

03072



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

9  
20/

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE  
FERMENTACIÓN QUE MAXIMIZAN LA SÍNTESIS  
DE LA ENZIMA ALCOHOL OXIDASA POR  
*Pichia pastoris.***

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**MARÍA LETICIA RAMÍREZ CASTILLO**

ASESOR: DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

265275



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo de la DGAPA-UNAM a través del proyecto IN207293.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ANTECEDENTES GENERALES</b>	<b>3</b>
1.1.1 Las levaduras	3
1.1.1.1 Levaduras metilotróficas	4
1.1.1.2 Requerimientos de los microorganismos metilotróficos.	5
1.1.2 Metabolismo de metanol por levaduras	6
1.1.2.1 Desasimilación de metanol	6
1.1.2.1.1 Oxidación del metanol a formaldehído	6
1.1.2.1.2 Oxidación de formaldehído a formato	7
1.1.2.1.3 Oxidación de formato a dióxido de carbono	8
1.1.2.2 Asimilación de metanol	9
1.1.3 Papel de los peroxisomas en el metabolismo de metanol	10
1.1.3.1 Estructura y función	10
1.1.3.2 Biogénesis de peroxisomas	11
1.1.4 Enzima alcohol oxidasa	13
1.1.4.1 Propiedades generales de la alcohol oxidasa	13
1.1.4.2 Aplicaciones de la enzima alcohol oxidasa.	15
<b>1.2 ANTECEDENTES PARTICULARES.</b>	<b>16</b>
1.2.1 Metabolismo diáuxico de levaduras metilotróficas.	16
1.2.2 Fermentaciones de mezclas de sustratos en cultivos continuos.	17
1.2.3 Fermentaciones de mezclas de sustratos en cultivos por lote.	21
1.2.4 Modelamiento matemático de metabolismo diáuxico	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Microorganismo</b>	<b>26</b>
3.1.1 Pureza de la cepa	26
3.1.2 Conservación de la cepa.	26
<b>3.2 Composición del medio de cultivo.</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Preparación del inóculo.</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Equipo utilizado</b>	<b>28</b>
3.4.1 Fermentadores	28
<b>3.5 Sistemas fermentativos</b>	<b>28</b>

<b>3.6 Métodos analíticos</b>	<b>29</b>
3.6.1 Determinación de la concentración celular	29
3.6.2 Determinación de azúcares reductores	31
3.6.3 Determinación de metanol	31
3.6.4 Determinación de actividad de alcohol oxidasa	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Determinación de las condiciones del ensayo enzimático</b>	<b>33</b>
4.1.1 Permeabilización de la pared celular	33
4.1.2 Cinética enzimática	35
<b>4.2 Determinación del metanol evaporado</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Comportamiento cinético de <i>P. pastoris</i> en cultivos por lote</b>	<b>39</b>
4.3.1 Fuente de carbono: Glucosa	39
4.3.1.2 Biomasa y sustrato residual.	39
4.3.2 Fuente de carbono: Metanol	40
4.3.2.1 Biomasa y sustrato residual	40
4.3.2.2 Actividad de alcohol oxidasa	42
4.3.3 Fuente de carbono: Mezcla de glucosa y metanol.	44
4.3.3.1 Biomasa y sustrato residual.	44
4.3.2.2 Actividad de alcohol oxidasa	46
<b>4.4 Producción de la alcohol oxidasa en mezclas de glucosa-metanol</b>	<b>49</b>
4.4.1 Comportamiento cinético en los diferentes medios de cultivo.	51
4.4.2 Efecto de los factores.	54
<b>4.5 Comportamiento cinético de <i>P. pastoris</i> en cultivos continuos.</b>	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 1. Diseño de experimentos</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Vía para la oxidación del metanol por levaduras metilotróficas (Duff y Murray, 1988)	9
<b>Figura 1.2</b> Modelo propuesto para la formación de peroxisomas por brote en el retículo endoplásmico (Becker, 1986)	12
<b>Figura 1.3</b> Vías metabólicas empleadas por las levaduras metilotróficas para la conversión diáuxica de glucosa y metanol (Bryers y col., 1991)	18
<b>Figura 3.1</b> Procesamiento de las muestras de fermentación	30
<b>Figura 4.1</b> Producción de acetaldehído por alcohol oxidasa. Comparación de los tratamientos efectuados a las células	35
<b>Figura 4.2</b> Efecto de la concentración de sustrato en la actividad específica de alcohol oxidasa en Medio Murray con metanol al 1%, 15 minutos de ensayo a 25 °C.	36
<b>Figura 4.3</b> Cinética de evaporación de metanol	38
<b>Figura 4.4</b> Monitoreo en el medio de cultivo al adicionar el metanol evaporado, para las concentraciones de 5 y 10 g/l.	38
<b>Figura 4.5</b> Cinética de biomasa y consumo de sustrato. Fuente de carbono: glucosa 10 g/l	39
<b>Figura 4.6</b> Cinética de biomasa y consumo de metanol. Fuente de carbono: metanol 10 g/l	41
<b>Figura 4.7</b> Actividad total de alcohol oxidasa. Fuente de carbono: Metanol 10 g/l	43
<b>Figura 4.8</b> Actividad específica de alcohol oxidasa. Fuente de carbono: Metanol 10 g/l	43
<b>Figura 4.9</b> Velocidad específica de síntesis de alcohol oxidasa en metanol 10 g/l	44
<b>Figura 4.10</b> Cinética de crecimiento y sustratos residuales. Sustratos: Glucosa 10 g/l: Metanol 10 g/l	45
<b>Figura 4.11</b> Actividad de alcohol oxidasa. Sustrato: Glucosa 10 g/l: Metanol 10 g/l	47
<b>Figura 4.12</b> Actividad específica de alcohol oxidasa. Sustrato: Glucosa 10 g/l: Metanol 10 g/l	47
<b>Figura 4.13</b> Efecto de la composición de los diferentes medios de cultivo en el crecimiento de <i>P. pastoris</i>	52
<b>Figura 4.14</b> Efecto de la composición de los diferentes medios en la actividad de alcohol oxidasa de <i>P. pastoris</i>	53

<b>Figura 4.15</b> Efecto de los factores en la actividad de alcohol oxidasa	55
<b>Figura 4.16</b> Gráfica de probabilidad normal e histograma para los efectos	56
<b>Figura 4.17</b> Gráfica de residuos contra la actividad teórica de alcohol oxidasa	59
<b>Figura 4.18</b> Gráfica de probabilidad normal e histograma de residuos	60
<b>Figura 4.19</b> Gráficas de efectos e interacciones	61
<b>Figura 4.20</b> Efecto de metanol y glucosa sobre la actividad de alcohol oxidasa. Curvas de isorrespuesta. A: contorno de la superficie de respuesta y B: superficie de respuesta	62
<b>Figura 4.21</b> Efecto de metanol y extracto de levadura sobre la actividad de alcohol oxidasa. Curvas de isorrespuesta. A: contorno de la superficie de respuesta y B: superficie de respuesta	63
<b>Figura 4.22</b> Fermentación de <i>P. pastoris</i> en cultivo continuo. Medio de cultivo: Metanol 13 g/l, Glucosa 6 g/l, Ext Lev 0.7 g/l	65
<b>Figura 4.23</b> Fermentación de <i>P. pastoris</i> en cultivo continuo. Efecto de la D en la actividad total. Metanol 13 g/l, Glucosa 6 g/l, Ext Lev 0.7 g/l	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Levaduras y hongos capaces de crecer en metanol (Sahm, 1977)	5
<b>Tabla 1.2</b> Especificidad por el sustrato de la alcohol oxidasa de <i>Pichia pastoris</i> (Couderc y Baratti, 1980)	14
<b>Tabla 1.3</b> Propiedades de la alcohol oxidasa de varios microorganismos (Veenhuis y col., 1983)	14
<b>Tabla 3.1</b> Medios utilizados para mantenimiento, inóculo y fermentación de <i>P. pastoris</i>	27
<b>Tabla 3.2</b> Condiciones generales de operación	29
<b>Tabla 4.1</b> Ensayo de actividad con el método de la alcohol oxidasa-peroxidasa	34
<b>Tabla 4.2</b> Valores de $v_{max}$ y $K_m$ obtenidos con los dos medios.	36
<b>Tabla 4.3</b> Parámetros cinéticos obtenidos en glucosa y metanol	41
<b>Tabla 4.4</b> Relación entre los valores de los niveles codificados y los valores reales de los factores	50
<b>Tabla 4.5</b> Matriz de experimentos con los valores de los niveles codificados para los diferentes factores	50
<b>Tabla 4.6</b> Resultados del experimento factorial	54
<b>Tabla 4.7</b> Efectos ordenados y puntos de probabilidad	55
<b>Tabla 4.8</b> Análisis de varianza para la actividad de alcohol oxidasa	57
<b>Tabla 4.9</b> Residuos ordenados y puntos de probabilidad para los datos de actividad de alcohol oxidasa	59

## RESUMEN

Este trabajo tuvo como propósito aumentar la producción de la enzima alcohol oxidasa por la levadura *Pichia pastoris*. Esta enzima presenta aplicaciones potenciales varias y se puede manipular bajo diversas condiciones de reacción. La alcohol oxidasa se produce intracelularmente por levaduras metilotróficas, siendo *Hansenula polymorpha* y *P. pastoris* las levaduras más estudiadas. La enzima se localiza en los peroxisomas y cataliza el primer paso de la vía desasimilatoria del metanol, de tal forma que la levadura puede crecer en este sustrato.

La síntesis de alcohol oxidasa es reprimida por la presencia de glucosa. En este trabajo se manejaron mezclas de glucosa y metanol bajo condiciones tales que permitieron la producción de la enzima. Se empleó la glucosa como una segunda fuente de carbono porque el crecimiento celular en metanol es muy limitado buscando con ello el aumentar la producción de biomasa y, en consecuencia, la productividad de alcohol oxidasa.

Se realizaron cultivos por lote utilizando como fuente de carbono a la glucosa, al metanol y mezcla de ambos. En el caso de la mezcla de glucosa y metanol cada una con una concentración de 10 g/l el valor de actividad total máxima fue de 380 U, valor menor al obtenido cuando se utilizó metanol como única fuente de carbono (950 U). Esto indica que la presencia de glucosa afecta la producción de la enzima pero no la reprime totalmente. Los rendimientos de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) en las fermentaciones con metanol y glucosa como únicas fuentes de carbono fueron de 0.34 y 0.4 respectivamente, mientras que en el caso de la mezcla el rendimiento fue menor con un valor de 0.32.

Con los resultados generados se llevó a cabo un diseño factorial para el mejoramiento del medio de cultivo, el cual fue evaluado en cultivos por lote. La glucosa, el metanol y el extracto de levadura se seleccionaron como los componentes que más influyen en el medio para la producción de la enzima. En estas fermentaciones también se muestreó a intervalos cortos para detectar condiciones puntuales exactas donde ocurren transiciones críticas.

Del análisis del diseño factorial se determinaron los efectos de los factores, resultando ser el más importante la interacción de metanol con glucosa. Los demás efectos, salvo la interacción de metanol con extracto de levadura, también son

significativos pero en menor grado. Con estos datos se generó un modelo estadístico que predice satisfactoriamente la actividad de alcohol oxidasa (U/l) obtenida en los experimentos factoriales y con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.99.

El medio con el que se obtuvo la mayor actividad contenía glucosa 2 g/l, metanol 7 g/l y extracto de levadura 1.3 g/l, con un valor de 240 U/l, cercano al obtenido únicamente con metanol. Esto indica que haciendo un balance adecuado de estos nutrientes es posible obtener actividades similares a las resultantes para metanol.

Posteriormente se empleó uno de estos medios (metanol 13 g/l, glucosa 6 g/l y extracto de levadura 0.7 g/l) en cultivo continuo de etapa simple. En este sistema la mayor actividad (300 U/l) se observó a bajas velocidades de dilución y fue disminuyendo conforme aumentaba la velocidad de dilución. Por otra parte el metanol solo fue aprovechado a bajas velocidades de dilución, mientras que la glucosa fue consumida a cualquier valor.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tecnología enzimática es una de las actividades biotecnológicas que han llegado a su fase productiva, en la que se busca obtener mayores utilidades de las investigaciones realizadas por medio de la aplicación práctica en el procesamiento industrial empleando microorganismos y otros agentes biológicos. El resultado ha sido la producción de enzimas a escala industrial, la purificación y estabilización de éstas y su amplio uso en la fabricación de alimentos, medicinas, detergentes, etc. De hecho los procesos fermentativos han sido la base para la creación de la biotecnología enzimática, ya que estos procesos se llevan a cabo por reacciones catalizadas por enzimas. El uso de enzimas con propósitos tecnológicos supone utilizarlas como catalizadores de un proceso de transformación de materias primas en productos de valor agregado.

Las enzimas parcialmente purificadas se utilizan en lugar de los microorganismos intactos, o de los tejidos vivos, con la ventaja de incrementar la especificidad de la reacción química. De esta manera se obtiene un producto deseado con el máximo control sobre la calidad y rendimientos y el mínimo de productos colaterales indeseables (Wiseman, 1975). Sin embargo lo anterior representa un reto tecnológico debido a la labilidad de las enzimas y es por eso que existen pocos procesos enzimáticos operativos a gran escala (Illanes, 1994).

Las enzimas son biocatalizadores que llevan a cabo reacciones bioquímicas específicas en los procesos metabólicos de las células vivas. Presentan elevada especificidad respecto a su sustrato, aceleran reacciones químicas específicas sin formación de subproductos, poseen alta eficiencia en la conversión de sustrato a producto y elevada actividad en condiciones ambientales moderadas. Sin embargo, su estructura proteica las hace lábiles y difíciles de manipular en sistemas *in vitro*. Debido a estas propiedades las enzimas ofrecen ventajas para su aplicación práctica en diversas áreas y a nivel industrial con respecto a otros catalizadores. A comienzos de la década de los 60 más del 70 % del mercado mundial de enzimas era obtenido de plantas y órganos animales, mientras que en la actualidad sucede lo contrario, ya que el 75 % son enzimas de origen microbiano, el resto corresponde a quimosina o renina del cuajo, amilasas de cereales germinados y proteasas de origen vegetal (Smith, 1988; Chaplin y Bucke, 1990; Illanes, 1994).

Los microorganismos son la fuente preferida de enzimas debido a su alta velocidad de síntesis, alto rendimiento de conversión de sustrato en proteína enzimática y alta actividad específica. Además para producirlas existe suficiente disponibilidad de materias primas con una composición relativamente constante, y su producción no está sujeta a variaciones estacionales. A lo anterior debe agregarse que la ingeniería genética ha incrementado las posibilidades de optimizar los rendimientos y las propiedades de los catalizadores a través de mutaciones, selección de cepas o bien mediante la tecnología del DNA recombinante (Smith, 1988; Chaplin y Bucke, 1990; Illanes, 1994).

La enzimas presentan muchas aplicaciones, por ejemplo, como catalizadores en procesos industriales, en la medicina, en la investigación (sobre todo en genética molecular e ingeniería genética), como sensores enzimáticos para control de procesos, en tratamiento de efluentes y en síntesis orgánica, entre otras.

Debido a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se busca aumentar la producción de la enzima alcohol oxidasa, enzima de particular interés como herramienta biotecnológica debido a las amplias aplicaciones potenciales que presenta y a las diversas condiciones de reacción en las que se puede manipular su síntesis.

Esta enzima se produce intracelularmente por levaduras metilotróficas encontradas en los géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia* y *Hansenula* (Sudbery y Gleeson, 1989), y son *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris*, las levaduras más estudiadas. Estas presentan la habilidad de crecer en metanol como única fuente de carbono y forman microcuerpos llamados peroxisomas, donde se localiza la enzima alcohol oxidasa. Esta enzima cataliza el primer paso del metabolismo del metanol, el cual comprende los procesos biosintéticos llamados anabolismo (asimilación) y los procesos de degradación o catabolismo (desasimilación) que dan como resultado una liberación de energía, de tal forma que la levadura puede utilizar este sustrato.

La síntesis de alcohol oxidasa es reprimida por la presencia de glucosa, sin embargo se ha estudiado la posibilidad de manejar medios con mezclas de glucosa y metanol que resulten en la acumulación de la enzima (Duff y Murray, 1988; Giuseppin, 1989; Bryers y Yeh, 1990) ya que en metanol la levadura crece muy poco. Debido a lo anterior, resulta necesario profundizar en el conocimiento fisiológico de la enzima alcohol oxidasa con el fin de aumentar su producción. En este trabajo se plantea maximizar la producción de alcohol oxidasa por la levadura *P. pastoris*, definiendo las concentraciones de metanol y glucosa apropiadas, para lo cual se llevarán a cabo fermentaciones en diversos sistemas de cultivo.

## 1.1 ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1.1 Las levaduras

Las levaduras son un grupo de microorganismos que filogenéticamente pertenecen al reino fungi (Kurtzman, 1988). La clasificación más aceptada tiene tres subdivisiones: Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina. El término "levadura" describe organismos eucarióticos predominantemente unicelulares. Su reproducción vegetativa puede ser por gemación o fisión (Kurtzman, 1988; Stewart, 1981) y se conocen aproximadamente 60 géneros y 500 especies (Lachance, 1987). Las levaduras pertenecen al reino fungi al igual que los hongos filamentosos. Se diferencian de estos por su forma dominante unicelular, y se reproducen con mayor facilidad. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y presentan una gran capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales diversas, como son: la composición del suelo, temperatura, luz, humedad, etc. Este grupo de microorganismos presenta propiedades de interés como son: tolerancia a intervalos amplios de temperatura, pH, tensión de oxígeno, concentración de sales y de azúcares, capacidad para crecer en gran diversidad de sustratos, facilidad de manejo y algunas tienen ciclo de vida sexual.

Los estudios sobre la fisiología y bioquímica de las levaduras son más antiguos que las disciplinas por sí mismas, ya que el estudio del papel de las levaduras en diversos procesos nos indican la relevancia de las mismas en el desarrollo de la bioquímica. Muchos de estos estudios se llevaron a cabo debido a la importancia de las levaduras en la producción de bebidas alcohólicas y en la panificación. Aunque los requerimientos de las levaduras para su crecimiento no son complejos, sí son extremadamente sensibles a cambios en las condiciones de crecimiento, como pueden ser la naturaleza y concentración de la fuente de carbono y la disponibilidad del oxígeno, que determinan el rendimiento celular y los productos de la fermentación. Como todos los microorganismos, las levaduras obtienen de su entorno las sustancias necesarias para la síntesis de su material celular y la producción de energía para llevar a cabo los procesos biosintéticos; de acuerdo a lo anterior cuando se cultiva una levadura en un medio sintético éste debe de contener todos los elementos esenciales en proporciones adecuadas para su crecimiento (Cartledge, 1987).

La naturaleza del sustrato y las características del mecanismo de transporte para su utilización son de vital importancia para entender el metabolismo de las levaduras ya que pueden crecer en una amplia variedad de sustratos (carbohidratos o no carbohidratos) y generan diversos metabolitos. En el caso de producción de proteína unicelular las levaduras presentan mayores ventajas con respecto a las bacterias porque además de que tradicionalmente son aceptadas en alimentos y

bebidas contienen bajos niveles de ácidos nucleicos y pueden crecer a valores bajos de pH. En ocasiones es posible eliminar la esterilización de medios y equipo (Urakami y col., 1983). Además las células de levaduras son más grandes que las de bacterias lo cual representa una ventaja durante las etapas post-fermentativas de recuperación.

#### 1.1.1.1 Levaduras metilotróficas

En décadas recientes se ha estudiado la utilización de sustratos no convencionales como fuente de carbono y energía, tales como las parafinas, los n-alcanos, el metano y el metanol para la producción de proteína unicelular y enzimas (Osumi y col., 1975; Windass y col., 1980; Kemp y col., 1988). Evidentemente también se han utilizado estos sustratos por el interés de generar conocimiento ya que los estudios fisiológicos de estos microorganismos han dado resultados por demás interesantes. El crecimiento microbiano en metanol en ocasiones se incluye en el estudio del crecimiento en hidrocarburos ya que el metanol es el primer producto de la oxidación del metano. El metanol presenta varias ventajas como sustrato: a) alta pureza; b) es completamente miscible en agua y por lo tanto no existen problemas de crecimiento en interfases; c) no es explosivo y por lo tanto es fácil de manejar y almacenar; d) al ser líquido se transporta fácilmente; e) debido a su volatilidad se puede remover fácilmente del producto final, esta ventaja en la recuperación de producto representa una desventaja durante la fermentación; f) no presenta riesgos de contaminación y por lo tanto no requiere esterilizarse. Sin embargo presenta dos desventajas principales: debido a su volatilidad las pérdidas por evaporación pueden ser importantes y el costo del metanol comparado con otros sustratos es mucho mayor pues llega a representar cerca del 60 % de los costos totales, comparado con el 40 % para otros sustratos comerciales (Sahm, 1977; Cartledge, 1987).

Como consecuencia del interés científico e industrial en los microorganismos metilotróficos se han realizado varios estudios relacionados con su aislamiento, identificación y fisiología. Se han encontrado más de cien bacterias asimiladoras de metanol, las cuales pueden ser metilotróficas obligadas o facultativas. No fue sino hasta 1969 que Ogata y colaboradores reportaron por vez primera levaduras metilotróficas, específicamente *Kloeckera sp.* 2201, la cual fue re-identificada más recientemente como una cepa de *Candida boidinii*. van Dijken y colaboradores (1975) aislaron levaduras a partir de muestras de suelo ricas en materia orgánica. En la Tabla 1.1 se presenta una lista de algunas levaduras metilotróficas y sólo tres hongos que son capaces de crecer en metanol. Es importante señalar que estos microorganismos son metilotróficos facultativos.

**Tabla 1. 1 Levaduras y hongos capaces de crecer en metanol (Sahm, 1977).**

<b>1. Levaduras</b>	
<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia haplophila</i>
<i>methanolica</i>	<i>lindnerii</i>
<i>N-16</i>	<i>pastoris</i>
<i>parapsilosis</i>	<i>pinus</i>
<i>tropicalis</i>	<i>trahalophila</i>
<i>Hansenula capsulata</i>	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>glycozima</i>	<i>methanodomerquii</i>
<i>henricii</i>	<i>methanolovescens</i>
<i>minuta</i>	<i>methanosorbosa</i>
<i>nonfermentans</i>	<i>molischiana</i>
<i>philodendra</i>	<i>nemodentra</i>
<i>polymorpha</i>	<i>nitratophila</i>
<i>wickerhamii</i>	<i>pinus</i>
<b>2. Hongos</b>	
<i>Gliocladium deliquescens</i>	
<i>Paecilomyces varioti</i>	
<i>Trichoderma lignorum</i>	

### 1.1.1.2 Requerimientos de los microorganismos metilotróficos.

Debido a que el metanol es uno de los principales subproductos en el proceso de refinación del petróleo se pensó en su utilización potencial como fuente de carbono para la producción de biomasa. El desarrollo del proceso para producción de biomasa por microorganismos metilotróficos utilizando metanol como fuente de carbono requirió investigaciones exhaustivas acerca del diseño del reactor, las condiciones de operación y el medio de cultivo más adecuados. El interés en la producción de biomasa fue acompañado de estudios fisiológicos de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol y por supuesto su producción.

El medio sintético usado en el proceso incluye metanol y otros compuestos químicos bien definidos como son fosfatos, sulfatos, amonio o nitrato, magnesio,

potasio, calcio, sales de fierro y elementos traza; algunos microorganismos requieren la adición de vitaminas. En estudios realizados con las levaduras metilotróficas *H. polymorpha* y *C. boidinii* se observó que aunque estas levaduras presentaban vías metabólicas idénticas (de asimilación y desasimilación), el rendimiento celular durante el crecimiento en metanol variaba. Estas variaciones se debían a la composición del medio y principalmente al contenido de elementos traza cuya limitación produce bajos rendimientos celulares (Egli y Fiechter, 1981).

En el caso de los microorganismos metilotróficos se reporta que hay inhibición por sustrato si la concentración excede los 10 g/l pero esto depende de las condiciones nutricionales, de operación así como el microorganismo utilizado (Giuseppin, 1989). El intervalo de pH óptimo de crecimiento de levaduras metilotróficas es muy amplio. Las temperaturas de operación para bacterias pueden ir de 35 a 42 °C y para levaduras entre 30-32°C.

El oxígeno también juega un papel muy importante en el crecimiento y producción de las enzimas del metabolismo del metanol ya que las limitaciones de oxígeno producen reacciones indeseables en el cultivo. En el medio de fermentación el oxígeno presenta una solubilidad muy baja, cuando proviene del aire su concentración en solución acuosa es del orden de 6 a 8 ppm (mg/l). Los requerimientos de las células pueden variar ampliamente dependiendo del microorganismo, pero la demanda para el crecimiento del microorganismo aerobio es alta y el oxígeno disuelto es consumido rápidamente es por eso que debe ser suministrado continuamente (Lee, 1992). En el caso de las levaduras metilotróficas la limitación de oxígeno puede causar inactivación catabólica lo que implica una disminución en la síntesis de las enzimas del metabolismo del metanol ( Murray y col., 1990a; Duff y Murray, 1991).

Los rendimientos de biomasa obtenidos en general para levaduras y hongos se ubican en el rango de  $Y_{x/s} = 0.2$  a  $0.4$ , mientras que las bacterias presentan rendimientos más altos, con valores de  $Y_{x/s}$  de  $0.4$  a  $0.5$  (Faust y Sittig, 1977).

