo en varios productos de la industria alimentaria

específicamente en la producción de jugo de naranja concentrado y congelado (Armstrong y Yamazaki, 1986).

Normalmente el acetaldehído es producido por síntesis química a través de la oxidación del alcohol etílico o del etileno, derivados del petróleo. Pero dada la preferencia actual de los consumidores por los productos naturales, la producción de acetaldehído "grado alimenticio" puede llevarse a cabo a partir de métodos biológicos (Armstrong y Yamazaki, 1986).

1.5 Producción de acetaldehído

La mayoría de los estudios sobre la producción biológica de acetaldehído y el actual conocimiento que se tiene sobre los factores ambientales y bioquímicos que afectan los procesos de producción, se han llevado a cabo en medio acuoso empleando células enteras de levadura.

Varias son las ventajas de llevar a cabo la biocatálisis con las células completas sobre la utilización de la enzima pura. El uso de las células completas elimina la necesidad de ruptura celular y purificación enzimática; la proteína trabaja en su entorno natural; todos los cofactores necesarios para la catálisis están "co-inmovilizados" con la enzima. Este último punto es de particular interés en la oxidación de alcoholes de cadena corta por la alcohol oxidasa debido que tanto el FAD y la catalasa son indispensables para sostener la actividad enzimática por tiempos prolongados (Couderc y Baratti, 1980; Duff y col., 1989).

Sin embargo, es importante reconocer el largo camino que tienen que recorrer tanto el etanol como el acetaldehído cuando se emplean las células de levadura (vs la enzima inmovilizada) por lo que en principio se esperaría que la difusión juegue un papel importante durante la catálisis (Duff y Murray, 1990). Bajo esta perspectiva, trabajar con las células lisadas podría afectar positivamente la producción del acetaldehído, aunque esta posibilidad ha sido poco explorada.

Couderc y Baratti (1980) detectaron un incremento en la actividad de metanol oxidasa en las células de *Hansenula polymorpha* inmovilizadas en alginatos (comparable a la obtenida con el extracto libre de células), cuando exponían el biocatalizador a un detergente catiónico (CTAB), ó cuando lo sometían a un periodo de incubación de 24 horas a 37 °C. La mayor actividad oxidativa fue debida a una parcial lisis ó autólisis (según sea el caso), de la membrana celular facilitando así la movilidad del sustrato y producto a través de ella.

En contraparte se ha demostrado que las células enteras de levadura extrudidas y secadas con un contenido de humedad del 10%, son capaces de catalizar la oxidación de alcoholes de bajo peso molecular en un medio acuoso, orgánico y en fase gas, sin que al parecer se presente alguna limitación difusional (Duff y Murray, 1990).

En fase gaseosa la mayoría de los estudios que se han realizado hasta ahora se pueden dividir en dos categorías. Aquellos en donde se ha comprobado que la catálisis en fase gas es factible tanto en un sistema por lote como continuo, y en menor proporción los trabajos enfocados básicamente a la producción de acetaldehído.

Bárzana y colaboradores (1989) trabajando con la enzima alcohol oxidasa pura, co-inmovilizada con la catalasa, demostraron que la producción de acetaldehído en FG sigue el comportamiento clásico de Michaelis y Menten, reportando una constante de afinidad dos órdenes de magnitud menor en fase gas con respecto a la obtenida en fase acuosa; además sugieren que la interacción del sustrato gaseoso con la enzima es directa, es decir, sin que sea requisito indispensable para la catálisis una previa adsorción del etanol al soporte.

A principios de esta década apareció el estudio mas completo de la reacción continua en fase gas empleando la enzima pura de alcohol oxidasa, en donde se establecen los parámetros operativos más importantes a controlar para obtener los

mejores rendimientos (Hwang y col., 1993; 1994). Por su parte, Kim y Rhee (1992) diseñaron un proceso continuo, partiendo con un contenido de agua menor del 8%, en donde la actividad oxidativa de las células de *Hansenula polymorpha* se logró mantener con un 100 % de bioconversión durante un mes a 35 °C.

Justificación

La biosíntesis de precursores de aromas y la modificación enzimática de ésteres y aldehídos en fase gas reviste especial interés en la industria alimentaria dada la preferencia actual de los consumidores por los llamados "productos naturales". En este sentido, la producción de acetaldehído se ha logrado llevar a cabo utilizando la alcohol oxidasa pura en reactores discontinuos y continuos.

Los estudios llevados a cabo en medio acuoso han demostrado que el emplear las células enteras o permeabilizadas con actividad alcohol oxidasa hace innecesaria la co-inmovilización del FAD y la catalasa. Sin embargo, a la fecha sólo hay un estudio enfocado a la producción continua de este aldehído empleando células de levadura, a bajos contenidos de agua.

A través de un estudio más sistemático en un reactor por lote, se pretende evidenciar los factores que afectan la bioconversión de etanol en fase gas.

Objetivos

Objetivo general

Determinar los eventos críticos que regulan la acción enzimática de células de *Pichia pastoris* en fase gaseosa.

Objetivos particulares

Producir un biocatalizador con las células enteras de *Pichia pastoris* para la producción de acetaldehído en fase gas.

Determinar el efecto del grado de hidratación del biocatalizador sobre la actividad y estabilidad de la alcohol oxidasa presente en la levadura.

Conocer la influencia de los componentes del sistema sobre la reacción, en particular el papel del soporte sobre el cual la enzima está dispersada.

Determinar las causas fundamentales que resultan en la inactivación de la enzima.

Materiales y Métodos

2.1 Condiciones de cultivo de *Pichia pastoris*

2.1.1 Microorganismo y conservación de la cepa

En este estudio se utilizó la cepa metilotrófica *Pichia pastoris* ATCC 28485, capaz de expresar la actividad alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13). La cepa se conservó de acuerdo a lo recomendado en la literatura, en medio sólido para levaduras agar YM (Lab.Difco; Detroit, USA) a 4°C, resemebrando periódicamente (Murray y col., 1990) y mediante liofilización de una suspensión celular en leche descremada al 10%.

2.1.2 Preparación del inóculo

El medio basal empleado para la producción del inóculo fue "base de nitrógeno para levadura" YNB (Lab.Difco; Detroit, USA), reconstituido en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH de 6.0, en matraces Erlenmeyer (con 3 deflectores) de 500 mL y un volumen de trabajo de 100 mL. El cultivo se mantuvo con agitación orbital a 120 r.p.m. en una cámara de incubación Innova 4330 (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison NJ, USA) a temperatura controlada de 30°C, durante 24 horas.

2.1.3 Producción y cuantificación de biomasa

Se utilizó un inóculo al 10% (v/v) bajo las mismas condiciones de trabajo incrementando solamente la agitación hasta 150 r.p.m. y 0.5% (v/v) de metanol como única fuente de carbono durante 36 horas. Al término de la fermentación se cosecharon las células por centrifugación a 11 300 g (Beckman Instruments, INC., Palo Alto, California, USA) durante 10 min a 4°C y se lavaron dos veces consecutivas con sol. amortiguadora estéril de fosfatos 0.1M, pH 7.5 y un tercer lavado con la misma sol. amortiguadora pero a una concentración 1mM.

La concentración celular se determinó midiendo la turbiedad a una longitud de onda de 610 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S UV-VIS. La lectura se correlacionó con la medición de peso seco; para lo cual se pasó un volumen conocido de suspensión celular a través de una membrana Millipore con poros de 0.45 μm de diámetro, previamente ajustadas a peso constante. La biomasa retenida en la membrana se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 1mM, pH 7.5 y se secó en estufa a 90°C.

2.2 Producción del biocatalizador

2.2.1 Preparación del soporte

Las células se inmovilizaron en la resina de intercambio aniónico tipo *gel* denominada Amberlita IRA 402 (Rohm & Haas Co., Philadelphia, USA), que presenta las siguientes características fisicoquímicas:

Tabla 2.1

Propiedades fisicoquímicas de la Amberlita IRA 402

Grupo funcional	Amina terciaria
Forma iónica	Cloruros
Temperatura	80 °C (Cl)
(Máxima)	60 °C (OH)
Capacidad	1.25 meq/ mL
	4.10 meq/ g

El soporte se lavó con KOH (10mM) y posteriormente con HCl (10mM) para eliminar contraiones e impurezas. Se ajustó el pH a 7.5 con sol. amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH de máxima actividad de la alcohol oxidasa, y posteriormente con la misma sol. amortiguadora a una concentración 100 veces menor; estas condiciones (fuerza iónica y pH) fueron las que se utilizaron para

preparar el biocatalizador y una concentración de la solución amortiguadora de 1mM como medio de reacción. Se decantó el excedente líquido, y las partículas se congelaron a -63 °C seguido de liofilización (Heto Lab Equipment, FD1.0 CT60e Dinamarca).

2.2.2 Inmovilización celular

El biocatalizador se preparó utilizando tanto las células de levadura como la enzima comercial. Una solución concentrada de células se puso en contacto con cierta cantidad de soporte de tal manera que se formara una pasta homogénea, la cual se congeló a -63 °C previo a su liofilización.

El mismo procedimiento se siguió para inmovilizar la enzima comercial, la cual fue adquirida de los laboratorios Moldowan (Philomath, Oregon, USA) con las siguientes especificaciones:

Actividad	1283 EU/mL
Concentración de proteína	67.0 mg/mL
Actividad específica	19.2 EU/mg

Esta enzima se encuentra en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0, 1mM que contiene 60% de sacarosa como estabilizante.

Una unidad de actividad enzimática, definida por el proveedor, corresponde a la cantidad de enzima necesaria para oxidar un mmol de metanol por minuto a 25°C y pH de 7.5.

2.3 Determinación de la actividad enzimática

2.3.1 Actividad en fase acuosa

La actividad de alcohol oxidasa se determinó cuantificando por cromatografía de gases el acetaldehído generado durante la biotransformación. Las

reacciones se llevaron a cabo en viales sellados para minimizar posibles pérdidas del producto. De cada muestra del biocatalizador se pesaron 0.1-0.3 gramos y se suspendieron en 1.3 mL de la sol. amortiguadora de reacción.

Para iniciar la reacción se agregaron 0.15 mL de etanol 50 mM y los valores de rapidez inicial fueron obtenidas a partir de la concentración del acetaldehído formado. Para ello se tomaron muestras cada 10 min y se inyectaron (1 μ L) a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 acoplado a un detector de ionización de flama (Hewlett-Packard, Avondale, CA, USA). Se utilizó una columna capilar con fase estacionaria: CP-Wax-52 CB (30 m x 0.25 mm D.I., 0.25 μ m) de Chrompack, Holanda y N₂ como gas acarreador.

Se operó a las siguientes temperaturas:

Temperatura del detector: 250°C

Temperatura del inyector: 170 °C

Temperatura del horno (isoterma): 90 °C

Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra.

2.3.1.1 Curva de calibración

Para valorar cuantitativamente el área obtenida en los cromatogramas de acetaldehído producido, fue necesario preparar una curva patrón del producto en un intervalo de 0-20 mM. Cada concentración de acetaldehído se preparó por triplicado en un cuarto frío para evitar su evaporación. La inyección de una misma muestra se hizo tres veces.

2.3.2 Actividad en fase gas

2.3.2.1 Hidratación del biocatalizador

Para llevar a cabo la reacción enzimática primero se procedió a hidratar el biocatalizador. Se emplearon las soluciones salinas saturadas necesarias para

ajustar la actividad acuosa deseada (Greenspan, 1977). En cada desecador se colocó una solución salina saturada y en un recipiente separado se ubicó, el biocatalizador seco en una pequeña cápsula de vidrio, previamente pesado (1.0000 ± 0.0030 g). Se aplicó vacío al desecador y se almacenó a 4°C .

Una vez alcanzado el equilibrio en la hidratación, el catalizador fue transferido rápidamente a un matraz bola con boca esmerilada acoplado a una llave de paso sellada con un septum, evitando al máximo cualquier fuga. El matraz se equilibró a temperatura ambiente, condición a la cual se llevó a cabo la reacción.

Para iniciar la reacción en fase gas el etanol se depositó en un pequeño tubo colocado dentro del matraz, de manera que sólo los vapores del sustrato tuvieron acceso al biocatalizador hidratado. Se tomaron muestras (100 μL) del espacio de cabeza a diferentes tiempos, las cuales fueron directamente inyectadas al cromatógrafo empleando jeringas gas-tight (Precision Sampling Co., Baton Rouge, LA, USA). El volumen final inyectado al cromatógrafo correspondió al 10% del volumen total de reacción (10 mL).

