



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Producción de oxigenasas de hidrocarburos por
Aspergillus niger por fermentación en estado sólido**

Tesis que para obtener el grado de

Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M.S. Teresa del Carmen Flores Flores

Director: Dr Ernesto Favela Torres

México D. F., Mayo 2011

*El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma
Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de
Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia
001466*

México D.F. a 22 de abril del 2011

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Producción de oxigenasas de hidrocarburos por
Aspergillus niger por fermentación en estado sólido**

que presentó

M.S. Teresa del Carmen Flores Flores

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres
Asesor: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Asesor: Dr. Sergio Revah Moiseev

Jurado:

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Secretario Dra. Araceli Tomasini Campocosio
Vocal: Dra. Elvia Inés García Peña
Vocal: Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Handwritten signatures in blue and black ink, corresponding to the names listed in the Jury section.

Para Alberto con mucho amor
Porque amores que matan nunca mueren

A mis hijos Karla y Carlos
Porque son lo mejor que la vida me ha dado

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto Favela Torres por su apoyo permanente y discusiones tan acertadas y valiosas para la realización de este trabajo.

Al Dr Mariano Gutiérrez Rojas y al Dr. Sergio Revah, miembros de mi comité tutorial.

A los miembros del jurado: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, Dra. Araceli Tomasini Campocosio, Dra. Elvia Inés Peña García y Dr. Gabriel Viguera Ramírez por sus sugerencias y por el tiempo tan valioso que dedicaron a la corrección de este documento. Pero sobre todo por el fuerte apoyo que me brindaron porque sin éste la conclusión del Doctorado no hubiera sido posible.

Al Instituto Tecnológico de Celaya y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

A mi madre por todo su amor y porque a pesar de todos sus dolores me apoyo en el cuidado de la casa y la familia en los momentos más decisivos de este trabajo.

A mi padre Q.E.P.D. porque la mejor herencia que pudo darme fue mi educación.

A toda mi familia por su cariño y por la confianza que han depositado en mí.

A todos mis compañeros y amigos de la PP4, gracias por todos los momentos inolvidables que pasamos juntos.

A mis compañeros y amigos del ITC por todo su apoyo, especialmente al Dr. Eleazar Escamilla

A Inés por compartir horas de trabajo y de alegría, por todos los momentos que pasamos juntas con nuestros hijos y por su gran amistad.

A mis más íntimos amigos Paty E., Blanquita, Marichú, Wendy, Sra. Ma. Elena y Octavio (Q.E.P.D.) porque compartieron conmigo tristezas y alegrías e hicieron de mi trabajo horas muy gratas y de mi vida momentos que no quisiera uno que se acabaran nunca.

A Don Gato y su Pandilla, a Tere y a Mauricio porque me infunden un gran respeto y admiración y porque los quiero mucho.

A Luis Eduardo mi ángel guardián, gracias por existir.

RESUMEN

En los últimos años la fermentación en estado sólido (FES) se ha considerado como un proceso con un gran potencial en el desarrollo de bioprocesos y de productos. Entre sus aplicaciones está la obtención de enzimas. Las enzimas que se obtienen mediante este proceso son principalmente extracelulares.

Las oxigenasas son enzimas intracelulares que catalizan reacciones en las cuales los átomos de oxígeno, provenientes de oxígeno molecular, son directamente incorporados en el substrato, formando un nuevo grupo hidroxilo o carbonilo. Existen dos tipos de oxigenasas, las monooxigenasas/hidroxilasas que catalizan la inserción de un solo átomo de oxígeno y las dioxigenasas/hydroxilidasas que catalizan la inserción de ambos átomos de oxígeno. Las oxigenasas tienen un papel primordial en el metabolismo y en la biosíntesis. Han sido utilizadas en la remoción de contaminantes de aire, suelo y agua. En los últimos diez años han adquirido una gran importancia en el diseño de medicamentos y en la producción de compuestos de alto valor agregado.

En esta tesis se estudió el consumo de hexadecano por *Aspergillus niger* ATCC 9642 en FEL y en FES en presencia y ausencia de glucosa, con el propósito de seleccionar un medio de cultivo adecuado para producir biomasa con actividad oxigenasa. La actividad oxigenasa fue evaluada en células en reposo y en extractos enzimáticos de la biomasa obtenida por ambos sistemas de fermentación.

Las fuentes de carbono usadas en ambos sistemas de fermentación fueron mezclas de glucosa y hexadecano, en diferentes proporciones, pero con la misma relación C/N (12.12). Excepto para un caso de fermentación sumergida en donde se aumentó la relación C/N (16.24).

Los resultados incluyen la caracterización cinética de ambos sistemas de fermentación. Entre éstos podemos mencionar que, en ambos sistemas con el uso de glucosa como cosustrato, se incrementan las tasas específicas de crecimiento (μ), las tasas específicas de consumo de substrato (q_s) y los rendimiento de biomasa con respecto al substrato (Y_{sx}), comparados con los valores obtenidos cuando sólo se usa hexadecano

como sustrato. Los aumentos en estos parámetros siempre son mayores para FEL. Sin embargo, no en todos los casos hubo consumo de hexadecano en FEL, mientras que en FES siempre se presentó consumo de hexadecano y el consumo fue en mayores porcentajes que para los casos de FEL.

En ambos sistemas de cultivo, la mineralización del sustrato consumido es mayor cuando se usa una mezcla de sustratos, que cuando se usan glucosa o hexadecano como fuentes únicas de carbono. Los coeficientes respiratorios en ambos sistemas fueron mayores de 1.0 cuando sólo se consumió glucosa. Sus valores fueron muy cercanos al valor teórico cuando se consumió hexadecano en presencia de glucosa.

Se llevó a cabo un análisis de los metabolitos hidrosolubles presentes en cultivos líquido y sólido de *A. niger* con hexadecano y glucosa (50 % C-glu, 50% C-hxd). En el cultivo sólido se observó un rápido consumo de glucosa con acumulación de ácido cítrico y de fructosa. En el cultivo líquido no se observó acumulación de algún metabolito.

Se analizó la estabilidad de las oxigenasas en los extractos libres de células obtenidos en FEL y en FES, con tratamientos como la concentración por deshidratación y el almacenamiento a -20 °C de los extractos. Se encontró que los extractos enzimáticos pierden alrededor de 75 % de la actividad inicial tanto por el efecto de la concentración como por el almacenamiento durante 7 días a -20 °C. La pérdida de actividad fue similar independientemente del método de obtención de las mismas.

Se observó el efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa y se encontró que se presentan dos máximos de actividad, uno a 26 y otro a 35 °C. Las actividades registradas para esta prueba son significativamente diferentes con un $\alpha=0.05$. Se estudió la especificidad de las oxigenasas, obtenidas en cultivo líquido y analizadas con una prueba t-student. En cultivo sólido, encontrándose que el extracto enzimático obtenido en FES no tiene una especificidad diferente para hidrocarburos alifáticos (lineales o ramificados). Sin embargo, la especificidad para compuestos aromáticos se incrementa con

la complejidad del anillo. La mayor especificidad se presenta con tolueno y pireno. La actividad del extracto enzimático de FEL no presenta un patrón determinado y muestra actividad tanto con aromáticos como con alifáticos.

Se evaluó la actividad oxigenasa en extractos enzimáticos de biomasa obtenida tanto en FEL como en FES, encontrándose que la actividad es significativamente diferente para la biomasa de ambos sistemas de fermentación. La actividad del extracto enzimático de FEL es por lo menos 7 veces menor que la actividad en FES.

Palabras clave: oxigenasas, fermentación en estado sólido, hidrocarburos aromáticos, hexadecano, soporte de poliuretano, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Recently, the solid state fermentation (SSF) has been regarded as a big potential process for the development of bioprocesses and products. Among their applications one can find enzyme production that is mainly extracellular.

The oxygenases are intracellular enzymes that catalyze reactions in which oxygen atoms from molecular oxygen are directly incorporated into the substrate to form a new hydroxyl or carbonyl group. There are two kinds of oxygenases, the monooxygenases/hydroxylases that catalyze the insertion of only one of the oxygen atoms and the dioxygenases/hydroxylases that catalyze the insertion of both oxygen atoms. The oxygenases have a crucial role in the metabolism and the biosynthesis. They have been used to eliminate pollutants from air, soil and water. Furthermore, in the last ten years, they have become important for the pharmaceuticals design and the production of specialty chemicals.

In this thesis it is presented the study of hexadecane consumption by *Aspergillus niger*, ATCC 9642, with and without glucose by submerged fermentation (SmF) and by solid state fermentation (SSF). This study was undertaken with the aim of selecting a suitable culture medium to produce biomass with oxygenase activity. Oxygenase activity was evaluated in resting cells and in enzyme extracts of biomass obtained by both fermentation systems. The oxygenase was also characterized in terms of activity, stability and specificity.

The carbon sources used in both SmF and SSF were different mixtures of glucose and hexadecane. In most of the experiments the ratio C/N ratio was (12.12), the exception was a SSF test where a C/N (16.24) was used.

The results include the kinetic characterization of both fermentation systems. They show that independently of the system, the use of glucose as cosubstrate increases the specific growth rate (μ), the specific substrate consumption rate (q_s) and the biomass yield with respect of substrate (Y_{SX}), compared with the values obtained with hexadecane as sole

carbon source. The increases in these parameters are always larger for FEL. However, not all cases had been consumed hexadecane in FEL, while FES always presented hexadecane consumption and this was significantly higher than for the case of FEL.

In both fermentation systems, the mineralization of the substrate consumed is greater when using a mixture of substrates, that when using glucose or hexadecane as sole sources of carbon. The respiratory coefficients in both systems were higher than 1.0 when only glucose was consumed. Their values were very close to the theoretical value when hexadecane was consumed in the presence of glucose.

The study of water soluble metabolites during the liquid and solid cultures of *A. niger* with hexadecane and glucose (50 % C-glu, 50 % C-hxd) showed a rapid consumption of glucose with accumulation of citric acid and fructose in SSF. However, no accumulation of any metabolite was detected in FEL.