## **1.1.2 Metabolismo de metanol por levaduras**

### **1.1.2.1 Desasimilación de metanol**

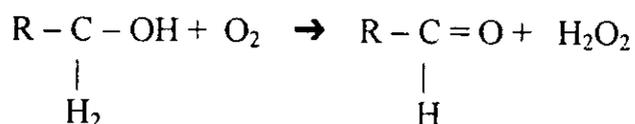
#### **1.1.2.1.1 Oxidación del metanol a formaldehído**

De acuerdo a los estudios realizados con las levaduras metilotróficas, éstas presentan un catabolismo parecido y todas las enzimas aisladas de estas levaduras

son muy similares. El metabolismo de metanol inicia en organelos especializados llamados peroxisomas donde el metanol es oxidado a formaldehído por la enzima alcohol oxidasa y se forma peróxido de hidrógeno en esta reacción. Este subproducto es degradado a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> por la enzima catalasa que también se encuentra en los peroxisomas. La estequiometría de la reacción es la siguiente:



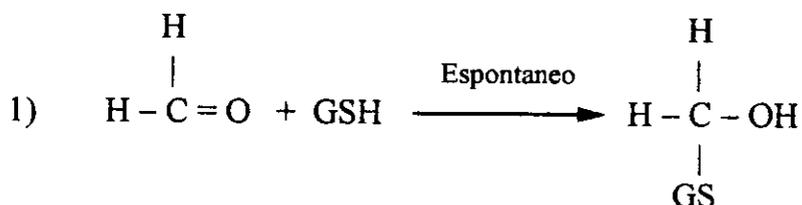
Aparte del metanol, los alcoholes alifáticos primarios así como el formaldehído en su forma hidratada (metilen glicol) también sirven como sustratos y son oxidados *in vitro* por la alcohol oxidasa de acuerdo a la siguiente ecuación general:

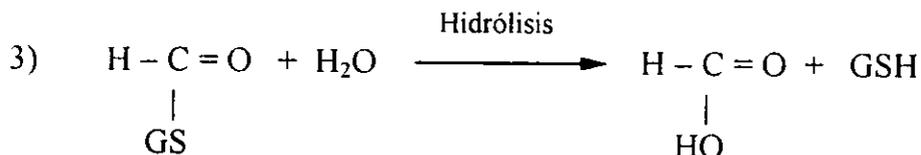
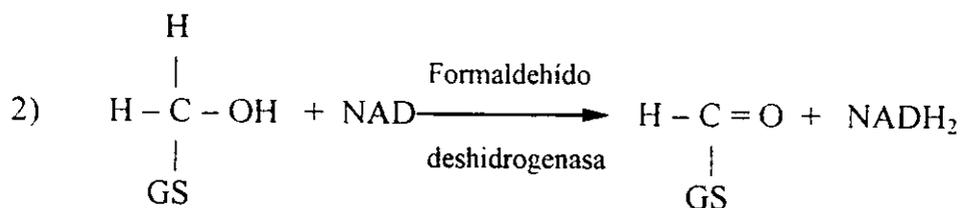


De esta manera tenemos que en las levaduras metilotróficas el metanol puede ser oxidado a formaldehído por medio de la alcohol oxidasa la cual requiere oxígeno para llevar a cabo la reacción produciéndose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y formaldehído. Algunos estudios indican que la catalasa no sólo cataliza la reacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> sino que también tiene una función peroxidativa y oxida metabolitos con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado, en este caso el metanol puede servir como donador de protones (Sahm, 1977).

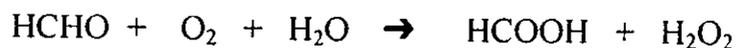
#### 1.1. 2.1.2 Oxidación de formaldehído a formato

En todas las levaduras metilotróficas estudiadas se ha encontrado la enzima formaldehído deshidrogenasa unida al NAD y dependiente de glutatión (GSH). Esta enzima es un dímero compuesto probablemente de dos subunidades idénticas y requiere glutatión para su actividad. En algunas levaduras como *C. boidinii*, el formaldehído y el glutatión forman espontáneamente el hemimercaptal el cual se asume es el sustrato verdadero de la formaldehído deshidrogenasa (Sahm, 1977; Sibirny y col., 1988). Veenhuis y colaboradores (1983) informan que la formato deshidrogenasa de *H. polymorpha* por si misma puede tener actividad de hidrolasa. La reacción de oxidación del formaldehído a formato se lleva a cabo en los siguientes pasos:





Recientemente se ha encontrado que la alcohol oxidasa también puede oxidar al formaldehído con la siguiente reacción:

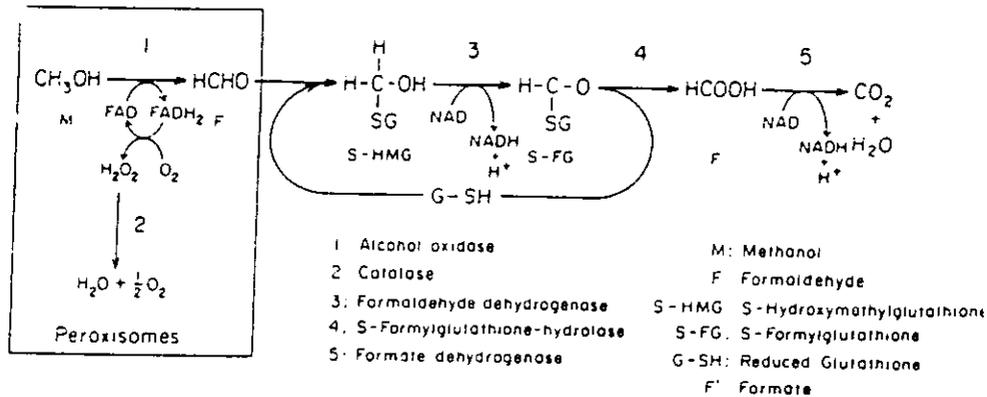


#### 1.1.2.1.3 Oxidación de formiato a dióxido de carbono

El formaldehído puede salir del peroxisoma hacia el citoplasma donde puede ser 1) oxidado hasta  $\text{CO}_2$  por la formaldehído deshidrogenasa; o bien 2) junto con la xilulosa-5-P por medio de la dihidroxiacetona sintasa reagruparse para formar dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-P, los cuales son transportados hasta el citoplasma para ser asimilados por el ciclo de la xilulosa monofosfato.

En las levaduras metilotróficas la glucosa es metabolizada pasando una porción a la y la porción restante al ciclo oxidativo de las pentosas. En mezclas de glucosa y metanol en quimiostato, donde existe limitación de la fuente de carbono, las levaduras metilotróficas pueden asimilar ambos sustratos simultáneamente, suponiéndose que mientras la glucosa es metabolizada vía glucólisis y ciclo de las pentosas fosfato, el metanol es asimilado por el ciclo de la xilulosa monofosfato.

En la figura 1.1 se presenta la vía para la oxidación del metanol para levaduras metilotróficas.



**Figura 1.1 Vía para la oxidación del metanol por levaduras metilotróficas (Duff y Murray, 1988).**

### 1.1.2.2 Asimilación de metanol

Los estudios de la asimilación de metanol en levaduras indican que el metanol es incorporado al material celular vía las hexosas fosforiladas. Esto sugiere que la vía de fijación de formaldehído en levaduras, es similar a la encontrada en ciertas bacterias (vía ribulosa monofosfato de fijación de formaldehído). Quayle y colaboradores de acuerdo a lo informado por Sahm (1977) encontraron que en las bacterias existían tres diferentes vías por medio de las cuales se asimilan los compuestos de carbono en nuevo material celular; estas vías son:

- 1) Ciclo de la ribulosa difosfato (ciclo de Calvin)
- 2) Ciclo de la ribulosa monofosfato
- 3) Vía de la serina

En las levaduras crecidas en metanol se forman las hexosas fosfatadas a partir de triosas fosfatadas, en contraste con la vía de la ribulosa monofosfato en la cual se forman triosas fosfatadas a partir de hexosas fosfatadas. Lo anterior llevó a establecer un vía de la xilulosa fosfato para la fijación del formaldehído, donde la reacción clave es una condensación de tipo transcetolasa de la xilulosa 5-fosfato con formaldehído para formar gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona. La enzima que cataliza la reacción es la dihidroxiacetona sintetasa.

Por lo tanto la vía de asimilación de metanol puede describirse con la siguiente secuencia:

Metanol → Formaldehído → Hexulosa fosfato → Constituyentes celulares

### 1.13 Papel de los peroxisomas en el metabolismo del metanol

#### 1.1.3.1 Estructura y función

El peroxisoma es un organelo esférico con un diámetro entre 0.2 y 1.0  $\mu\text{m}$  que se encuentra rodeado por una membrana. Los peroxisomas varían en su contenido de enzimas y en su función metabólica dependiendo del tipo de célula y de su medio ambiente. Se han determinado varias capacidades bioquímicas en muchos peroxisomas de animales, plantas y microorganismos: respiración (basada en el metabolismo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), procesamiento de compuestos tóxicos, oxidación de ácidos grasos, catabolismo de sustancias inusuales, oxidación del exceso de NADH y regulación de la tensión de oxígeno (Lazarow y Fujiki, 1985; Becker, 1986). Por ejemplo en *Candida tropicalis* crecida en un medio con ácidos grasos como única fuente de carbono se favorece la inducción de peroxisomas y de las enzimas de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (Tanaka y col., 1982).

En forma similar, las levaduras metilotróficas como *H. polymorpha*, *C. boidinii* y *P. pastoris* responden a un medio con metanol con la inducción de peroxisomas y de las enzimas peroxisomales del metabolismo del metanol (Aitchison y col., 1992). En trabajos realizados con mutantes deficientes en peroxisomas (van der Klei y col., 1991), se encontró que las mutantes de *H. polymorpha* eran incapaces de crecer en metanol y que la ausencia de peroxisomas intactos resultaba en problemas como la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y formaldehído. De lo anterior resalta la importancia que presenta la formación de estos organelos en el metabolismo de metanol.

Es importante señalar que bajo ciertas condiciones de cultivo los peroxisomas pueden ocupar el 80% del volumen celular, lo cual demuestra que estos organelos deben tener una gran capacidad de almacenamiento (Veenhuis y col., 1983; Hoop y col., 1991).

La habilidad para inducir los peroxisomas y las enzimas peroxisomales convierte a las levaduras en un sistema muy atractivo para el estudio de la biogénesis de los peroxisomas, para la clonación de genes que codifican para estas enzimas y en

la obtención de mutantes sobreproductoras (Sudbery y Gleeson, 1989; Aitchinson y col., 1992; Kiel y col., 1995).

Varias vías metabólicas requieren la participación de enzimas peroxisomales que actúan junto con otras enzimas intracelulares, pero aún se conoce poco acerca de estas vías. Existe evidencia muy fuerte de que la membrana peroxisomal en las células intactas no es permeable libremente a los metabolitos, sino que el transporte de éstos es mediado por translocadores específicos. También se han logrado avances en el entendimiento de la biogénesis peroxisomal, ya que se sabe que las proteínas peroxisomales son sintetizadas en los ribosomas libres e incorporadas postranscripcionalmente dentro de los peroxisomas preexistentes, los cuales crecen y se dividen (van der Bosch y col., 1992; Subramani, 1993).

De acuerdo a estudios realizados sobre el metabolismo de compuestos de un solo carbono en levaduras, los peroxisomas se adaptan al ambiente en el cual crecen los microorganismos. Por ejemplo, en levaduras metilotróficas crecidas en glucosa, durante el crecimiento exponencial es difícil detectar a los peroxisomas y su función fisiológica es incierta, pero cuando las levaduras crecen en un medio con metanol como fuente de carbono se forman un gran número de peroxisomas ricos en catalasa y alcohol oxidasa, esta última involucrada en el primer paso de oxidación del metanol (van Dijken y col., 1975; Sahn, 1977). Una respuesta similar se ha observado en levaduras crecidas en n-alcenos (octadecano, hexadecano, etc.) donde las levaduras utilizan el sistema de  $\beta$ -oxidación de los peroxisomas (Kemp y col., 1988; Belov y col., 1995). Incluso se ha propuesto una vía para el metabolismo de alcanos que involucra una alcohol oxidasa "grasa" la cual presenta propiedades distintas a la alcohol oxidasa conocida (Kemp y col., 1988).

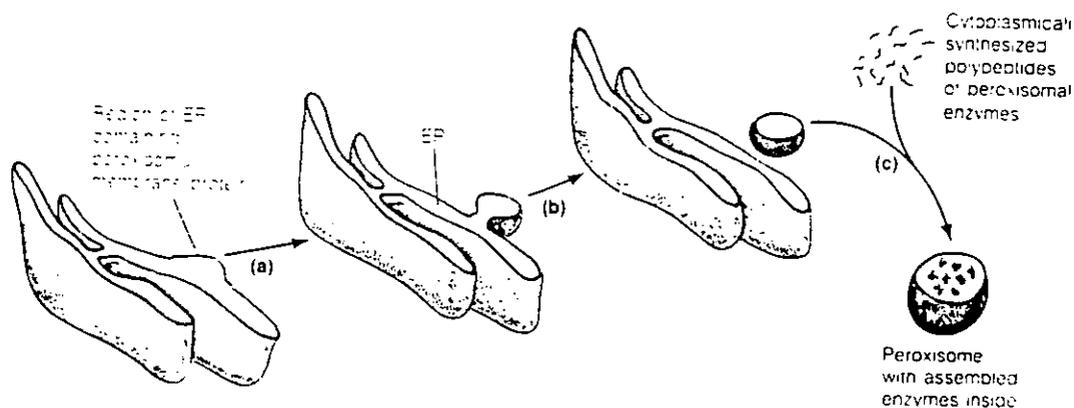
Se ha observado que el proceso de proliferación de peroxisomas se revierte rápidamente, ya que algunos estudios indican que al transferir las células crecidas en metanol a un medio con glucosa, los peroxisomas desaparecen rápidamente como resultado de una degradación. Este rápido ajuste de funciones dependiente de las condiciones ambientales, indica que la levadura está provista de un sistema muy complejo de biogénesis y desactivación de los peroxisomas (Veenhuis y col., 1983).

### **1.1.3.2 Biogénesis de peroxisomas**

Los peroxisomas en las levaduras aparecen en racimos y existen en una asociación cerrada con el retículo endoplásmico. Estos microcuerpos están rodeados de una membrana de aproximadamente 7 nm (70 Å) que difiere de las membranas de otros organelos por sus propiedades fisicoquímicas como son: mayor labilidad, contiene menos proteínas y presenta diferencias en sus gradientes de pH y funciones

fisiológicas (Biryuzova y Pomoshchnikova, 1996). El tamaño, número y subestructura de los organelos depende de las condiciones de cultivo.

En la figura 1.2 se presenta el posible modelo para la formación de peroxisomas por un brote en el retículo endoplásmico (RE). Las proteínas de la membrana del peroxisoma probablemente son sintetizadas en el RE rugoso y posteriormente insertadas en la membrana del RE en una región específica que dará lugar al peroxisoma. Las enzimas de la matriz peroxisomal son sintetizadas en el citoplasma y transportadas a través de la membrana peroxisomal como péptidos individuales. El proceso final de ensamble y activación de estas enzimas ocurre en el organelo y las enzimas peroxisomales activas se encontrarán sólo en el peroxisoma. Las enzimas peroxisomales no son glicosiladas y por lo tanto deben de tener otra característica estructural para ser transportadas al organelo correcto (Becker, 1986; van der Bosch y col., 1992). Algunos investigadores han sugerido la participación del aparato de Golgi en la formación de los peroxisomas ya que en levaduras, especialmente en la fase logarítmica y estacionaria, el RE no está muy desarrollado. Por el contrario, durante esas fases la síntesis de membranas del aparato de Golgi (responsable de la formación de lisosomas, fagocitosis, eliminación de residuos en la célula) se encuentra muy activa (Biryuzova y Pomoshchnikova, 1996).



**Figura 1.2 Modelo propuesto para la formación de peroxisomas por brote en el retículo endoplásmico (Becker, 1986).** (a) Una región localizada del RE contiene las proteínas de la membrana peroxisomal, y empieza a formarse un brote, (b) eventualmente se va separando el brote, (c) los polipéptidos de las enzimas peroxisomales, que son sintetizados en los ribosomas libres del citoplasma, se van adicionando.

## 1.1.4 Enzima alcohol oxidasa

### 1.1.4.1 Propiedades generales de la alcohol oxidasa

La alcohol oxidasa se encuentra asociada a la enzima catalasa en el peroxisoma. El formaldehído que se genera en el peroxisoma es degradado por las enzimas citosólicas para producir CO<sub>2</sub> y energía, como ya se había mencionado anteriormente. La alcohol oxidasa ha sido purificada y caracterizada de las levaduras *Kloeckera sp.*, *C. boidinii*, *Candida N-16*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*, siendo química y estructuralmente muy similar para todos estos géneros.

La alcohol oxidasa es una flavoproteína ya que su grupo prostético es el FAD. El peso molecular de la enzima se estima en 600 000 a 670 000 daltones, está compuesta por 8 subunidades idénticas (peso molecular entre 74 000 a 83 000) y cada una conteniendo una molécula de FAD. Al parecer es un octámero agregado, compuesto por dos tétradas (Sahm, 1977; Müller y col., 1990).

Se ha encontrado que esta enzima no es específica para metanol, sino que también puede oxidar al formaldehído y a gran diversidad de alcoholes primarios de cadena corta, aunque a menor velocidad que el metanol, como son: etanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propen-1-ol, 2-buten-1-ol, 2-cloroetanol y 2-bromoetanol. La presencia de ramificaciones y el aumento de la cadena disminuyen la actividad (Couderc y Baratti, 1980).

En la tabla 1.2 se indican los porcentajes de actividad relativa de algunos alcoholes con respecto al metanol ya que éste es el mejor sustrato para la enzima. Es importante señalar que estos resultados son *in vitro* ya que la levadura sólo puede asimilar metanol.

La enzima alcohol oxidasa se encuentra presente en cantidades importantes durante el crecimiento de levaduras metilotróficas en metanol. En la tabla 1.3 se reportan algunas propiedades de la alcohol oxidasa obtenida de diferentes microorganismos, donde resalta una ligera variabilidad en los reportes de las constantes cinéticas respectivas.

**Tabla 1. 2 Especificidad por el sustrato de la alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (Couderc y Baratti, 1980)**

Sustrato	Actividad Relativa [ % ]
Metanol	100
Etanol	82
1-Propanol	43
2-Propanol	2
1-Butanol	20
Isobutanol	1.2
Terbutanol	0
n-Octanol	0

Las actividades fueron obtenidas a partir de datos de consumo de oxígeno.  
Las concentraciones de oxígeno y alcohol fueron de 0.93 mM y 10 mM respectivamente.

**Tabla 1.3 Propiedades de la alcohol oxidasa de varios microorganismos (Veenhuis y col., 1983)**

Fuente	$K_m$ [mM] Metanol	$K_m$ [mM] Etanol	$K_m$ [mM] Formaldehído	$V_{max}$ metanol	Peso molecular
<b>HONGOS</b>					
<i>Polyporus sp.</i>	1.52	10.0	---	25.1	300,000
<i>Poria contigua</i>	0.2	1.0	6.1	20.0	610,000
<b>LEVADURAS</b>					
<i>Kloeckera sp 2201</i>	1.25	2.5	---	11.0	570,000 <sup>a</sup>
<i>Kloeckera sp 2201</i>	0.44	2.5	2.4	8.5	673,000 <sup>b</sup>
<i>H. polymorpha</i>	0.23	4.4	2.6	11.3	669,000
<i>H. polymorpha</i>	1.30 <sup>c</sup>	7.2	4.7	56.3	616,000
<i>Candida boidinii</i>	2.0	2.62	5.7	3.4	600,000
<i>Candida N16</i>	2.12	---	---	3.5	210,000
<i>Candida 25A</i>	0.019	0.13	---	2.8	520,000
<i>Pichia pastoris</i>	1.4 <sup>c</sup>	---	---	11.9	675,000
<i>Pichia sp.</i>	0.5	---	3.5	6.6	300,000

$V_{max}$  = [uM/min·mgProteína]

a Determinada por sedimentación (velocidad de centrifugación).

b Determinada por sedimentación (equilibrio de centrifugación).

c Determinada por saturación de aire.

#### 1.1.4.2 Aplicaciones de la enzima alcohol oxidasa.

La habilidad que presenta la alcohol oxidasa para oxidar una gran variedad de alcoholes primarios de cadena corta, además de su relativa estabilidad en un amplio rango de condiciones, hace posible que esta enzima presente gran número de aplicaciones potenciales en el área de la biotecnología (Murray y Duff, 1990).

El uso de esta enzima no sólo se limita a los sistemas acuosos ya que también se ha utilizado en las conversiones enzimáticas en fase gas y en sistemas donde las enzimas se encuentran suspendidas en disolventes orgánicos con poca agua o incluso sin ésta. La transformación de sustratos gaseosos por enzimas deshidratadas permite que se amplíe el rango de reacciones que pueden llevarse a cabo por biocatálisis, con las siguientes ventajas sobre las reacciones en fase acuosa: 1) las enzimas deshidratadas son más resistentes a la termoinactivación, por lo que se pueden manejar temperaturas elevadas; 2) La difusión en fase gas es más grande que en fase acuosa; 3) muchos sustratos gaseosos tienen baja solubilidad en agua que disminuye aún más al aumentar la temperatura; por el contrario en fase gas se puede aumentar la concentración de estos sustratos al incrementar la presión en el sistema y 4) la separación de los productos resulta más fácil y menos costosa que en medio acuoso. (Barzana y col., 1989).

La alcohol oxidasa puede ser utilizada en ensayos para cuantificar alcoholes (metanol, etanol) y oxígeno el cual se requiere para la reacción enzimática, o incluso en biosensores. También se usa para la producción de aldehídos saborizantes. Por ejemplo, se han realizados trabajos donde se produce acetaldehído a partir de etanol. El acetaldehído es un intermediario importante en la industria química en la manufactura de ácido acético, butanol, butiraldehído, cloral, piridinas, etc. y presenta aplicaciones como aditivo en alimentos (ya que se genera en forma natural en frutas impartiendo un sabor de frescura). El acetaldehído se produce sintéticamente por la oxidación catalítica de etanol o etileno, pero el interés se enfoca a su producción por métodos biológicos, debido a la demanda de los consumidores por los productos naturales. De esta manera se pueden emplear ya sea la enzima purificada o la levadura entera para producir acetaldehído "grado-alimenticio" ya sea en fase acuosa o en fase gas. (Armstrong y col., 1984; Herzberg y Rogerson, 1985; Legoy y col., 1985; Barzana y col., 1989; Duff y col., 1989; Nelles y col., 1990; Chiang y col., 1991).

Se han realizado oxidaciones de alcoholes alifáticos y aromáticos de peso molecular alto por medio de células de levaduras metilotróficas como *P. pastoris* y *C. tropicalis*, por ejemplo el hexanal, el dodecanal y el alcohol bencílico. Este último es oxidado a benzaldehído el cual es un compuesto importante en la industria de saborizantes ya que también es conocido como aceite amargo de almendras

(Kemp y col., 1988; Duff y Murray, 1989; Murray y Duff, 1990). También se ha considerado la producción enzimática de peróxido de hidrógeno y de formaldehído (Baratti y col., 1978; Sakai y Tani, 1988; Tani y col., 1988; Nelles y col., 1990).

## 1.2 ANTECEDENTES PARTICULARES.

### 1.2.1 Metabolismo diáuxico de levaduras metilotróficas.

Los estudios fundamentales del crecimiento de los microorganismos y su metabolismo se habían restringido a cultivos puros empleando una única fuente de carbono y energía. Posteriormente se observó que muchos microorganismos eran capaces de crecer en mezclas binarias de fuentes de carbono, y a este fenómeno se le llamó "metabolismo diáuxico" el cual fue descubierto por Monod y nos permite comprender el crecimiento del microorganismo (Kompala y col., 1986), ya que la presencia de dos sustratos como fuente de carbono y energía representa un dilema regulatorio, por lo que cuando es cultivado en estas condiciones, el microorganismo consume primero sólo el sustrato con el cual crece más rápido y una vez que ha sido totalmente consumido empieza a sintetizar las enzimas necesarias para la utilización del segundo sustrato, de esta manera el microorganismo optimiza recursos.

Los microorganismos presentan dos estrategias para disponer de la mezcla binaria de sustratos: 1) bajo condiciones de crecimiento con nutriente suficiente, como los cultivos por lote, los sustratos son utilizados secuencialmente, siendo metabolizado en primer lugar el sustrato con el cual se obtiene la mayor velocidad de crecimiento y 2) bajo condiciones de crecimiento con limitación de sustrato, tales como los cultivos continuos, los dos sustratos se utilizan simultáneamente a bajas velocidades de dilución (D); a este fenómeno se le conoce como "crecimiento en sustrato mixto" o "metabolismo secundario de sustrato" (Egli y col., 1986; Bryers y Yeh, 1990). La utilización de metanol como única fuente de carbono y energía ya ha sido estudiada extensamente en levaduras metilotróficas, y la asimilación bajo condiciones mixotrópicas (con otras fuentes de carbono) ha sido menos estudiada.

Las levaduras metilotróficas presentan la capacidad de crecer diáuxicamente en metanol y glucosa, aunque se obtiene mayor actividad de las enzimas que oxidan al metanol cuando se emplea éste como única fuente de carbono. En ocasiones se puede obtener mayor actividad en una mezcla de sustratos dependiendo de la composición de la mezcla y de la velocidad de crecimiento. Cuando se asimilan ambos sustratos simultáneamente, la glucosa es metabolizada vía glucólisis o por el ciclo de las pentosas fosfato, para producir compuestos de tres carbonos para la asimilación o desasimilación, mientras que el metanol es asimilado por el ciclo de la

xilulosa monofosfato. En la figura 1.3 podemos observar la interrelación entre las vías metabólicas de la glucosa y el metanol en levaduras metilotróficas. Se han realizando estudios para aumentar la producción de enzimas como la alcohol oxidasa en mezclas con metanol aprovechando la mayor velocidad de crecimiento y el rendimiento de biomasa que se obtiene con otros sustratos (Brinkmann y Babel, 1992; Teuygas y Simisker, 1994).