2.3.2.2 Curva de calibración

Conociendo el volumen de reacción se tomó una alícuota de acetaldehído y se colocó en el matraz bola, evitando al máximo cualquier fuga, y se inyectaron por triplicado diferentes volúmenes de vapor de acetaldehído al cromatógrafo. La curva patrón abarcó el intervalo de 0-350 nmoles.

2.3.3 Medición del color formado en el biocatalizador

El espectro de reflectancia de muestras sólidas o difusas da información concerniente a su color, para lo cual, se necesita coleccionar la luz dispersa por la muestra mediante un banco óptico que pueda acoplarse al detector de un espectrofotómetro (Caux, 1980).

Para la evaluación del color generado durante la producción de acetaldehído en función del a_w , se utilizó la esfera de integración Labsphere RSA-PE-20 (Inc. North Sutton, NH, USA). La línea base a 100% de reflectancia en la región visible se ajustó con el biocatalizador a base de ImmoBaSil G (Ashby Scientific Ltd., UK) y se determinó el espectro de cada muestra, previamente seca con una corriente de N_2 , correspondiente a las 6 horas de reacción en fase gas.

Resultados y Discusión

3.1 Producción del biocatalizador

3.1.1 Producción de biomasa con actividad alcohol oxidasa

La preparación y caracterización del biocatalizador abarcó varias etapas iniciando con la producción de biomasa. El inóculo de la fermentación se preparó en medio líquido, conteniendo metanol como única fuente de carbono, esto con el objeto de inducir la producción de los peroxisomas y por ende de la enzima alcohol oxidasa.

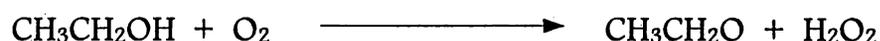
El medio YNB aporta todos los nutrientes necesarios a excepción de la fuente de carbono la cual se selecciona y adiciona por separado a una concentración final de 0.5 % (v/v) bajo condiciones estériles; según se requiera producir biomasa con actividad enzimática en la que se empleó metanol ó para la conservación de la cepa adicionando glucosa al medio.

El medio basal contiene los aminoácidos y vitaminas esenciales para el desarrollo óptimo de la levadura, por lo que es sensible a la temperatura. Se recomienda esterilizar una solución 10 veces más concentrada por filtración ó utilizar un tratamiento térmico moderado. Bastan 5 minutos a 121°C para garantizar inocuidad con un buen desarrollo de la levadura. Es indispensable adicionar por separado la fuente de carbono dada la volatilidad del metanol y para evitar el oscurecimiento del medio y la subsecuente pérdida de nutrientes cuando se emplea glucosa.

Bajo estas condiciones de trabajo se obtuvieron altas concentraciones celulares en un lapso corto de tiempo, ya que en sólo 36 horas de fermentación con metanol como sustrato, se alcanzó una concentración celular promedio medida como turbiedad a 610 nm de 6.9. Este valor correspondió a una

concentración de biomasa de 1.94 g/L y un rendimiento $Y^x/s=0.49$. Si bien la concentración de biomasa es comparable a lo reportado en la literatura (1.80 g/L), no fue el caso del rendimiento obtenido siendo el doble de lo reportado por Duff y Murray (1988).

La alcohol oxidasa está presente en los peroxisomas de cultivos aerobios de *Pichia pastoris*, cuando utiliza metanol como única fuente de carbono. Como se mencionó previamente, esta levadura es capaz de oxidar al etanol produciendo acetaldehído y peróxido de hidrógeno:



Es evidente que la oxidación continua está condicionada a la remoción del peróxido de hidrógeno para reducir su efecto inactivador (Bárzana y col., 1989a; Couderc y Baratti, 1980). Como se señaló previamente el emplear las células enteras de levadura trae consigo las siguientes ventajas:

- a) No se requiere co-inmovilizar a la catalasa que funciona como degradadora del peróxido de hidrógeno.
- b) La habilidad de regenerar el cofactor (FAD) *in situ*. En el perfil espectral característico de la alcohol oxidasa se aprecian dos máximos de absorción a 373 y 461 nm, debido a la presencia de FAD. La adición de metanol a la enzima bajo condiciones anaerobias produce una disminución en la absorción a 461 nm, la cual se logra restablecer al burbujear O_2 al medio de reacción (Tani y col., 1972b).
- c) Se ha comprobado que la enzima presenta una mayor estabilidad al estar presente en las células en comparación con las enzimas purificadas (Kim y Rhee, 1992).

3.1.2 Inmovilización

3.1.2.1 Inmovilización celular por adsorción

Se decidió trabajar con las células inmovilizadas en lugar de las células aglomeradas, ya que de ésta manera se mejora la transferencia de masa y se maximiza la actividad debido a un incremento del área superficial (Halling, 1994).

Durante la etapa de inmovilización, la adsorción de las células en la amberlita fue la opción más sencilla a partir de una suspensión concentrada de biomasa. Inicialmente se pretendió evaluar la cantidad de células adheridas al soporte por monitoreo del decremento de la turbiedad del medio. El contacto soporte-células se mantuvo 12 horas a bajas temperaturas y con una agitación orbital de 120 r.p.m. Transcurrido el tiempo anterior, no se logró apreciar una disminución significativa de la turbiedad, por lo que se drenó el exceso líquido, el soporte se congeló y seco por liofilización, sin embargo, se desconocía la concentración celular adherida al soporte.

3.1.2.2 Inmovilización celular por co-liofilización

Por lo anterior y para conocer la concentración de células inmovilizadas se optó por poner en contacto una determinada cantidad de soporte seco con pequeños volúmenes de una suspensión celular de concentración conocida formando una pasta homogénea, la cual se secó por liofilización y se almacenó a bajas temperaturas hasta su uso en viales herméticamente cerrados.

Se decidió evaluar la actividad enzimática en fase acuosa, para determinar si el procedimiento experimental empleado hasta el momento no repercutía negativamente en la actividad enzimática y en la selección de las condiciones cromatográficas de trabajo, ya que la caracterización y posterior optimización de la producción de acetaldehído se llevó a cabo monitoreando el espacio de cabeza del reactor, *headspace*.

Los cromatogramas de las curvas de calibración y los obtenidos durante la reacción muestran los mismos picos cromatográficos, simétricos y con una buena resolución. En la figura 3.1 se muestra el cromatograma de la mezcla acetaldehído:etanol, el aldehído eluye primero. Se monitoreó fácilmente la reacción debido a los cortos tiempos de retención de la mezcla acetaldehído:etanol (3.3 : 3.7 min respectivamente) y a la alta sensibilidad del equipo, ya que se logró detectar cantidades en el orden de nmoles de producto.

El biocatalizador obtenido por co-liofilización presentó un buen nivel de actividad en fase acuosa (se alcanzó 35% de bioconversión en una hora de reacción a temperatura ambiente), sugiriendo que no era necesario permeabilizar las células.

3.2 Bioconversión del etanol a bajos contenidos de agua

Antes de iniciar la reacción en fase gas se llevó a cabo la hidratación del biocatalizador a bajas temperaturas (4°C) para evitar la termoinactivación, se colocó aproximadamente un gramo de biocatalizador seco, diseminado dentro de un desecador, lo más homogéneamente posible en una pequeña cápsula de vidrio. En los primeros ensayos de reacción se decidió trabajar con una humedad relativa alta ($a_w = 0.97$) generada con una solución saturada de K_2SO_4 ; se aplicó vacío para acelerar la difusión de las moléculas de agua del reservorio al biocatalizador y con esto disminuir el tiempo de hidratación, ya que la cinética de adsorción de agua no es favorecida a bajas temperaturas.

Transcurrido este tiempo y antes de iniciar la reacción se dejó equilibrar el biocatalizador aún dentro del desecador a la temperatura ambiente. Alcanzado esto, se transvasó rápidamente al matraz de reacción. Se trabajó inicialmente con 200 μ L de una solución de etanol 300 mM y se detectó la producción de acetaldehído. Se emplearon dos concentraciones diferentes de células adheridas a la resina y se inmovilizó para fines comparativos la enzima comercial.

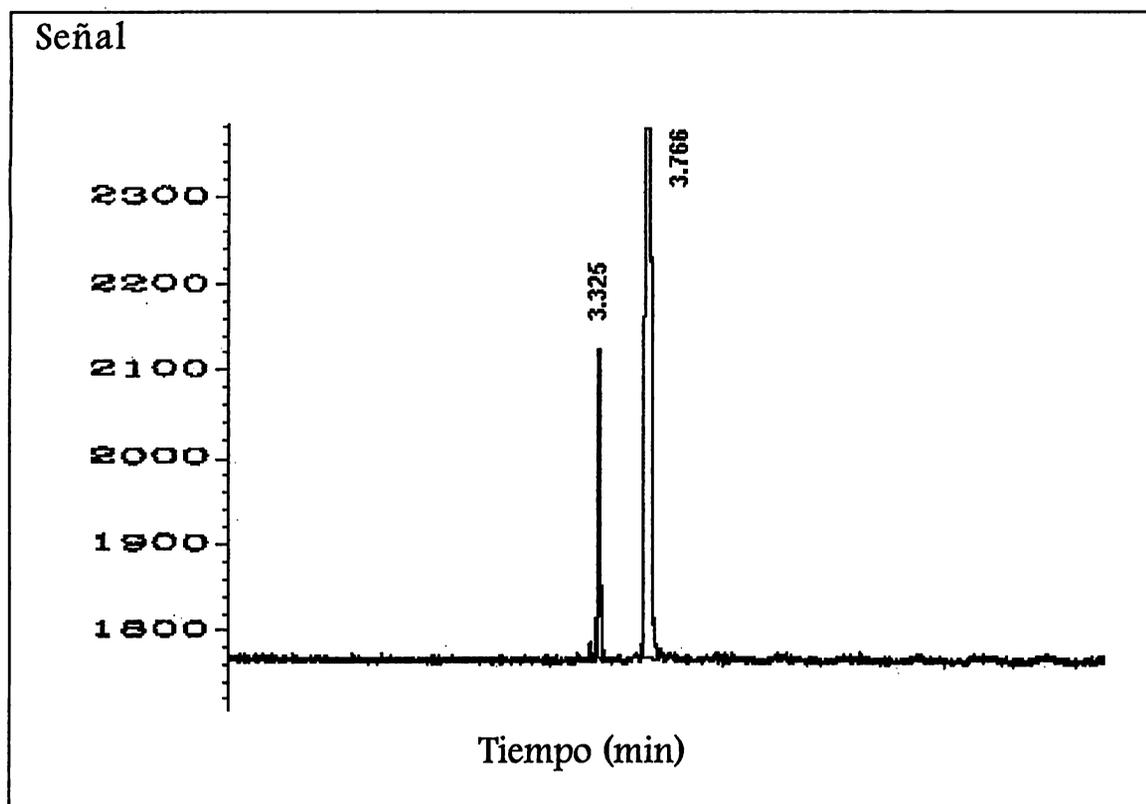


Fig 3.1 Resolución cromatográfica de la mezcla gaseosa acetaldehído:etanol.

Cromatógrafo Hewlett-Packard 5890-II, detector de ionización de flama.,
columna: CP-Wax-52CB. $T_{\text{horno}}=90^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{detector}}=250^{\circ}\text{C}$ y $T_{\text{inyector}}=170^{\circ}\text{C}$.
Gas acarreador: N_2 . Inyección por *headspace* de $100\ \mu\text{L}$ muestra.
 $t_{\text{r acetaldehído}}=3.3\ \text{min}$, $t_{\text{r etanol}}=3.7\ \text{min}$.

En estos primeros intentos de llevar a cabo la reacción a bajos contenidos de agua se apreció claramente que, a diferencia del biocatalizador preparado con la enzima comercial, en los primeros tiempos de reacción la producción del acetaldehído no fue constante, sino que siguió un comportamiento sigmoideal. Asimismo no se observó una producción significativamente mayor de acetaldehído al incrementar la concentración celular como se muestra en la Figura 3.2. También, se comprobó que una fracción de acetaldehído producido se disolvía en la solución de sustrato, al inyectar al cromatógrafo de gases una alícuota (1 μ L) del volumen residual del sustrato después de 6 horas de reacción.