Cell-free extracts obtained by SSF and SmF were concentrated by dehydration or stored at -20 °C to study the oxygenase stability. It was found that the enzymatic extracts lost about 75% of the initial activity in only 7 days at -20 °C and a similar effect was shown by dehydration. The loss of activity was independent of the fermentation system.

The measurements of oxygenase activity at different temperatures yield two peaks of activity at 26 and 35 °C. The activities reported in this test were significantly different with an $\alpha = 0.05$ using a t-student test.

The oxygenase produced under SSF have no specificity difference for aliphatic hydrocarbons (linear and non linear). But, it increases for aromatic substrates as the complexity of the ring increases. Oxygenase produced under SmF has no specific pattern of specificity. It has activity with aliphatic as well as with aromatics. Albeit, the activities were significantly different and lower, at least 7-folds, compared to SSF.

Key words: oxygenases, solid state fermentation, aromatic hydrocarbons, hexadecane, polyurethane matrix support, *Aspergillus niger*.

INDICE	i
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	5
1 ANTECEDENTES (Revision bibliografica).....	6
1.1 Degradación de hidrocarburos y uso de cosubstratos.....	6
1.1.1 Degradación de hidrocarburos por bacterias.....	6
1.1.2 Degradación de hidrocarburos por hongos	9
1.1.3 Uso de cosubstratos.....	14
1.2 Oxigenasas.....	15
1.2.1 Clasificación de oxidorreductasasy características generales	15
1.2.2 Nomenclatura de oxidorreductasas	16
1.2.3 Monooxigenasas.....	18
1.2.3.1 Clasificación de monooxigenasas en base al cofactor que usan.....	18
1.2.4 Dioxigenasas	25
1.2.4.1 Clasificación de dioxigenasas.....	26
1.2.4.2 Dioxigenasas no dependientes de grupo hemo con Fe-S tipo Rieske	26
1.2.4.3 Tipos de reacciones que catalizan las dioxigenasas hidroxilasas de anillo aromático	28

1.2.4.4 Clasificación de Dioxigenasas no dependientes de grupo hemo con Fe-S tipo Rieske.....	30
1.2.5 Aplicaciones de las oxigenasas	32
1.2.5.1 Monooxigenasas	32
1.2.5.2 Dioxigenasas.....	33
1.3 Caracterización de oxigenasas.....	33
1.4 Fermentación en estado sólido	35
1.5 Características de <i>Aspergillus niger</i>	36
1.5.1 Generalidades de Hongos.....	36
1.5.2 Clasificación taxonomica de <i>A. niger</i>	37
1.5.3 Reproduccion de <i>A. niger</i>	37
1.5.4 Morfología de <i>A. niger</i>	38
1.5.5 aplicaciones industriales de <i>A. niger</i>	38
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	40
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
Objetivo general	41
Objetivos particulares	41
Hipótesis.....	41
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 Reactivos químicos.....	43
3.1.1 Reactivos para la propagación de la cepa	43

3.1.2 Reactivos para fermentaciones en estado solido y en estado líquido	43
3.1.3 Reactivos para preparación de extractos enzimáticos crudos	43
3.1.4 Reactivos para procedimientos analíticos	43
3.1.4.1 Reactivos para determinación de glucosa.....	43
3.1.4.2 Reactivos para determinación de hexadecano	43
3.1.4.3 Reactivos para determinación de actividad oxigenasa	44
3.1.4.4 Reactivos para determinación de proteína.....	44
3.1.4.5 Reactivos para caracterización de oxigenasa(s)	44
3.1.5 Reactivos para determinación de pureza y de proteínas con actividad oxigenasa	44
3.2 Microorganismo	44
3.3 Propagación de <i>A. niger</i>	44
3.4 Preparación de inóculos.....	45
3.5 Cuenta de esporas	45
3.6 Medios de cultivo	46
3.7 Sistemas de fermentación	48
3.7.1 Fermentación en estado líquido	48
3.7.2 Fermentación en estado sólido.....	48
3.7.2.1 Soporte inerte.....	48
3.7.2.2 Condiciones de Fermentación	49
3.7.3 Parámetros cinéticos	50
3.8 Producción de oxigenasas.....	51

3.9 Preparación de extractos enzimáticos libres de células	52
3.10 Procedimientos analíticos	53
3.10.1 Análisis de glucosa.....	54
3.10.2 Análisis de hexadecano	56
3.10.3 Determinación de biomasa.....	56
3.10.4 Evaluación de metabolitos hidrosolubles.....	56
3.10.5 Evolución de la concentración de O ₂ y de CO ₂	57
3.10.6 Determinación de actividad oxigenasa	57
3.10.6.1 actividad oxigenasa con células en reposo	58
3.10.6.2 Actividad oxigenasa de extractos enzimáticos	59
3.10.7 Determinación de proteína	60
3.11 Caracterización de las oxigenasas	61
3.11.1 Estudio de estabilidad	61
3.11.2 Estudio de especificidad.....	61
3.11.3 Efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa	62
3.12 Análisis de pureza del extracto e identificación de bandas con actividad oxigenasa	62
3.12.1 Zimogramas.....	62
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN A	63
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN A	64
4. Dinámica de <i>A. niger</i> en FEL y FES	64
4.1 Fermentación en estado líquido.....	64

4.2 Fermentación en estado sólido	74
4.3 Comparación de las cinéticas de consumo de sustratos y producción de biomasa en FEL y en FES	80
4.4 Balances de carbono en FEL y en FES	82
4.5 Análisis de consistencia.....	83
4.5.1 Validación de los datos experimentales con el modelo de caja negra	84
4.6 Análisis de metabolitos hidrosolubles	93
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN B	95
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN B	96
5. Caracterización de oxigenasas.....	96
5.1 Actividad oxigenasa con células en reposo obtenidas por FEL	96
5.2 Actividad oxigenasa con células en reposo obtenidas por FES	98
5.3 Actividad oxigenasa con extractos libres de células	98
5.4 Estabilidad de las oxigenasas	99
5.5 Especificidad de oxigenasas	101
5.6 Efecto de la temperatura en la actividad de oxigenasa.....	102
5.7 Análisis de proteínas con actividad oxigenasa	104
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	126
ANEXO A Cálculos y calibraciones	127
Anexo A.1 Curva de calibración de hexadecano.....	127

Anexo A.2 Curvas de calibración y cromatogramas de HPLC	128
Anexo A.3 Cálculo de actividad oxigenas con células en reposo	132
Anexo A.4 Cálculo de actividad oxigenasa por oximetría con extracto enzimático.....	135
Anexo A.5 Curva de calibración de actividad peroxidasa	137
Anexo A.6 Cálculo de actividad oxigenasa, método espectrofotométrico.....	138
Anexo A.7 Curva de calibración de proteína	139
ANEXO B. Nomenclatura.....	140

Lista de Tablas

Tabla 1.1 Clasificación de monooxigenasas externas dependientes de flavina	21
Tabla 1.2 Tipos representativos de reacciones de dihidroxilación-cis catalizadas por dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático.....	29
Tabla 3.1 Composición mineral del medio de cultivo ATCC 687 Pontecorvo para <i>Aspergillus</i> usado para estudiar la producción de oxigenasas de <i>A. niger</i> en FEL y en FES.	46
Tabla 3.2 Descripción de las fuentes de carbono agregadas al medio mineral ATCC 687 usadas para estudiar la producción de oxigenasas de <i>A. niger</i> en FEL y en FES	47
Tabla 3.3 Tiempos típicos de retención de estándares para análisis de metabolitos hidrosolubles.....	57
Tabla 4.1 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento fúngico y al consumo de sustratos en FEL usando diferentes relaciones de Glu:Hxd	73
Tabla 4.2 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento fúngico y al consumo de sustratos en FES usando diferentes relaciones de Glu:Hxd.	78
Tabla 4.3 Carbono recuperado como CO ₂ durante la FES y la FEL de hexadecano, glucosa y mezclas de ambos por <i>A. niger</i>	83
Tabla 4.4 Comparación de los datos experimentales con los corregidos por grado de reducción para los compuestos medidos en las fermentaciones en estado sólido con <i>A. niger</i>	88
Tabla 4.5 Datos para análisis de consistencia de las fermentaciones en medio líquido con <i>A. niger</i>	92

Tabla 5.1 Tasas de consumo de oxígeno por biomasa de <i>A. niger</i> , en presencia y ausencia de substrato y en presencia y ausencia de inhibidores de respiración (NaN ₃ y NaCN).....	97
Tabla 5.2 Actividad oxigenasa en extractos libres de células de biomasa producida en FEL y FES.	98
Tabla 5.3 Estudio de estabilidad de oxigenasas producidas por <i>A. niger</i> en cultivo sólido y en cultivo líquido.	100
Tabla A.5.1. Procedimiento para la elaboración de la curva peroxidasa	137

Lista de Figuras

Figura 1.1 Clasificación de oxidorreductasas en base al aceptor de electrones que usan y a los productos de la reacción.	17
Figura 1.2 Ejemplos de cofactores usados por oxidorreductasas	19
Figura 1.3 Compuestos aromáticos degradados por rutas bacterianas que inician por la hidroxilación del anillo aromático por dioxigenasas.....	27
Figura 3.1 Diagrama de los tratamientos realizados a las muestras obtenidas de fermentación en estado líquido, para la elaboración de análisis microbiológicos y fisicoquímicos de las mismas.	53
Figura 3.2 Diagrama de los tratamientos realizados a las muestras obtenidas de fermentaciones en estado sólido, para la elaboración de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos de las mismas	54
Figura 4.1 Cultivo líquido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 14 g L ⁻¹ hexadecano.	65
Figura 4.2 Evolución de sustratos y productos en un cultivo líquido de <i>A. niger</i> con el medio de cultivo <i>a</i> : 15 g L ⁻¹ glucosa, 7.1 g L ⁻¹ hexadecano.	67
Figura 4.3 Cultivo líquido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 30 g L ⁻¹ glucosa, 5 g L ⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 16.24 g L ⁻¹ , 74% de carbono aportado por la glucosa y el otro 26 % por hexadecano. C:N 16.41	68
Figura 4.4 Cultivo líquido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 30 g L ⁻¹ glucosa. Concentración total de carbono 12 g L ⁻¹ . C:N 12.12	72