### 1.2.2 Fermentaciones de mezclas de sustratos en cultivos continuos.

En los sistemas de cultivo continuo es donde se han realizado la mayor parte de las investigaciones del metabolismo diáuxico de levaduras metilotróficas, con resultados interesantes que se mencionan a continuación.

En los estudios realizados con la levadura *H. polymorpha*, cuando se utilizó como sustrato único el metanol o la glucosa en una concentración de 5 g/l, las  $D$  máximas y los rendimientos de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) observados fueron respectivamente para metanol de 0.19 h<sup>-1</sup> y 0.39, y para glucosa de 0.51 h<sup>-1</sup> y 0.55 (Bryers y Yeh, 1990). Cuando se estudiaron las mezclas de glucosa y metanol en una composición fija, y a una concentración de ambas fuentes de carbono de 5 g/l, todas presentaron el mismo patrón de utilización, esto es, a bajas velocidades de dilución ambos sustratos son metabolizados completamente. En contraste, a altas velocidades de dilución sólo la glucosa es consumida por las células y el metanol en el fermentador mantiene una concentración constante. La  $D$  de transición a la cual las células cambian de crecer en la mezcla de sustratos a crecer en un solo sustrato depende de la composición de la mezcla en la alimentación. También es importante señalar que la  $D$  a la cual el metanol es completamente utilizado en presencia de glucosa aumenta cuando el metanol se encuentra en menor proporción en la mezcla.

En las mezclas de sustratos las células pueden utilizar el metanol a velocidades de dilución mayores a la  $\mu_{max}$  obtenida con metanol como única fuente de carbono y la biomasa es aditiva, es decir que resulta de la suma de la biomasa producida en metanol y glucosa, a las velocidades de dilución donde la levadura crece en la mezcla de sustratos. En todas las mezclas probadas hubo un consumo total de glucosa a velocidades de dilución por debajo de 0.46 h<sup>-1</sup> y también se encontró que la máxima velocidad de dilución encontrada fue de 0.51 h<sup>-1</sup> independientemente de la composición de la mezcla utilizada. Sin embargo hubo una reducción en el rendimiento de biomasa con respecto a la glucosa cuando la concentración de metanol excedió los 0.5 g/l; incluso cuando la proporción de metanol fue de 20 % del total de la mezcla el rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) disminuye de 0.55 a 0.35-0.45 (Bryers y Yeh, 1990; Bryers y col., 1991).

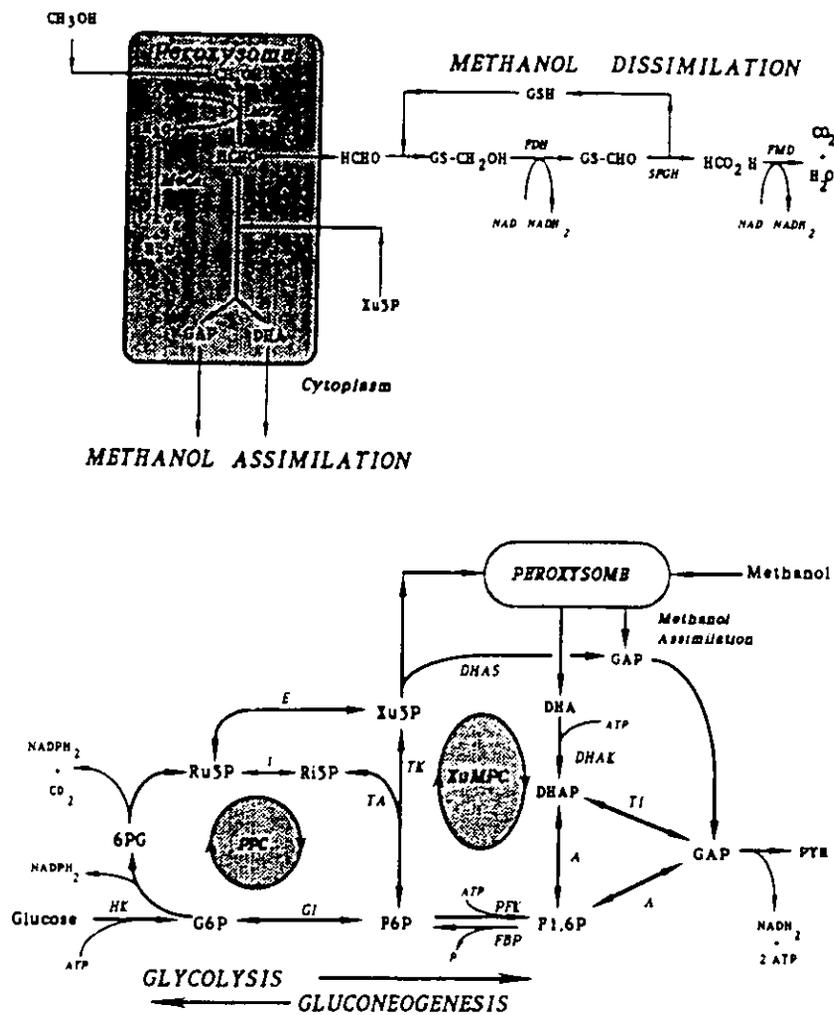


Figura 1.3 Vías metabólicas empleadas por las levaduras metilotróficas para la conversión de glucosa y metanol (Bryers y col., 1991). A=Aldolasa; DHA=dihidroxiacetona; DHAK= dihidroxiacetona cinasa; DHAP=dihidroxiacetona fosfato; DHAS=dihidroxiacetona sintasa; E=ribulosa-5-fosfato epimerasa; FBP=fructosa 1,6-bifosfatasa; FDH=formaldehído deshidrogenasa; FMD=formato deshidrogenasa; F1,6P=fructosa 1,6-bifosfato; F6P=fructosa-6-fosfato; GAP=gliceraldehído-3-fosfato; GI=glucosa-6-fosfato isomerasa; G6P=glucosa-6-fosfato; GS-CH<sub>2</sub>OH=s-hidroximetilglutation; GS-CH<sub>2</sub>O=s-formilglutation; GSH=glutation reducido; HK=hexocinasa; I=ribosa-5-fosfato isomerasa; AOX=alcohol oxidasa; CAT=catalasa; PFK=fosfofructocinasa; PPC=ciclo de las pentosas fosfato; Pyr=piruvato; Ri5P=ribosa-5-fosfato; Ru5P=ribulosa-5-fosfato; SFGH=s-formilglutation hidrolasa; TA=transaldolasa; TI=triosafosfatoisomerasa; TK=transcetolasa; Xu5P=xilulosa-5-fosfato. 6PG=6-fosfogluconato; XuMPC=ciclo xilulosa monofosfato. El flujo a través de las vías es indicado por las flechas.

Los niveles de las enzimas asociadas con la conversión de metanol y glucosa dependen de la composición de la mezcla de sustratos y de la velocidad de crecimiento, ya que es muy complejo el mecanismo de control. De esta forma tenemos que a bajas velocidades de dilución y alta concentración de metanol en la mezcla de alimentación los niveles de las enzimas relacionadas con la oxidación de metanol son altos y los niveles de enzimas relacionados con la oxidación de la glucosa son bajos. Por el contrario, a altas velocidades de dilución y altas concentraciones de glucosa en la mezcla de alimentación se inducen los niveles de enzimas para el metabolismo de glucosa y los niveles de enzimas para la oxidación de metanol se ven reprimidos (Bryers y Yeh, 1990; Giuseppin y col., 1988, Egli y col., 1986, Eggeling y Sahn, 1980).

Estudios similares se han realizado con mezclas de otros sustratos y metanol, como son algunos polioles (glicerol y sorbitol), pentosas (xilosa, arabinosa, ribosa) y sorbosa obteniéndose el mismo comportamiento que el encontrado con glucosa. Es decir, a bajas velocidades de dilución ambos sustratos se utilizan simultáneamente y hay un aumento en la actividad de la alcohol oxidasa, mientras que a altas velocidades de dilución sólo se utiliza el sustrato con el que se obtiene la mayor velocidad de crecimiento y por lo tanto hay una disminución en la actividad de la enzima. La actividad medida en la mezcla de sustratos es menor a la encontrada cuando se emplea metanol únicamente. El incremento en la actividad específica de las enzimas que participan en la oxidación del metanol en la mezcla de sustratos es debida al metanol por sí mismo (Eggeling y Sahn, 1980; Giuseppin y col., 1988; Brinkmann y Babel, 1992; Teugyas y Simisker, 1994).

También se han realizado estudios a nivel de transcripción para determinar cual es el mecanismo de síntesis de la alcohol oxidasa. Por ejemplo, Bryers y colaboradores (1991) llevaron a cabo cultivos utilizando mezclas de 4 g/l de metanol con 1 g/l de glucosa; la concentración de enzima intracelular y la actividad específica de alcohol oxidasa y catalasa fueron determinadas con un RNA mensajero específico que codifica para la expresión de alcohol oxidasa. Los resultados indican que la actividad de alcohol oxidasa, durante el cambio de una baja velocidad de dilución a una alta velocidad de dilución, está limitada no a nivel de transcripción sino más bien durante el paso postranscripcional, al polimerizarse los monómeros de alcohol oxidasa y la subsecuente incapacidad para unirse al flavin adenin dinucleótido. Al parecer la formación de una alcohol oxidasa activa puede estar limitada por cualquiera de los pasos de la síntesis de un octámero activo. Durante la transcripción, la síntesis del monómero de alcohol oxidasa se encuentra determinada por el nivel de RNA mensajero-alcohol oxidasa específico (AO-mRNA). Los monómeros de la proteína alcohol oxidasa son sintetizados por los ribosomas en el citoplasma. Se cree que la alcohol oxidasa es ensamblada postranscripcionalmente en su forma octamérica en el peroxisoma, requiriendo para su activación moléculas de

FAD, pero aún no está claro cómo se lleva a cabo el transporte de los monómeros a través de la membrana peroxisomal y su subsecuente polimerización, y se sugiere que durante o quizá directamente después de transportarlos dentro del peroxisoma, los monómeros son octamerizados y activados por el cofactor FAD. Generalmente en *H. polymorpha* la alcohol oxidasa es un homo-octámero que contiene una molécula de FAD unida no covalentemente por monómero u ocho por octámero, pero esto puede variar en las diferentes etapas de crecimiento celular. En contraste, durante el crecimiento en glucosa únicamente, la enzima alcohol oxidasa es reprimida y las células presentan sólo un pequeño peroxisoma localizado cerca de la pared celular (Bryers y Yeh, 1990; Giuseppin y col., 1988; McNew y Goodman, 1996).

De esta forma, bajo limitación de glucosa las enzimas que participan en la oxidación del metanol se incrementan cuando disminuye la velocidad de dilución. Algunos investigadores sugieren que los términos desrepresión-represión, más que inducción-represión, son los más adecuados para describir la regulación de las enzimas que participan en la asimilación del metanol, sin embargo también se ha reportado que la actividad de alcohol oxidasa se ve reducida por la glucosa a través de dos mecanismos de regulación: la represión y la inactivación catabólica (Eggeling y Sahm, 1980; Bruinenberg y col., 1982; Veenhuis y col., 1983; Sakai y col., 1987; Murray y col., 1990a).

La represión se presenta a nivel de control de la síntesis de la enzima y la inactivación catabólica involucra la inactivación o degradación de la enzima. La regulación de la síntesis de la alcohol oxidasa es controlada a nivel de transcripción (Ellis y col., 1985), pero hay pocos reportes de represión de síntesis de alcohol oxidasa por glucosa (Eggeling y Sahm, 1980). El mecanismo alternativo es la inactivación catabólica donde la glucosa induce la inactivación de las enzimas en la levadura, involucrando procesos como la proteólisis total o limitada o bien modificaciones covalentes en la enzima o cambios en la conformación de la estructura cuaternaria de la enzima. En los trabajos revisados de inactivación catabólica de alcohol oxidasa, se encontró que cuando las células crecidas en metanol son transferidas a un medio que contiene otro sustrato como la glucosa, o el etanol, se produce una alteración que requiere la síntesis de nuevas enzimas y la rápida degradación de otras que ya no se necesitan para el metanol, por lo que los peroxisomas desaparecen rápidamente como resultado de la degradación (Egli y col., 1986; Tuttle y Dunn, 1995). En *H. polymorpha* los peroxisomas son secuestrados y envueltos en una membrana de origen desconocido para su degradación, fenómeno conocido como "autofagia" (Tuttle y Dunn, 1995). Para *P. pastoris* se utilizaron estrategias morfológicas y genéticas para demostrar que existen al menos dos vías para el secuestro de peroxisomas dentro de la vacuola en la cual se lleva a cabo su degradación: 1) los peroxisomas son secuestrados en autofagosomas por atrapamiento con la membrana, la cual se fusiona con la vacuola, proceso similar a la

macroautofagia y 2) atrapamiento de un grupo de peroxisomas por dedos que se forman por brotes que sobresalen de la vacuola, proceso análogo a la microautofagia (Tuttle y Dunn, 1995).

En otros microorganismos como *Methylomonas* L3, se llevaron a cabo varios experimentos con metanol y mezclas de metanol y formaldehído induciendo estados transitorios por pulsos de metanol. En estos trabajos se encontró que después de la adición de los pulsos grandes cantidades de metanol desaparecían ya que no era detectado. Se cree que lo anterior se debe a la acumulación de metanol en las células, sugiriendo la existencia de un sistema de transporte activo para metanol. Al parecer debido a la alta permeabilidad de la membrana el metanol difunde más rápido cuando es acumulado por las células y por eso es difícil determinar el metanol intracelular. Con base en los balances de materia que se realizaron se encontró que el metanol intracelular acumulado puede ser mayor que el extracelular. Además, la acumulación es mayor cuando se utiliza únicamente metanol como fuente de carbono a bajas velocidades de dilución que en la mezcla con otros sustratos o a altas velocidades de dilución (Chu y Papoutsakis, 1987a; Chu y Papoutsakis, 1987b).

### **1.2.3 Fermentaciones de mezclas de sustratos en cultivos por lote.**

Reportes previos en cultivos por lote para mezclas de metanol con otros sustratos nos proporcionan las siguientes observaciones:

En cultivos por lote el metanol fue utilizado completamente a concentraciones de 10 y 20 g/l, los rendimientos de biomasa fueron muy bajos y conforme aumentaba la concentración de metanol estos fueron disminuyendo, tal vez debido a la pérdida evaporativa del metanol. También se observó que la concentración de metanol por arriba de los 20 g/l provoca una disminución en la actividad de la alcohol oxidasa y en la producción de biomasa debido a la inhibición por sustrato. Anteriormente ya se había reportado, para la levadura *H. polymorpha*, la desaparición de peroxisomas y una reducción en la actividad de alcohol oxidasa cuando hay exceso de metanol; debido a eso se limitó el metanol y se busco aumentar la productividad de la biomasa adicionando extracto de levadura y/o glucosa al medio base con 10 g/l de metanol. El extracto de levadura favorece la producción de biomasa y la actividad específica de alcohol oxidasa, a una concentración de 1 g/l con la que se obtuvo la máxima actividad específica de 1290 U/g de biomasa. Concentraciones más altas aumentaron la biomasa pero disminuyeron la actividad específica, debido al alto contenido de carbohidratos solubles en el extracto de levadura. Al adicionar glucosa y extracto de levadura se incremento la producción de biomasa (3 g/l) y también la de alcohol oxidasa. La adición retardada de metanol no aumenta el crecimiento inmediatamente porque el metanol se utilizó hasta que todos los carbohidratos

solubles se consumieron, incrementando la biomasa pero causando una disminución en la actividad específica de alcohol oxidasa (Duff y Murray, 1988).

La regulación de la síntesis de alcohol oxidasa con mezclas de sustratos también ha sido estudiada en la levadura metilotrófica *H. polymorpha*. En cultivos por lote empleando ribosa y metanol se encontró un incremento en la síntesis de alcohol oxidasa comparado con ribosa sola (Eggeling y Sahm, 1980; Giuseppin y col., 1988); estos estudio concuerdan con otros para mezclas de metanol con otras pentosas (D-xilosa, L-arabinosa y D-ribosa) en una relación de 1.1:1.5 g/l, en cultivos por lote y utilizando *Pichis pinus*. Se encontró que la presencia de estas no inhibía la síntesis de las enzimas del metabolismo de metanol. Además el metanol no afectaba la inducción de las enzimas del metabolismo de las pentosas. Algo importante de señalar es que la actividad encontrada de las enzimas de ambos metabolismos era más baja que la obtenida en levaduras que crecen en estos sustratos como única fuente de carbono. Las pentosas fueron adicionadas al inicio de la fase lag partiendo de cultivos crecidos en las diferentes pentosas, donde el tiempo de fermentación varió dependiendo de la pentosa utilizada. Para la D-xilosa y la D-ribosa se obtuvo una curva de crecimiento de forma sigmoide, con una fase de crecimiento logaritmico. En este caso todo el metanol fue asimilado. Cuando se utilizó L-arabinosa, el metanol utilizado sólo fue el 25 % del adicionado al medio, mientras que esta pentosa se consumió más rápido que las otras observándose un crecimiento bifásico. En la primera fase logarítmica, con una mayor velocidad de crecimiento ( $0.19 \text{ h}^{-1}$ ), las células utilizan simultáneamente la L-arabinosa y el metanol; en la segunda fase logarítmica con una menor velocidad de crecimiento se utiliza únicamente al metanol ya que la L-arabinosa se agota en la primera fase. Estas diferencias posiblemente se deban a las diferentes vías de formación de intermediarios que presentan estos compuestos. (Teugyas y Simisker, 1994). Los resultados encontrados en la mezcla de ribosa y metanol concuerdan con los obtenidos por Eggeling y Sahm en 1980. En estos estudios se detectó una actividad de alcohol oxidasa muy baja, en los sustratos sin metanol esta actividad fue similar para todos los sustratos mencionados anteriormente, es decir que a las concentraciones ensayadas 0.2-0.4 %, si hay síntesis de la enzima a un nivel basal (Eggeling y Sahm, 1980; Teugyas y Simisker, 1994).

Las observaciones realizadas en cultivos por lote concuerdan con los resultados obtenidos en cultivos continuos donde a bajas velocidades de crecimiento ambos sustratos se utilizan por completo y a altas velocidades de crecimiento sólo es metabolizado el sustrato más fácilmente asimilable, por lo que el metanol permanece constante ya que no se utilizó. La velocidad de crecimiento a la cual la célula cambia la asimilación de la mezcla de sustratos para utilizar un solo sustrato depende de la composición de la mezcla.

En conclusión, para mezclas de glucosa y metanol, los niveles de las enzimas asociadas con su conversión dependen de la composición de la mezcla y de la velocidad de crecimiento ya que es muy complejo el mecanismo de regulación.

#### **1.2.4 Modelamiento matemático del metabolismo diáuxico.**

Los modelos matemáticos han sido ampliamente utilizados para analizar el comportamiento de sistemas complejos. En los sistemas biológicos es difícil construir modelos matemáticos por la complejidad inherente de los sistemas vivos. Sin embargo la necesidad de mejorar los procesos microbianos para lograr la máxima productividad de las sustancias deseadas hace que los modelos sean aplicados utilizando técnicas de computación y análisis automático (Nagai, 1979).

Los modelos matemáticos propuestos pueden dividirse en dos grupos: estructurados y no estructurados. Los modelos no estructurados apenas implican las características biológicas y fisiológicas de los sistemas vivos y en consecuencia son modelos empíricos o descriptivos. Por su parte, los modelos estructurados se dividen en dos tipos, 1) modelos en los que se establecen relaciones estequiométricas en base a las características macroscópicas con respecto al crecimiento, consumo de sustrato, respiración entre otros y 2) modelos que implican características microscópicas que implican teoría cinética molecular y biología molecular, estos últimos resultan muy complejos y difíciles de resolver (Nagai, 1979).

El crecimiento de microorganismos en mezclas de sustratos ya han sido estudiados mediante modelos estructurados y no estructurados (Kompala y col., 1986; Luong, 1987; Turner y col., 1988).

En el caso de los modelos cibernéticos, éste es un término introducido por Ramkrishna y colaboradores y se trata de un modelo estructurado llamado así porque supone que el microorganismo utiliza su maquinaria regulatoria celular para conducirse hacia algún objetivo óptimo. Por ejemplo, en el caso de metabolismo diáuxico se introduce una variable que controla la fuente de carbono para los diferentes sistemas de síntesis de enzimas, de esta manera el microorganismo sintetizará ciertas enzimas al crecer en un determinado sustrato dependiendo de la velocidad específica de crecimiento (Turner y col., 1988).

Kompala y colaboradores (1986) propusieron un modelo cibernético que posteriormente fue evaluado experimentalmente con éxito para el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* en cultivos por lote con mezclas de glucosa, xilosa, arabinosa, lactosa y fructosa. Este modelo se basó en la información procedente del cultivo en

lote de cada uno de los sustratos y resultó adecuado para predecir el comportamiento en las mezclas. Los postulados básicos de acuerdo a estos investigadores son:

1) En sustratos múltiples, en los cuales las velocidades de crecimiento son diferentes, los microorganismos prefieren crecer en el sustrato con el que se obtiene la mayor velocidad; la curva de crecimiento mostrará un comportamiento multiaxial.

2) El crecimiento difiere de la utilización simultánea de múltiples sustratos (lo cual ocurre cuando las velocidades de crecimiento son muy similares) a la utilización secuencial con periodos lag intermedios.

3) La velocidad de crecimiento en mezclas de sustratos nunca es mayor a la obtenida en los sustratos individuales.

4) Cuando el microorganismo crece en un sustrato que utiliza lentamente y se adiciona un sustrato que utiliza más rápido, el microorganismo inhibe la actividad de las enzimas para el primer sustrato.

Giuseppin (1989) propuso un modelo de crecimiento y producción de la metanol oxidasa por *H. polymorpha* para mezclas de glucosa y metanol, donde asume una independencia de las vías metabólicas, y también establece algunas suposiciones:

1) El crecimiento de *H. polymorpha* en glucosa se describe por la cinética de Monod.

2) El crecimiento de *H. polymorpha* en metanol se describe por la cinética de inhibición por sustrato siempre que el metanol que fluye de la célula sea más alto que un valor arbitrario escogido de 99 % del flujo de carbono total; de lo contrario se asume una cinética de Monod.

3) Los coeficientes de rendimiento para glucosa y metanol son constantes e independientes.

4) La velocidad de consumo de glucosa sigue una cinética de Monod.

5) La velocidad de consumo de metanol en un cultivo en estado estable o casi estable sigue una cinética de Monod, o de inhibición por sustrato de acuerdo al punto 2).

Estos modelos nos permiten obtener una aproximación al comportamiento real del microorganismo, y son de gran ayuda para comprender la fisiología de estos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar las condiciones de fermentación que maximicen la síntesis de alcohol oxidasa por la levadura *P. pastoris*.

### 2.2 Objetivos Particulares

Establecer las condiciones de ensayo para la enzima alcohol oxidasa en medio acuoso.

Determinar la velocidad de evaporación de metanol durante la fermentación con el fin de diseñar una estrategia para su reposición al medio de reacción.

Evaluar y comparar el crecimiento y la producción de enzima alcohol oxidasa de *P. pastoris* en cultivos por lote utilizando como sustratos glucosa, metanol y una mezcla de ambos.

Mejorar el medio de cultivo para la producción de alcohol oxidasa de *P. pastoris*, siguiendo un plan factorial.

Determinar cuales son los componentes que más influyen en el medio de cultivo para la producción de la enzima alcohol oxidasa.

Generar un modelo estadístico de producción de la enzima.

Comparar los niveles de actividad encontrados en cultivo por lote y continuo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la levadura *P. pastoris* ATCC 28485 capaz de producir alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13) con actividad específica de 37 UI/mg de proteína (Bárzana y col., 1989). La cepa siempre se manejó en condiciones asépticas

##### 3.1.1 Pureza de la cepa

Para comprobar la pureza de la cepa, ésta se sembró en placas con agar YM, mediante la técnica de estría cruzada y se incubó a 30°C, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se observó la morfología colonial y microscópica. También se realizó una tinción de gram para comprobar que no hubiera contaminación con otro microorganismo. De las colonias aisladas se realizó la propagación de la cepa en placas con medio YM.

##### 3.1.2 Conservación de la cepa.

La cepa se conservó en placas con agar YM bajo condiciones de refrigeración (4°C). Las resiembras se realizaron cada tres meses.

#### 3.2 Composición del medio de cultivo.

La composición del medio de cultivo base utilizado en los diferentes sistemas fermentativos se presenta en la Tabla 1, de acuerdo a lo informado por Duff y Murray, 1988. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La adición del metanol en condiciones asépticas se llevó a cabo cuando el medio ya estaba frío. El medio de fermentación sólo varía en la composición de la fuente de carbono con diferentes proporciones de glucosa y metanol.

### 3.3 Preparación del inóculo.

El inóculo se generó en matraces con el medio de cultivo apropiado, es decir que la fuente de carbono fue la misma para el inóculo y para la fermentación, en el caso de los experimentos factoriales todos los inóculos se realizaron con metanol. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de operación de 150 ml, los matraces se inocularon con asadas de una colonia de la levadura obtenida de una caja de Petri mantenida en refrigeración, inmediatamente después se midió la absorbencia la cual, después de hacer la dilución adecuada, fue de aproximadamente 2 unidades. Los matraces se incubaron a 30 °C y con agitación a 150 r.p.m en una incubadora Innova 4330 (New Brunswick Scientific). Para el inóculo con glucosa se dejaron transcurrir 12 horas y para el metanol alrededor de 30 horas, tiempo en el cual las células se encuentran en la fase exponencial y con una concentración similar de aproximadamente 5 g de biomasa/l, de tal manera que la concentración celular inicial en el fermentador fue próxima a 0.25 g de biomasa /l.