Se repitió el experimento de co-lifilización, con diferentes concentraciones de suspensión celular, de manera tal que se obtuviera la mayor adhesión celular sin que se desprendieran las células al transvasarlas de un recipiente a otro. De varias preparaciones se obtuvo que la máxima concentración celular retenida al soporte fue de 3.18 mg/mL que correspondió a 11.95 mg de células/g de biocatalizador.

Se utilizaron pequeños volúmenes (0.3 a 4.5 μ L) de etanol de alta pureza concentrado con el fin de incrementar la velocidad de reacción y minimizar la solubilización del acetaldehído producido en el sustrato.

En la figura 3.3 se muestra el efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez inicial de reacción, determinada a partir de la cantidad de acetaldehído detectado en el espacio de cabeza del reactor a cortos tiempo de reacción. Después de 6 horas de monitoreo de la reacción no se obtuvo un grado de bioconversión significativo, a pesar de que el sustrato continuó disminuyendo, se determinó que ocurría la adsorción del etanol al biocatalizador sin ser biotransformado. Esto último fue comprobado al poner en contacto el soporte sin células prehidratado al mismo contenido de agua y registrando la reducción del área del etanol en el

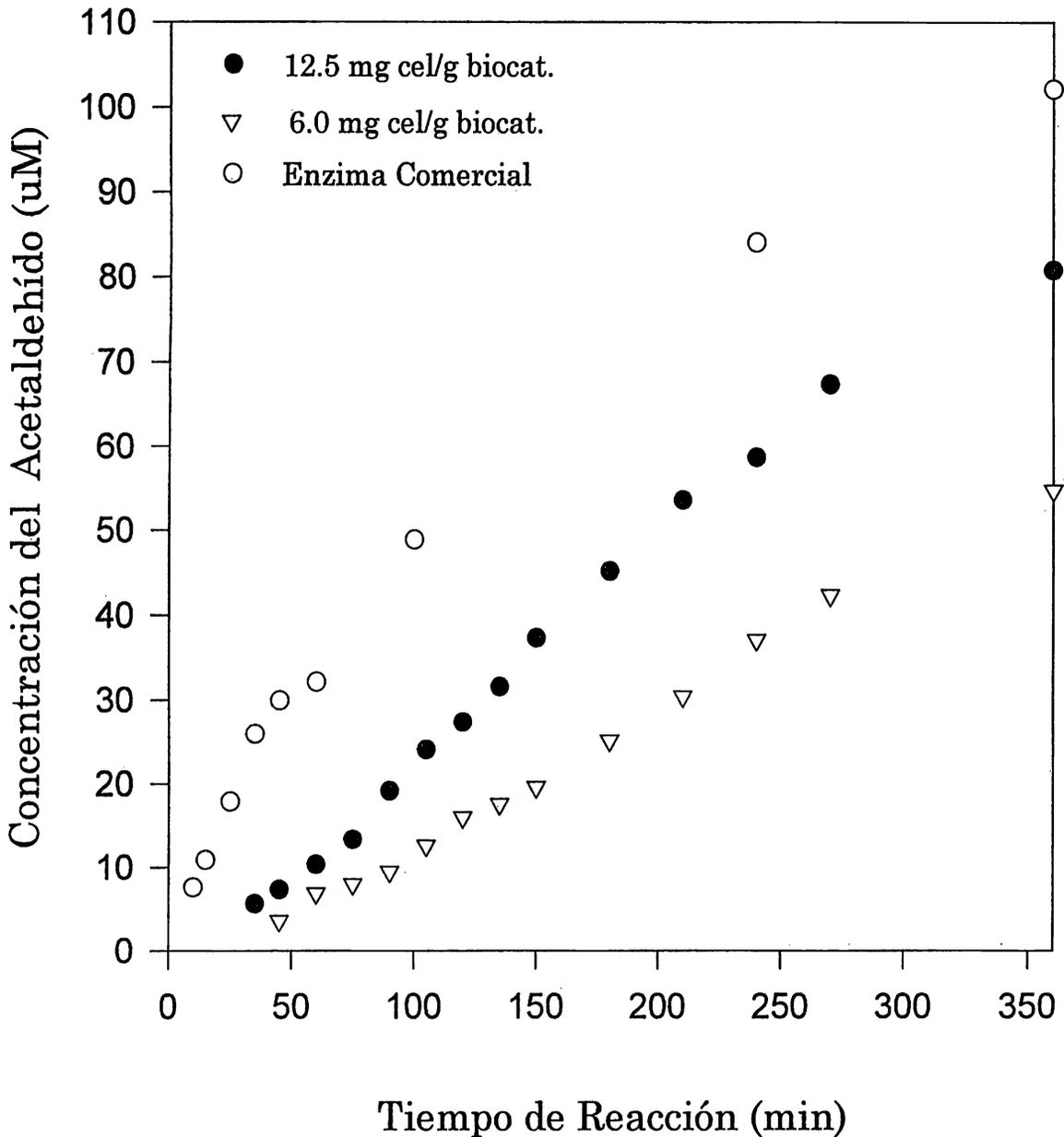


Fig. 3.2 Bioconversión del etanol empleando células y enzima comercial inmovilizadas en amberlita

El biocatalizador con la enzima comercial se preparó a partir de una concentración de 67mg proteína/mL, que equivale a 182.2 U/g de soporte. Tiempo de hidratación 18 h (4°C, bajo vacío).

espacio de cabeza del reactor. Esto sugería que parte del sustrato se volvía no disponible para la catálisis.

Bajo estas condiciones de reacción todo el etanol se evapora, por lo que nunca se alcanza el equilibrio etanol_{liq/gas}. Por lo anterior se calculó la concentración inicial de sustrato al dividir el volumen de etanol agregado entre el volumen total de reacción (10 mL). Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1

Actividad alcohol oxidasa a bajos contenidos de agua en función de la concentración de sustrato.

Etanol (total) mM	Velocidad inicial $\mu\text{M}/\text{min}$	Producción $\mu\text{M}/\text{h}$	Conversión %
0.5	0.13	3.96	4.76
1.0	0.20	6.20	3.72
2.0	0.23	9.50	2.85
5.0	0.30	12.90	1.29
7.5	0.30	13.54	0.96

De los datos de la tabla anterior y a partir de la linearización de Lineweaver-Burk se obtuvo un valor de V_{max} de $0.34 \mu\text{M}/\text{min}$ y un $K_{\text{m gas}}$ de 0.78 mM . Este último valor es del mismo orden de magnitud con lo reportado en la literatura, tanto en sistema por lote ($a_w = 0.53$) en donde se empleó la enzima comercial de *Pichia pastoris* inmovilizada en DEAE-celulosa y se obtuvo un valor de $K_{\text{m gas}}$ 0.13 mM (Bárzana y col., 1989a); como en un reactor continuo empacado con células inmovilizadas de *H. polymorpha* en el que reportan un valor de $K_{\text{m gas}}$ 0.24 mM (Kim y Rhee, 1992). Estos valores de K_{m} deben ser considerados como "pseudoconstantes" debido a la competencia por el sustrato que presenta la adsorción mencionada. Claramente las diferencias de K_{m} obtenidos son achacables a las variaciones en adsorción de etanol para los sistemas empleados.

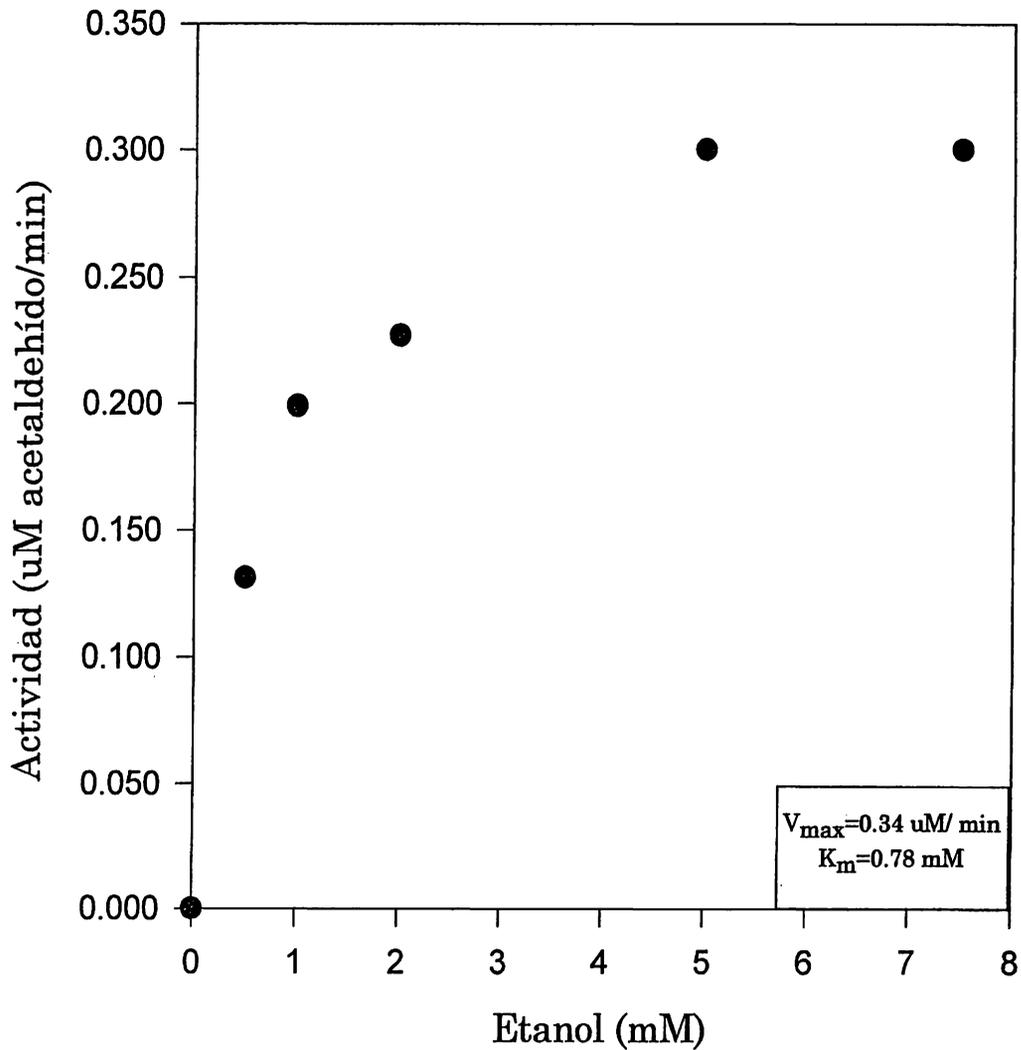


Fig 3.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez inicial de reacción en FG

La reacción se llevo a cabo a temperatura ambiente a partir de 1.00 g de biocatalizador (11.95 mg cel/g biocat.). El tiempo de hidratación (13 h) fue el mismo para todas las muestras.

Debido a los bajos rendimientos alcanzados y resaltando el hecho de haber trabajado a humedades relativas altas, era importante determinar el paso limitante de la reacción, sobretodo conociendo el importante papel que desempeña el agua en la catálisis. Fue entonces indispensable conocer la cinética de hidratación del soporte dada la posibilidad de que el tiempo de hidratación hubiese sido insuficiente para alcanzar el equilibrio del biocatalizador con la humedad relativa del sistema. Por ello se decidió registrar la ganancia de peso correspondiente a la cantidad de agua adsorbida por el biocatalizador en función del tiempo, misma que se puede apreciar en la Figura 3.4.

Al analizar la gráfica es evidente que se requiere por lo menos de 48 horas para garantizar que el biocatalizador equilibre su a_w con el valor generado por la solución salina. Para un $a_w=0.97$ el contenido de agua promedio es de 62 gH₂O/100g de biocatalizador seco. Transcurrido este tiempo la ganancia en peso aumenta discretamente. En consecuencia el tiempo de equilibrio fue fijado entre 60-66 horas de hidratación. Se demostró también que a estos tiempos de incubación la pérdida de actividad es despreciable.

Para conocer la dependencia del contenido de agua en la actividad enzimática se llevó a cabo la reacción con catalizadores expuestos a diferentes tiempos de hidratación empleando una concentración de sustrato de 5 mM (Fig 3.5a y b).