Figura 4.5 Cultivo sólido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 94.16 g L ⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 80 g L ⁻¹ , C:N 12.12	74
Figura 4.6 Cultivo sólido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 50 g L ⁻¹ glucosa, 23.5 g L ⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 40 g L ⁻¹ , 50% de carbono aportado por la glucosa y el otro 50 % por hexadecano. C:N 12.12.....	75
Figura 4.7 Cultivo sólido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 100 g L ⁻¹ glucosa, 47.08 g L ⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 80 g L ⁻¹ , 50% de carbono aportado por la glucosa y el otro 50 % por hexadecano. C:N 12.12	76
Figura 4.8 Cultivo sólido de <i>A. niger</i> en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 100 g L ⁻¹ glucosa. Concentración total de carbono 40 g L ⁻¹ , C:N 12.12	77
Figura 4.9 Distribución elemental de los substratos (fuentes de carbono y oxígeno) en los productos de las fermentaciones en sólido.	89
Figura 4.10 Distribución elemental de los substratos (fuentes de carbono y oxígeno) en los productos de las fermentaciones en líquido	92
Figura 4.11 Perfiles de producción de metabolitos solubles y del consumo de glucosa durante la fermentación en estado sólido del medio de cultivo <i>f</i> por <i>A. niger</i>	94

Figura 4.12 Perfiles de producción de metabolitos solubles y del consumo de glucosa durante la fermentación en estado sólido del medio de cultivo <i>g</i> por <i>A. niger</i>	94
Figura 5.1 Actividad oxigenasa de extractos de biomasa de <i>A. niger</i> cultivado en FES (A) y en FEL (B).....	102
Figura 5.2 Efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa.	103
Figura 5.3 PAGE nativo en 6% acrilamida	105
Figura A.1.1 Curva de calibración de hexadecano.....	127
Figura A.2.1 Curva de calibración de ácido acético.....	128
Figura A.2.2 Curva de calibración de ácido cítrico.....	128
Figura A.2.3 Curva de calibración de ácido láctico	129
Figura A.2.4 Curva de calibración de glucosa	129
Figura A.2.5 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo <i>e</i> a las 160h	130
Figura A.2.6 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo <i>f</i> a las 13.5h.....	130
Figura A.2.7 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo <i>f</i> a las 20h.....	131
Figura A.2.8 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo <i>g</i> a las 35h.....	131
Figura A.2.9 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo <i>g</i> a las 60h.....	132

Figura A.3.1 Consumo de oxígeno por células de <i>A. niger</i> en ausencia de hidrocarburo (respiración endógena).....	133
Figura A.3.2 Consumo de oxígeno por células de <i>A. niger</i> en presencia de hidrocarburo (RS)	133
Figura A.3.3 Consumo de oxígeno por oxigenasa presente en biomasa de <i>A. niger</i>	134
Figura A.4.1 Concentraciones de O ₂ en saturación (mg L ⁻¹).....	135
Figura A.5.1 Curva de calibración de peroxidasa	138
Figura A.6.1 Resultados de la reacción de una muestra estándar, una de decano y una de pireno con ortodinitrosidina.....	139
Figura A.7.1 Curva de calibración de proteína.....	139

INTRODUCCIÓN

Varios estudios han demostrado que la capacidad de usar hidrocarburos como única fuente de carbono y de energía es muy común en los microorganismos y que no está restringida a ningún grupo de ellos. Esta capacidad ha sido reconocida tanto en procariontes como en eucariontes.

El consumo de hidrocarburos se lleva a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas que comienzan gracias a un grupo de enzimas conocidas como oxigenasas o hidroxilasas. Las oxigenasas han adquirido una gran importancia desde el punto de vista ambiental y económico, ya que dichas enzimas sirven como iniciador indispensable, para la biodegradación o biotransformación de compuestos recalcitrantes y para la obtención de compuestos de alto valor agregado. Algunos ejemplos de aplicaciones de las oxigenasas son los siguientes: 1) las oxigenasas de esteroides que hidroxilan en sitios muy específicos moléculas de esteroides y de otros terpenoides así como de compuestos bencílicos y alicíclicos; 2) el sistema no-hemo xileno monooxigenasa de *P. putida*, que ha sido clonado en *E. coli* y usado para la oxidación paso a paso de tolueno a alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico vía hidroxilación dependiente de NADH (Buhler y col. 2000); 3) la dihidroxilación enantioselectiva de arenos por dioxigenasas (Boyd y col. 2001).

Las oxigenasas que han sido más ampliamente estudiadas provienen de bacterias, aunque en la última década se ha hecho un gran avance en el conocimiento de oxigenasas provenientes de hongos. Aparte de las aplicaciones que se han hecho de las oxigenasas para tratamiento de suelos y de remoción de contaminantes volátiles, éstas han sido estudiadas principalmente en fermentación sumergida (FEL).

La fermentación en estado sólido (FES) puede definirse como un proceso en el que los microorganismos crecen sobre la superficie de un material sólido, que tiene la propiedad de absorber o contiene agua, con o sin nutrientes solubles. El material sólido puede ser o no

biodegradable. También se requiere para la FES que los microorganismos crezcan con nutrientes que se difundan por debajo y por arriba de un gas (Viniegra-González, 1997).

Por otra parte, la fermentación sumergida (FEL) abarca una gran variedad de procesos microbianos, agitados o sin agitar, en donde la biomasa está completamente rodeada de un medio de cultivo líquido. Las principales diferencias entre FES y FEL están relacionadas a varias características fisicoquímicas tales como: 1) el mezclado y la difusión de substratos y productos en relación a la biomasa son mucho más pequeños en FES, 2) la solubilidad y la difusión de oxígeno y de otros gases no polares es mayor en FES, 3) La conducción de calor es mucho más pequeña en FES y 4) el contenido de agua es más pequeño en FES. Tales diferencias parecen contar para ventajas y desventajas importantes de FES en relación a un proceso convencional de FEL (Viniegra-González, 1997).

Entre las ventajas que se han reportado del uso de FES comparado con FEL se pueden mencionar las siguientes: 1) bajas contaminaciones con bacterias del sistema de fermentación, cuando se trabaja con hongos, ya que éstos crecen en medios de cultivo con baja humedad (Gutiérrez-Rojas y col. 1995); 2) producción de metabolitos secundarios con rendimientos mayores, tales como la penicilina (Barrios-González, 1988) y el ácido giberélico (Kumar y col., 1987); 3) procesos de FES menos inhibidos por grandes cantidades de glucosa (Viniegra-González y col. 1993); 4) tasas mayores, de consumo de glucosa o de sacarosa, por *A. niger* No. 10, cuando se cultiva en FES (Córdova, 1994); 5) mejores productividades de enzimas por rendimientos mayores de enzimas y menores proteólisis (Aguilar y col. 2001); 6) cultivos en FES tienen una mayor oxigenación con una adición de azúcar más lenta (Viniegra-González, 2003).

Los hongos filamentosos, o mohos, como se les conoce comúnmente, han sido de gran importancia en la vida del género humano a lo largo de su historia, inicialmente para la producción de alimentos fermentados y a partir del siglo XX, en la industria farmacéutica y en la producción de ácidos carboxílicos y de enzimas. Para finales del siglo XX se

incrementó el uso de hongos filamentosos en la producción de bioinsecticidas (*Trichoderma sp*), en el tratamiento de residuos lignocelulósicos (*Trametes versicolor* y *Lentinus edodes*), en la bioacumulación de metales pesados (*Aspergillus ochraceus* que fija uranio en su biomasa) y en el tratamiento de efluentes industriales (Wainwright, 1992). En el siglo XXI los hongos filamentosos han sido importantes en el tratamiento de suelos y aire contaminados.

El género *Aspergillus* comprende unas doscientas especies y una gran cantidad de variedades. Es un género multifacético que puede considerarse como un microorganismo de valor comercial (producción de ácidos carboxílicos, antibióticos, enzimas), como una plaga (invasión de papel, cuero y telas en regiones húmedas) o en algunos casos hasta un patógeno mortal (producción de micotoxinas en granos de cereal almacenados). *Aspergillus niger* es una especie de este género, clasificado como GRAS por sus siglas en inglés (generally regarded as safe), que se usa en la industria por su amplia capacidad enzimática. Por ejemplo, se usa con gran éxito en la producción de ácido cítrico, ácido glucónico, proteasas, pectinasas entre otros compuestos. Sin embargo, la producción de oxigenasas por este hongo ha sido poco estudiada.

En el presente documento se revisa el conocimiento actual de las oxigenasas, de los microorganismos que las producen y de sus aplicaciones; de las ventajas y desventajas del uso de fermentación en estado sólido para la producción de enzimas; de las características de *A. niger* y del conocimiento que se tiene de la producción de oxigenasas por este hongo. La contribución de esta tesis es la ampliación del conocimiento de la fisiología y del metabolismo de *A. niger* (ATCC 9642) en presencia de la combinación de sustratos de fácil consumo (glucosa) con compuestos de “difícil” consumo, considerados como xenobióticos (hexadecano, como molécula modelo), cultivado en sistemas líquido y sólido. Se consideró oportuno el estudio de este tema, dada la importancia de las oxigenasas y de las ventajas que se han atribuido a las enzimas extracelulares obtenidas por fermentación en estado sólido; por la capacidad de *A. niger* de producir enzimas y al escaso

conocimiento que se tiene del efecto del tipo de cultivo en la actividad de enzimas intracelulares como es el caso de las oxigenasas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES (Revisión bibliográfica)

Como parte de la descripción del estado del arte en el que se enmarca el presente trabajo, en los antecedentes se tratará la degradación de hidrocarburos señalando los microorganismos que se usan, las condiciones bajo las cuales se han estudiado y el uso de cosubstratos para incrementar la degradación de dichos compuestos.