**Tabla 3.1. Medios utilizados para mantenimiento, inóculo y fermentación de *P. pastoris*.**

Compuesto	Mantenimiento (g/l)	Inóculo (g/l)	Fermentación (g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.2	17.4	1.74
Ácido cítrico	0	6.95	0.695
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5	3.0	3.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3	0.3	0.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5x10 <sup>-6</sup>	5x10 <sup>-6</sup>	5x10 <sup>-6</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7x10 <sup>-5</sup>	7x10 <sup>-5</sup>	7x10 <sup>-5</sup>
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>

### 3.4 Equipo utilizado

#### 3.4.1 Fermentadores

Para los cultivos por lote se empleó un fermentador Bioflo IIc (New Brunswick Scientific Co.), con capacidad nominal de 6 litros, controles automáticos de temperatura, pH, espuma y oxígeno disuelto, con bombas peristálticas integradas para la adición de nutrientes, ácido, álcali y antiespumante. Además se emplearon los siguientes aditamentos:

- Filtro de aire con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  para evitar contaminación del medio.
- Muestreador automático MX-3 (New Brunswick Scientific Co.).
- Tanques de suministro de nutrientes, álcali, ácido y antiespumante.

Para el sistema de cultivo continuo se empleó un quimiostato (New Brunswick Scientific Co.) con una capacidad nominal de 1 litro, con control automático de temperatura y pH. Los aditamentos auxiliares fueron los siguientes:

- Bombas peristálticas (Cole-Palmer Instrument Co. MOD WZIRO57)
- Filtros de aire (Whatman con tamaño de poro de 0.25  $\mu\text{m}$ ).
- Flujómetro
- Baño para el control de temperatura
- Potenciómetro para el control de pH.
- Tanques de suministro de nutrientes con capacidad de 13 litros.
- Tanques de 1 litro para álcali y antiespumante.

### 3.5 Sistemas fermentativos

La cinética de fermentación se siguió en los cultivos por lote y en los continuos.

El volumen de operación para los cultivos por lote fue de 3 litros y para el cultivo continuo de 400 ml, en todos los casos el control de pH se realizó por la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5 % (w/v) o HCl al 5 % (v/v), y para el control de espuma se utilizó una suspensión de antiespumante de silicón al 10 % (v/v). La adición de medio fresco estéril se ajustó de acuerdo a la velocidad de dilución deseada en el caso de los cultivos continuos. Las condiciones generales de operación de los cultivos se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 3.2 Condiciones generales de operación

Variable	Valor
pH	5.5-6.0
Temperatura	30 °C
Agitación	300 rpm
Aireación	1 vvm

El cultivo continuo tuvo como precedente un cultivo por lote con un medio de cultivo similar al que se utilizaría en el continuo; se manejaron diferentes velocidades específicas de crecimiento las cuales son iguales a las velocidades de dilución de acuerdo a la teoría del cultivo continuo. La muestra se recolectó después de tres tiempos de residencia para asegurarse que el cultivo se encontraba en estado estable.

### 3.6 Métodos analíticos

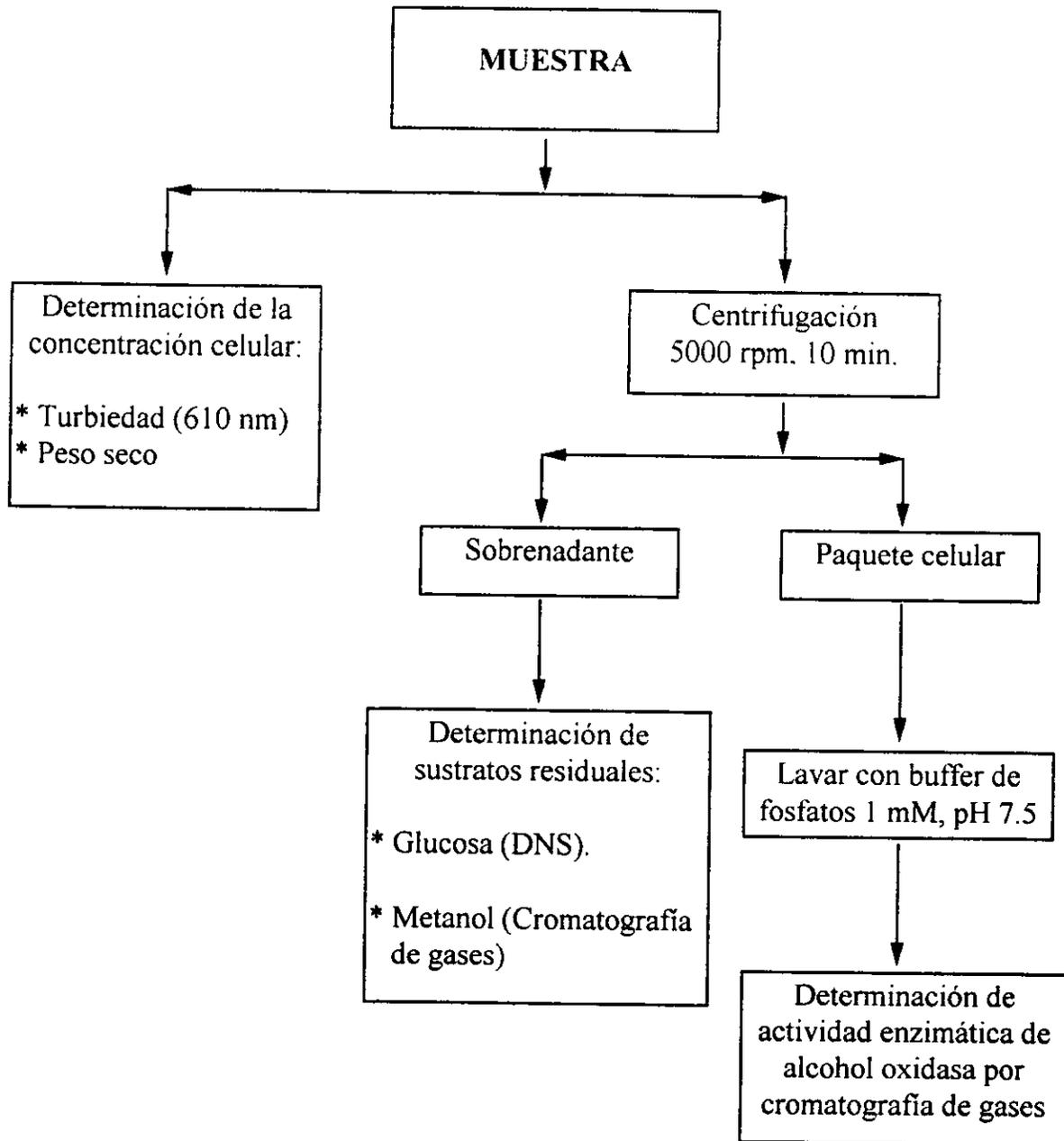
Todas las muestras de fermentación recibieron el tratamiento que se presenta en la figura 3.1. Las determinaciones se realizaron por triplicado, los métodos analíticos empleados se describen a continuación. Para la determinación de sustrato residual y actividad de alcohol oxidasa 4 ml de la muestra se centrifugaron a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos separando el sobrenadante al cual se le determinó glucosa y metanol residuales; al paquete celular se le determinó actividad de alcohol oxidasa por cromatografía de gases.

#### 3.6.1 Determinación de la concentración celular

Durante la fermentación se realizó una estimación del crecimiento por densidad óptica del medio, leyendo la absorbencia a 610 nm y el crecimiento celular se cuantificó por la estimación del peso seco de la masa celular.

*Procedimiento:* la suspensión celular (3 mililitros) se filtró a través de una membrana de nylon puesta previamente a peso constante utilizando un "kit" de filtración; posteriormente el paquete celular depositado en la membrana se lavó tres veces con agua destilada con el fin de eliminar residuos del medio de cultivo y

finalmente la membrana se colocó en una estufa a 80 °C hasta peso constante. La concentración celular se estima por diferencia de pesos.



**Figura 3.1** Procesamiento de las muestras de fermentación.

### 3.6.2 Determinación de azúcares reductores

Se utilizó el método descrito por Bernfeld en 1951 (Worthington, 1972).

*Fundamento:* los grupos reductores son cuantificados por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico. La concentración de ácido nitroaminosalicílico formado se determina colorimetricamente.

*Reactivos:* reactivo de DNS: 1 gramo de ácido 3,5-dinitrosalicílico se disolvió en 20 ml de NaOH 2N y 50 ml de agua, se añadieron 30 gramos de tartrato de sodio y potasio y se llevó a un volumen de 100 ml.

*Procedimiento:* a 0.5 ml de la muestra problema se le adicionó 0.5 ml del reactivo de DNS, la mezcla se colocó en baño María a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se le adicionó 5 ml de agua destilada. Se leyó la absorbencia a 540 nm. Se utilizaron los testigos de concentración adecuados y el espectrofotómetro se ajustó con un blanco de reactivos.

### 3.6.3 Determinación de metanol

El metanol residual se determinó por cromatografía de gases. El cromatógrafo de gases utilizado fue un Hewlett Packard 5890 Series II. La instrumentación del CG fue la siguiente:

- i) La columna utilizada fue WCOT de sílica fundida, con fase estacionaria CP-Wax-52 CB.
- ii) Computadora Hewlett Packard como integrador.
- iii) Interfase.
- iv) Tanques de gas para cromatografía de gases de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno.

Se utilizaron otros aditamentos como: jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l y sonicador Branson 2200.

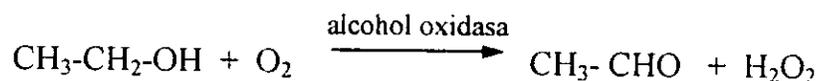
Condiciones cromatográficas manejadas:

- \* Temperatura de detector, 250 °C.
- \* Temperatura de inyector, 170 °C.
- \* Temperatura del horno, 90 °C.
- \* Flujo de nitrógeno como gas acarreador, 100 ml/min.

Se inyectó un volumen de 1  $\mu$ l en todos los casos y por triplicado. La determinación de metanol se realizó por la técnica de estándar externo realizando una curva patrón de concentración contra área bajo la curva de acuerdo a los cromatogramas obtenidos. El valor del área de las muestras se extrapola en la curva.

### 3.6.4 Determinación de actividad de alcohol oxidasa

*Fundamento:* la determinación de la actividad enzimática se basa en la cuantificación del acetaldehído producido por la oxidación del etanol con alcohol oxidasa, de acuerdo a la siguiente reacción:



*Procedimiento:* para determinar la actividad de alcohol oxidasa el paquete celular fue lavado extensamente con buffer de fosfatos 1 mM, pH 7.5 y posteriormente resuspendido al volumen original. Se tomó 1 ml de la muestra para la reacción, la cual se realizó en un vial sellado de 1.5 ml para evitar la fuga tanto de sustrato como de producto. Se utilizó etanol como sustrato, la concentración final del sustrato en el vial fue de 50 mM. El vial una vez sellado se colocó en un baño María a 25 °C con agitación. El producto de la oxidación del etanol fue el acetaldehído el cual fue cuantificado a diferentes tiempos al igual que la desaparición de sustrato por cromatografía de gases de acuerdo a lo referido en el punto anterior. De igual forma se hicieron curvas patrón de acetaldehído y etanol.

Una unidad de actividad de alcohol oxidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de acetaldehído por minuto bajo las condiciones de ensayo. Dividiendo esta actividad entre el peso seco de la biomasa obtenemos la actividad específica de alcohol oxidasa [U/g de biomasa].

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de las condiciones del ensayo enzimático.

Para la determinación de la actividad de alcohol oxidasa en las muestras de fermentación se realizó una cinética enzimática empleando el paquete celular que contiene la enzima alcohol oxidasa, con el fin de conocer las condiciones más adecuadas para el ensayo enzimático. Se utilizó el paquete celular de la levadura *P. pastoris* la cual se cultivó en el medio de Murray tanto en presencia como en ausencia de extracto de levadura (1g/l). De acuerdo a lo reportado por Duff y Murray (1988) su adición aumenta la producción de biomasa y la actividad específica de alcohol oxidasa. En ambos medios la fuente de carbono fue metanol 10 g/l. Las células se cosecharon a las 40 horas de cultivo y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 1 mM, pH 7.5 y se procedió al análisis.

Por otra parte debido a que en algunos reportes se indica que para el ensayo de la actividad de alcohol oxidasa en el paquete celular es necesario permeabilizar la pared celular o bien romper la célula (Eggeling y Sahn, 1980; Giuseppin y col., 1988; Duff y Murray, 1988; van der Klei y col, 1991), se realizaron experimentos previos a la cinética enzimática para determinar la pertinencia de estos tratamientos preparativos para el análisis en cromatografía de gases.

#### 4.1.1 Permeabilización de la pared celular.

Se utilizó una solución de la enzima liticasa (SIGMA Chemical Co.) de 2 mg/ml en buffer tris-HCl pH 7.5 para permeabilizar las células dada su alta actividad en levaduras. Para comprobar que realmente la liticasa ataca la pared celular se realizaron ensayos de actividad con un método colorimétrico modificado, basado en el ensayo de la enzima peroxidasa (Childs y Bardsley, 1975; Pütter y Becker, 1983).

Este método modificado fue desarrollado por Herzberg y Rogerson (1985) acoplando las enzimas alcohol oxidasa y peroxidasa y nos indica visualmente si hubo reacción. El  $H_2O_2$  producido por la primera enzima (en este caso contenida en el paquete celular) al degradar el metanol es utilizado para oxidar al compuesto cromógeno ABTS [2,2'-diazino-(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)] en presencia de peroxidasa (la cual se agrega a la muestra como reactivo), desarrollándose un color verde el cual se cuantifica 15 minutos después a 420 nm. Se realizaron pruebas con las células tratadas con enzima liticasa a diferentes

tiempos de incubación a 30 °C en baño metabólico y también se corrieron testigos de reactivos sin células y con células enteras. Los resultados de esta experiencia se muestran en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1 Ensayo de actividad con el método de la alcohol oxidasa-peroxidasa.**

Muestra [μl]	Buffer de fosfatos [μl]	Sol. liticasa [2 mg/ml]	Incubación [min]	Sol.de ABTS [μl]	As 620nm [Promedio]
-	200	1800	30	2500	0.0
200	200	-	30	2500	0.0
200	200	1800	30	2500	0.452
-	200	1800	60	2500	0.0
200	200	-	60	2500	0.0
200	200	1800	60	2500	0.72
-	200	1800	90	2500	0.0
200	200	-	90	2500	0.0
200	200	1800	90	2500	0.95

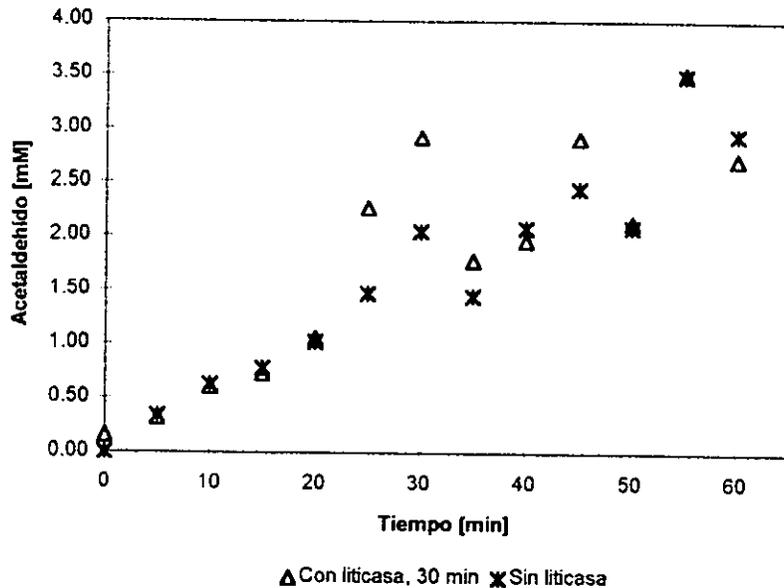
La solución de ABTS contiene aparte del compuesto cromógeno la enzima peroxidasa y el metanol, los cuales se disuelven en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5. Este reactivo se prepara al momento de usarse.

En la tabla 4.1 se observa que a mayor tiempo de incubación con la enzima liticasa hay un aumento del color y para los testigos la reacción fue negativa. Es importante remarcar que el testigo con células enteras no desarrolló color, lo que indica que la solución de enzima liticasa si atacó la pared celular, y además que al aumentar el tiempo de incubación con esa concentración de enzima hay una mayor permeabilización de la pared.

Es importante señalar que este método colorimétrico fue empleado solamente para comprobar la permeabilización de la pared celular con liticasa, debido a que se requería determinar si este tratamiento era necesario para el análisis de actividad de alcohol oxidasa por cromatografía de gases ya que el método colorimétrico para actividad resulta laborioso y tardado.

De esta manera se midió por cromatografía de gases el acetaldehído, producto de la oxidación del etanol por la alcohol oxidasa del paquete celular, el cual se empleó después de tratarlo con liticasa y sin tratar. El tiempo de ensayo enzimático fue de 15 minutos a 25 °C (Barzana y col., 1989). En la figura 4.1 se compara la producción de acetaldehído, medido por cromatografía de gases, con células tratadas

con liticasa y sin liticasa a una misma concentración celular. Podemos observar que no hay una gran variación entre los tratamientos para los tiempos probados por lo que se procedió a realizar la cinética enzimática y los ensayos enzimáticos posteriores con las células sin permeabilizar, lavándolas únicamente con buffer.



**Figura 4.1 Producción de acetaldehído por alcohol oxidasa. Comparación de los tratamientos efectuados a las células.**

#### 4.1.2 Cinética enzimática.

Se realizó la cinética enzimática para determinar la concentración de sustrato más adecuada para el ensayo enzimático, para lo cual se manejaron diferentes concentraciones de etanol, las condiciones de temperatura y tiempo de ensayo se conservaron. En la figura 4.2 se presenta el comportamiento de la velocidad específica de reacción para alcohol oxidasa en el medio Murray con y sin extracto de levadura. Observamos que en ambos casos se obtiene un comportamiento tipo Michaelis-Menten con una ligera inhibición por exceso de sustrato. La concentración del paquete celular en el ensayo se varió de 0.34 a 0.70 mg de biomasa/ml, presentándose actividades específicas entre 167.6 y 170.7 U/g de biomasa, valores muy similares para el intervalo de concentraciones de muestra probadas.

Los valores de  $v_{m\acute{a}x}$  y de  $K_m$ , obtenidos empleando la expresión gráfica de Lineweaver y Burk se presentan en la tabla 4.2; se puede observar que el valor de  $K_m$  concuerda con el obtenido en fase acuosa para otros trabajos, no así el valor de  $v_{m\acute{a}x}$  ya que el obtenido por Barzana y col. (1989) fue con la enzima comercial de *P. pastoris*.

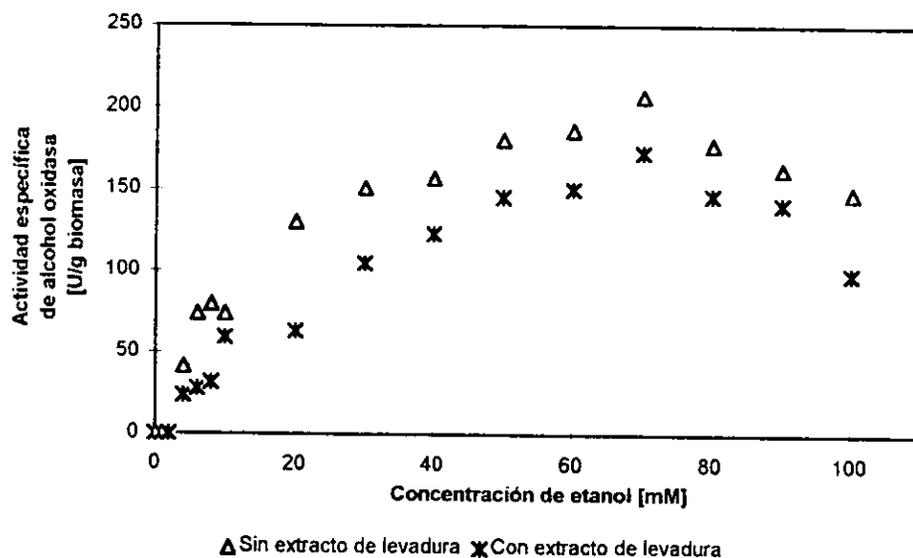


Figura 4.2 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad específica de alcohol oxidasa en Medio Murray con metanol al 10 g/l, 15 min de ensayo a 25 °C.

Tabla 4.2 Valores de  $v_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  obtenidos con los dos medios.

Medio de cultivo	$v_{m\acute{a}x}$ [U/g de biomasa]	$K_m$ [mM etanol]
Medio Murray con extracto de levadura	150	19
Medio Murray sin extracto de levadura	180	12
Barzana y col., 1989	1160 <sup>a</sup>	10.8

<sup>a</sup>=unidades de actividad enzimática [U/g de alcohol oxidasa]

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar la concentración de 60 mM de etanol para efectuar los ensayos de actividad de alcohol oxidasa, concentración con la que se asegura obtener la  $v_{m\acute{a}x}$  de la enzima en el paquete celular. Por otra parte se observa que estos resultados contradicen lo obtenido por Duff y Murray (1988) los cuales encontraron mayor actividad específica con el medio que contenía extracto de levadura. En este trabajo la actividad específica fue menor en las células crecidas en el medio con con este compuesto, pero es importante señalar que el aumento en la actividad específica conseguido por Duff y Murray (1988) al adicionar extracto de levadura no fue muy grande comparado con el medio sin extracto de levadura. Fue en el crecimiento donde estos investigadores

obtuvieron el mayor incremento y por ende en la actividad total. Por lo tanto a pesar de que con el medio Murray sin extracto de levadura se obtiene una velocidad específica ligeramente mayor de la enzima alcohol oxidasa, se seleccionó el medio con extracto de levadura ya que en éste se obtuvo una mayor cantidad de células y, por ende, de actividad volumétrica (U/l) lo cual coincide con lo informado por Duff y Murray (1988).

## 4.2 Determinación del metanol evaporado

En trabajos anteriores se reportaron bajos rendimientos de biomasa a causa de las pérdidas por evaporación (Faust y Sitting, 1977; Duff y Murray, 1988; Chu y Papoutsakis, 1987). Se realizaron testigos utilizando el medio de cultivo con 5 y 10 g/l de metanol pero sin inocular y bajo las condiciones de operación que se seguirían en las fermentaciones (agitación, temperatura, pH y aireación). De esta forma se midió la cantidad de metanol evaporado al monitorear el metanol en el medio y con esto se pudo conocer la cantidad real de metanol consumido por el microorganismo. Los resultados de la cinética de metanol residual en el medio se presentan en la figura 4.3.

Se observa que la evaporación es lineal y que aproximadamente a las 44 horas se pierde la mitad del metanol adicionado originalmente. La pendiente de la recta corresponde a la velocidad de evaporación del metanol, para 5 g/l fue de 0.066 g de metanol/l\*h y para 10 g/l de 0.1 g de metanol/l\*h.

Se encuentra que existe una diferencia en las velocidades de evaporación para ambas concentraciones bajo las mismas condiciones de operación, esto se debe a la diferencia de concentración del metanol en la solución ya que entre más metanol haya en el medio se vera favorecida su evaporación por la aereación. La aereación favorece la evaporación del medio, arrastrando moléculas de agua y metanol, no hay un equilibrio entre la fase liquida y el aire ya que el sistema en el que se trabajo es abierto y se pierde metanol a pesar de que en la salida había una trampa para condensar los vapores.

Una vez comprobado que el metanol se perdía en el sistema, se procedió a reponer el metanol evaporado adicionándolo con una bomba peristáltica a un flujo determinado de acuerdo a la velocidad de evaporación obtenida. Para lo anterior se realizó un segundo testigo igual al anterior pero ahora adicionando el metanol evaporado y monitoreándolo en el medio de cultivo. En la figura 4.4 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que la tasa de adición de metanol fue la adecuada ya que la concentración permanece prácticamente constante para los valores de 5 y 10 g/l.

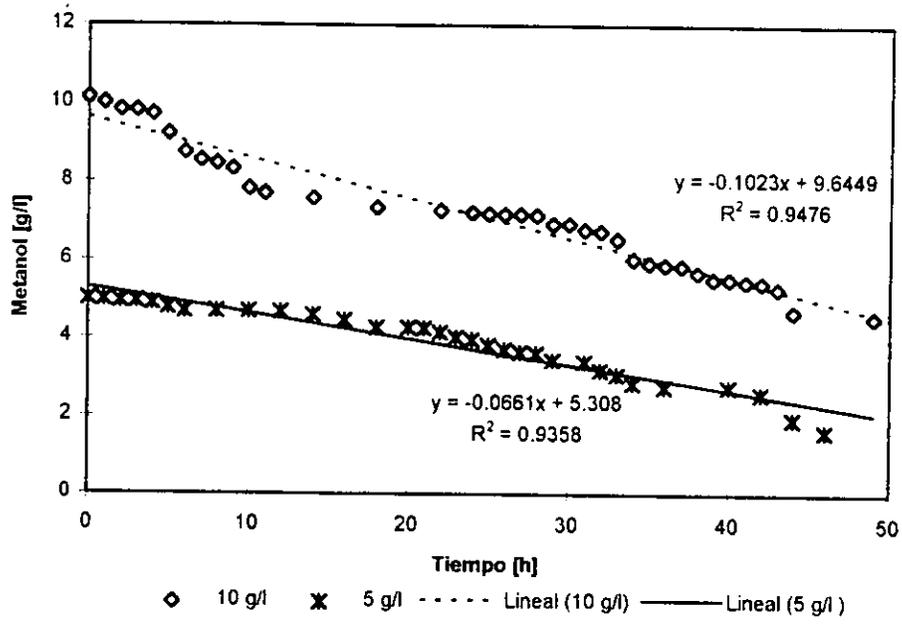


Figura 4.3 Cinética de evaporación de metanol.