La importancia del contenido de agua en la velocidad de reacción se ve reflejada en la catálisis y por ende, en la producción de acetaldehído. Un incremento del 4.4% en el nivel de hidratación, entre las 8 y 13 horas de hidratación, quintuplica la rapidez de la oxidación. Los resultados globales se muestran en la tabla 3.2.

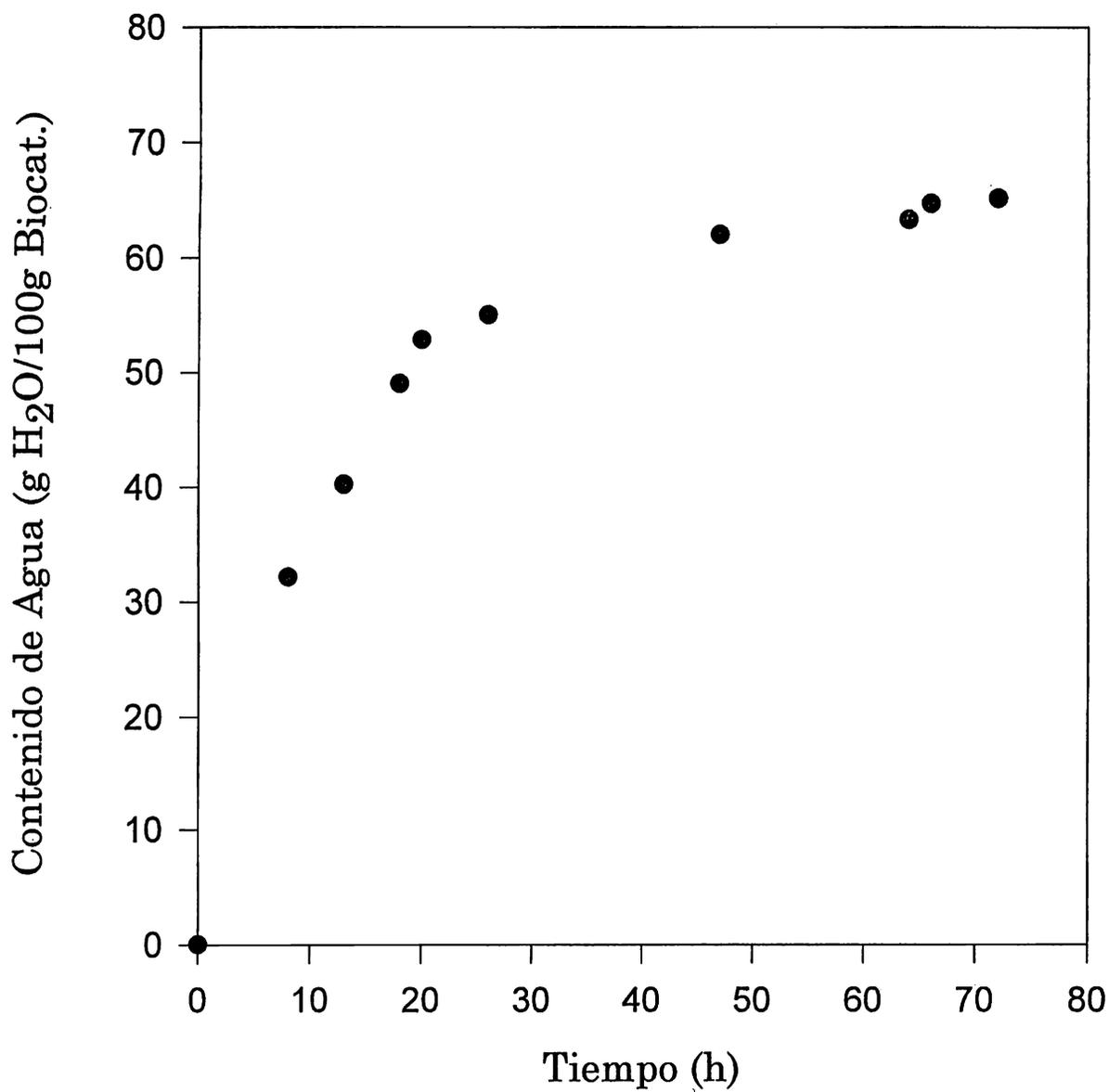


Fig 3.4 Cinética de adsorción de agua del biocatalizador en cámara sellada con vacío a 4°C y Aw de 0.97

Tabla 3.2

Velocidad Relativa de la alcohol oxidasa en función del contenido de agua

Tiempo de hidratación (h)	Velocidad de reacción (nmol A/min g biocat)	mgH ₂ O/gbiocat.	Velocidad relativa
8	1.90	341.4	4.54
13	10.60	402.1	25.35
18	20.60	490.0	49.28
47	38.60	620.0	92.34
66	41.80	647.0	100.00

La dualidad del papel que desempeña el agua podría explicar los resultados anteriores. Por un lado es indispensable una mínima cantidad de agua para la catálisis, que como se puede apreciar en la Fig. 3.5a es de 340 mg/g biocat. para el sistema empleado; asimismo se observa una muy buena correlación entre la velocidad relativa y la cantidad de agua.

Por otro lado, al analizar las cinéticas entre las 13, 18 y 47 horas de hidratación a temperatura ambiente, es decir, conforme se incrementó el contenido de agua, disminuyó el periodo de tiempo en que se sostuvo constante la producción de acetaldehído. Sin embargo, resulta interesante notar que la reacción se detiene independientemente del grado de hidratación (Fig.3.5a).

Los resultados anteriores concuerdan con lo que Yang y Russell (1996b) proponen en el sentido de que la molécula enzimática se mantiene esencialmente inactiva hasta que cierto grado de su superficie se logra hidratar. Si bien la cinética de adsorción de agua es dependiente de la temperatura, los autores anteriores encontraron que la cantidad de agua "crítica", coincide en un amplio intervalo de temperatura, estrechamente relacionada con el contenido de aminoácidos hidrofílicos de la proteína. Por lo anterior y al igual que Bárzana y col. (1989a), estos autores demostraron que la catálisis en fase gas es factible de llevarse a cabo con un contenido de agua por debajo de la monocapa.

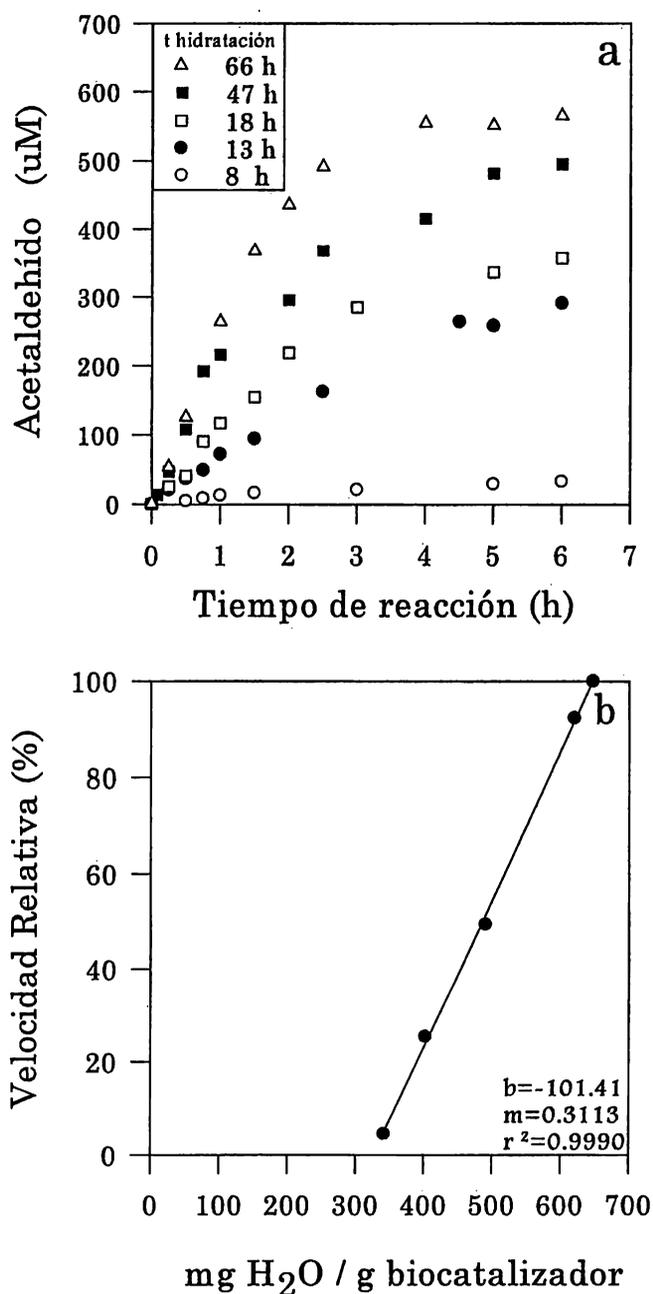


Fig 3.5 a. Producción de acetaldehído a diferentes contenidos de agua

b. Efecto del contenido de agua sobre la velocidad relativa en FG

El progreso de la reacción se determinó a partir de la concentración del acetaldehído en el espacio de cabeza del reactor (100 μ L) a temperatura ambiente. La concentración del etanol empleada fue de 5 mM. Volumen total de reacción 10 mL.

La actividad correspondiente a las 8 horas de hidratación podría estar entonces muy cercana al contenido de agua "crítico", valor superior al reportado con las enzimas puras. Lo anterior puede ser explicado por las interacciones que se establecen entre el agua y otros componentes en el sistema como pueden ser los materiales celulares no enzimáticos, por lo que este valor debe ser considerado como aparente.

Es de suponer que el soporte compita con las células por el agua, siendo capaz de ligar grandes cantidades de ésta al presentar grupos funcionales iónicos, que promueven además la estructuración de la misma (Ling, 1972; Hwang y col., 1994). Esto podría explicar por un lado los largos tiempos de hidratación necesarios para alcanzar el equilibrio, independientemente de saber que las células *per se* retienen más agua que las proteínas puras (Nikolova, 1993).

En este sentido, a partir de los resultados de la velocidad relativa en función del grado de hidratación, la caracterización cinética de la reacción en fase gas se llevo a cabo prácticamente al mínimo contenido de agua correspondiente a 347 mg H₂O/g biocatalizador.

Después de 6 horas de reacción en fase gas se obtuvo por *headspace* un 11% de bioconversión a un $a_w=0.97$. Para determinar el valor real de conversión que incluyera al producto adsorbido y no detectado en el *headspace*, se decidió elevar la temperatura hasta 60 °C y una vez alcanzada como resultado se encontró una concentración significativa del acetaldehído ligada al biocatalizador. La concentración total de acetaldehído alcanzada fue de 1.5mM, correspondiendo a dos terceras partes a la forma adsorbida al soporte. En consecuencia, la conversión real alcanzó un 30%.

El paso siguiente fue identificar los factores que podrían verse involucrados en tan baja productividad, dirigiendo nuestra atención a los siguientes: la disponibilidad del sustrato, la termoinactivación de la enzima, pérdida de grupos

reactivos indispensables para la catálisis o para conservar su estructura catalíticamente activa y efectos derivados del conocimiento fisiológico como una posible inactivación catabólica por el acetaldehído.

3.3 Efecto de la disponibilidad de sustrato sobre la reacción en FG

En lo que se refiere a la disponibilidad del sustrato, su consumo evaluado por *headspace* con respecto al tiempo no corresponde con la concentración del acetaldehído producido. Es probable que el etanol se adsorba al soporte y la transferencia de las moléculas de vapor de etanol de la fase sólida a la fase gaseosa fuera el paso limitante de la catálisis. Se optó entonces por emplear volúmenes significativamente mayores de etanol puro para alcanzar la saturación de los sitios de adsorción. Paralelamente, en otro reactor se adicionaron pulsos del sustrato gradualmente durante la reacción (adición). La cinética de ambos casos se muestra en la Fig.3.6.

Al emplear un exceso de sustrato (100 μL de etanol) se observó claramente que no hay un incremento significativo en la velocidad inicial de reacción. Los niveles de producción de acetaldehído, sin embargo, fueron notablemente superiores. El área de los registros de etanol no variaron durante las 6 horas de monitoreo, por lo que podemos pensar que el soporte y de hecho todo el sistema de reacción rápidamente se saturaron con el etanol. Se trabajó con un verdadero exceso que no repercutió en la actividad enzimática, quedando descartado una posible inhibición por sustrato.