Posteriormente se explicará qué son las oxigenasas, cómo se clasifican y usos de las mismas. Se señalarán aspectos importantes de las características de oxigenasas purificadas así como los mecanismos de reacción propuestos para dichas enzimas.

Finalmente se tratará el conocimiento que se tiene de la fermentación en estado sólido y se darán algunos antecedentes generales del hongo usado en esta tesis.

1.1 Degradación de hidrocarburos y uso de cosubstratos

El consumo de hidrocarburos se lleva a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas que comienzan gracias a un grupo de enzimas conocidas como oxigenasas o hidroxilasas. Se han reportado varias rutas de oxidación de hidrocarburos de cadena larga. La más conocida (Kemp y col. 1994) involucra una secuencia de oxidaciones en uno de los dos átomos de carbono terminales, produciendo un alcohol graso ($R-CH_2OH$), aldehído ($R-CHO$), y finalmente un ácido graso ($R-COOH$). En la ruta de oxidación subterminal, se forman secuencialmente un alcohol secundario y una cetona (Sakai y col., 1996). El primer paso de esta ruta de oxidación es una reacción que depende de la presencia de oxígeno y está catalizada por un sistema de monooxigenasas. Se ha propuesto también la ruta de Finnerty (Finnerty, 1977). En ésta una dioxigenasa actúa en el primer paso produciendo un alquil-hidroperóxido, el cual es después oxidado a aldehído y posteriormente a ácido.

1.1.1 Degradación de hidrocarburos por bacterias

Oxidación de alcanos por bacterias aerobias

n-Alcanos son compuestos saturados, no polares, sin grupo funcional. A 20 °C y presión atmosférica, los alcanos son gaseosos (C1 a C4), líquidos (C5 a C16) o sólidos (> C16). También hay cicloalcanos, los cuales en su mayoría son líquidos y alcanos ramificados (Miethe y col. 1994). Las bacterias alcano-oxidantes pueden dividirse en tres grupos: bacterias metano-oxidantes, bacterias que usan otros alcanos gaseosos y las que crecen en alcanos líquidos o sólidos.

Oxidación de alcanos líquidos y sólidos

La oxidación de alcanos de cadenas medianas y alcanos de cadena larga por bacterias aerobias ocurre vía rutas mono, bi o subterminales. La oxidación inicial de alcanos a los correspondientes alcoholes primarios o secundarios es una monooxidación que involucra ya sea un citocromo P450 o una hidroxilasa dependiente de rubredoxina. Los n-alcoholes resultantes de la oxidación terminal son oxidados vía aldehídos a ácidos grasos. Los ácidos grasos producidos por la oxidación terminal de alcanos pueden entrar más adelante en otras rutas metabólicas. La mineralización procede vía β -oxidación y el ciclo de ácidos tricarboxílicos, en el cual se producen cuatro equivalentes reductores por ciclo. Los equivalentes reductores se introducen en la cadena respiratoria, la cual (dependiendo del potencial redox predominante en el ámbito celular) contiene diferentes acarreadores de electrones y usa diferentes aceptores terminales de electrones. Los sistemas de transporte de electrones que están involucrados en la transformación de alcanos a ácidos grasos son compuestos comunes de las células y no específicos para el metabolismo de alcanos. Entre las bacterias degradadoras de este tipo de hidrocarburos se han reportado varias especies de *Bacillus* (*cereus*, *sphaericus*, *fusiformis*, *pumilis*), *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*

Oxidación de alcanos gaseosos

La oxidación de metano por bacteria aerobia metanotrófica ha sido bien caracterizada, mientras que la degradación de otros alcanos gaseosos (etano, propano y butano) ha recibido comparativamente, menos atención. Parece ser que la mayoría de las bacterias oxidantes de alcanos de cadena corta, que se han aislado, pertenecen a las bacterias Gram-

positivas de los géneros *Corynebacteria*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.*, y *Rhodococcus (Dietzia) sp.*, además se han reportado cepas de *Pseudomonas*. Sin embargo, las bacterias metanotróficas pueden también estar involucradas en la oxidación de alcanos de cadena corta, ya que su metano monooxigenasa soluble presenta una especificidad de sustrato extremadamente amplia y cataliza la oxidación de varios alcanos líquidos y gaseosos así como de amoníaco.

Oxidación de alcanos por bacterias anaerobias

Por varias décadas se pensó que la biodegradación de alcanos sólo se daba en presencia de oxígeno molecular. Sin embargo, en los setentas se discutió el metabolismo anaerobio de alcanos de cadena larga en sedimentos. En los últimos 20 años se han descrito un buen número de comunidades bacterianas así como de aislados que degradan hidrocarburos bajo condiciones estrictamente anóxicas. Se ha demostrado también la degradación anaerobia de alcanos bajo condiciones sulfato-reductoras y nitrato-reductoras (Rueter y col. 1994). Recientemente, se ha reportado la formación de CH₄ y de CO₂, a partir de alcanos de cadena larga, por bacterias estrictamente anaerobias. Este proceso se supone que involucra (1) bacterias acetogénicas que descomponen el alcano a acetato e H₂, (2) un grupo de arqueas el cual forma CH₄ y CO₂ a partir del acetato y (3) otro grupo de arqueas que convierte el CO₂ y el H₂ a CH₄.

Oxidación de compuestos aromáticos

La degradación de compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas frecuentemente se inicia por sistemas multicomponetes de dioxigenasas. Dos sistemas enzimáticos reponsables de la iniciación de la degradación de hidrocarburos aromáticos son la naftaleno dioxigenasa (NDO; EC 1.14.12.12) de *Pseudomonas sp.*, NCIB9816-4 y la tolueno dioxigenasa (TDO; EC 1.14.12.11) de *Pseudomonas putida F1*.

Los compuestos policíclicos aromáticos (PAH) son contaminantes industriales que se emiten en el ambiente por industrias de coquizado de carbón, de destilación de madera, de refinación de petróleo, por el asfaltado de calles y por procesos de combustión.

Mycobacterium flavescens y *Rhodococcus sp.* se encuentran entre las bacterias capaces de degradar este tipo de compuestos (Dean-Ross y col., 2002).

1.1.2 Degradación de hidrocarburos por hongos

Los hongos representan un reino que comprende una gran variedad de organismos eucariontes, morfológicamente clasificados como levaduras, hongos filamentosos u hongos dimórficos. Muchos de ellos viven como saprófitos descomponiendo materia muerta, mientras que otros han evolucionado para ser patógenos obligados u oportunistas, obteniendo nutrientes de sus huéspedes, animales o plantas. Los hongos filamentosos han desarrollado una habilidad extraordinaria para adaptarse a los cambios ambientales, principalmente debido a sus sistemas enzimáticos de defensa que los protegen de compuestos exógenos tóxicos, xenobióticos. Consecuentemente, los hongos filamentosos juegan un papel crucial en la degradación y mineralización de una amplia gama de contaminantes ambientales, así como en la catálisis de reacciones importantes para la producción biotecnológica de hormonas de plantas y humanas. Las Citocromo P450, superfamilia ubicua de monooxigenasas, son las enzimas clave en muchos de estos procesos fúngicos (Cresnar y Petric, 2011).

Las enzimas citocromo P450 de eucariontes se pueden dividir en dos clases mayores. La primera comprende los citocromos P450 que están localizados en la membrana mitocondrial y que requieren la actividad de un sistema donador de electrones de dos componentes, para tener actividad catalítica. La segunda clase se compone de citocromos P450 que están unidos a la membrana del retículo endoplasmático y sobresalen hacia el citosol. Los miembros de esta clase obtienen sus electrones de un donador de electrones, una citocromo P450 reductasa la cual también está unida en la membrana del retículo endoplasmático (Black y Coon 1987).

Se ha encontrado que la actividad de la mayoría de los citocromos P450 de eucariontes mayores se incrementa en la presencia de sus substratos particulares (Nebert y Gonzalez, 1987; Waxman y Azaroff, 1992). El incremento en los niveles de actividad de citocromo

P450 normalmente se debe al incremento en la transcripción, aunque también se ha reportado la regulación basada en cambios en la estabilidad de mRNA o en mecanismos que actúan al nivel de translación (Porter y Coon, 1991).

En el retículo endoplasmático de *Aspergillus niger* se ha encontrado un sistema enzimático de citocromo P450 que es capaz de hidroxilar en la posición para al benzoato. van den Brink y col. (2000) estudiaron la regulación de dicho sistema enzimático y encontraron que la expresión de los dos genes (*bphA* y *cprA*), que codifican los dos componentes del sistema citocromo P450, es inducible por benzoato. Análisis de la expresión del gen *cprA* revelaron una discrepancia cuantitativa clara entre la inducción al nivel de proteína (aproximadamente 4 veces) y al nivel de transcripción (>20 veces). La mayoría de las transcripciones observadas después de la inducción con benzoato (*cprA β*) fueron mayores que las transcripciones expresadas de forma constitutiva (*cprA α*). Ellos encontraron que la regulación de la expresión de la la citocromo P450 reductasa (CPR) es particularmente compleja, que involucra promotores reguladores, uso de promotores diferenciales y regulación a nivel de post-transcripción.