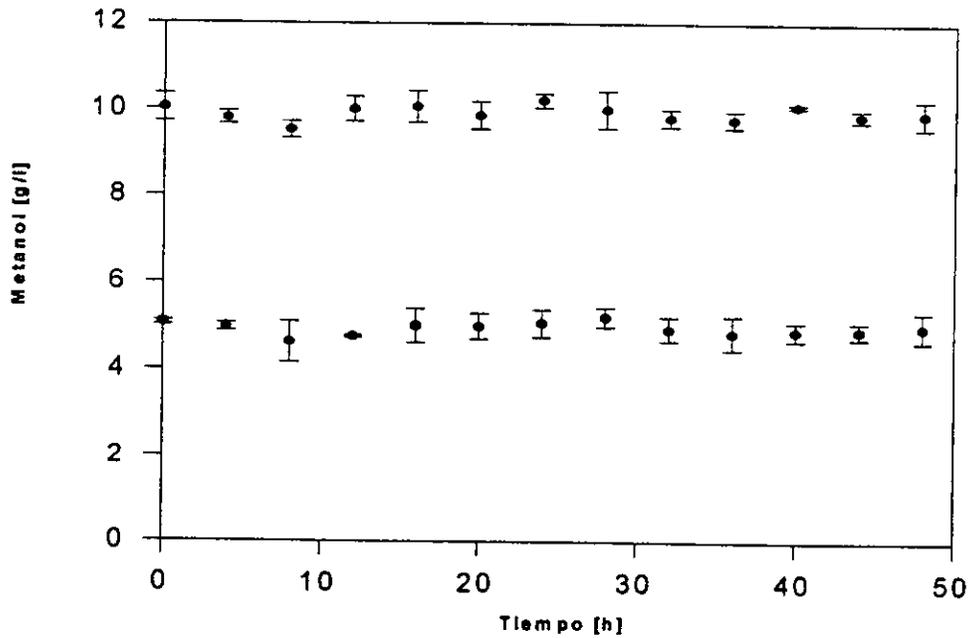


Figura 4.4 Monitoreo en el medio de cultivo al adicionar el metanol evaporado, para las concentraciones de 5 y 10 g/l

### 4.3 Comportamiento cinético de *Pichia pastoris* en cultivos por lote

Se llevaron a cabo cinéticas de fermentación en cultivos por lote utilizando como fuente de carbono: metanol, glucosa y una mezcla de ambos. Estos experimentos se realizaron para determinar el comportamiento cinético de *Pichia pastoris* en los diferentes sustratos y de esta forma tenerlos como base de comparación para los siguientes experimentos.

#### 4.3.1 Fuente de carbono: Glucosa

##### 4.3.1.2 Biomasa y sustrato residual.

La concentración de glucosa utilizada fue de 10 g/l sin extracto de levadura. La variación de biomasa y glucosa residual con respecto a la edad del cultivo se presenta en la figura 4.5. Se aprecia una curva de crecimiento típica, prácticamente sin fase de adaptación ya que la glucosa se empieza a asimilar rápidamente poco después de adicionar el inóculo crecido en glucosa y la fase estacionaria se alcanza aproximadamente a las 12 horas. La concentración celular máxima fue de 3.7 g de biomasa/l y el rendimiento celular,  $Y_{x/s} = 0.37$ . En lo que respecta a la glucosa, ésta se consumió rápidamente y su consumo total coincide con el inicio de la fase estacionaria. También se realizaron algunos ensayos de actividad de alcohol oxidasa los cuales resultaron negativos.

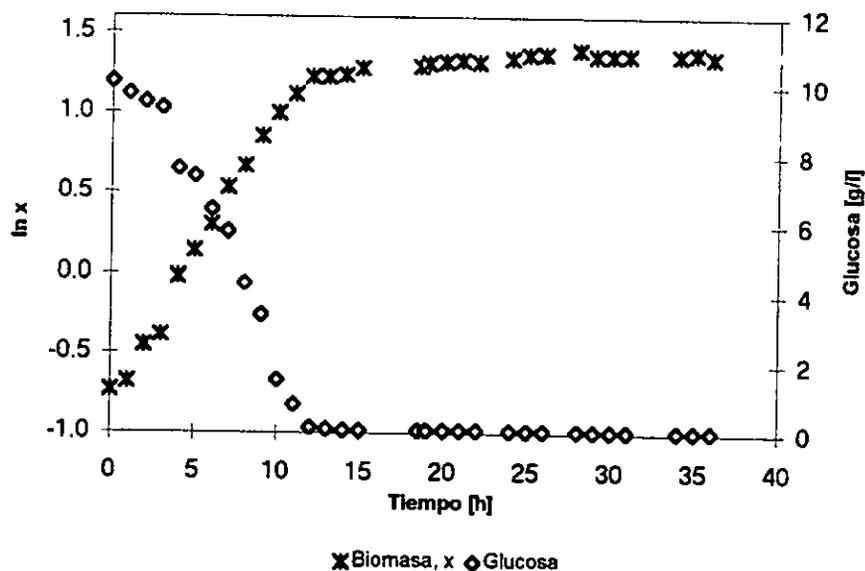


Figura 4.5 Cinética de biomasa y consumo de sustrato  
Fuente de carbono: Glucosa 10 g/l.

### 4.3.2 Fuente de carbono: Metanol

La concentración de metanol utilizada fue de 10 g/l adicionándose extracto de levadura en una concentración de 1 g/l para lograr un incremento en la biomasa. Se fijó esa concentración debido a que a altas concentraciones de metanol se inhibe el crecimiento de las levaduras metilotróficas, probablemente por el exceso de peróxido de hidrógeno y formaldehído producidos por la alcohol oxidasa en el primer paso de oxidación de metanol (Veenhuis y col., 1983; Duff y Murray, 1988). En los trabajos realizados por Duff y Murray (1988) se realizaron cultivos por lote con concentraciones de metanol entre 10-50 g/l y solo en los cultivos con concentraciones iniciales de 10 y 20 g/l se pudo metabolizar completamente el sustrato y además en estas concentraciones los rendimientos de biomasa y la actividad específica no variaron en forma considerable. La estrategia utilizada por estos autores para incrementar la concentración de metanol, y que la levadura lo pudiera metabolizar, fue la adición por pulsos. Como lo que se deseaba en este experimento era tener una cinética en un cultivo por lote tradicional sin alimentación se escogió la concentración de 10 g/l.

#### 4.3.2.1 Biomasa y sustrato residual

La cinética de crecimiento y consumo de sustrato se presenta en la figura 4.6. Se puede apreciar una curva de crecimiento típica en la cual la fase de adaptación es cercana a 10 horas, a pesar de que la fermentación partió de un inóculo crecido en metanol. La fase estacionaria no se observa claramente ya que hay un aumento de biomasa entre las 45 y 50 horas y posteriormente hay una disminución de la biomasa que permanece constante.

La concentración celular máxima fue de 3.8 g biomasa/l, y el rendimiento celular es de aproximadamente  $Y_{v/s} = 0.34$ , este rendimiento no es exacto ya que se adicionó metanol de más porque se mantuvo constante la adición con la velocidad de evaporación correspondiente a 10 g/l y no se hizo la corrección cuando ya había 5 g/l por lo que se adicionó cerca de 1 g/l de más. En la figura 4.6 también se observa que la fuente de carbono se consumió totalmente cerca de las 40 horas.

En la tabla 4.3 se presentan los parámetros cinéticos calculados en este trabajo a partir de los datos obtenidos en glucosa y metanol y se comparan con los reportados en la bibliografía. Se observa que el rendimiento de biomasa en metanol fue muy parecido al obtenido con glucosa debido a la presencia del extracto de levadura el cual favorece el crecimiento ya que contiene sales y vitaminas que pueden favorecer reacciones metabólicas; la  $\mu_{m\acute{a}x}$  es mayor en glucosa que en metanol ya que el microorganismo crece más rápido en el primero.

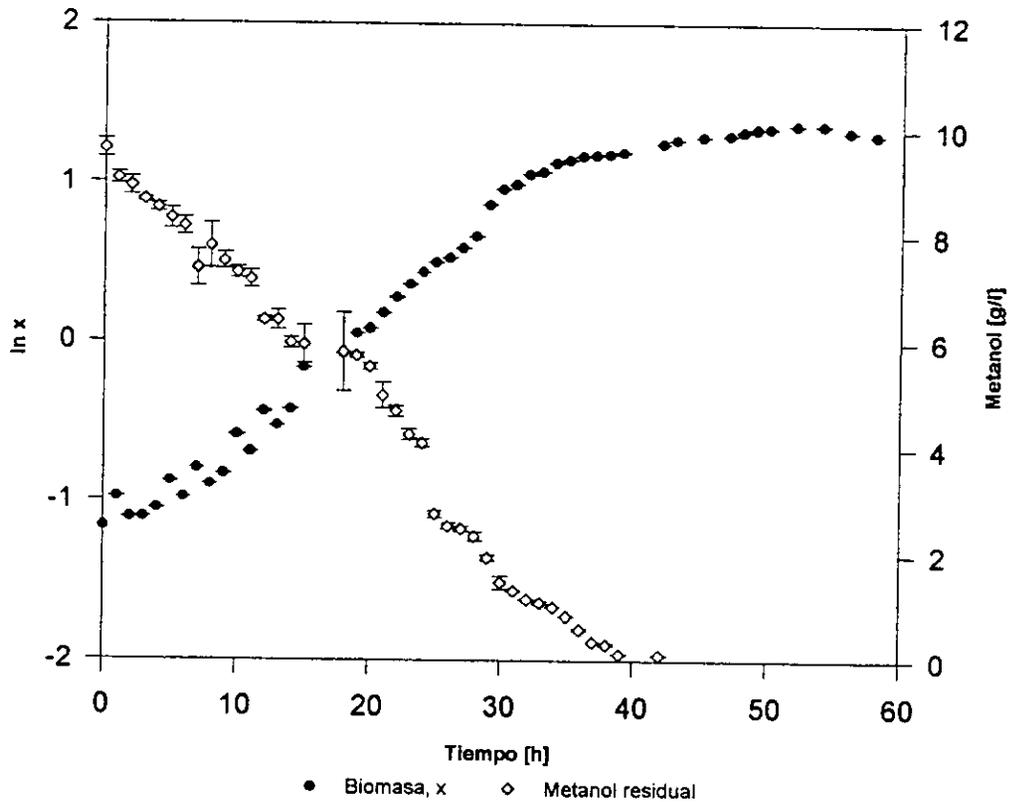


Figura 4.6 Cinética de biomasa y consumo de metanol.  
Fuente de carbono: Metanol 10 g/l

Tabla 4.3 Parámetros cinéticos obtenidos en glucosa y metanol

Parámetro	$\mu_{\text{máx}}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$Y_{x/s}$	Microorganismo y fuente
Glucosa	0.22	0.4	Este estudio
	0.51	0.55	<i>H. polymorpha</i> (Egli y col., 1986)
	0.52	0.52	<i>H. polymorpha</i> (Giuseppin y col., 1988)
	0.61		<i>H. polymorpha</i> (Brinkmann y Babel, 1992)
Metanol	0.17	0.38	Este estudio
	0.18-0.19	0.37-0.39	<i>H. polymorpha</i> (Egli y col., 1986)
	0.21	0.42	<i>H. polymorpha</i> (Giuseppin y col., 1988)
	0.21		<i>H. polymorpha</i> (Brinkmann y Babel, 1992)
		0.18	<i>P. pastoris</i> (Duff y Murray, 1988)
	0.12		<i>P. pinus</i> (Teugyas y Simisker, 1994)

Los valores experimentales de  $\mu_{\text{máx}}$  obtenidos en este trabajo son muy parecidos a los reportados en metanol, mientras que para glucosa los valores obtenidos de  $\mu_{\text{máx}}$  y  $Y_{x/s}$  fueron más bajos, posiblemente debido a que no se adicionó extracto de levadura, compuesto que contiene nutrientes importantes para el crecimiento, ya que en la mayoría de los trabajos revisados se adicionan vitaminas al medio.

#### 4.3.2.2 Actividad de alcohol oxidasa

La actividad de la enzima alcohol oxidasa se presenta en la figura 4.7, en la cual se obtuvo una curva muy parecida a la obtenida para el crecimiento. Se presenta un aumento exponencial de la actividad alcanzándose un máximo de aproximadamente 900 U cerca de las 35 horas de fermentación, seguido de un descenso ligero en la actividad. La actividad de la enzima por volumen de medio fue de 300 U/l, valor que se encuentra muy por debajo del obtenido por Duff y Murray (1988) de 1162 U/l, esta diferencia, puede deberse al método de determinación de actividad, ya que ellos realizan la reacción en presencia de exceso de oxígeno y además disminuyen el pH hasta 6 para liberar el acetaldehído producido lo cual no se realizó en este estudio.

En la figura 4.8 se aprecia la actividad específica de la alcohol oxidasa en el paquete celular, esta gráfica nos indica en realidad un rendimiento de enzima con respecto a la biomasa, obteniendo el rendimiento máximo cerca de las 18 horas con un valor de 200 U/g biomasa, valor muy bajo comparado con el obtenido por Duff y Murray (1988) de 1290 U/g biomasa.

En la figura 4.9 se presenta la velocidad específica de síntesis de alcohol oxidasa ( $q_p$ ) en función de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), cuando la levadura se cultivó en metanol, se observa que son directamente proporcionales ya que se obtuvo una línea recta lo cual indica que a bajas velocidades específicas de crecimiento hay menor velocidad de síntesis de enzima y a altas  $\mu$  habrá mayor síntesis de enzima. Lo anterior nos indica que el crecimiento y por lo tanto la utilización del metanol están relacionados directamente con la síntesis de la enzima, comportamiento esperado al ser la alcohol oxidasa la primera enzima involucrada en la oxidación del metanol (Schügerl, 1987).

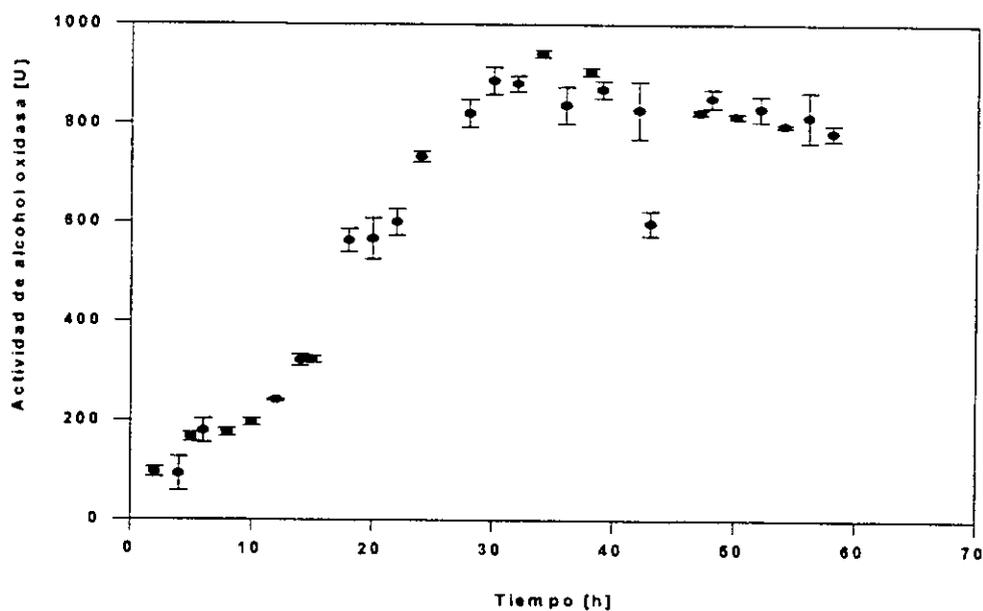


Figura 4.7 Actividad de alcohol oxidasa.  
Fuente de carbono: Metanol 10 g/l.

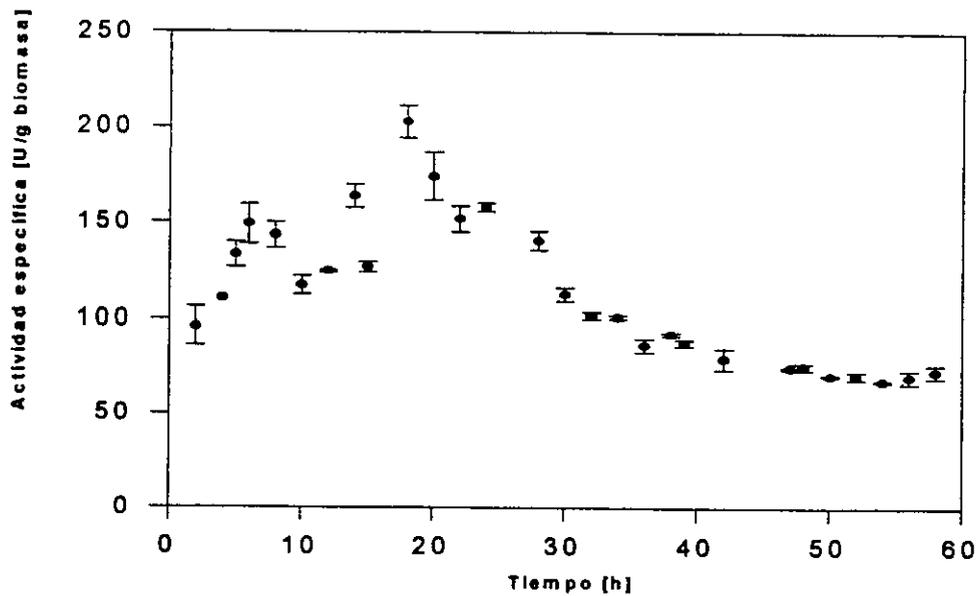


Figura 4.8 Actividad específica de alcohol oxidasa.  
Fuente de carbono: Metanol 10 g/l.

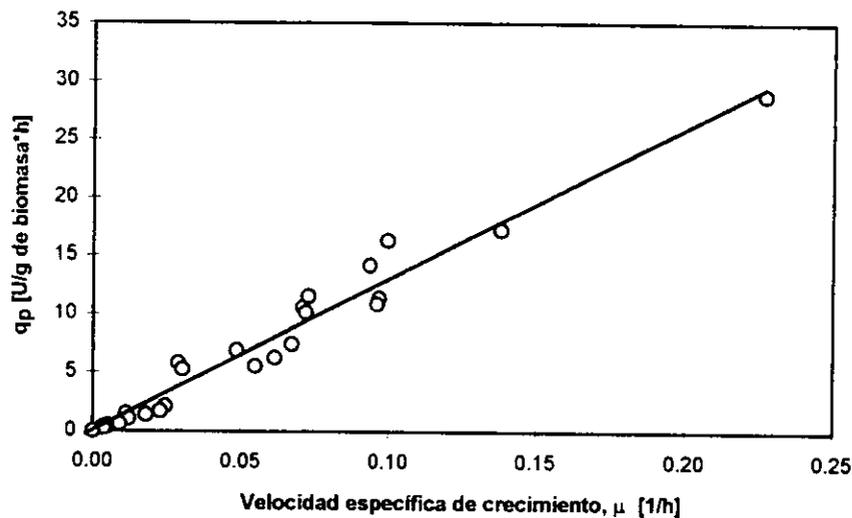


Figura 4.9 Velocidad específica de síntesis de alcohol oxidasa en metanol.

### 4.3.3 Fuente de carbono: Mezcla de glucosa y metanol.

En esta fermentación se utilizó una mezcla de glucosa y metanol a una concentración de 10 g/l cada uno; se partió de un cultivo con glucosa al cual se le adicionó el metanol antes de su consumo total. De esta forma, la adición de 10 g/l de metanol se hizo a las 10 horas, en las que se tenía una concentración de glucosa de aproximadamente 4 g/l.

#### 4.3.3.1 Biomasa y sustrato residual.

Los resultados de la biomasa y sustrato residuales en la mezcla se muestran en la figura 4.10. El crecimiento presenta una clara transición cerca de las 16 horas en las cuales la pendiente de la curva de crecimiento decae de manera notable. Esto refleja la mayor afinidad de la levadura por la glucosa. Es importante hacer notar que el incremento en biomasa después de las 20 horas fue de cerca de 1.2 g biomasa/l. En la misma figura se muestra tanto el consumo de glucosa como de metanol, la glucosa se agotó totalmente a las 14 horas siendo la primera en asimilarse. El metanol es consumido totalmente a las 40 horas, 30 horas después de su adición.

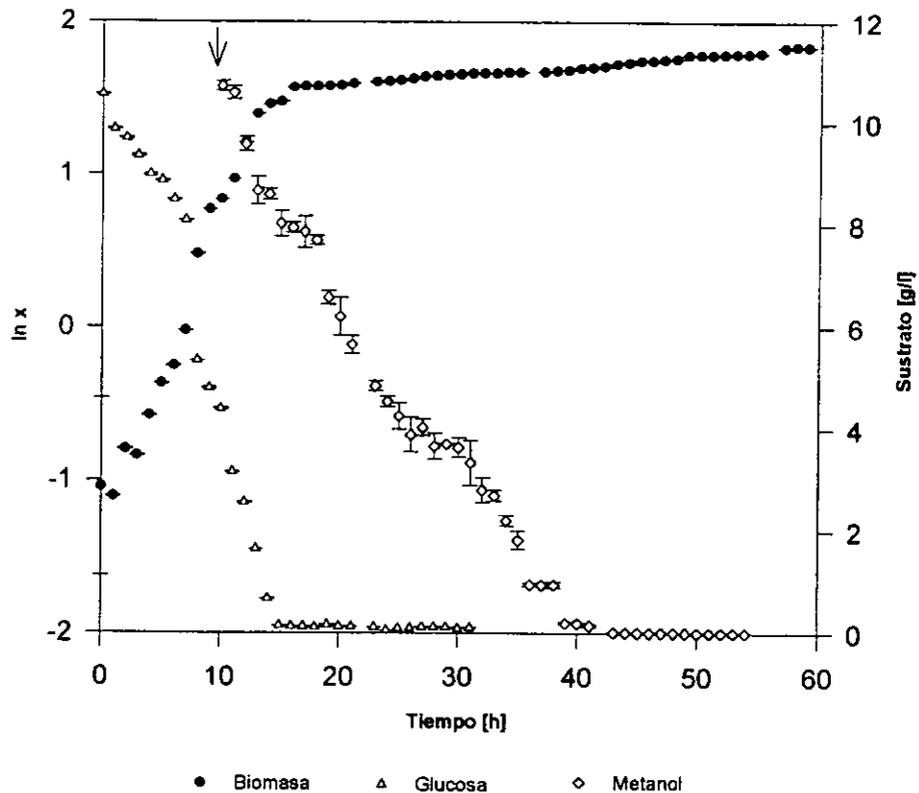


Figura 4.10 Cinética de crecimiento y sustratos residuales. Sustratos: Glucosa 10 g/l : Metanol 10 g/l

Evidentemente al presentar la glucosa una velocidad de crecimiento mayor ( $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$ ) fue metabolizada primero, seguida del metanol. Trabajos realizados (Eggeling y Sahm, 1980; Egli y col., 1986; Kompala y col., 1986; Giussepín, 1989; Bryers y Yeh, 1990) indican que muchos microorganismos emplean dos diferentes estrategias para hacer frente a las mezclas binarias de sustratos. Es conocido que bajo condiciones de crecimiento con suficiente nutriente, como es el caso de los cultivos por lote, los sustratos son utilizados secuencialmente, se metaboliza primero el sustrato con el que el microorganismo crece más rápido, es decir que ocurre un crecimiento diáuxico. Bajo condiciones de limitación de sustrato, caso del cultivo continuo, los dos sustratos son utilizados simultáneamente a bajas velocidades de dilución y se describe como “crecimiento en mezcla de sustratos” (Egli y col., 1986).

En este estudio no se observa muy claramente la diauxia ya que después de agotada la glucosa empieza a haber un incremento muy pequeño en la biomasa pero

no se observa otra curva sigmoide como era de esperarse, además de que la velocidad específica de crecimiento es muy baja ( $\mu=0.035 \text{ h}^{-1}$ ).

En lo que respecta al metanol este se consumió totalmente cerca de las 40 horas pero no se reflejó en el incremento de biomasa, por lo que el rendimiento fue muy bajo ( $Y=0.15$ ). Es importante señalar que el metanol se empieza a asimilar aún antes de que la glucosa se agote. Algunos estudios indican que el metanol es acumulado por las células, específicamente en los trabajos realizados por Chu y Papoutsakis. (1987a y 1987b), en los que se trabajó con *Methylomonas* L3 en cultivos continuos con adición de metanol para inducir estados transitorios rápidos, se encontró que después de agregar los pulsos de metanol este desaparecía no por el fenómeno de evaporación sino que era acumulado en las células, aparte de este fenómeno de acumulación de metanol, los autores sugieren la existencia de un sistema de transporte activo para metanol. Al parecer la acumulación de metanol fue mucho más alta cuando se utilizó solamente metanol como sustrato y a bajas velocidades de dilución que cuando se utilizó la mezcla con glucosa. También se sugiere que debido a la alta permeabilidad de la membrana el metanol difunde más rápido cuando es acumulado por las células y la oxidación del metanol no puede ser desacoplada de este sistema (Chu y Papoutsakis, 1987a; Chu y Papoutsakis, 1987b).

Por otra parte es posible que se este formando otro producto el cual no fue detectado por cromatografía de gases, este producto puede ser formaldehído, aunque también es posible que haya habido limitación por algún nutriente que se agotó antes de poder aprovechar al metanol.

#### 4.3.3.2 Actividad de alcohol oxidasa

En las figuras 4.11 y 4.12 se presentan la actividad total y la actividad específica de alcohol oxidasa, respectivamente, en función de la edad del cultivo.

Aunque el perfil de actividad no está suficientemente definido, la tendencia es de tipo campana. Podemos ver que la actividad de alcohol oxidasa se presentó cerca de las 15 horas y se fue incrementando hasta alcanzar un máximo de actividad total de 390 U y 25 U/g biomasa de actividad específica a las 25 horas, seguido de un descenso en la actividad y una posterior etapa estacionaria, estos valores son muy bajos comparados con los obtenidos por Duff y Murray (1988) con 10 g/l de metanol, 5 g/l de glucosa y 2 g/l de extracto de levadura, con 1845 U/g biomasa y 4200 U/l.