En los experimentos en donde se trabajó con un menor a_w , se observó claramente el comportamiento convencional de Michaelis y Menten evaluando la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la V_{max} . Se determinó que 3 μL de etanol garantizan la mayor rapidez inicial.

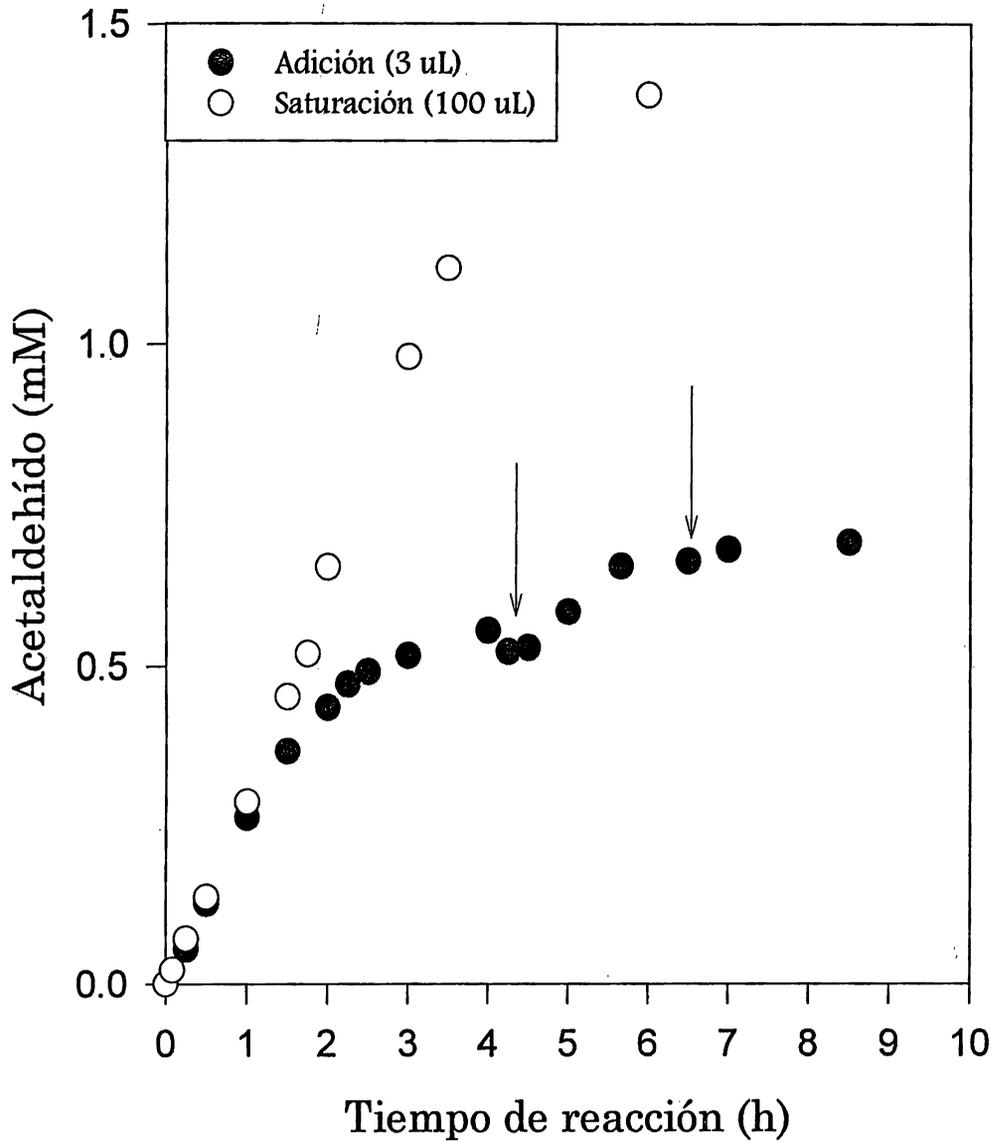


Fig. 3.6 Cinéticas de reacción en condiciones de saturación y adición pulsada en FG.

Las flechas indican el tiempo en que se adicionó 3 μL de etanol a la capsula del sustrato. La reacción de "saturación" corresponde a un total de 100 μL de etanol agregados al inicio del experimento.

Se optó por dosificar etanol al sistema durante la reacción buscando mantener la biotransformación. Este nuevo experimento consistió en iniciar la reacción, e inyectar una nueva alícuota de 3 μ L directamente al contenedor de vidrio, justo en el momento en que la producción del acetaldehído se detenía (4 h). Se realizaron tres ensayos. En uno no se adicionó más etanol a manera de control. Cuando si se adicionó etanol se observó un incremento en la producción de acetaldehído pero no a la misma velocidad inicial y por un lapso corto de tiempo. Una segunda adición de etanol 3 horas después mostró la pérdida total de la actividad enzimática (ver Fig 3.6).

Estos resultados indican que el paso limitante de la reacción no es la disponibilidad del sustrato sino que el acetaldehído producido podría jugar un papel importante en la inactivación enzimática, y que dicha inactivación es dependiente del tiempo. De manera tal que en forma independiente de la difusión del etanol a la fase gas, hay una pérdida gradual de la actividad enzimática como resultado de la reacción. Otro elemento de apoyo es que cuando el soporte está saturado con etanol se reduce la adsorción de acetaldehído y con ello la inactivación según se observa para la reacción "saturada" en la Fig. 3.6.

3.4 Efecto de la adsorción del acetaldehído sobre la actividad FG

Bajo la hipótesis de que la adsorción del acetaldehído en la fase sólida promueve la inactivación de la alcohol oxidasa, y que al saturar los sitios físicos de adsorción con el etanol se evitaría la acumulación del producto al favorecerse su difusión a la fase gas, se buscó confirmar estos efectos.

Para ello se expuso el biocatalizador, una vez equilibrado a un a_w de 0.97, a una concentración fija de acetaldehído gaseoso. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que la reacción enzimática ensayando tres tiempos diferentes a temperatura ambiente. En lugar de etanol se inyectó un exceso de acetaldehído (5 μ L) correspondiente a una concentración de prácticamente el doble de la generada si se llevara a cabo el 100% de bioconversión. Para poder distinguir entre

la posible inactivación por acetaldehído y/o una termoinactivación, paralelamente se corrió un control (sin acetaldehído) que se sometió al mismo periodo de incubación.

Transcurrido ese tiempo se eliminó el acetaldehído adsorbido al biocatalizador al calentarlo a 35°C durante 1 hora. Una vez libre de acetaldehído el biocatalizador se hidrató nuevamente, se transfirió al matraz bola, se cerró el sistema y se verificó la ausencia del acetaldehído en el *headspace*. La reacción se inició por adición de etanol a las condiciones referidas previamente.

En la Figura 3.7 se presentan las pérdidas de actividad para los diferentes tratamientos. De estos resultados se infiere que la inactivación de la alcohol oxidasa se podría llevar a cabo por dos mecanismos diferentes.

El biocatalizador presentó una disminución de la actividad de alcohol oxidasa del 65.6%, 72.8% y 87.0% cuando se sometió a una temperatura promedio de 22 °C en presencia de O₂ y 9 mM de acetaldehído, durante 4, 8 y 24 horas respectivamente, siendo más marcada la inactivación durante las cuatro primeras horas. En el experimento control efectuado paralelamente, sin la adición del acetaldehído, se detectó una incipiente inactivación al inicio pero que a partir de las cuatro horas de exposición al oxígeno sólo, se incrementa rápidamente. Claramente el oxígeno es un potente inactivador y esta pérdida de la actividad se ve potenciada en presencia de acetaldehído.

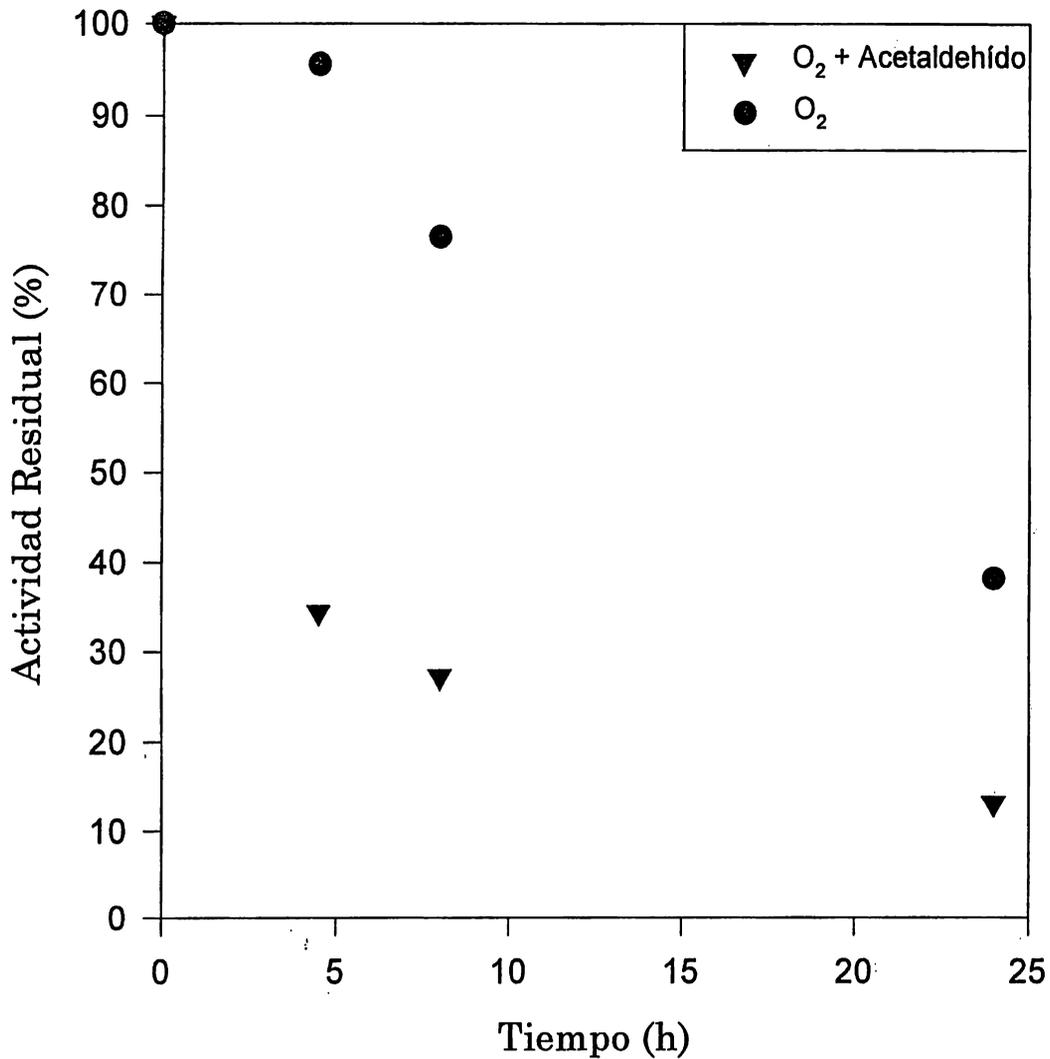


Fig 3.7 Efecto del tiempo de pre-incubación del biocatalizador con acetaldehído + O_2 y su control con O_2 a temperatura ambiente

Para la reacción se utilizó un gramo de biocatalizador hidratado, se expuso a una concentración de 9 mM de vapores de acetaldehído. El acetaldehído se desorbió y se volvió a hidratar para llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente. Etanol= 5 mM.

Existen antecedentes sobre la inactivación de la enzima durante la reacción. El grupo de trabajo de Duff y Murray (1988) han propuesto varios mecanismos de inactivación de la alcohol oxidasa en medio acuoso. Demostraron que la pérdida de dicha actividad se debe a una inhibición competitiva por producto reportando un valor de la constante de inhibición de 2.6 g/L. Estos autores argumentan que aunque el grupo carbonilo presenta una estructura espacial muy diferente al grupo alcohol, la forma hidratada de los aldehídos de bajo peso molecular son, al parecer, capaces de acoplarse al sitio activo de la enzima. Tal es el caso del formaldehído, que en su forma hidratada es también sustrato de la alcohol oxidasa (Patel y col., 1981).