Faber y col. (2001) purificaron, hasta aparente homogeneidad, la benzoato-para-hidroxilasa (CYP51 o BpH) y la NADPH:citocromo P450 reductasa de *Aspergillus niger*, usando una cepa sobreproductora. Al combinar BpH con NADPH:citocromo P450 oxidorreductasa en la presencia del fosfolípido dilauril fosfatidilcolina se restablecía en pequeña escala la actividad de BpH. Análisis espectrales de BpH mostraron el espectro característico de citocromo P450. Con estudios de enlace de substrato con la BpH purificada, en función de la temperatura y del pH, ellos encontraron que a pH 8.0 el modelo de equilibrio de spin simplificado, originalmente propuesto para la unión de alcanfor a la citocromo P450cam (Fisher y Sligar, 1987) también se aplica al sistema benzoato-BpH. Se determinaron dos constantes de equilibrio, K_1 para el enlace de substrato sin un cambio de spin y K_2 para el cambio de spin del complejo benzoato-BpH. Se encontró además que K_1 y K_2 se incrementan con el pH, lo que indica una mayor afinidad. Como K_1 decrece más fuertemente con el pH que K_2 , ellos sugieren que el benzoato primero se une a un sitio de

unión en el exterior de la proteína con dependencia del pH, seguido de una transferencia al interior de la proteína causando un cambio de spin en el hierro del grupo hemo. La fuerte dependencia de K_1 con el pH puede ser el resultado de la necesidad de romper un puente salino en el sitio de enlace, en la parte exterior de la proteína. Estudios de cinética con microsomas mostraron que los valores aparentes de K_M siguieron la tendencia observada para la unión de benzoato a la BpH purificada, mientras que los valores de K_{cat} fueron constantes entre pH 6.6 y 8.0 y decrecieron por arriba de pH 8.0, probablemente debido a la pérdida de una interacción productiva entre BpH y NADPH:citocromo P450 oxidorreductasa. La investigación de la especificidad de los sustratos por BpH mostró que la BpH puede usar solamente ácido benzoico y algunos de sus derivados. La monosustitución en el anillo fenílico está permitida pero sólo en ciertas posiciones con grupos específicos, no muy grandes. La sustitución del anillo siempre propicia una afinidad menor de los sustratos. Con una excepción, todos los sustratos fueron convertidos a sus derivados 4-hidroxi. La excepción el 3-metoxibenzoato se desmetiló produciéndose solamente 3-hidroxibenzoato. El número restringido de sustratos y la especificidad en la catálisis sugieren que la BpH no es una hidroxilasa de propósitos generales sino que su función está confinada a la hidroxilación del benzoato en la ruta de β -cetoacil-CoA de *A. niger*.

Grupos de monooxigenasas P450 esenciales en el metabolismo primario son altamente específicas, a diferencia de las enzimas asociadas a la desintoxicación. Entre las enzimas asociadas al metabolismo primario se encuentran la CYP51 y la CYP61 que son familias de P450 fúngicas, estructural y funcionalmente conservadas, las cuales participan en la síntesis de ergosterol en la membrana. La familia CYP51 se encuentra en todos los reinos, mientras que las proteínas CYP61 están presentes sólo en hongos, pero sus homólogos funcionales (i.e. la familia CYP710) se han encontrado también en plantas mayores (Cresnar y Petric, 2011).

La primera enzima CYP51 aislada y caracterizada funcionalmente provenía de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta enzima cataliza la 14 α -desmetilación de lanosterol y eburicol en levaduras y hongos filamentosos respectivamente.

La función de la CYP61 como Δ^{22} -desaturasa en la síntesis de esterol en la membrana fúngica se ha elucidado en *S. cerevisiae* y en *Candida glabrata*. La CYP61 también interviene en el metabolismo de benzo [a]pireno produciendo 3-hidroxibenzo[a]pireno. Por lo tanto la CYP61 funciona también como monooxigenasa de desintoxicación de hidrocarburos aromáticos.

Miembros de la familia fúngica CYP56 se han caracterizado en *S. cerevisiae* y en los hongos patógenos *C. albicans*. Estas enzimas catalizan la reacción de formación de N,N'-bisformil ditirosina (componente de la parte externa de la pared de esporas de *S. cerevisiae*) a partir de la unión de dos moléculas de N-formiltirosina.

La familia de CYP52 (P450Alk), compuesta de varias subfamilias, contiene miembros encontrados en *Candida spp* que asimilan n-alcanos (por ejemplo *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *C. lipilytica* y *C. bombicola*). Estas enzimas son responsables del paso inicial y limitante de la hidroxilación de n-alcanos y de ácidos grasos los cuales son oxidados posteriormente y finalmente metabolizados a través de la ruta de β -oxidación. Las levaduras tienen múltiples genes que codifican isoenzimas CYP52 las cuales tienen diferentes, aunque algunas veces las mismas, especificidades de substratos. Cuando las especies crecen con compuestos tales como n-alcanos, alquenos, alcoholes grasos y ácidos grasos de varias longitudes de cadena, como única fuente de carbono, se inducen la mayoría de los genes. El grado de inducción varía de gen a gen y depende de la estructura química del inductor.

Las rutas de biosíntesis de los hongos que conducen a la producción de metabolitos secundarios son complicadas, consisten de varios pasos de oxigenación por diferentes enzimas. La ruta de metabolitos secundarios de hongos mejor estudiada es la de la producción de micotoxinas (aflatoxinas, tricotecenos y fumonisinas) y de plantas mayores la ruta mejor estudiada es la de la producción de hormonas (giberelinas). Las enzimas están

codificadas la mayoría de las veces por clusters de genes y su expresión normalmente está co-regulada.

Cinco de las 25 enzimas reponsables de la producción de aflatoxina por *A. parasiticus* tienen características estructurales de monooxigenasas citocromo P450, cada una perteneciente a una familia diferente. Las reacciones catalizadas por cuatro de estas enzimas son epoxidación (CYP58), oxidación (CYP59), hidroxilación y desaturación (CYP60) e hidroxilación (CYP64), mientras que CYP62 cataliza una reacción cuyo mecanismo no se conoce aún.

La biosíntesis de giberelinas en *Fusarium fujikuroi* también involucra cuatro enzimas P450 (CYP68A1), (CYP68B1), (CYP69A1) y (CYP503A1). Las enzimas son multifuncionales y catalizan 10 de 15 pasos de reacciones.

En el hongo *Fusarium oxysporum* se ha detectado la actividad de una P450 monooxigenasa que cataliza la hidroxilación subterminal en los carbonos ω -1 y ω -3 de ácidos grasos saturados e insaturados. Este tipo de enzima es una flavocitocromo autosuficiente que se compone de una hidroxilasa P450 en el dominio N-terminal conectado a través de un ligando corto de 20 a 30 aminoácidos al dominio C-terminal en donde se encuentra una citocromo P450 reductasa que contiene FAD/FMN.

En células de *Aspergillus terreus* se detectaron actividades de Citocromo P450 monooxigenasa (CYP) con diferentes categorías de sustratos tales como alcanos, derivados de alcanos, alcoholes, compuestos aromáticos, solventes orgánicos y esteroides (Vatsyayan y col., 2008). Actividades específicas altas de CYP se observaron cuando se usaron como sustratos los siguientes compuestos: metanol ($5.6 \pm 0.017 \text{ U mg}^{-1}$), acetona ($7.76 \pm 0.02 \text{ mg}^{-1}$) dimetilsulfóxido ($9.70 \pm 0.005 \text{ U mg}^{-1}$), n-hexadecano ($4.39 \pm 0.02 \text{ U mg}^{-1}$), n-octadecano ($4.23 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$) y naftaleno ($3.80 \pm 0.002 \text{ U mg}^{-1}$). El n-hexadecano fue oxidado por CYP via oxidación terminal y subterminal. La actividad fue localizada en el citosol de células cultivadas con n-hexadecano. Cuando las células se cultivaron con glucosa la actividad CYP aparentemente estaba distribuida en la fracción

mitocondrial y en la fracción microsomal. Las especificidades de los sustratos por CYP presentes en todas las localizaciones fueron similares independientemente del sustrato usado para el cultivo del hongo. A través de la tinción con hemo en SDS-PAGE de la fracción microsomal que contiene CYP y otras proteínas, se encontró solamente una banda de proteína hemo con un peso molecular de 110 kDa.

1.1.3 Uso de cosustratos

Se ha reportado que la adición de fuentes de carbono más fácilmente asimilables altera substancialmente la cinética de degradación de contaminantes orgánicos (Scow y col., 1989). La degradación y la mineralización de compuestos orgánicos cuando se encuentran en bajas concentraciones pueden estar controladas por la presencia de otros compuestos orgánicos. La estimulación y la inhibición debidas a la presencia de un segundo sustrato depende de los microorganismos, factores ambientales, la concentración y naturaleza del cosustrato y del contaminante que se quiere eliminar (Schmidt y Alexander, 1985).

Merkel y Perry (1977) reportan un aumento en la degradación del malatión en presencia de n-hexadecano. Scow y col. (1989) encontraron que la adición de glucosa favoreció la degradación de 2,4-diclorofenoxiacetato y del metil-paratión mientras que la anilina favoreció la mineralización de dicloroanilina.

Scow y col. (1989) estudiaron el efecto de la adición de glucosa, fenol y glutamato en la biodegradación del p-nitrofenol en suelos. Ellos encontraron que la adición de fenol en una concentración de 10 mg/kg_{suelo} mejoró la mineralización del p-nitrofenol mientras que otras concentraciones de fenol así como el uso de glucosa y glutamato no tuvieron efecto en la degradación de p-nitrofenol.

Wunder y col. (1994) estudiaron el metabolismo de pireno, un hidrocarburo aromático policíclico, por *Aspergillus niger* SK9317. Para este estudio se utilizó un sistema de fermentación en líquido, reactor de 20 L, en donde se usó un caldo de cultivo compuesto de sales minerales y de 10 g L⁻¹ de glucosa. La temperatura de fermentación fue de 25 °C, el pH de 5.5. Se tuvo una agitación mecánica (150 rpm) y una velocidad de aereación de 3.3 L

aire min^{-1} Después de 24 h de fermentación, se agregaron al reactor 400 mg de pireno, disueltos en dimetilformamida. En este tipo de sistema el pireno disminuyó hasta 0.1 mg L^{-1} en 200 h. El consumo de glucosa se completó a las 75 h de incubación, momento en el que se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 5.3 g L^{-1} peso seco. *Aspergillus niger* aumentó la velocidad de consumo de pireno en el momento en que desapareció la glucosa. Entre los metabolitos que se formaron en esta fermentación se reportan 1-hidroxipireno, pirenoquinonas, dihidroxipirenos, sulfatos conjugados, etilacetatos.