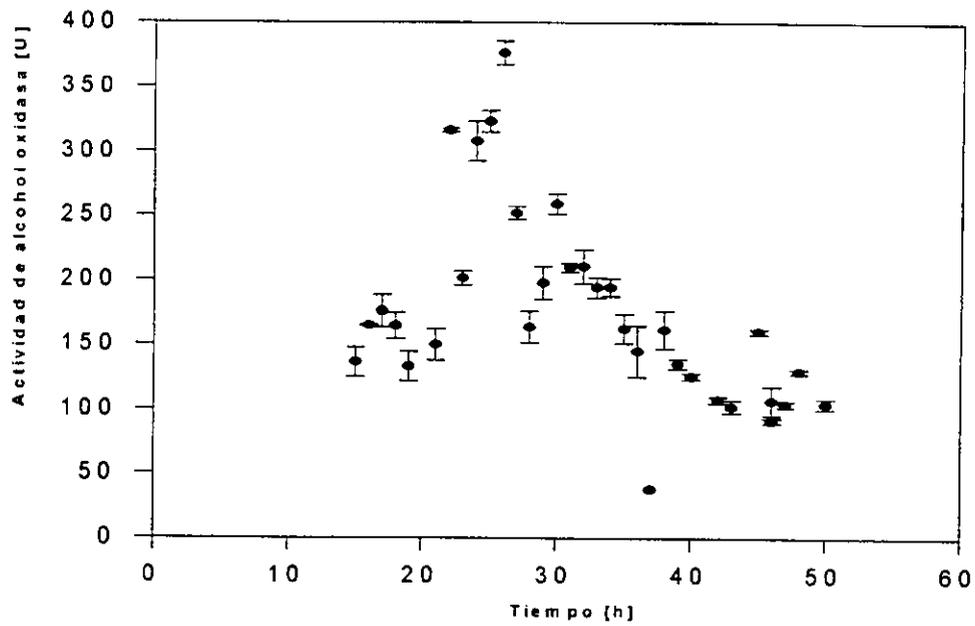


Fig. 4.11 Actividad de alcohol oxidasa.  
Sustrato: Glucosa 10 g/l; Metanol 10 g/l.

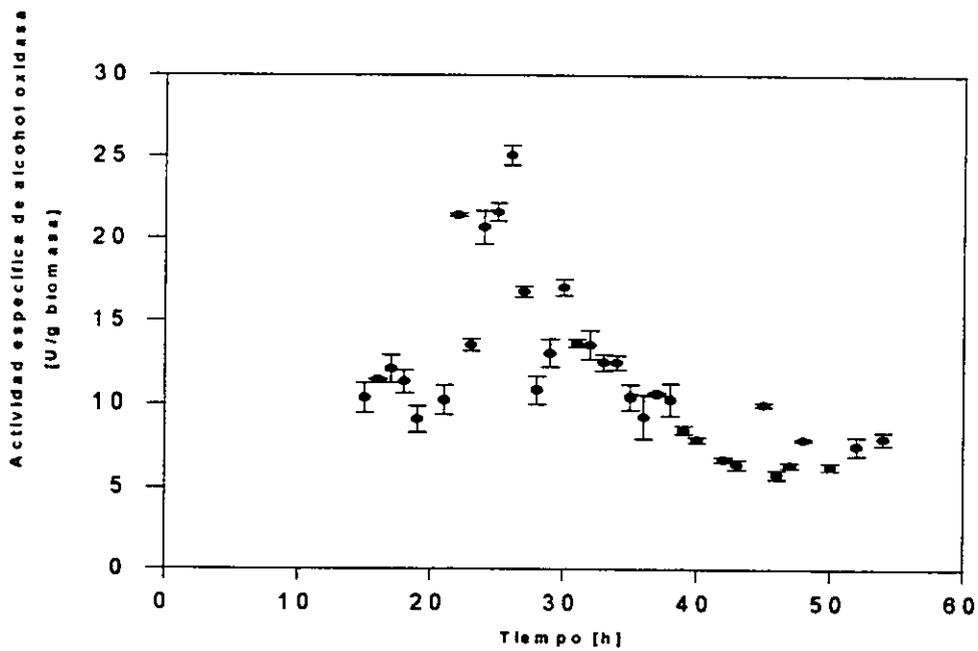


Fig. 4.12 Actividad específica de alcohol-oxidasa.  
Sustrato: Glucosa 10 g/l; Metanol 10 g/l.

La actividad de alcohol oxidasa se presenta cerca de las 15 horas, inmediatamente después de que se acaba la glucosa. lo cual puede resultar engañoso al suponer que la síntesis de alcohol oxidasa se ve reprimida por la presencia de glucosa como se informa en trabajos anteriores (Sahm, 1977; Veenhuis y col., 1983). Se logró detectar actividad después de agregado el metanol (10 h) pero ésta no pudo ser cuantificada con la técnica empleada en este trabajo.

Esta disminución en la actividad de la enzima alcohol oxidasa en mezclas de metanol y glucosa ya había sido reportada anteriormente (Eggeling y Sahm, 1980; Duff y Murray, 1988; Brinkmann y Babel, 1992; Teugyas y Simisker, 1994).

En el caso de esta fermentación el descenso en la actividad no se debió a la presencia de glucosa ya que esta ya había sido consumida totalmente, esta disminución a pesar de haber metanol esta relacionada con el crecimiento tan bajo que se obtuvo ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en la fermentación con metanol como única fuente de carbono, la síntesis de la enzima estaba relacionada directamente con la velocidad de crecimiento, de esta manera tenemos que después de las 20 horas la velocidad específica de crecimiento fue muy baja casi cercana a cero por lo que la actividad enzimática también disminuyó. Ahora bien el hecho de que la actividad permanezca constante después de desaparecido el metanol del medio confirma que este puede ser acumulado en las células y por eso se mantiene la actividad. Es importante señalar que los valores de actividad de alcohol oxidasa estuvieron muy por debajo de los obtenidos en metanol como única fuente de carbono.

En la siguiente fermentación el metanol se agregó desde el inicio de la fermentación con la mezcla de sustratos, esperando que se presentara actividad de alcohol oxidasa aún en presencia de glucosa. Esta suposición fue confirmada experimentalmente. La disminución de la actividad de alcohol oxidasa puede deberse a la represión o a la inactivación catabólica (Eggeling y Sahm, 1980; Bruinenberg y col., 1982; Veenhuis y col., 1983; Tani y col., 1988; Murray y col., 1990). La primera es a nivel de control de la síntesis de la enzima y la segunda involucra la inactivación o degradación de la enzima. pero hay pocos reportes de represión de síntesis de alcohol oxidasa por glucosa (Eggeling y Sahm, 1980).

Puesto que se tenían evidencias de que había actividad de alcohol oxidasa aún en presencia de glucosa, se decidió disminuir la cantidad de glucosa para permitir un incremento en la actividad y buscando no afectar el rendimiento obtenido para metanol como única fuente de carbono. Para esto se decidió agregar desde el principio el metanol junto con la glucosa para que la levadura se adaptara a ambos sustratos y así utilizarlos de manera simultánea.

#### 4.4 Producción de la alcohol oxidasa en mezclas de glucosa-metanol.

Los resultados anteriores nos indican que hubo consumo de metanol en presencia de glucosa, por lo que se procedió a determinar las concentraciones óptimas de glucosa y metanol con las cuales podemos obtener la mayor actividad total de alcohol oxidasa (U/l). Para ello se propuso realizar un diseño factorial. Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores para estudiar su efecto conjunto sobre una respuesta. Los resultados son entonces utilizados para encontrar los componentes o condiciones que más afectan dicha respuesta y así proponer otra serie de experimentos en donde algunos componentes se incrementan, y otros se disminuyen, hasta llegar a un nivel óptimo de cada componente (Montgomery, 1991, Saucedo-Castañeda, 1991; Trejo-Hernández, 1992).

Se eligieron metanol, glucosa y extracto de levadura como los componentes que más influyen en el medio para la producción de la alcohol oxidasa de acuerdo a los criterios siguientes:

- \* Es necesaria la presencia de metanol para que se induzca la síntesis de la enzima alcohol oxidasa ya que es la primera enzima que participa en el metabolismo de metanol.
- \* El crecimiento celular en metanol es muy limitado por lo que se utilizó una segunda fuente de carbono que incremente la producción de biomasa; esta fuente fue la glucosa. Los experimentos realizados anteriormente y la información revisada indicaron que esto es factible.
- \* De acuerdo a la bibliografía, la adición de extracto de levadura da como resultado un incremento en la producción de biomasa y en la actividad específica de la alcohol oxidasa, pero en exceso reduce esta actividad.

Una vez escogidos los factores, se realizó un plan factorial completo de la forma  $2^3$ , caso especial de diseño factorial general  $2^k$ , donde k son los factores de interés que se estudian a dos niveles (inferior y superior).

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia relativa de estos tres factores en la actividad de la enzima alcohol oxidasa. De acuerdo a la bibliografía y a los experimentos realizados anteriormente se determinaron las unidades de variación para cada componente considerando la concentración del medio original. De esta forma se estableció el nivel superior y el inferior para cada componente, de acuerdo a la tabla 4.4.

**Tabla 4.4 Relación entre los valores de los niveles codificados y los valores reales de los factores.**

Factores	Unidades	Valor Central	Intervalo	Nivel de los factores	
				-1	+1
A Metanol	g/l	10	3 (30 %)	7	13
B Glucosa	g/l	4	2 (50 %)	2	6
C Extracto de levadura	g/l	1	0.3 (30 %)	0.7	1.3

En la tabla 4.5 se establece la matriz de experiencias con los valores de los niveles codificados para los diferentes factores. Se procedió a sustituirlos por los valores reales y se prepararon los medios.

**Tabla 4.5 Matriz de experimentos con los valores de los niveles codificados para los diferentes factores.**

Ensayo No.	Niveles de los factores		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Una vez establecida la composición de los medios, se procedió a realizar cultivos por lote partiendo de un inóculo de metanol 10 g/l, se tomaron muestras cada hora hasta llegar al consumo total de glucosa.

El efecto de los factores fue modelado de acuerdo al siguiente polinomio (Montgomery, 1991; Saucedo-Castañeda, 1991):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1 X_3 + \beta_6 X_2 X_3 + \beta_7 X_1 X_2 X_3$$

donde Y es la respuesta, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> corresponden a los valores codificados de concentración de metanol, glucosa y extracto de levadura,  $\beta_0$  es un término independiente que corresponde al valor de la respuesta cuando los factores se encuentran en su nivel central (centro del dominio experimental),  $\beta_1$  a  $\beta_6$  son los coeficientes correspondientes a los diferentes factores y sus interacciones. Para ajustar los valores experimentales se realizó una regresión múltiple.

#### 4.4.1 Comportamiento cinético en los diferentes medios de cultivo.

La figura 4.13 muestra las cinéticas de crecimiento en los diferentes medios. Para cada fermentación se partió de un inóculo crecido en metanol 10 g/l como fuente de carbono en agitación a 250 r.p.m. y a 30 °C. Se realiza la cosecha a las 30 horas de cultivo, cuando la levadura se encuentra en su fase exponencial. Lo anterior se hizo con el fin de tener un inóculo similar y de esta forma partir de una misma concentración de biomasa. En la figura 4.13 se aprecia que en la mayoría de los casos esta concentración inicial es de aproximadamente 0.2 g biomasa/l.

Debido a lo anterior, la fase de adaptación en todos los casos fue de aproximadamente 5 horas. Se observa que las cinéticas de biomasa son muy similares variando únicamente los valores de biomasa máxima. En los medios 5, 7 y 8 se observa el crecimiento diáuxico, no así en los otros donde se obtuvo una curva de crecimiento típica. El medio con el cual se obtuvo la mayor biomasa de 3.4 g biomasa/l fue el medio 8 en el cual todos los factores están en su máximo nivel seguido del medio 7 con 3.2 g biomasa/l (en este medio el metanol se encuentra en su nivel más bajo). Como se esperaba, el caso contrario se obtuvo con el medio 1 en el cual los factores se encuentran en su nivel más bajo, con una concentración de biomasa de 0.275 g biomasa/l.

En la figura 4.14 se presenta una comparación de la actividad total de la enzima alcohol oxidasa a los diferentes tiempos de fermentación, obtenida con los medios propuestos. Se observa que la mayor actividad total de la enzima se logró con el medio 5 el cual contenía 7 g/l metanol, 2 g/l glucosa y 1.3 g/l de extracto de levadura. Los medios 4 y 8 presentan perfiles parecidos y un máximo de actividad total mayor a las 12 horas. Estos medios contenían al metanol y la glucosa en sus niveles más altos variando el extracto de levadura. Por el contrario, el medio con el que se obtuvo la menor actividad total fue el medio 7 que contenía 7 g/l de metanol, 6 g/l de glucosa y 1.3 g/l de extracto de levadura. Se observa que desde el inicio de la fermentación se detecta actividad de alcohol oxidasa. y que esta actividad, al contrario de lo que se esperaba, presenta variabilidad. Posiblemente esto se deba al

efecto de la dilución en el medio del inóculo con actividad de alcohol oxidasa y a la presencia de glucosa en el medio, es decir que el inóculo ya traía un actividad determinada y al pasarlo a un volumen mayor va disminuyendo, ya que la presencia de glucosa afecta inmediatamente la actividad de la alcohol oxidasa, en concordancia con lo observado en experimentos anteriores a este trabajo.

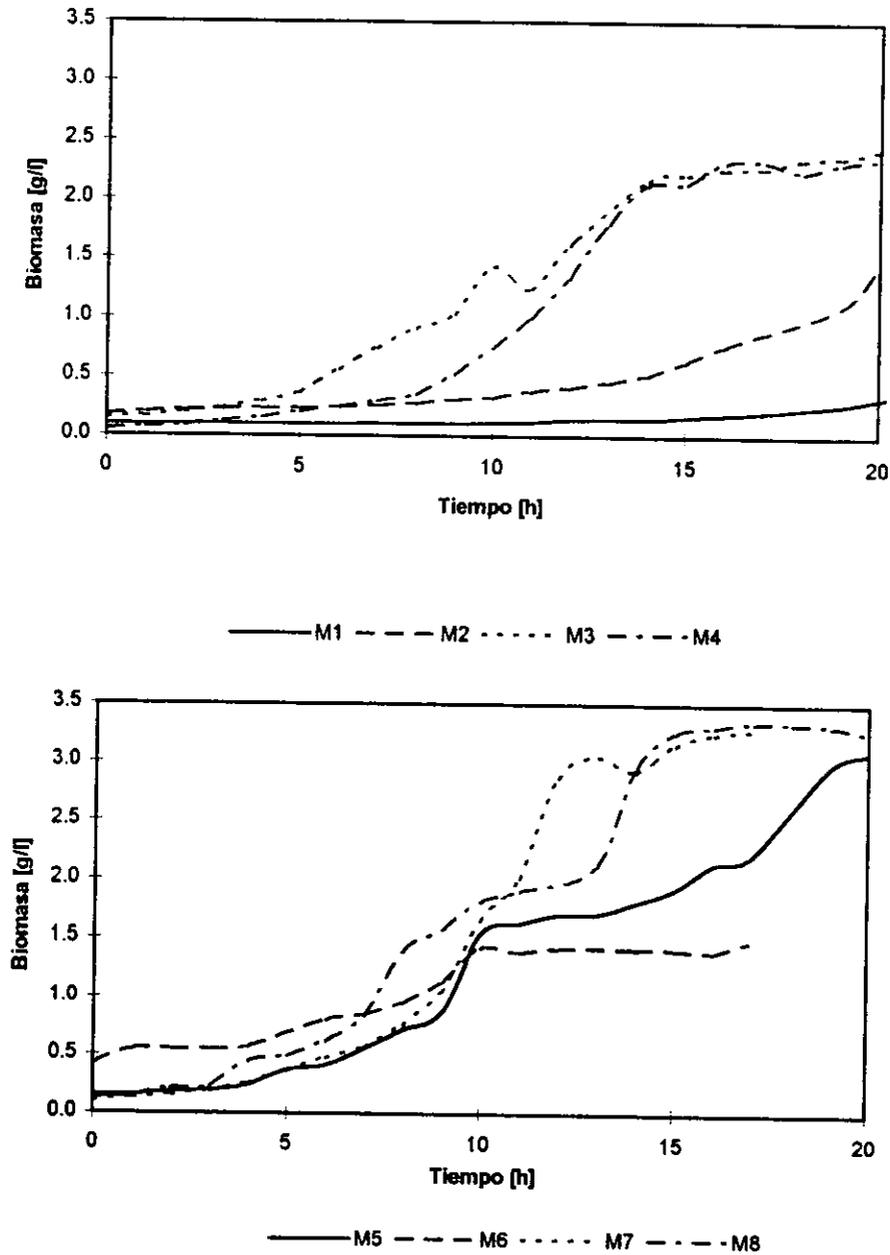


Figura 4.13 Efecto de la composición de los diferentes medios de cultivo en el crecimiento de *P. pastoris*.

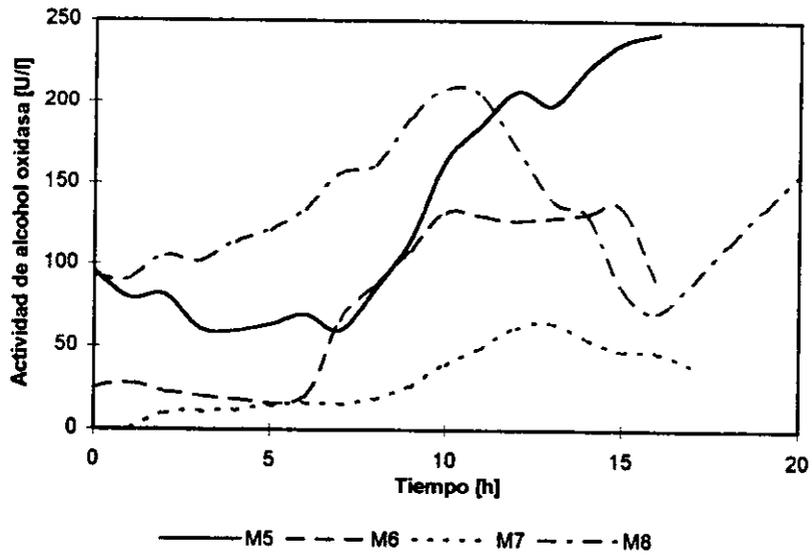
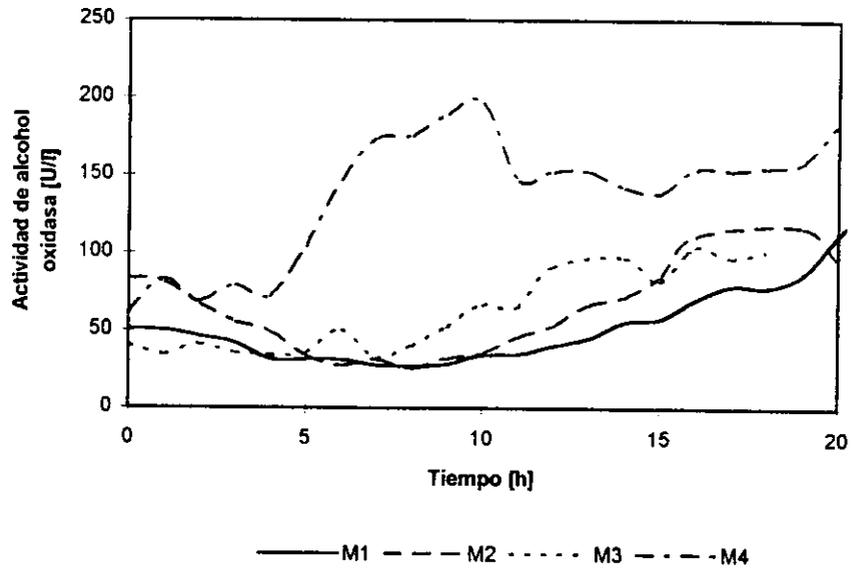


Figura 4.14 Efecto de la composición de los diferentes medios en la actividad de alcohol oxidasa de *P. pastoris*.

Se observa que en el caso de los medios 4, 5 y 8 se logran actividades cercanas a las obtenidas con metanol como única fuente de carbono y 1 g/l de extracto de levadura.

#### 4.4.2 Efecto de los factores.

Para realizar el análisis del experimento factorial se tomaron los valores máximos de actividad de alcohol oxidasa (U/l), no se tomaron las productividades porque lo que realmente interesaba era la actividad total (U/l) independientemente del tiempo ya que el proceso de purificación es más costoso que el de fermentación. En la tabla 4.6 observamos los resultados del experimento factorial.

**Tabla 4.6 Resultados del experimento factorial.**

Número de ensayo	Factor			Combinación de tratamientos	Actividad de alcohol oxidasa [U/l]. Replicas	
	A	B	C		I	II
1	-	-	-	(1)	173.162	171.753
2	+	-	-	a	120.535	116.442
3	-	+	-	b	103.429	100.535
4	+	+	-	ab	181.831	188.327
5	-	-	+	c	237.141	242.632
6	+	-	+	ac	130.771	135.058
7	-	+	+	bc	64.12	61.515
8	+	+	+	abc	207.831	203.74

El efecto relativo de los factores sobre la actividad total de alcohol oxidasa se presenta en la figuras 4.15. Observamos que la mayoría de los factores y sus interacciones presentan efecto sobre la actividad de alcohol oxidasa, excepto la interacción de metanol con extracto de levadura, el principal efecto positivo es la interacción de metanol con glucosa, y los únicos efectos negativos son de la glucosa y su interacción con el extracto de levadura.

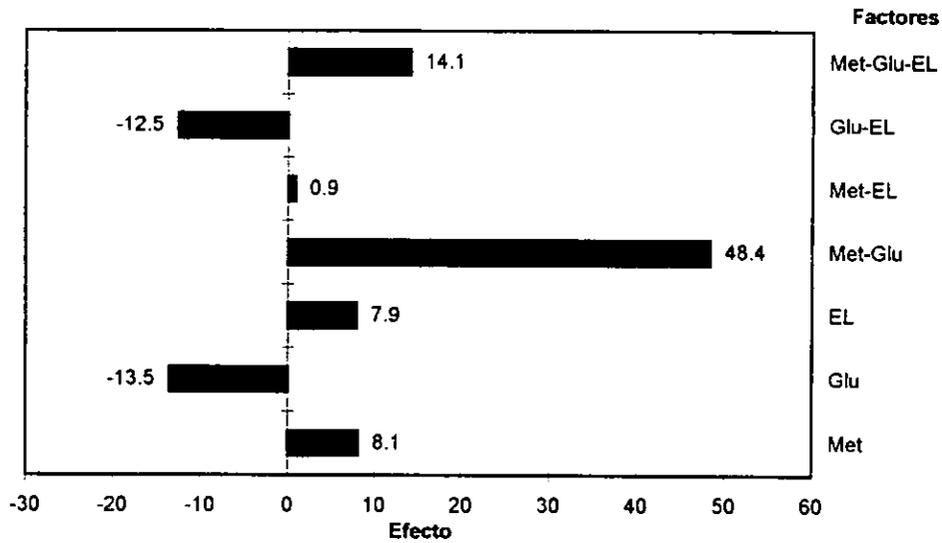


Figura 4.15 Efecto de los factores en la actividad de alcohol oxidasa

En la tabla 4.7 observamos los efectos ordenados y sus puntos de probabilidad que nos permitirán construir la gráfica de probabilidad normal e histograma de efectos que corresponde a la figura 4.16.

Tabla 4.7 Efectos ordenados y puntos de probabilidad.

Orden ( <i>j</i> )	Efecto	Estimación	$P_j$ $(j - 0.5)/7$
7	ab	48.38	0.9285
6	abc	14.11	0.7857
5	a	8.14	0.6428
4	c	7.92	0.5000
3	ac	0.86	0.3571
2	bc	-12.54	0.2142
1	b	-13.51	0.0714

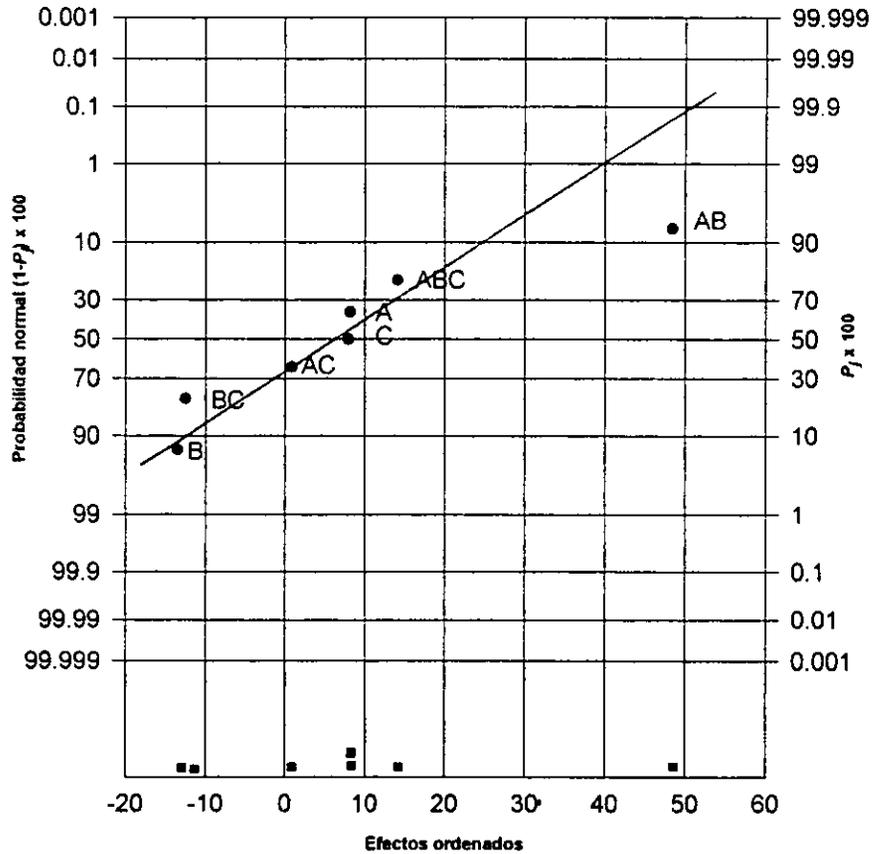


Figura 4.16 Gráfica de probabilidad normal e histograma para los efectos.