Murray y colaboradores (1990) reportaron tiempo después, apoyados por varios trabajos sobre el metabolismo de levaduras, que la pérdida de la actividad obedece a una inactivación catabólica al establecer una similitud entre la biotransformación y los cambios metabólicos que se desencadenan cuando las células se exponen a otra fuente de carbono mucho más fácil de asimilar. Por ello asociaron (Murray y col., 1990) la baja producción del acetaldehído con una caída en la actividad oxidativa del etanol en fase acuosa. Propusieron un proceso de dos etapas consecutivas resaltando la presencia simultánea de acetaldehído y del oxígeno molecular como requisitos para dicha inactivación.

Posteriores determinaciones como la cuantificación del cAMP, actividad proteolítica y evaluación de la presencia e integridad de los peroxisomas por microscopía electrónica, los llevó a proponer que el primer paso consiste en el marcaje de la alcohol oxidasa, a través de una fosforilación mediada por una cinasa dependiente del cAMP, que es responsable de la pérdida del 55 por ciento de la actividad en las primeras dos horas de reacción. A partir de ese momento la inactivación se lleva a cabo a una velocidad menor que desencadena en una total degradación de los peroxisomas por enzimas proteolíticas en un lapso de tiempo no mayor de 24 horas.

3.5 Efecto de la hidrofiliidad del soporte sobre la actividad FG

En virtud de que la gran cantidad de agua que demandaba el gel de amberlita no permitía elucidar claramente el mecanismo de inactivación enzimática, fue indispensable minimizar el fenómeno de adsorción (sustrato, producto o agua) por lo que se decidió probar un soporte menos hidrofílico como el ImmoBaSil-G. Este soporte se caracteriza por su capacidad para retener altas concentraciones celulares y la de ser inerte químicamente.

Siguiendo la metodología de inmovilización por co-lifilización para producir el biocatalizador e igualando la misma cantidad de células por gramo de biocatalizador, se obtuvo una concentración de 3mM de acetaldehído en fase gas a temperatura ambiente en tan solo dos horas de reacción. Esto representa un incremento de aproximadamente 3 veces los valores obtenidos para la amberlita.

El acetaldehído no se adsorbe al biocatalizador basado en el ImmoBaSil, por lo que escapa a la fase gas una vez generado por la enzima. Esto repercute favorablemente en la velocidad de reacción y el grado de bioconversión como se puede apreciar en la Figura 3.8. Sin embargo se observa que, a partir de las dos horas de reacción disminuyó gradualmente la concentración del acetaldehído. Paralelamente se observó un oscurecimiento del biocatalizador, distinguible por el color blanco original del ImmoBaSil. Este efecto no fue detectado en la Amberlita por su color café claro.

Siendo el acetaldehído altamente reactivo y estando en contacto con una matriz rica en proteínas y por lo tanto con grupos amino libres es posible que durante la reacción, aunque a una velocidad menor, se lleve a cabo la reacción de Maillard. Resultaría lógico pensar que la proteína más afectada es aquella que lo está generando, dada su proximidad, pudiendo ser ésta una explicación de la inactivación enzimática no asociada al oxígeno.

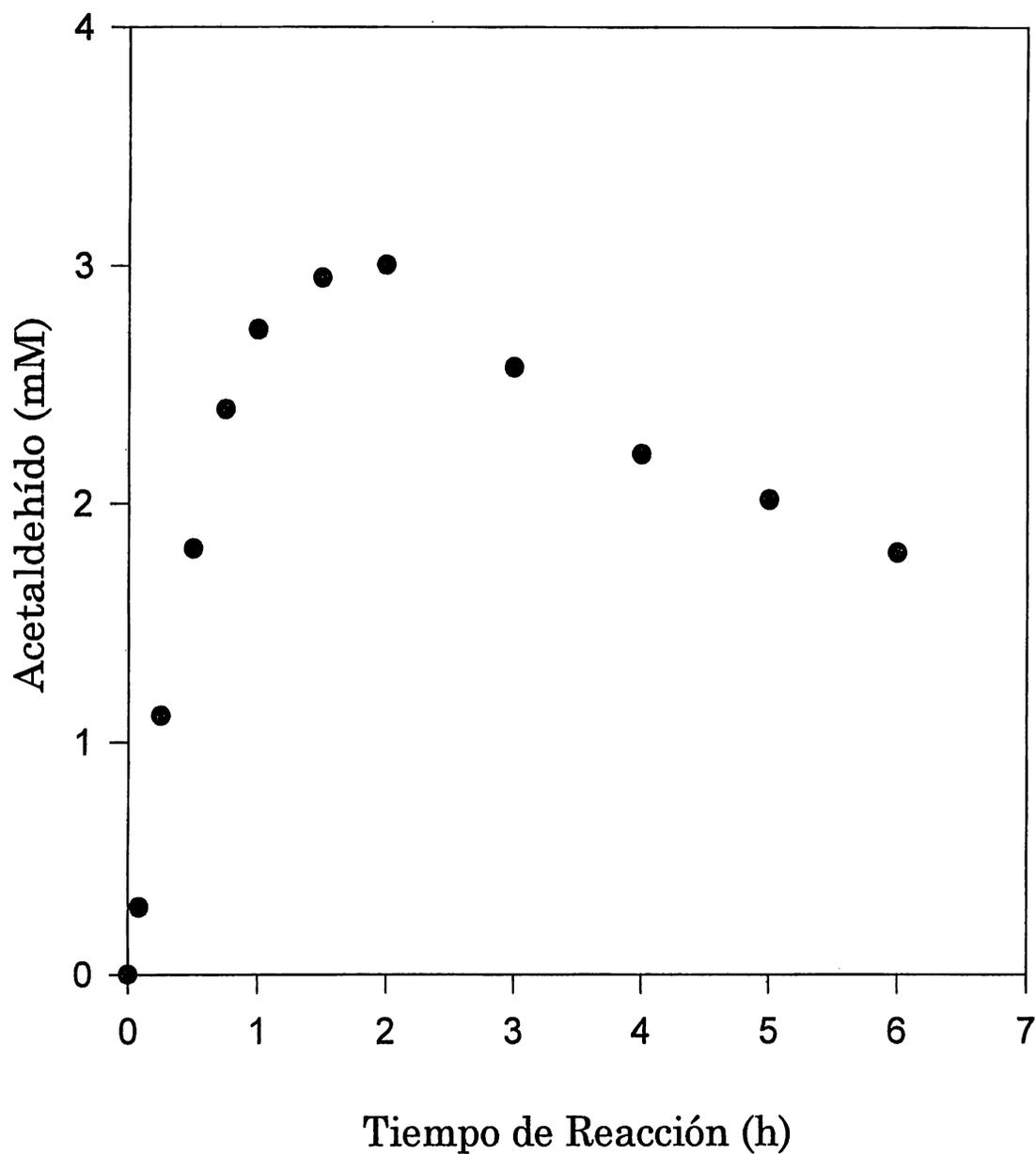


Fig 3.8 Producción de acetaldehído empleando el soporte ImmoBaSil-G

La reacción en fase gas se llevó a cabo a temperatura ambiente y se trabajó prácticamente con la misma capacidad (g células/ g biocat.) de la Amberlita IRA-402.

Aunque se mejoró la producción, la conversión fue sólo de aproximadamente 60 por ciento. Seguramente en los primeros tiempos de reacción se generó más acetaldehído del detectado. Suponiendo que la adsorción es despreciable para el soporte ImmobaSil, el acetaldehído no detectado correspondería al que es sustrato de otras reacciones y dado que la aparición de compuestos coloridos involucra cierto tiempo de inducción (definido como el lapso de tiempo que transcurre desde el ataque nucleofílico del grupo amino libre hacia el carbonilo del acetaldehído que posee una carga parcial positiva), ya que el desarrollo de color es detectable hasta tiempos largos de incubación.

La reacción de Maillard en alimentos ha sido ampliamente estudiada (Labuza y Baiser, 1992). Es importante mencionar que la mayoría de los trabajos experimentales y los mecanismos de reacción del oscurecimiento no enzimático se han propuesto a partir de pentosas y hexosas y aminoácidos libres. De tal manera que el color generado se explica a partir de la formación de compuestos de alto peso molecular a través de reacciones de condensación de moléculas como 3-deoxyglicosulosa y su enamina así como de la formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos (Wong, 1989). Sin embargo, se ha demostrado que el grupo hidroxilo del C₂ de una aldosa es requisito mínimo e indispensable para la isomerización irreversible de la N-glicosilamina y la generación de oscurecimiento (Labuza y Baiser, 1992). Varios factores pueden manipularse para minimizar el oscurecimiento, por lo que en un sistema por lote la disminución del color podría lograrse trabajando a bajas actividades acuosas.

Comprobamos que el soporte es químicamente inerte y presenta poca afinidad por el agua a diferencia de la amberlita. Por ejemplo, en 24 horas el biocatalizador alcanza el equilibrio con un contenido de agua de 146.5 mg H₂O/g biocatalizador (vs 66 h y 647 mg/g para la amberlita; ver Fig.3.4).

Sería posible evaluar la termoestabilidad a un menor contenido de agua, ya que la mínima actividad enzimática detectada empleando amberlita, se obtuvo con 34% de agua y que se asocia a su alta demanda de agua.

En este momento, es interesante retomar lo que la literatura define como una verdadera reacción en fase gas, en donde el sustrato en estado gaseoso interactúa directamente con la enzima, y el contenido de agua es el necesario para mantener la estructura proteínica y la movilidad para la catálisis sin la presencia de agua de solvatación. Este nuevo soporte se acerca a los requerimientos anteriores, es decir, que podemos garantizar y eventualmente comprobar que la reacción se lleve a cabo en fase gas. Un menor contenido de agua llevaría a una mayor termoestabilidad del biocatalizador que se vería reflejada en la mejora de la productividad y en la disminución del oscurecimiento no enzimático.

3.6 Producción de acetaldehído en función del A_w

Con los antecedentes anteriores se decidió explorar la cinética de reacción en FG y la producción de color en un amplio intervalo de a_w (0.343-0.973). El oscurecimiento se evaluó después de 6 horas de reacción con los controles apropiados empleando una esfera de integración que se adapta al espectrofotómetro, diseñada especialmente para evaluar el color en superficies sólidas.

Los resultados se pueden apreciar en las Fig. 3.9 y 3.10. El biocatalizador fue equilibrado con soluciones salinas saturadas a 4°C en contenedores separados. Claramente, la mayor A_w y por lo tanto una mayor concentración de acetaldehído modifican proporcionalmente el espectro obtenido.