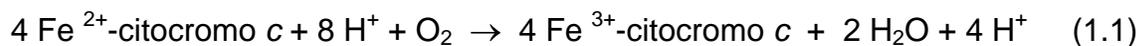
La expresión de los genes de citocromo P-450 y de citocromo P-450 reductasa (CPR) en presencia de corticoesteroides y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) se estudió en *Cunninghamella elegans* 1785/21Gp (Lisowska y col., 2006). Se encontró que los genes de la citocromo P-450 y la CPR fueron inducidos por ambos compuestos, corticoesteroides y por PAHs. La expresión del gen de la citocromo P450 se incrementó nueve veces y la del gen de CPR 6.4 veces en cultivos con cortexolona y o fenantreno, comparada con controles y se concluye que el incremento en la expresión del gen de citocromo P450 está acompañada del incremento en los niveles de actividad enzimática de la citocromo P-450.

1.2 Oxigenasas

1.2.1 Clasificación de oxidorreductasas y características generales

Las oxidorreductasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción. Esto es catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donante (agente reductor) a otra aceptora (agente oxidante). A este grupo de enzimas pertenecen las oxidasas, peroxidasas, **oxigenasas/hidroxilasas** y las deshidrogenasas/reductasas (Burton, 2003; Xu, 2005).

Las oxidasas son enzimas que catalizan reacciones en las cuales el oxígeno molecular es el aceptor de electrones, pero los átomos de oxígeno no aparecen en el producto oxidado. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua o a peróxido de hidrógeno. Un ejemplo de oxidasas lo constituye la enzima Citocromo c oxidasa o complejo IV que cataliza la siguiente reacción:



Las peroxidasas catalizan reacciones en las cuales intervienen dos sustratos. Uno de los sustratos es el peróxido de hidrógeno (agente oxidante) y el otro puede ser un sustrato orgánico e inorgánico (agente donante de electrones) que será oxidado por el peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, los productos de este tipo de oxidaciones serán el sustrato orgánico o inorgánico oxidado y agua (peróxido reducido).

Las **oxigenasas/hidroxilasas** por su parte, catalizan reacciones en las cuales los átomos de oxígeno, provenientes de oxígeno molecular, son directamente incorporados en el sustrato, formando un nuevo grupo hidroxilo o carbonilo. Existen dos tipos de oxigenasas, las monooxigenasas/hidroxilasas que catalizan la inserción de un solo átomo de oxígeno y las dioxigenasas/hidroxilasas que catalizan la inserción de ambos átomos de oxígeno. En el presente trabajo nos enfocaremos al estudio de este tipo de oxidoreductasas.

Finalmente, las deshidrogenasas/reductasas catalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno, empleando un par de coenzimas que actúan como aceptores o como donadores de electrones y protones; los principales coenzimas implicados en estas reacciones son los pares NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, FAD/FADH_2 Y FMN/FMNH_2 .

1.2.2 Nomenclatura de oxidoreductasas

En base al tipo de reacción que las oxidoreductasas catalizan se han dividido en 22 diferentes EC-subclases. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, ha clasificado a las oxidoreductasas con el número 1. Y de acuerdo al grupo que actúa como donador de electrones le corresponderá un segundo número. Por ejemplo, una enzima clasificada como EC 1.1 se refiere a una oxidoreductasa que actúa con grupos CH-OH como donantes de electrones. Para el caso de las oxigenasas tendremos las clasificaciones EC 1.13, actúan con un donante con la incorporación de

oxígeno molecular (dioxigenasas) y EC 1.14, actúan con dos donantes con la incorporación o reducción de oxígeno molecular (monooxigenasas).

En la Fig 1.1 se presenta un resumen de la clasificación de las oxidoreductasas en base a la naturaleza del substrato oxidante (aceptor de electrones) y de los productos de la reacción. Se incluye además la nomenclatura para cada uno de los diferentes tipos de oxidorreductasas.

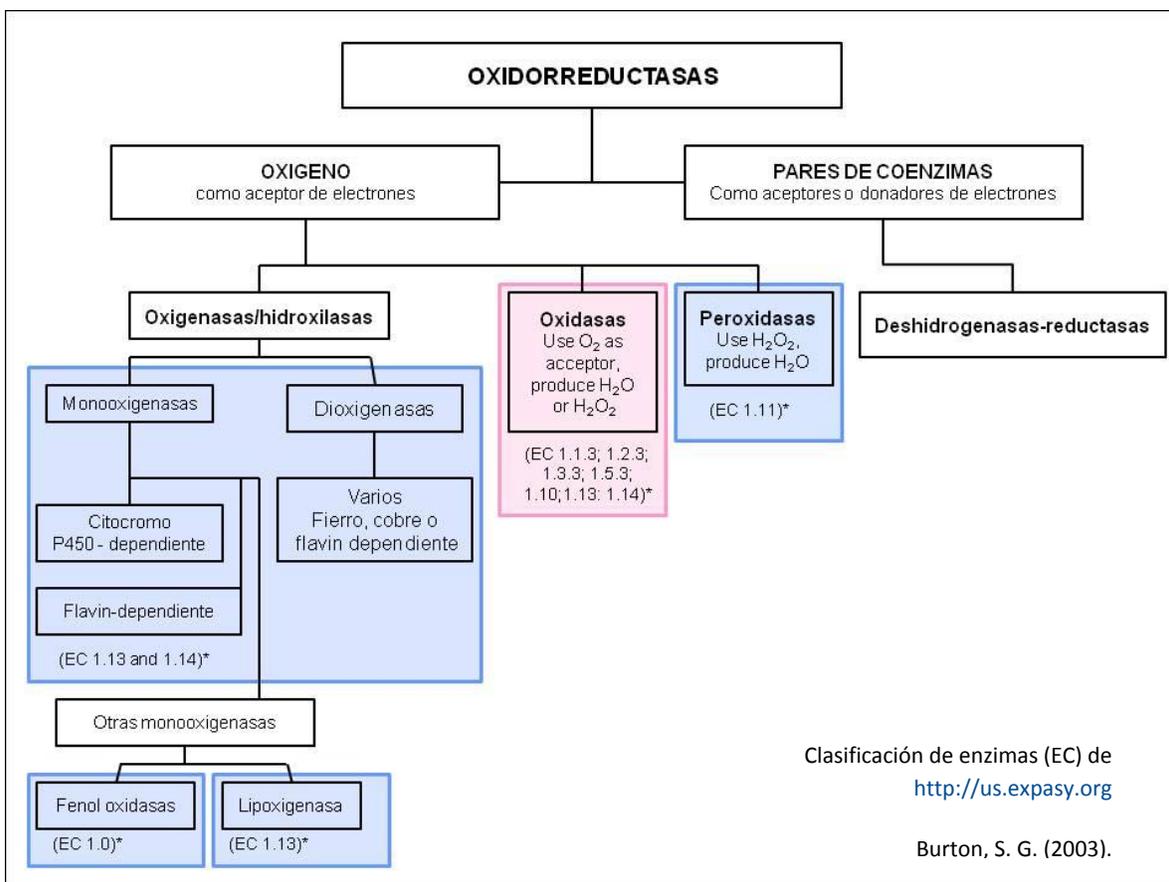


Figura 1.1 Clasificación de oxidorreductasas en base al aceptor de electrones que usan y a los productos de la reacción.

1.2.3 Monooxigenasas

Las monooxigenasas, como ya se dijo se caracterizan porque catalizan reacciones en las cuales sólo un átomo de la molécula de oxígeno es incorporado al sustrato mientras que el otro es transformado a agua, ya sea por el sustrato (S) mismo o por un cosustrato reductor (H_2X):



En algunas reacciones el oxígeno del sustrato se reduce a un hidroxilo, razón por la cual las monooxigenasas se conocen también como hidroxilasas. Para poder realizar esta reacción, las monooxigenasas tienen que activar al oxígeno molecular, ya que ninguna reacción ocurrirá sin la activación debido al spin del O_2 . La activación del oxígeno se da por la donación de electrones al oxígeno molecular, después de la cual puede darse la oxigenación del sustrato. El tipo de oxígeno-intermediario reactivo que se forma dependerá de cual es el cofactor presente en la monooxigenasa (Torres-Pazmiño y col. 2010). En algunos casos ningún cofactor está presente. Las monooxigenasas internas obtienen estos electrones del mismo sustrato, en tanto que las monooxigenasas externas dependen de donadores de electrones externos, por ejemplo de la coenzima NAD(P)H.

1.2.3.1 Clasificación de monooxigenasas en base al cofactor que usan.

Torres Pazmiño y col.(2010) publicaron una excelente revisión de la clasificación de las monooxigenasas. La mayor parte de la información redactada en esta sección se extrajo de dicha publicación. Sin embargo, se respetaron las citas originales para dar crédito a los autores.

❖ Monooxigenasas dependientes del grupo Hemo

Las monooxigenasas dependientes del grupo hemo, conocidas también como monooxigenasas citocromo P450 o CYPs (EC 1.14.13.x, EC 1.14.14.x y EC 1.14.15.x) se pueden encontrar en muchas formas de vida: eucariontes (mamíferos, plantas y hongos) y procariontes (Nelson y col., 1996), aunque son más abundantes en eucariontes. Las CYPs son monooxigenasas externas dependientes del grupo hemo tipo b (ver Fig 1.2). Dependiendo del sistema de transporte de electrones se han definido cuatro sistemas citocromo P450 que se denominan como: clase I, clase II, clase III y clase IV (Bernhardt, 2006).