En la figura 4.16 observamos que los efectos importantes que se descubren en este análisis son los efectos principales de metanol con glucosa y glucosa. Los efectos que se ubican en una línea recta son despreciables y los efectos grandes están alejados de ella, en realidad en esta gráfica el efecto principal más evidente es el de metanol con glucosa, sin embargo siempre es necesario examinar cualesquiera interacciones que sean importantes.

Para confirmar la significancia de los efectos principales se procedió a realizar un análisis de varianza., el cual se resume en la tabla 4.8. De este análisis de varianza encontramos que a excepción de la interacción metanol-extracto de levadura toda los demás fuentes de variación presentan diferencia altamente significativa al comparar con los valores de F de tablas, lo cual indica que influyen en la actividad de alcohol oxidasa.

**Tabla 4.8 Análisis de varianza para la actividad de alcohol oxidasa.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada
A	1060.2838	1	1060.2838	120.0069 (**)
B	2920.4837	1	2920.4837	330.5515 (**)
C	1004.7949	1	1004.7949	113.7265 (**)
AB	37443.4110	1	37443.4110	4237.9890 (**)
AC	11.7923	1	11.7923	1.3347 (NS)
BC	2515.6745	1	2515.6745	284.7336 (**)
ABC	3185.1349	1	3185.1349	360.5058 (**)
Error	70.6800	8	8.8351	
Total	48212.2570	15		

(\*) Diferencia significativa, si  $F_{calculada} > F_{tablas\ 5\%} = 5.32$

(\*\*) Diferencia altamente significativa, si  $F_{calculada} > F_{tablas\ 1\%} = 11.26$

(NS) No hay diferencia significativa, si  $F_{calculada} \leq F_{tablas\ 5\%} = 5.32$

De esta manera tenemos que el modelo propuesto para predecir la actividad de alcohol oxidasa en función de los factores es el siguiente:

$$Y = 152.42 + 8.14X_1 - 13.51X_2 + 7.92X_3 + 48.38X_1X_2 - 12.54X_2X_3 + 14.11X_1X_2X_3$$

donde las variables codificadas  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  representan a metanol, glucosa y extracto de levadura respectivamente. La suma de cuadrados del modelo es:

$$SS_{Modelo} = SSA + SSB + SSC + SSAB + SSBC + SSABC$$

y el coeficiente de regresión

$$R^2 = SS_{Modelo} / SST = 48129.7828 / 48212.257 = 0.99$$

De modo que el modelo explica alrededor del 99 % de la variabilidad en la actividad de alcohol oxidasa en U/l.

Los residuos de este experimento se generan empleando el modelo de regresión, de acuerdo a la fórmula:

$$e_{ij} = Y_{\text{calculada}} - Y_{\text{experimental}}$$

En la tabla 4.9 observamos los residuos ordenados y puntos de probabilidad para los datos experimentales de alcohol oxidasa, y en la figura 4.17 tenemos la gráfica de los residuos con respecto a la actividad de alcohol oxidasa predicha por el modelo, observamos que no presentan algún patrón y además los residuos son muy pequeños por lo que el modelo propuesto es adecuado para predecir la actividad de alcohol oxidasa.

También se realizó la gráfica de probabilidad normal e histograma de residuos, figura 4.18, se observa que la distribución de los errores es normal ya que es prácticamente una línea recta, únicamente en los extremos hay desviaciones moderadas las cuales no tienen mucha importancia en el análisis de varianza. La normalidad es importante porque al no haberla se ve afectado el modelo propuesto y por consiguiente el análisis de varianza para la prueba F ya que las desviaciones de la normalidad hacen que el nivel de significancia verdadero difiera de los valores especificados (Box y col., 1987; Montgomery, 1991).

Para comprender mejor el comportamiento de la actividad de alcohol oxidasa (U/l) en función de los factores involucrados, se procedió a construir la gráfica de los efectos principales e interacciones. En la figura 4.19 se encontró que los efectos de A (metanol) y C (extracto de levadura) son positivos y el efecto de B (glucosa) es negativo. Si consideramos sólo estos tres efectos principales, podemos correr los factores A y C a su nivel más alto y el B a su nivel bajo para aumentar la actividad de alcohol oxidasa. Sin embargo como se mencionó anteriormente siempre es necesario examinar las interacciones que sean importantes, ya que los efectos principales no tienen mucho sentido cuando están implicados en interacciones significativas.

En lo que respecta a las interacciones recordemos que solo AB y BC tenían efecto en la respuesta. Sin embargo también se construyó la gráfica de AC para observar que a cualquiera de los niveles trabajados en esta interacción no se aprecia un incremento muy importante en la actividad. La interacción AB indica que para obtener actividades altas es necesario, ya sea aumentar ambos compuestos (glucosa y metanol) o bien disminuirlos. En lo que respecta a la interacción BC el extracto de levadura tiene poco efecto a bajo nivel de glucosa, pero un gran efecto positivo en el nivel alto de glucosa.

Por lo tanto, las mayores actividades se obtienen al parecer cuando C se encuentra en su nivel más alto y A y B pueden estar en cualquiera de los dos niveles.

Tabla 4.9 Residuos ordenados y puntos de probabilidad para los datos de actividad de alcohol oxidasa.

Orden $k$	Número de ensayo	Y calculada	Y experimental	Residuo $e_{ij}$	$P_k$ $(k - 0.5)/16$
16	4	185.9374	181.831	4.1064	0.9687
15	5	240.7449	237.141	3.6039	0.9062
14	2	119.3469	116.442	2.9049	0.8437
13	7	63.6759	61.515	2.1609	0.7812
12	6	132.0559	130.771	1.2849	0.7187
11	8	204.9269	203.74	1.1869	0.6562
10	3	101.1234	100.535	0.5884	0.5937
9	1	171.5989	171.753	-0.1540	0.5312
8	7	63.6759	64.12	-0.4440	0.4687
7	2	119.3469	120.535	-1.1880	0.4062
6	1	171.5989	173.162	-1.5630	0.3437
5	5	240.7449	242.632	-1.8870	0.2812
4	3	101.1234	103.429	-2.3055	0.2187
3	4	185.9374	188.327	-2.3895	0.1562
2	8	204.9269	207.831	-2.9040	0.0937
1	6	132.0559	135.058	-3.0020	0.0312



Figura 4.17 Gráfica de residuos contra la actividad teórica de alcohol oxidasa.

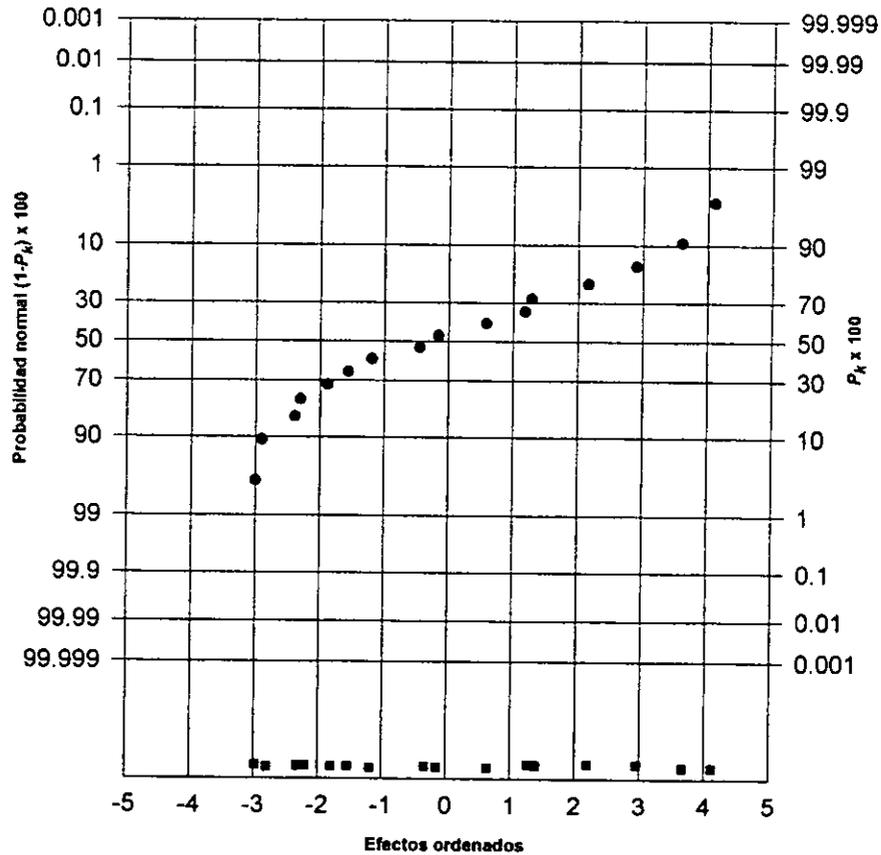


Figura 4.18 Gráfica de probabilidad normal e histograma de residuos.

El análisis de las gráficas de efectos principales e interacciones genera resultados que permiten decidir a que niveles se manejarán los componentes para la construcción de curvas de isorrespuesta para la actividad de alcohol oxidasa. Estas curvas se muestran en las figuras 4.20 y 4.21, son una proyección del polinomio propuesto anteriormente. Como sólo es posible representar dos factores a la vez, a los factores que no se representan se les dio el valor de +1 para extracto de levadura y -1 para glucosa, de acuerdo a lo encontrado en las gráficas de efectos principales. Las curvas están limitadas a los valores de los niveles inferior y superior.

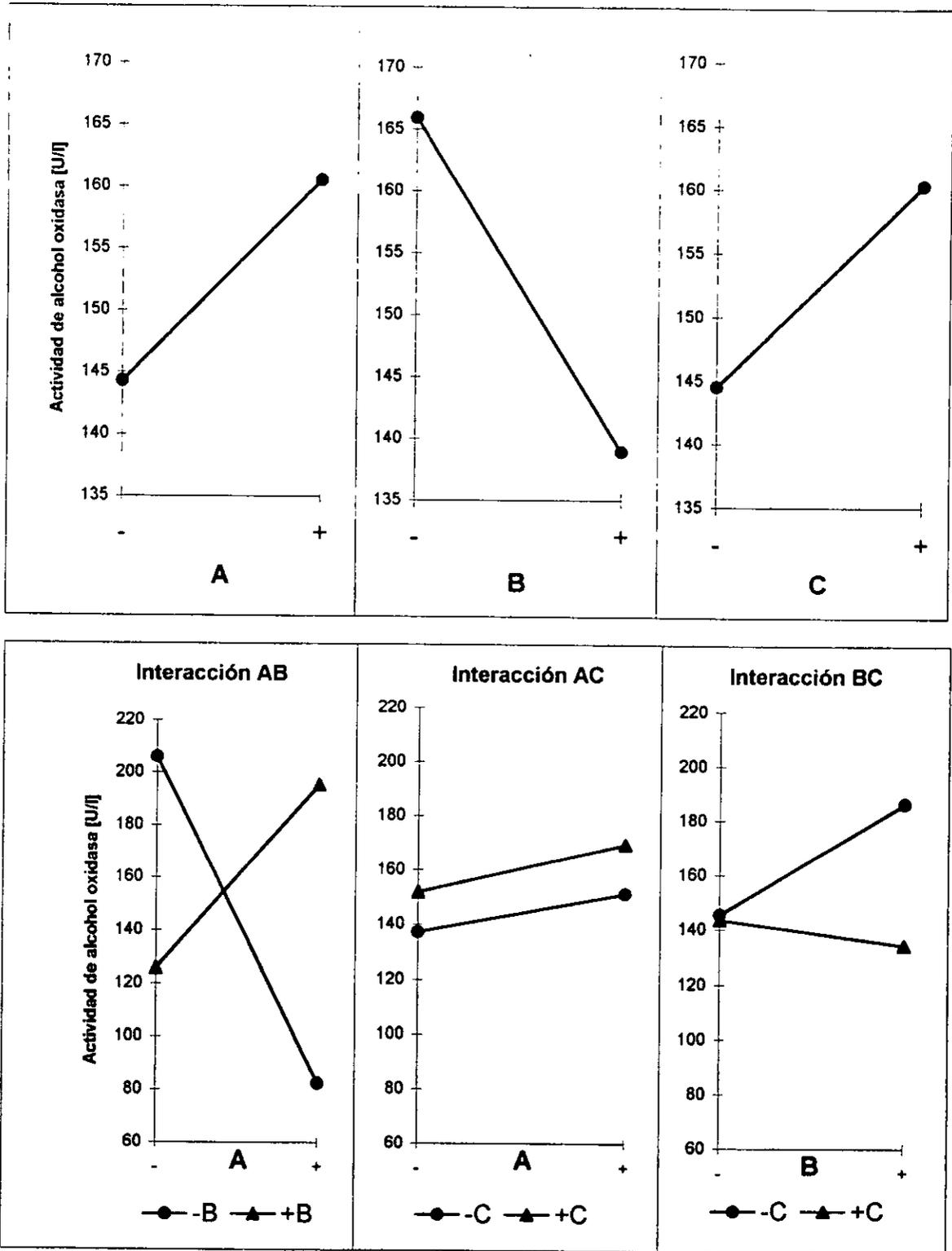
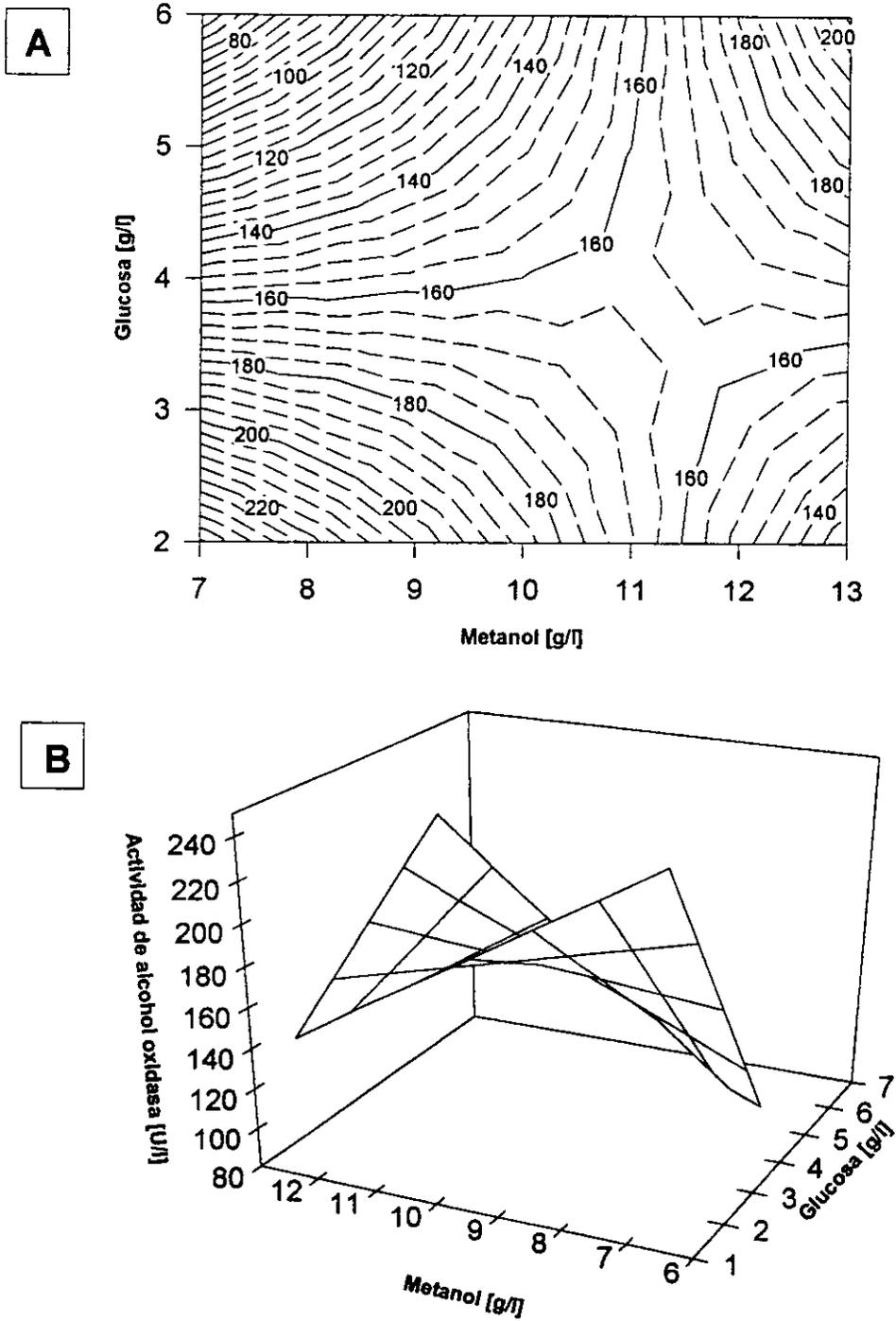


Figura 4. 19 Gráficas de efectos e interacciones.



**Figura 4.20 Efecto del metanol y glucosa sobre la actividad de alcohol oxidasa. Curvas de isorrespuesta. A: contorno de la superficie de respuesta y B: superficie de respuesta.**

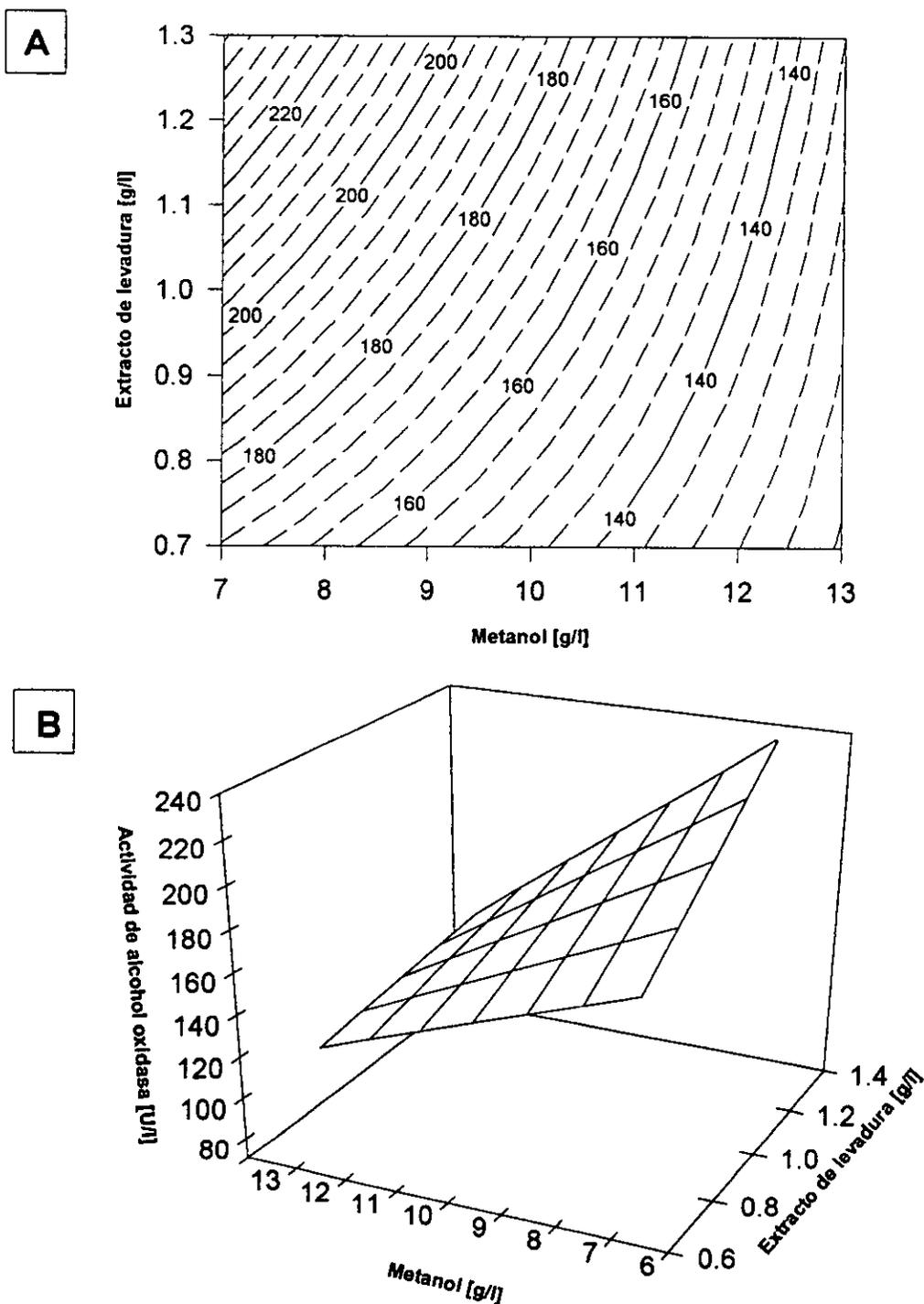


Figura 4.21 Efecto de metanol y extracto de levadura sobre la actividad de alcohol oxidasa. Curvas de isorrespuesta. A: contorno de la superficie de respuesta y B: superficie de respuesta.

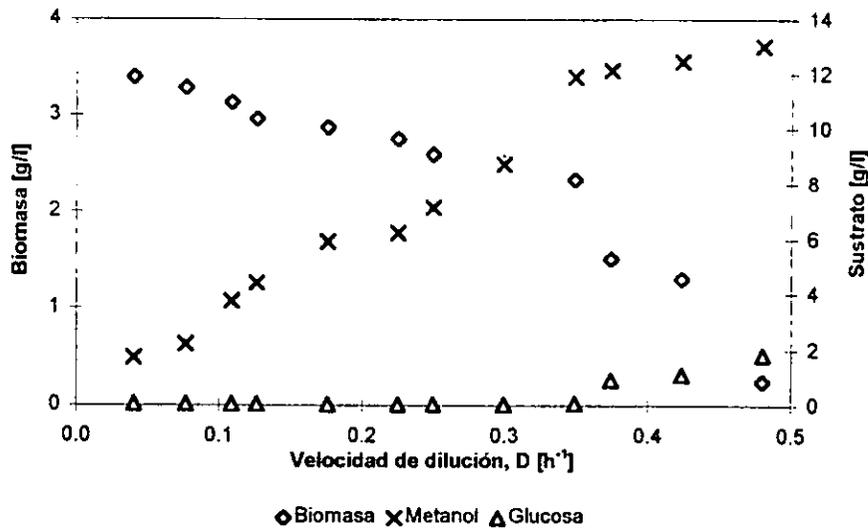
En la figura 4.20 se presentan las curvas de isorrespuesta para el efecto del metanol y la glucosa sobre la actividad total, y en la figura 4.21 para el efecto del metanol y el extracto de levadura. Los análisis de estas curvas nos indican que los mejores resultados de actividad total (aproximadamente 240 U/l) se obtienen con 7 g/l de metanol, junto con 2 g/l de glucosa y 1.3 g/l de extracto de levadura de acuerdo con ambas figuras. Podemos observar que estos resultados concuerdan con los obtenidos experimentalmente, y que son valores cercanos a los de metanol como única fuente de carbono. De esta manera encontramos que en este trabajo fue posible producir la enzima alcohol oxidasa con mezclas de glucosa y metanol alcanzando niveles altos y se logró aumentar el crecimiento al utilizar glucosa y extracto de levadura.

Posteriormente se decidió realizar un cultivo continuo con uno de los medios para observar el comportamiento en función de la velocidad de dilución.

#### 4.5 Comportamiento cinético de *P. pastoris* en cultivos continuos.

Se realizó un cultivo continuo con la composición obtenida de uno de los experimentos factoriales, 13 g/l de metanol, 6 g/l de glucosa y 0.7 g/l de extracto de levadura. En la figura 4.22 se observa que a bajas velocidades de dilución se obtuvo la máxima biomasa con un valor de 3.5 g biomasa/l y se logró un consumo casi total de metanol y completo de glucosa, este rendimiento es parecido al encontrado para los cultivos por lote con glucosa, metanol y mezcla de ambas. Al incrementarse la velocidad de dilución (D) la biomasa disminuye hasta alcanzar un punto en el que se presenta el lavado ( $D \approx 0.5 \text{ h}^{-1}$ ). Este valor es muy parecido al reportado para *H. polymorpha* en mezclas de glucosa y metanol (0.46-0.51  $\text{h}^{-1}$ ), (Eggeling y Sahn, 1980; Egli y col., 1986; Giuseppin y col., 1988; Giuseppin, 1989; Bryers y Yeh, 1990). En estos trabajos también se encontró que la glucosa es completamente consumida a velocidades de dilución por debajo de 0.46  $\text{h}^{-1}$ , mientras que para este trabajo el valor fue de 0.35  $\text{h}^{-1}$ .