Los resultados de la cinética en función del a_w muestran un comportamiento similar al reportado en la Fig. 3.8, en lo que se refiere a una fase de alta producción seguida de la eventual desaparición del acetaldehído. Después de una

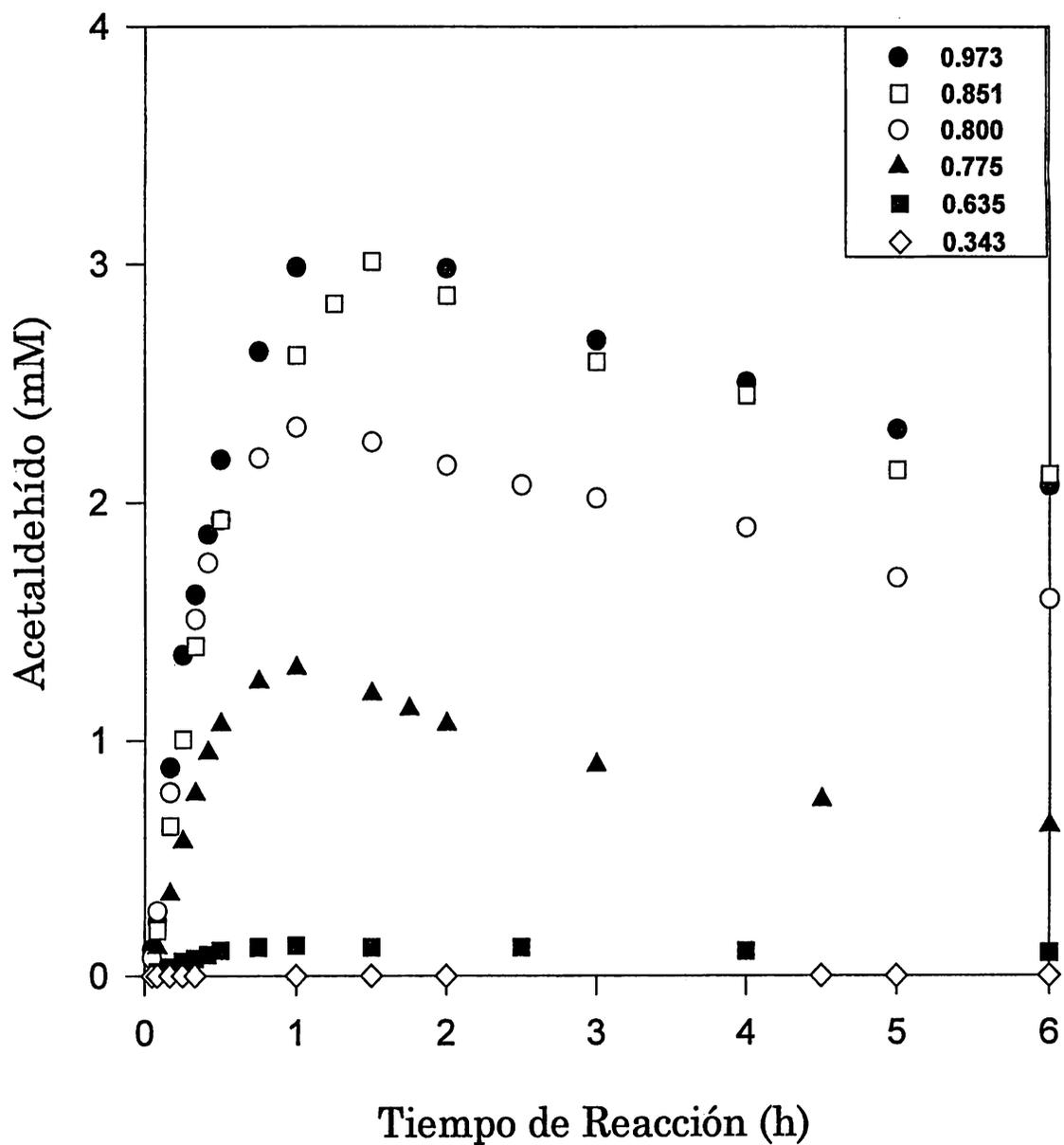


Fig 3.9 Producción de acetaldehído en función de la actividad acuosa

Reflectancia (%)

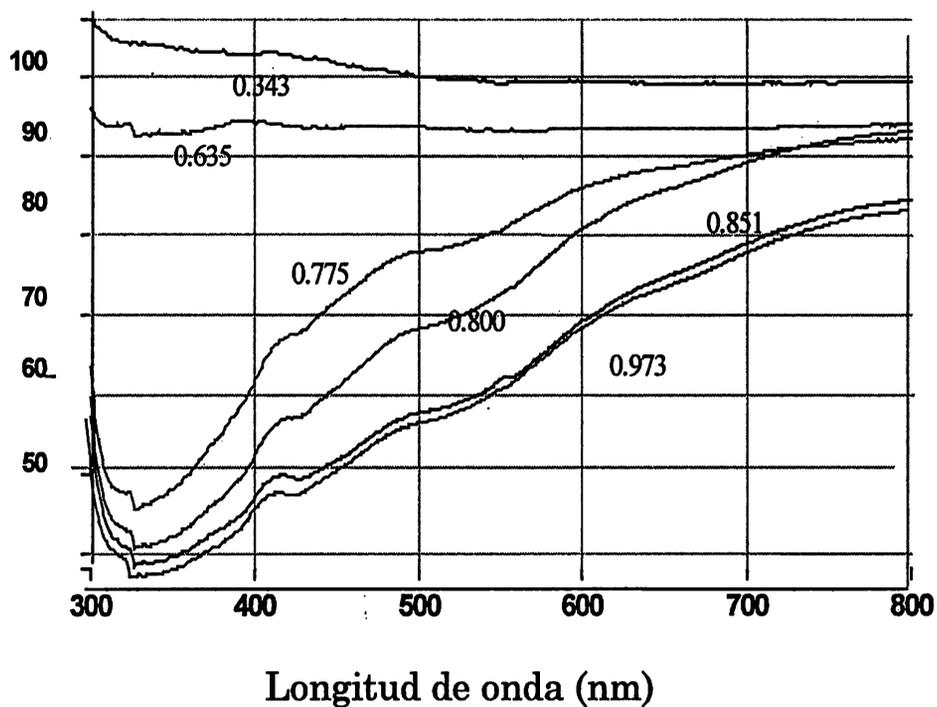


Fig. 3.10 Evaluación del color generado en el biocatalizador en función de la actividad acuosa

Las muestras fueron evaluadas a las seis horas de reacción en la esfera de integración

hora de reacción, la máxima producción del acetaldehído prácticamente coincide a un mismo tiempo en el intervalo de a_w de 0.973 -0.776 y en donde es evidente la aparición del color (tiempo de inducción). Además no se encontró diferencia significativa entre las velocidades iniciales a un a_w de 0.973, 0.851 y 0.800 y la mínima a_w a la cual se detectó reacción fue de 0.443. La misma velocidad inicial que observamos en el intervalo de a_w de 0.80 a 0.97 podría ser debida a problemas difusionales al interior del biocatalizador, ya que éste se aglomera conforme el contenido de agua se incrementa. Otra posibilidad sería un efecto de dilución del sustrato adsorbido.

La mayor producción de acetaldehído va acompañada del mayor oscurecimiento no enzimático; la desaparición del acetaldehído con respecto al tiempo es equivalente y prácticamente constante en el intervalo de a_w de 0.973-0.775 hasta las seis horas de la reacción. Es importante resaltar también que durante la reacción, la actividad acuosa se mantuvo constante evaluada en un experimento aparte con un sensor de humedad relativa (Rotronic Corp., Huntington, NY, USA) es decir, el etanol y el acetaldehído no ejercen un efecto deshidratante.

Este comportamiento cinético, con un máximo tan pronunciado, podría explicarse como resultado de dos reacciones simultáneas: la oxidación del etanol y la reacción de Maillard cuya evidencia experimental es la formación de color. Asimismo se observó en el cromatograma la aparición de otros dos productos de bajo peso molecular y que aparecen en mayor porcentaje conforme el a_w se incrementa. (Fig 3.11).

Yang y Russell (1996c) reportan que la preparación de la enzima alcohol deshidrogenasa se torna amarilla conforme transcurre el tiempo de reacción a diferentes contenidos de agua. Observaron que a mayor concentración del producto (en el estado estacionario) se incrementa la coloración y la velocidad de desactivación, así como la pérdida de la solubilidad de la enzima. Sugieren que la

pérdida de la actividad es a través de una inhibición por producto de tipo no-competitivo.

En este sentido, estudios recientes (Hirano y col., 1996) han demostrado que las melanoidinas pueden ser inhibidores de enzimas, particularmente de la tripsina. Las melanoidinas obtenidas de la reacción entre la D-glucosa y la glicina se pusieron en contacto con la tripsina; los estudios cinéticos indicaron que la inhibición es de tipo no-competitivo con una $K_i=5.8\%$. Los investigadores proponen que la inhibición puede ser debida a un impedimento estérico.

Si bien la inactivación es independiente de la actividad acuosa, basados en los estudios anteriores podríamos plantear la posibilidad de que durante la producción de acetaldehído se forme cierto grado de entrecruzamiento que disminuye la movilidad de la alcohol oxidasa, fenómeno que se refleja en la eventual pérdida de la actividad enzimática.

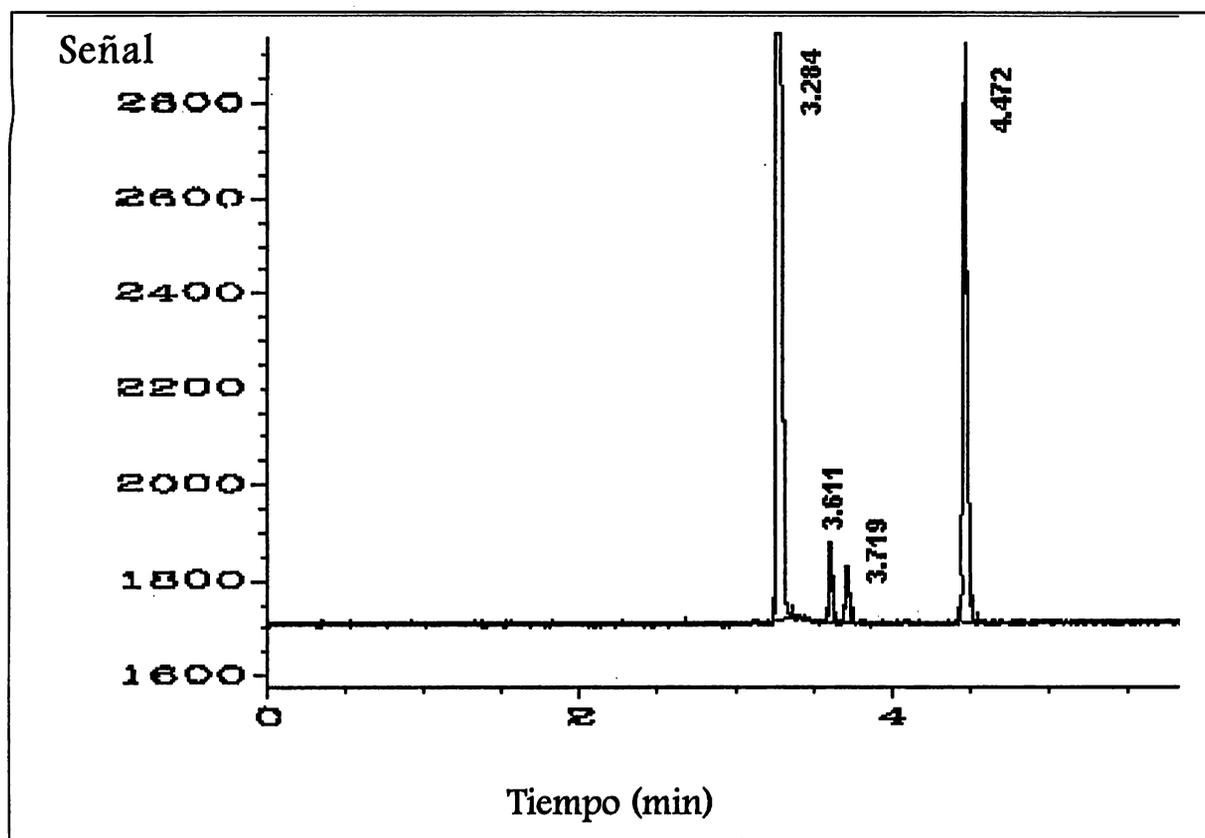


Fig 3.11 Resolución cromatográfica al término de la reacción en fase gas

En la figura se muestra el perfil cromatográfico obtenido al inyectar por *headspace*, una alícuota (100 μ L) correspondiente a las 6 horas de reacción en fase gas a temperatura ambiente. (Condiciones cromatográficas: ver la Fig 3.1.)

Conclusiones

- El proceso de co-liofilización es eficiente para inmovilizar las células enteras de *Pichia pastoris* con actividad alcohol oxidasa en fase gas.
- La biotransformación del etanol a bajos contenidos de agua sigue el comportamiento convencional de Michaelis-Menten. La enzima presente en las células de levadura alcanzó los niveles de saturación de sustrato con una concentración de 5 mM de etanol.
- La mínima cantidad de agua necesaria para la producción de acetaldehído en fase gas depende de la naturaleza hidrofílica/hidrófoba del soporte.
- La mínima actividad de la alcohol oxidasa en el ImmoBaSil-G en fase gas inicia a un $a_w=0.443$. Dada la naturaleza hidrófoba del soporte, se infiere que la formación de una fase condensada sobre el soporte no es un pre-requisito para el inicio de la reacción.
- La actividad se ve inhibida por una interacción directa del acetaldehído producido en la reacción con la enzima. Este contacto puede ocurrir con especies adsorbidas o presentes en fase gas.
- La velocidad y extensión de la conversión en fase gas está afectada por la adsorción del acetaldehído sobre el soporte, por lo que la saturación del soporte de naturaleza hidrofílica con agua o etanol o el uso de soportes hidrófobos minimizan la inactivación de la enzima por el producto de la reacción.
- La pérdida de la actividad de la alcohol oxidasa se asocia con la modificación covalente de la proteína al formar bases de Schiff con el acetaldehído y eventualmente por la aparición de compuestos de alto peso molecular.