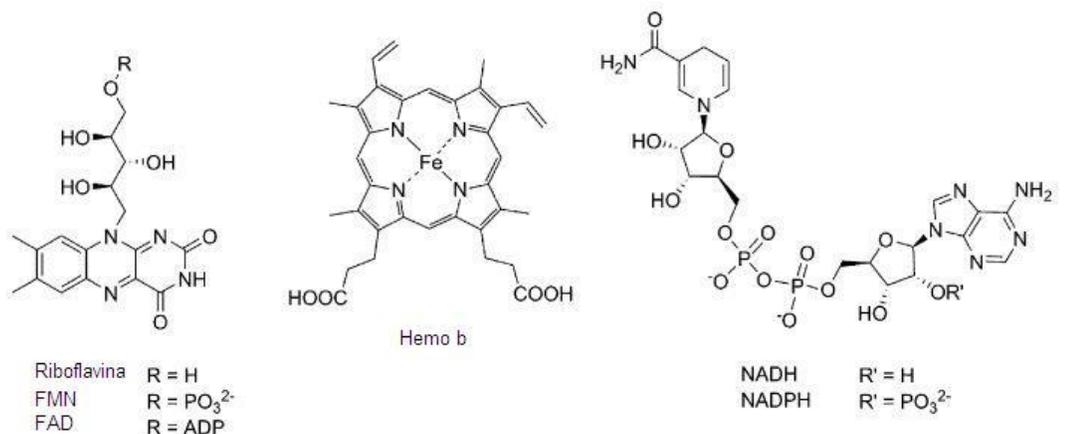


Figura 1.2 Ejemplos de cofactores usados por oxidorreductasas

El sistema clase I consiste de tres componentes separados, la proteína-hemo, una ferredoxina (Fd) y una ferredoxina reductasa que contiene FAD (FdR) y es dependiente de NADH. Muchos sistemas enzimáticos de bacterias y la mayoría de los sistemas mitocondriales pertenecen a la clase I. Los CYPs mitocondriales se encuentran unidos a la membrana, mientras que los CYPs de bacterias y sus sistemas Fd/FdR son usualmente proteínas solubles.

Los citocromo P450 de clase II son sistemas de dos componentes, en los cuales ambos, la proteína-hemo y la unidad reductasa (CPR) están unidos a la membrana del retículo endoplásmico. Estos CYPs son comunes en eucariontes.

Los CYPs clase III consisten de los mismos componentes que los sistemas de clase II; sin embargo, ambos dominios se localizan en una sola cadena polipeptídica. Esta característica facilita el transporte de electrones e incrementa considerablemente las velocidades de reacción de los CYPs clase III, comparados con los dominios separados. Los CYPs clase III pueden ser solubles o unidos a membrana y se encuentran tanto en eucariontes como en procariontes.

Los CYPs clase IV consisten de los mismos componentes de la clase I pero los dominios están fusionados en una sola cadena polipeptídica (Roberts y col., 2002).

❖ **Monooxigenasas dependientes de flavina**

Este tipo de enzimas es más común en procariontes aunque también se da en eucariontes. Las flavinas usadas por estas enzimas son FMN o FAD (Fig. 1.1) y pueden estar fuertemente unidas a la enzima (grupo prostético) o funcionar como un substrato (coenzima). No se ha encontrado evidencia de que las monooxigenasas dependientes de flavina se unan al cofactor por enlaces covalentes. Se han identificado algunas monooxigenasas internas dependientes de flavina (EC 1.13.12.x) pero la mayoría de estas enzimas son monooxigenasas externas (EC 1.14.13.x) y requieren NAD(P)H como coenzima auxiliar (van Berkel y col. 2006).

Las monooxigenasas dependientes de flavina catalizan varias reacciones, por ejemplo epoxidaciones, oxidaciones tipo Baeyer-Villiger y halogenaciones. Hace apenas cuatro años que se reportó por primera vez una monooxigenasa dependiente de flavina que es capaz de hidroxilar alcanos no activados (Feng y col. 2007; Li y col. 2008).

Las monooxigenasas externas dependientes de flavina se han clasificado recientemente, en base a su similitud en la secuencia de aminoácidos y los datos estructurales disponibles, en seis subclases (Tabla 1.1) (van Berkel y col. 2006). Todas estas monooxigenasas son dependientes de FAD, excepto los miembros de la subclase C. Estas últimas monooxigenasas son dependientes de FMN y consisten de una o dos subunidades monooxigenasas y una subunidad reductasas. La reductasa provee a la monooxigenasa de FMN reducido. Ejemplos de monooxigenasas

dependientes de flavina que pertenecen a esta subclase son las luciferasas (Baldwin y Ziegler, 1992; Viviani, 2002) y las llamadas monooxigenasas Bayer-Villiger Tipo II (Taylor y Trudgill, 1986; van der Werf, 2000). Las monooxigenasas dependientes de flavina que pertenecen a las subclases D, E y F también consisten de dos subunidades, en las cuales la reductasa provee de FAD reducido (FADH₂) a la monooxigenasa. La principal diferencia entre estas tres subclases de monooxigenasas dependientes de FAD es el tipo de reacción que catalizan. La monooxigenasa subclase D cataliza la oxigenación de un anillo aromático, mientras que las subclases E y F catalizan las reacciones de epoxidación y de halogenación respectivamente.

Tabla 1.1 Clasificación de monooxigenasas externas dependientes de flavina (van Berkel y col. 2006)

Subclase	Prototipo	Reacciones ^a	Subunidades	Cofactor	Coenzima
A	p-hidroxibenzoato hidroxilasa	Hidroxilación, epoxidación	α	FAD	NAD(P)H
B	Ciclohexanona monooxigenasa	Bayer-Villiger, N-oxidación	α	FAD	NADPH
C	Luciferasa	Emisión de luz, Bayer-Villiger	$\alpha + \beta$	-	FMN/NAD(P)H
D	p-hidroxifenilacetato hidroxilasa	Hidroxilación	$\alpha + \beta$	-	FAD/NAD(P)H
E	Estireno monooxigenasa	Epoxidación	$\alpha + \beta$	-	FAD/NAD(P)H
F	Triptófano 7-halogenasa	Halogenación	$\alpha + \beta$	-	FAD/NAD(P)H

^a Se dan las actividades de oxidación más comunes encontradas in vivo

Las monooxigenasas dependientes de flavina, que tienen un solo componente (subclase A y B) combinan la reducción de flavina y la monooxigenación en una cadena polipeptídica. Este tipo de enzimas sólo usan FAD como grupo prostético y básicamente NADPH como donador de electrones, aunque se conocen algunos

ejemplos que requieren de NADH (p.ej. salicilato 1-monooxigenasa) (White-Stevens y Kamin, 1972). Las diferencias principales entre las subclases A y la B es que todos los miembros conocidos de la subclase B son estrictamente dependientes de NADPH, estructuralmente compuestos de dos dominios enlazantes de dinucleótidos (para FAD Y NADPH) y tienen NADP⁺ unido a través de todo el ciclo catalítico (van den Heuvel y col., 2005; Torres Pazmiño y col., 2008). A esta subclase de monooxigenasas pertenecen las monooxigenasas que contienen flavina (Ziegle, 2002), las monooxigenasas N-hidroxilantes y las monooxigenasas Bayer-Villiger Tipo I (Kamerbeek y col. 2003). Las monooxigenasas subclase A son dependientes de NADH/NADPH, tienen solamente un dominio enlazante de dinucleótido y liberan NADP⁺ directamente después de la reducción de FAD. Algunos ejemplos de enzimas pertenecientes a la subclase A son p-hidroxibenzoato hidroxilasa y la escualeno monooxigenasa (Entsch, 1990; Laden y col., 2000).

Existe poca información en la literatura acerca de monooxigenasas internas dependientes de flavina. Dos enzimas de este tipo que han sido reportadas son la lactato monooxigenasa dependiente de FMN de *Mycobacterium phlei* (Sutton y col., 1957), la nitronato monooxigenasa (de varios organismos), que oxida nitroalcanos (Gadda y Francis, 2010).

❖ **Monooxigenasas dependientes de cobre**

Las monooxigenasas dependientes de cobre (EC 1.14.17.x) constituyen una familia de enzimas relativamente pequeña, que requieren iones de cobre para la hidroxilación de sus substratos. Enzimas de este tipo se han encontrado principalmente en eucariontes. La enzima mejor estudiada de esta familia es la dopamina β-monooxigenasa (DβM), una enzima que hidroxila el carbono-β de la dopamina con un equivalente de oxígeno molecular y dos equivalentes de ascorbato, produciendo norepinefrina como producto principal (Levin y col., 1960). Otros ejemplos de esta familia lo constituyen la tiramina β-monooxigenas (TβM) de *Drosophila melanogaster* (Monastirioti y col. 1996), la peptidoglicina α-monooxigenasa (PHM) y la monooxigenasa X (MOX). Estas dos últimas presentes tanto en humanos como en *Drosophila melanogaster* (Xin y col., 2004).

Se han encontrado además monooxigenasas dependientes de cobre que no requieren ascorbato como coenzima. Un ejemplo es la metano monooxigenasa, asociada a membrana, de *Methylococcus capsulatus* (pMMO) (Fox y col. 1989). Otro miembro de esta familia es la poco estudiada amonio monooxigenasa (AMO), asociada a membrana (Arp y col., 2002). La tirosinasa (EC 1.14.18.1) es otra de las enzimas monooxigenasas dependientes de cobre. Esta enzima se caracteriza por tener un centro reactivo binuclear de cobre, acoplado magnéticamente, en donde el cobre está ligado por tres residuos de histidina.

❖ **Monooxigenasas dependientes de hierro sin grupo hemo**

Este tipo de monooxigenasas utilizan dos átomos de Fe como cofactor para su actividad oxidativa. Este tipo de enzimas se conocen también como monooxigenasas bacterianas con multicomponentes (BMMs) y catalizan reacciones de hidroxilación y de epoxidación. Están constituidas por tres componentes: una monooxigenasa, una reductasa y una proteína regulatoria pequeña (Wallar y Lipscomb, 1996, Leahy y col., 2003). La mejor caracterizada de estas enzimas es la metanomonooxigenasa soluble (sMMO) de *M. capsulatus* (Murrell y col. 2000) que consiste de tres subunidades diferentes en una configuración $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Este tipo de enzima es activa con una amplia variedad de hidrocarburos (Green y Dalton, 1989). Análisis estructurales y funcionales han revelado que la subunidad α contiene el centro binuclear catalítico. Este centro consiste de dos átomos de hierro unidos por un puente hidroxilo y es requerido para la activación del oxígeno molecular y del metano (Merx y col., 2001). Otros miembros de esta familia incluyen a la alcano monooxigenasa (Gallagher y col., 1977), la fenol hidroxilasa (Whited y Gibson, 1991), las alcano hidroxilasas unidas a membrana (van Beilen y Funhoff, 2007) y las alqueno/aromático monooxigenasas de cuatro componentes (ej. tolueno 4-monooxigenasa). Este último grupo de enzimas dependientes de dos hierros contienen además un componente adicional separado, una ferredoxina tipo Rieske que facilita el transporte de electrones entre la reductasa y la monooxigenasa (Pikus y col., 1996).