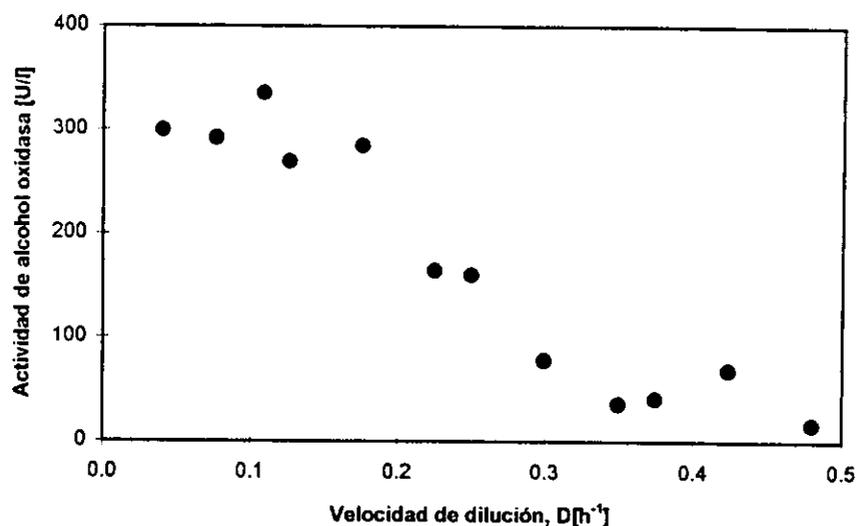
Se puede observar que a bajas velocidades de dilución los sustratos se aprovechan, pero eso no se refleja en un incremento de biomasa, lo cual sugiere una acumulación de metanol en las levaduras como se había indicado anteriormente. También observamos que conforme aumenta el valor de D el metanol ya no se consume. Al parecer a altas velocidades de dilución solo la glucosa es metabolizada, pero aún hay actividad de alcohol oxidasa porque una parte del metanol se está utilizando.



◆ Biomasa × Metanol ▲ Glucosa  
**Fig. 4.22 Fermentación de *Pichia pastoris* en cultivo continuo. Medio de cultivo: Metanol 13 g/l, Glucosa 6 g/l, EL 0.7 g/l.**

En lo que respecta a la actividad total de alcohol oxidasa, esta fue disminuyendo conforme aumentaba la velocidad de dilución de acuerdo a la figura 4.23, pero es importante señalar que no desapareció aún a altas velocidades de dilución, y que los máximos valores de actividad son muy parecidos a los encontrados en metanol como única fuente de carbono (320 U/l), también se debe notar que en cultivo continuo a bajas velocidades de dilución, se logra mayor producción de la enzima que en los cultivos por lote para las mezclas de sustratos.

Los estudios realizados con mezclas de sustratos metanol y glucosa también explican que la actividad de alcohol oxidasa durante el cambio de una baja velocidad de dilución a una alta, se ve limitada, no a nivel de transcripción sino más bien durante el paso postranscripcional, al polimerizarse los monómeros de alcohol oxidasa son incapaces de unirse al FAD. Durante el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono la enzima se ve reprimida completamente, pero bajo limitación de ésta y en presencia de metanol las enzimas que participan en la oxidación del metanol se incrementan cuando disminuye la velocidad de dilución. De acuerdo a lo anterior los términos desrepresión-represión resultan más adecuados para describir la regulación de las enzimas que participan en la asimilación del metanol (Bryers y Yeh., 1990; Chu y Papoutsakis, 1987b)



**Fig. 4.23 Fermentación de *P. pastoris* en cultivo continuo.  
Efecto de la D en la actividad total.  
Metanol 13 G/l, Glucosa 6 g/l y Ext Lev 0.7 g/l**

Como ya se había señalado anteriormente, al comparar los valores obtenidos de actividad con otros trabajos (Sahm, 1977; Duff y Murray, 1988), se encontró que los valores determinados en este estudio estuvieron un orden por debajo de los informados en bibliografía, por lo que se sugiere que el método de determinación de actividad pudo ser la diferencia.

## 5. CONCLUSIONES

Para la determinación de actividad de alcohol oxidasa no se requiere permeabilizar la pared celular de la levadura *P. pastoris*, se pueden utilizar las células enteras.

La presencia de extracto de levadura no afecta los valores de  $v_{max}$  y  $K_m$  de la alcohol oxidasa en el paquete celular

La evaporación de metanol sigue un comportamiento lineal en el rango de concentraciones trabajado por lo que es necesario reponerlo y así determinar parámetros reales.

Los rendimientos de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) en metanol fueron muy similares a los obtenidos en glucosa debido a la adición de extracto de levadura al medio. Los rendimientos respectivos para metanol y glucosa fueron de 0.34 y 0.4 y para la mezcla de ambos fue de 0.32. El alto rendimiento en metanol se debe a la presencia del extracto de levadura, el cual favorece el crecimiento del microorganismo en metanol, sin embargo el crecimiento continua siendo lento en este sustrato.

Con metanol 10 g/l como única fuente de carbono se obtuvo una actividad total máxima de 950 U y una actividad específica máxima de 200 U/g biomasa; para la mezcla de metanol con glucosa cada una a una concentración de 10 g/l los valores fueron de 380 U y 25 U/g biomasa, con glucosa no se detectó actividad de alcohol oxidasa.

En las mezclas de glucosa y metanol para cultivo por lote las actividades encontradas siempre estuvieron por debajo de las obtenidas únicamente con metanol.

En todos los experimentos factoriales desde el inicio de la fermentación se detectó actividad, observándose en varios medios el crecimiento diáuxico.

La interacción de metanol con glucosa presenta el efecto más importante en la actividad de alcohol oxidasa. Los demás efectos, salvo la interacción de metanol con extracto de levadura también son significativos pero en menor grado.

El modelo generado predice satisfactoriamente la actividad de alcohol oxidasa obtenida en los experimentos factoriales con un coeficiente de correlación de 0.99.

El medio con el que se obtuvo la mayor actividad contenía glucosa 2 g/l, metanol 7 g/l y extracto de levadura 1.3 g/l, lo cual concuerda con lo obtenido en las curvas de isorrespuesta y también al maximizar la respuesta de acuerdo con el polinomio obtenido, el valor de actividad fue de 240 U/l.

En el cultivo continuo realizado con el medio que contenía 13 g/l de metanol, 6 g/l de glucosa y 0.7 % de extracto de levadura, se encontró que a bajas velocidades de dilución se logró la mayor asimilación de metanol, la mayor producción de biomasa y de actividad de alcohol oxidasa. A altas velocidades de dilución solo se consumió la glucosa aunque también hubo presencia de actividad si bien, a bajos niveles.

En el cultivo continuo a bajas velocidades de dilución con la mezcla de sustratos se obtuvieron valores de actividad cercanos a los obtenidos únicamente con metanol (300 U/l).

## 6. RECOMENDACIONES

Dado que el ensayo de actividad de alcohol oxidasa se realizó en medio acuoso, y se determinó la producción del acetaldehído acumulado por medio de cromatografía de gases, el medio acuoso interfiere en la definición de los picos de integración. Se recomienda desarrollar otra técnica más adecuada para la determinación.

Los resultados del diseño factorial nos indican los componentes que más afectan la respuesta de interés y permiten proponer una nueva serie de experimentos en donde algunos componentes se incrementen y otros se disminuyan hasta llegar al nivel óptimo de cada uno, para lo anterior es posible maximizar el polinomio pero a otros niveles codificados para encontrar un medio con el que se obtenga mayor actividad y posteriormente comprobarlo experimentalmente.

Es recomendable comprobar experimentalmente los valores de actividad del medio con el que se obtiene la respuesta cuando los valores se encuentran en su nivel central.

De igual forma se sugiere realizar un cultivo continuo con el medio con el cual se obtuvo la mayor actividad de alcohol oxidasa.

Es recomendable profundizar los estudios con el sistema de cultivo continuo ya que proporcionará mayor información en función de la velocidad específica de crecimiento. Esto ayudaría a la construcción de simuladores que puedan predecir el comportamiento de la levadura *P. pastoris* y modelos de producción de la enzima alcohol oxidasa.

También se sugiere manejar otros sistemas de cultivo con los cuales se favorezca la producción de la enzima; por ejemplo, un cultivo alimentado lineal o exponencialmente. En el caso de los cultivos exponenciales es posible alcanzar un estado estable parecido al cultivo continuo bajo ciertas condiciones, lo cual sería adecuada para trabajar a velocidades de dilución bajas donde se consume el metanol y se produce mayor cantidad de enzima.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aitchison J. D., Nuttley W. M., Szilard R. K., Brade A. M., Glover J. R., Rachubinski R. A. (1992) Peroxisome biogenesis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6 (23): 3455-3460.

Armstrong D. W., Martin S. M., Yamazaki H. (1984) Production of acetaldehyde from ethanol by *Candida utilis*. *Biotechnol. Lett.* 6 (3): 183-188.

Baratti J., Couderc R., Cooney C. L., Wang D. I. C. (1978) Preparation and properties of immobilized methanol oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 333-348.

Barzana E., Karel M., Klibanov A. M. (1989). Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 1178-1185.

Becker W. M. (1986) The world of the cell. The Benjamin/Cummings Publishing Company. California, U. S. A. p 346-368.

Belov A. P., Gusel'nikova T. V., Zinchenko G. A. (1995) Isolation of peroxisomes from *Candida maltosa* and investigation of their role in lipid metabolism compartmentation. *Microbiol.* 64 (6): 632-635.

Biryuzova V. Y., Pomoshchnikova N. A. (1996) Formation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Candida (Kloeckeria) boidinii*. *Microbiol.* 65 (1): 41-46.

Box G. E., Hunter W. G., Hunter J. S. (1987) Statistics for the experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. p 653.

Brinkmann U., Babel W. (1992) Simultaneous utilization of heterotrophic substrates by *Hansenula polymorpha* MH30 results in enhanced growth rates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 98-103.

Bruinenberg P. G., Veenhuis M., van Dijken J. P., Duine J. A., Harder W. (1982) A quantitative analysis of selective inactivation of peroxisomal enzymes in the yeast, *Hansenula polymorpha*, by high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 45-50.

Bryers J. D., Yeh T. (1990) Diauxic metabolism of *Hansenula polymorpha*. *Annals New York Academy of Sciences*. 589: 315-332.

Bryers J. D., Yeh T., Schweickart R. W. (1991). Diauxic metabolism in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* during repeated transients in system dilution rate. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 412-418.

Cartledge T. G. (1987) Sustrate utilization non-carbohydrate substrates. En: *Yeast biotechnology*. Berry D. R., Russell I., Steward G. C. (Ed.) Allen & Unwin, England. p. 311-342..

Couderc R., Baratti J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 44: 2279-2289.

Chaplin M. F., Bucke C. (1990) *Enzyme technology*. Cambridge University Press. p. 1-79, 138-166.

Chiang H. K., Foutch G. L., Fish W. (1991) Biological production of acetaldehyde from ethanol using non-growing *Pichia pastoris* whole cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 513-525.

Childs R. E., Bardsley W. G. (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145: 93-103.

Chu I. M., Papoutsakis E. T. (1987a). Growth dynamics of a methylotroph (*Methylomonas* L3) in continuous cultures. I. fast transients induced by methanol pulses and methanol acumulation. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 55-64.

Chu I. M., Papoutsakis E. T. (1987b). Growth dynamics of a methylotroph (*Methylomonas* L3) in continuous cultures. II. growth inhibition and comparison against an unstructured model. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 65-71.

Duff S. J. B., Murray W. D. (1988). Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 44-49.

Duff S. J. B., Murray W. D., 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. (1989). Oxidation of benzyl alcohol by whole cells of *Pichia pastoris* by alcohol oxidase in aqueous and nonaqueous reaction media. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 153-159.
- Duff S. J. B., Murray W. D. (1991). Oxygen and temperature effects on acetaldehyde-induced catabolite inactivation in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 82-86.
- Eggeling L., Sahm H. (1980). Regulation of alcohol oxidase synthesis in *Hansenula polymorpha*: oversynthesis during growth of mixed substrates and induction by methanol. *Arch. Microbiol.* 127: 119-124.
- Egli T., Fiechter A. (1981) Theoretical analysis of media used in the growth of yeast on methanol. *Journal of General Microbiology.* 123: 365-369.
- Egli T., Bosshard C., Hamer G. (1986). Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1735-1741.
- Ellis S. B., Brust P. F., Koutz P. J., Waters A. F., Harpold M. M., Gingeras T. R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.* 5 (5): 1111-1121.
- Faust U., Sittig W. (1977) Methanol as carbon source for biomass production in a loop reactor. *J. Ferm. Technol.* 55: 63-99.
- Giuseppin M. L. F., van Eijk H. M. J., Bes B. C. M. (1988). Molecular regulation of methanol oxidase activity in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 577-583.
- Giuseppin, M. L. F. (1989). Mathematical modeling of growth and production of alcohol oxidase by *Hansenula polymorpha* grown on methanol-glucose mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 524-535.
- Herzberg G. R., Rogerson M. (1985) Use of alcohol oxidase to measure the methanol produced during the hydrolysis of D- and L-methyl-3-hydroxybutyric acid. *Analytical Biochemistry.* 149: 354-357.
- Hoop M. J., Cregg J., Keizer-Gunnink I., Sjollem K., Veenhuis M., Ab G. (1991) Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *FEBS Letters.* 291(2): 299-302.

- Illanes A. (1994) Biotecnología de enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Universidad Católica de Valparaíso. p. 254
- Kemp G. D., Dickinson F. M., Ratledge C. (1988) Inducible long chain alcohol oxidase from alkane-grown *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:370-374.
- Kiel J. A. K. W., Keizer-Gunnink I., Krause T., Komori M., Veenhuis M. (1995) Heterologous complementation of peroxisome function in yeast: the *Saccharomyces cerevisiae* *PAS3* gene restores peroxisome biogenesis in a *Hansenula polymorpha* *per9* disruption mutant. *FEBS Letters.* 377: 434-438.
- Kompala D. S., Ramkrishna D., Jansen N. B., Tsao G. T. (1986) Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1044-1055.
- Kurtzman C. P. (1988) Identification and taxonomy. En: Yeast. Living resources for biotechnology. Kirsop B. E., Kurtzman C. P. (Ed.) Cambridge University Press. p 99-140.
- Lachance M. (1987) Approaches to yeast identification. En: Yeast biotechnology. Berry D. R., Russell I., Steward G. C. (Ed.) Allen & Unwin, England. p 33-51.
- Lazarow P. B., Fujiki Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1: 489-530.
- Lee J. M. (1992) Biochemical Engineering. Prentice Hall. Estados Unidos de America. p. 321.
- Legoy M. D., Kim H. S., Thomas D. (1985) Use of alcohol deshydrogenase for flavour aldehyde production. *Process Biochem.* 20 (5): 145-148.
- Luong J. H. T. (1987) Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 242-248.
- McNew J. A., Goodman J. M. (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends in Biochemical Sciences.* 21(2): 54-58.
- Montgomery D. C. (1991) Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamerica. p. 589

- Müller F., Hopkins T. R., Lee J., Bastiaens P. I. H. (1990) Methanol oxidase. En: Chemistry and biochemistry of flavoenzymes Volume III. Müller F. (Ed.) CRC Press. p 95-119.
- Murray W. D., Duff S. J. B., Beveridge T. J. (1990) Catabolite inactivation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (8): 2378-2383.
- Murray W. D., Duff S. J. B. (1990) Bio-oxidation of aliphatic and aromatic high molecular weight alcohols by *Pichia pastoris* alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 202-205.
- Nagai S. (1979) Mass and energy balances for microbial growth kinetics. *Adv. Biochem. Eng.* 11:49-83.
- Nelles L. P., Arnold J. A., Willman D. S. (1990) Enzymatic production of hydrogen peroxide and acetaldehyde in a pressure reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 834-838.
- Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. (1969) A yeast capable of utilising methanol. *Agr. Biol. Chem.* 33: 1519-1590.
- Osumi M., Imaizumi F., Imai M., Sato H., Yamaguchi H. (1975) Isolation and characterization of microbodies from *Candida tropicalis* PK 233 cells grown on normal alkanes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 375-387.
- Pütter J., Becker R. (1983) Peroxidases. En: Methods of enzymatic analysis Volume III. Meyer B. (Ed.) Editorial Consultant. p. 286-292.
- Sahm H. (1977) Metabolism of methanol by yeast. *Adv. Biochem. Eng.* 6: 75-103
- Sakai Y., Sawai T., Tani Y. (1987). Isolation and characterization of a catabolite repression-insensitive mutant of a methanol yeast, *Candida boidinii* A5, producing alcohol oxidase in glucose-containing medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (8): 1812-1818.
- Sakai Y., Tani Y. (1988) Production of formaldehyde by detergent-treated cells of a methanol yeast, *Candida boidinii* S2 mutant strain AOU-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (2): 485-489.
- Saucedo-Castañeda G. (1991) Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelli* cultivé sur support solide. Thèse pour obtenir le Diplôme de Doctorat. Université Montpellier II. France. p. 127-136.

Schügerl K. (1987) Bioreaction engineering Volume 1. John Wiley & Sons. p. 30-41.

Sibirny A. A., Titorenko V. I., Gonchar M. V., Ubiyvovk V. M., Ksheminskaya G. P., Vitvitskaya O. P. (1988) Genetic control of methanol utilization in yeasts. *J. Basic Microbiol.* 5: 293-319.

Smith J. E. (1988) Enzyme technology. En: Biotechnology. Arnold E. (Ed.) London, p 44-59.

Stewart G. G. (1981) The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can J. Microbiol.* 27 (10): 973-990.

Subramani S. (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 445-478.

Sudbery P. E., Gleeson M. A. G. (1989) Genetic manipulation of methylotrophic yeast. En: Molecular and cell biology of yeast. Walton E. F., Yarranton G. T. (Ed.) Blackie and Son Ltd. New York, U. S. A. p. 304-329.

Tanaka A., Osumi M., Fukui S. (1982) Peroxisomes of alkane grown yeast: fundamental and practical aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 183-199.

Tani Y., Sawai T., Sakai Y. (1988) Production of catalytic cells for formaldehyde production and alcohol oxidase by a catabolite repression-insensitive mutant of a methanol yeast, *Candida boidinii* A5. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 1165-1169.

Teugyas K. K., Simisker Y. A. (1994). Joint utilization of methanol and pentoses in the yeast *Pichia pinus* in batch culture. *Appl. Biochem. Microbiol.* 30 (6): 698-704.

Trejo-Hernández M. R. (1992) Physiologie de croissance de souches de *Claviceps*: production d'alcaloïdes par fermentation en milieu solide. These pour obtenir le Diplome de Doctorat. Université de Provence Aix-Marseille I. France. p. 90-96.

Turner B. G., Ramkrishna D., Jansen N. B. (1988) Cybernetic modeling of bacterial cultures at low growth rates: mixed-sustrate system. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 46-54.

Tuttle D. L., Dunn W. A. Jr. (1995). Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Cell Science.* 108: 25-35.

Urakami T., Teroa I., Nagai I. (1983) Isolation, identification and cultivation of methanol utilising yeast. *Journal of Fermentation Technology*. 61: 221-232.

van der Bosch H., Schutgens R. B. H., Wanders R. J. A., Tager J. M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 157-197.

van der Klei Y. J., Harder W., Veenhuis M. (1991) Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. microbiol.* 156: 15-23.

van Dijken J. P., Veenhuis M., Kreger-van Rij N. J. W., Harder W. (1975) Microbodies in methanol assimilating yeast. *Arch. Microbiol.* 102: 41.

Veenhuis M., van Dijken J. P., Harder W. (1983) The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.* 24: 1-82.

Windass J. D., Worsey M. J., Pioli E. M., Pioli E., Barth P. T., Atherton K. T., Dart E. C., Byrom D., Powell K., Senior P. J. (1980) Improved conversion of methanol to single-cell protein by *Methylophilus methylotrophus*. *Nature*. 287: 396-401.

Wiseman A. (1975) *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood Limited, England. p. 444.

Worthington Biochemical Corporation (1972) *Worthington Enzyme Manual*. Enzymes, enzyme reagents and related biochemicals. Freehold, New Jersey. U. S. A.

## ANEXO 1

### Diseño de experimentos

#### Optimización de medios de cultivo.

En la optimización de la composición de los medios de cultivo para fermentaciones es importante definir como primer paso el objetivo del diseño, ya sea para la producción de un metabolito de interés o bien para mejorar las condiciones de crecimiento del microorganismo. Se siguen varias etapas para la optimización de los medios de cultivo, de acuerdo a la Figura 5.

**1) Medio de referencia.-** se parte de un medio de referencia obtenido ya sea por referencias bibliográficas o bien desarrollado en laboratorio. En fermentaciones realizadas en laboratorio se debe probar que con este medio crece el microorganismo de interés.

**2) Medio de producción básico.-** En muchos casos si este medio ya fue desarrollado para microorganismos similares debe probarse como primera opción. Este medio debe incluir todos los elementos requeridos por el microorganismo para su crecimiento y producción del metabolismo de interés.

**3) Diseños experimentales.-** Estos tipos de experimentos detallados o cortos son comúnmente llamados diseños factoriales o diseños factoriales fraccionados (Box y col., 1987; Montgomery, 1991). Son matrices factoriales en las que se debe tomar en cuenta el número de factores (denominando así a los componentes del medio) los cuales son establecidos por el experimentador y también se deben de definir los niveles de concentración de cada factor. El nivel bajo se denota como “-” (algunas veces -1) y el nivel alto “+” (o bien +1).

En el diseño de experimentos se deben de tomar en cuenta las etapas siguientes:

**Definición de las variables para cada matriz.-** En esta etapa se considera el tamaño del experimento, el volumen de trabajo y la disposición del material para la realización de los experimentos, las condiciones operacionales uniformes a menos

---

que se consideren como factores, el parámetro que se va a medir y el tiempo de duración del experimento.

**Tamaño de la matriz.-** Este depende del número de factores que se van a considerar. Aquí se debe de tomar en cuenta el número de replicas requeridas con el fin de que la información obtenida sea confiable.

**Realización de la matriz de experimentos.-** la determinación de los valores alto y bajo de los factores se fijan básicamente por la experiencia del investigador.

Una vez realizado el experimento factorial se deben de calcular los efectos de cada factor y las interacciones con otros factores. El efecto de un factor único se denomina efecto principal. Las interacciones entre factores significan el efecto causado por la combinación de los efectos de cada factor. La interacción puede ser positiva o negativa o sin ningún efecto. El análisis de estos datos nos permitirá proponer una nueva composición que conlleve al mejoramiento de la respuesta.

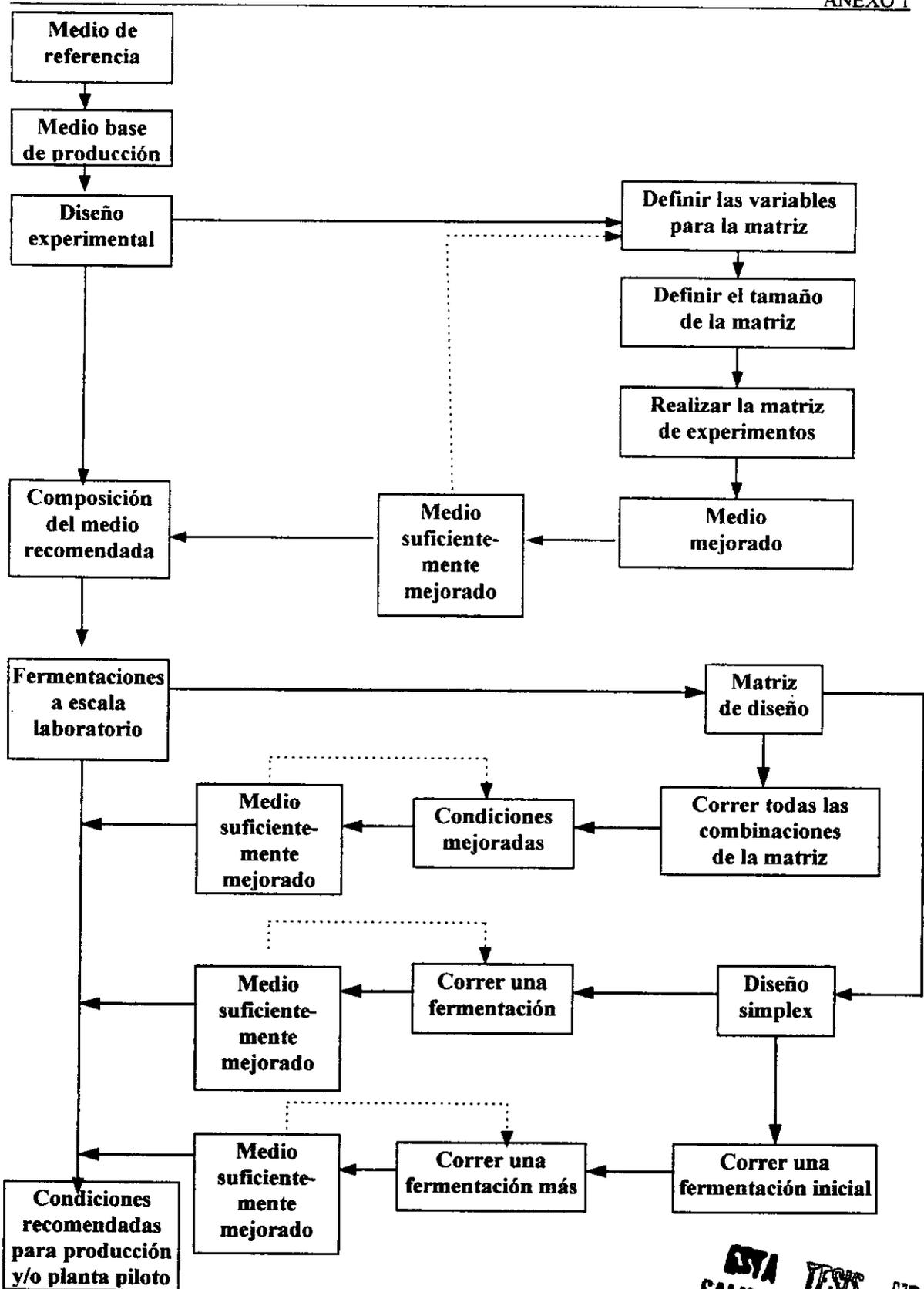


Diagrama de flujo de la ruta experimental para optimizar medio de cultivo y condiciones de operación.

ESTA TESIS NO ESTÁ EN LA BIBLIOTECA