Recomendaciones

Bajo las condiciones de trabajo, en un sistema por lote no se alcanzarán mayores porcentajes de bioconversión porque conforme se produce el acetaldehído una fracción significativa de éste interacciona con la matriz proteínica asociado a la aparición de productos oscuros en el biocatalizador.

Lo presentado permite establecer el fundamento de la inactivación enzimática en fase gas. Posiblemente otras reacciones, como las catalizadas por las lipasas estén sujetas a mecanismos similares, producto de los carbonilos presentes en ésteres. Esto merece ser estudiado a mayor profundidad.

Sería entonces interesante evaluar el efecto de la temperatura, y que sea esta variable la determinante en el predominio de una sobre otra de las reacciones que paralelamente se llevan a cabo. Como la alcohol oxidasa es psicotolerante, trabajar a bajas temperaturas (5°C), no se favorecería la de oscurecimiento dada su mayor energía de activación.

Identificar los compuestos volátiles que se generan en la reacción en FG a través del sistema acoplado gases-masas, posibles indicadores del curso de la reacción de oscurecimiento.

Dado que el progreso de la reacción de oscurecimiento es función del a_w , se recomienda establecer el esquema analítico para caracterizar los compuestos responsables del color.

Según los resultados sería atractivo llevar a cabo la reacción en un proceso continuo con el control adecuado del grado de hidratación. Se evitaría así la acumulación del acetaldehído repercutiendo significativamente en la productividad.

Demostrar la habilidad de las enzimas para catalizar reacciones en FG a temperaturas elevadas que permita establecer la relación entre el grado de hidratación del biocatalizador y la vida media del biocatalizador, así como definir el mecanismo de transporte de sustrato y producto.

Bibliografía

Armstrong, D.W. y Yamazaki, H. 1986. Natural flavours production: a biotechnological approach. *Trends Biotechnol.*, 4:264-258.

Bárzana, E; Klibanov, A. M. y Karel, M. 1987. Enzyme-catalyzed, gas-phase reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 15:25-34.

Bárzana, E; Karel, M. y Klibanov, A.M. 1989a. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnol. Bioeng.*, 34:1178-1185.

Bárzana, E; Klibanov, A. M. y Karel, M. 1989b. A colorimetric method for enzymatic analysis of gases: the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidase. *Anal. Biochem.*, 182:109-115.

Caux G. 1980. Description of the integrating sphere attachment and investigation on color measurements in various application fields. *Applied UV-Spectroscopy*, Perkin-Elmer No.7E:1-40.

Cedeño, M. y Waissbluth, M. 1978. Enzyme activity at a gas solid interphase: oxidation of methanol to formaldehyde. En *Enzyme engineering*. (Broun, G. B; Manecke, G. y Wingard, L. B; Eds.). Plenum Press NY; Vol. 4:405-407.

Chou, S. F. 1996. Amperometric biosensor for the determination of the artificial sweetener aspartame with an immobilized bienzyme system. *Analyst*, 121:71-73.

Couderc, R. y Baratti, J. 1980. Immobilized yeast cells with methanol oxidase activity: preparation and enzymatic properties. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:1155-1173.

Cromartie, T. H. 1981. Sulfhydryl and histidinyl residues in the flavoenzyme alcohol oxidase from *Candida boidinii*. *Biochemistry*, 20:5416-5423.

- Dastoli, F. R; Musto, N. A. y Price, S. 1966. Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. Arch. Biochem. Biophys., 115:44-47.
- de Bont, J. A. M. y van Ginkel 1983. Ethylene oxide production by immobilized *Mycobacterium* Py1 in a gas-solid bioreactor. Enzyme Microb. Technol., 5:55-59.
- Duff, S. J. B. y Murray, W. D. 1988. Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biotechnol. Bioeng., 31:44-49.
- Duff, S. J. B. y Murray, W. D. 1990. Extruded pellets of *Pichia pastoris*: a practical biocatalyst for use in aqueous, organic, and vapour-phase oxidations. Process Biochem., 25:40-42.
- Duff, S. J. B; Murray, W. D. y Overend, R. P. 1989. Factors affecting the yeast-mediated conversion of ethanol to acetaldehyde in batch reactors. Enzyme Microb. Technol., 11:770-775.
- Duff, S. J. B; Murray, W. D. y Overend, R. P. 1991. Oxygen and temperature effects on acetaldehyde-induced catabolite inactivation in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36:82-86.
- Giuseppin, M. L. F; van Eijk, H. M. J; Verduyn, C; Bante, I. y van Dijken, J. P. 1988. Production of catalase-free alcohol oxidase by *Hansenula polymorpha*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28:14-19.
- Goderis, H. L; Ampe, G; Feyten, M. P; Fouwé, B. L; Guffens, W. M; Van Cauwenbergh, S. M. y Tobback, P. P. 1987. Lipase-catalysed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. Biotechnol. Bioeng., 30:258-266.
- Goodman, J. M; Scott, C. W; Donahue, P. N. y Atherton, J. P. 1984. Alcohol oxidase assembles post-translationally into peroxisome of *Candida boidinii*. J. Biol. Chem., 259:8485-8493.

Gorman, Lu. A. S. y Dordick, J. S. 1992. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:392-397.

Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Nat. Bur. St. J. Res.*, 81A:89-96.

Habets-Crützen, A. Q. H; Brink, L. E. S; van Ginkel, C. G; de Bont, J. A. M. y Tramper, J. 1984. Production of epoxides from gaseous alkenes by resting-cell suspensions and immobilized cells of alkene-utilizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20:245-250.

Halling, P. J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 16:178-206.

Hammond, D. A; Karel, M. y Klivanov, A. M. 1985. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11:393-400.

Hamstra, R. S; Murriss, M. R. y Tramper, J. 1987. The influence of immobilization and reduced water activity on gaseous-alkene oxidation by *Mycobacterium* PY1 and *Xanthobacter* PY2 in a gas-solid bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:884-891.

Hill, D. J; Hann, Ao. C. y Lloyd, D. 1985. Degradative inactivation of the peroxisomal enzyme, alcohol oxidase, during adaptation of methanol-grown *Candida boidinii* to ethanol. *Biochem. J.*, 232:743-750.

Hirano, M; Miura, M. y Gomyo T. 1996. Kinetic-analysis of the Inhibition by melanoidin of trypsin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60:458-462.

Hou, C. T. 1984. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosinus* sp. CRL 31 in a gas-solid bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19:1-4.

Hwang, S. O. y Park, Y. H. 1994. Ethyl acetate production in the gas phase. *Biotechnol. Lett.*, 16:379-384.

- Hwang, S. O; Trantolo, D. J. y Wise, D. L. 1993. Gas phase acetaldehyde production in a continuous bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 42:667-673.
- Hwang, S. O; Wise, D. L. y Trantolo, D. J. 1994. Effect of biocatalyst activity changes in continuous reactions in the gas phase. *Biotechnol. Techniques*, 8:255-260.
- Kim, C. Ho. y Rhee, S. Ki. 1992. Enzymatic conversion of ethanol into acetaldehyde in a gas-solid bioreactor. *Biotechnol. Lett.*, 14:1059-1064.
- Kimura, K; Suzuki, A; Inokuchi, H. y Yagi, T. 1979. Hydrogenase activity in the dry state isotope exchange and reversible oxidoreduction of cytochrome C₃. *Biochem. Biophys. Acta*, 567:96-105.
- Klausner, A. 1984. Phillips: wildcatting in biotech. *Bio/technology*, 2:853-858.
- Klibanov, A. M. 1986. Enzymes that work in organic solvents. *Chem. Technol.*, 16:354-359.
- Labuza, T. P. y Baisier, W. M. 1992. The kinetics of nonenzymatic browning. En Physical chemistry of foods IFT Basic Symposium Series (Schwartzberg, H. G. y Hartel, R. W; Eds.) Marcel Dekker, Inc., 595-649.
- Lamare, S. y Legoy, M. D. 1993. Biocatalysis in the gas phase. *Trends. Biotechnol.*, 11:413-418.
- Lamare, S. y Legoy, M. D. 1995a. Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution. *Biotechnol. Bioeng.*, 45:387-397.
- Lamare, S. y Legoy, M. D. 1995b. Solid/gas biocatalysis how to fully define the system. *Biotechnol. Techniques*, 9:127-132.
- Ling G. N. 1972. Hydration of macromolecules. En Water and aqueous solutions. structure, thermodynamics, and transpor processes. (Horne R.A. ed.) Wiley-Interscience. 663-700.

Müller, F; Hopkins, T. R; Lee, J. y Bastiaens, P. I. H. 1982. Metanol oxidase. En Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. (Müller, F., Ed.) CRC Press London., Vol. III:95-119.

Murray, W. D; Duff, S. J. B. y Beveridge, T. J. 1990. Catabolite inactivation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2378-2383.

Nikolova, P. y Ward, O. P. 1993. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *J. Industrial Microb.*, 12:76-86.

Ogata, K; Nishikawa, H. y Ohsugi, M. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.*, 33:1519.

Parvareh, F; Robert, H; Thomas, D. y Legoy, M. D. 1992. Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:467-473.

Patel, R. N; Hou, C. T; Laskin, A. I. y Derelanko, P. 1981. Microbial oxidation of methanol: properties of crystallized alcohol oxidase from yeast, *Pichia* sp. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210:481-488.

Pulvin, S; Legoy, M. D; Lortie, R; Pensa, M. y Thomas, D. 1986. Enzyme technology and gas phase catalysis: alcohol dehydrogenase example. *Biotechnol. Lett.*, 8:783-784.

Randolph, T. W; Blanch, H. W; Prausnitz, J. M. y Wilke, C. R. 1985. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.*, 7:325-328.

Roa, M. y Blobel, G. 1983. Biosynthesis of peroxisomal enzymes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:6872-6876.

Sahm, H. y Wagner, F. 1973. Microbial assimilation of methanol. The ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 36:250-256.

Svensson, I; Wehtje, E; Adlercreutz, P. y Mattiasson, Bo. 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, 44:549-556.

Tani, Y; Miya, T; Nishikawa, H. y Ogata, K. 1972a. The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agric. Biol. Chem., 36:68-75.

Tani, Y; Miya, T. y Ogata, K. 1972b. The microbial metabolism of methanol. Part II. Properties of crystalline alcohol oxidase from *Kloeckera* sp. No. 2201. Agric. Biol. Chem., 36:76-83.

Uchiyama, H; Oguri, K; Yagi, O. y Kokufuta, E. 1992. Trichloroethylene degradation by immobilized resting-cells of *Methylocystis* sp. M. in a gas-solid bioreactor. Biotechnol. Lett., 14:619-622.

van Dijken, J. P; Veenhuis, M. y Harder, W. 1982. Peroxisomes of methanol-grown yeasts. En Peroxisomes and glyoxisomes (Kindl, H; Lazarow, P. B., Eds.) Anal. NY Acad. Sci., Vol. 386:200-215.

van Veldhoven, P. P. y Mannaerts, G. P. 1994. Assembly of the peroxisomal membrane. En Subcellular Biochemistry (Maddy, A. H. y Harris, J. R., Eds.) Plenum Press NY., Vol. 22:231-255.

Wong D.W.S. 1989. Mechanism and theory in food chemistry. Published by Van Nostrand Reinhold. AVI. New York. 74-76,113-122.

Yagi, T; Tsuda, M; Mori, Y. y Inokuchi, H. 1969. Hydrogenase activity in the dry state. J. Am. Chem. Soc., 91:2801.

Yang, F. y Russell, A. J. 1994. Two-step biocatalytic conversion of an ester to an aldehyde in reverse micelles. Biotechnol. Bioeng., 43:232-241.

Yang, F. y Russell, A. J. 1996a. Catalyse gas-phase reactions with enzymes. Chem. Technol., 26:24-27.

Yang, F. y Russell, A. J. 1996b. The role of hydration in enzyme activity and stability: 1. Water Adsorption by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 49:700-708.

Yang, F. y Russell, A. J. 1996c. The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 49:709-716.

Zaks, A. y Klivanov, A. M. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 224:1249-1251.

Zaks, A. y Klivanov, A. M. 1986. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reversed. *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2768-2769.