Estudios recientes de la producción, en birreactores, de biomasa de *M. trichosporium* con expresión de la sMMO han mostrado que grandes cantidades de biomasa se pueden obtener por la sustitución del metano por metanol como única fuente de carbono y energía (Yu y col., 2009). El uso de células completas que expresen MMOs es una aplicación prometedora para la biorremediación por ejemplo de solventes clorados (Lee y col., 2006). Por otra parte, la alcano ω -hidroxilasa, unida a membrana (AlkB) y la xileno monooxigenasa (incluyendo los componentes adicionales) se han sobreexpresado con éxito como enzimas recombinantes (Niebor y col., 1993; Staijen y col., 1997; Staijen y col., 2000; Bühler y col., 2000). Además de las hidroxilaciones y de las epoxidaciones esta familia de monooxigenasas también puede catalizar reacciones enantioselectivas de sulfooxidación (Feingersch y col., 2008).

❖ **Monooxigenasas dependientes de Pterina**

Las monooxigenasas dependientes de pterina (EC 1.14.16.x) son capaces de hidroxilar los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en el anillo aromático. Aunque algunas de estas enzimas se encuentran en bacterias, su origen principal es de eucariontes. Estas monooxigenasas unen un átomo de hierro en su sitio activo con dos histidinas y un glutamato y usan tetrahidrobiopterina (BH₄) como una coenzima. Después de la hidroxilación del sustrato, la coenzima se convierte a 4 α -hidroxibiopterina, la cual después de la deshidratación forma una dihidrobiopterina quinoidal. In vivo, una dihidropteridina reductasa, dependiente de NAD(P)H recicla este último producto a BH₄ (Fitzpatrick, 1999). Algunos ejemplos de esta familia de enzimas son la fenilalanina 4-monooxigenasa (PheH, EC 1.14.16.1), la antranilato 3-monooxigenasa, la tirosina 3-monooxigenasa, y la gliceril-etil monooxigenasa. En contraste con otros miembros de esta familia, las últimas enzimas actúan en sustratos alifáticos (Taguchi y Armarego, 1998).

❖ Otras monooxigenasas dependientes de cofactor

En este grupo se menciona a la única enzima que se conoce que depende de cofactores diferentes de los mencionados anteriormente. Esta enzima es la aclicinomicina 10-hidroxilasa de *Streptomyces purpurascens*. Esta enzima inserta un átomo de oxígeno, a partir de oxígeno molecular, en el sustrato y requiere S-adenosil-S-metionina como cofactor. El sustrato de dicha enzima es el 15-demetoxi- ϵ -rodomicina.

❖ Monooxigenasas independientes de cofactor

La mayoría de las monooxigenasas requiere un cofactor orgánico o metálico para su actividad catalítica. Sin embargo, se han encontrado varias monooxigenasas que no requieren cofactores. A esta familia de enzimas pertenece la enzima interna, tetracenomicina F1 monooxigenasa (TcmH) de *Streptomyces glaucens*. Se ha demostrado que esta enzima requiere sólo de oxígeno molecular para su actividad y utiliza el sustrato como agente reductor. Se ha encontrado además que los grupos sulfidril y los residuos histidina son esenciales para su actividad oxidativa (Shen y Hutchinson, 1993). La búsqueda de nuevos miembros de esta familia de monooxigenasas ha mostrado que muchas de las enzimas, de este tipo, están básicamente presentes en Streptomycetos. Por ejemplo, la ActVA-orf6 de *Streptomyces coelicolor* A3(2) es una monooxigenasa que se cree que cataliza la formación de dihidrokalafungina, un precursor de la actinorodina (Fetzner, 2002). Una excepción es una quinol monooxigenasa (YgiN) de *E. coli* (Adams y Jia, 2005).

1.2.4 Dioxigenasas

Las dioxigenasas son enzimas que incorporan dos átomos de oxígeno en el sustrato. Al igual que las monooxigenasas las dioxigenasas requieren cofactores capaces de reaccionar con el oxígeno molecular, ya que las reacciones concertadas están prohibidas entre el dióxígeno paramagnético, que tiene dos espines electrónicos desapareados, y el

carbono de compuestos orgánicos, que existe en un singlete. Las reacciones del dioxígeno con los metales de transición, los cuales tienen orbitales *d* incompletos, no están prohibidas por spin. Se pueden formar complejos diamagnético metal-oxígeno que pueden subsecuentemente reaccionar con substratos orgánicos (Harayama y Kok, 1992).

1.2.4.1 Clasificación de dioxigenasas

Las dioxigenasas se clasifican en dos grandes clases:

- a) Dioxigenasas no dependientes de grupo hemo con Fe-S tipo Rieske y
- b) Dioxigenasas dependientes de grupo hemo con Fe-S

1.2.4.2 Dioxigenasas no dependientes de grupo hemo con Fe-S tipo Rieske

Este tipo de enzimas se conoce también como dioxigenasas que hidroxilan un anillo aromático. Se sabe que catalizan la reacción inicial en la biodegradación, por bacterias, de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), de aromáticos clorados, nitroaromáticos, aminoaromáticos, heterocíclicos aromáticos y de ácidos aromáticos (ver Fig. 1.2) (Parales y Resnik, 2000). Las dioxigenasas que hidroxilan un anillo aromático utilizan oxígeno molecular como un substrato, agregando ambos átomos de oxígeno al anillo aromático del substrato. Este grupo de enzimas está distribuido entre una gran variedad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y son importantes para el catabolismo de una amplia gama de contaminantes ambientales.

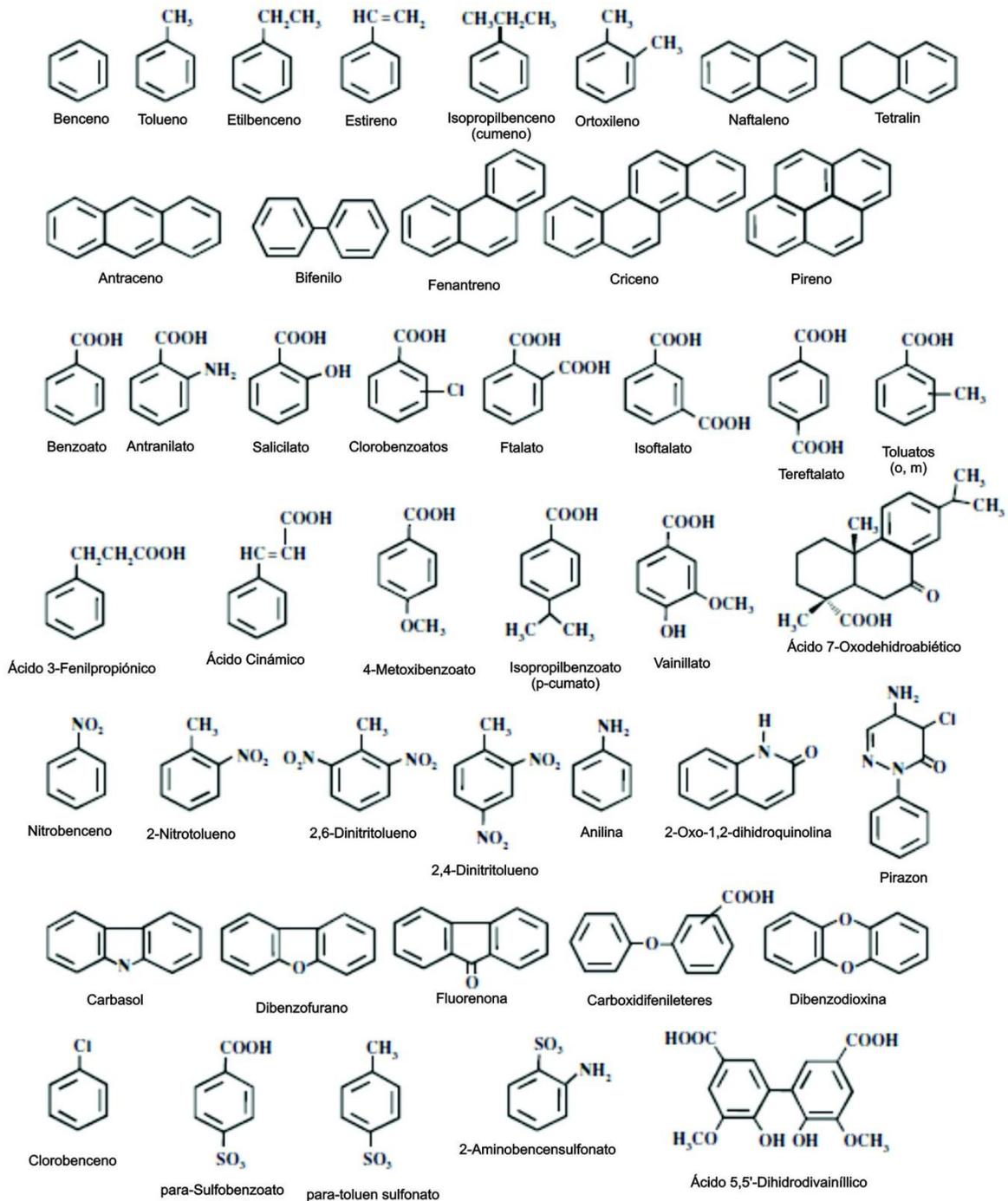


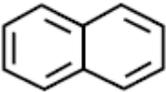
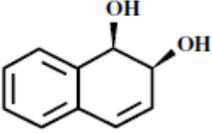
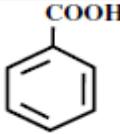
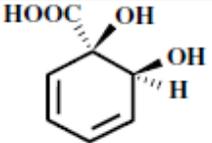
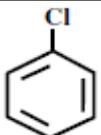
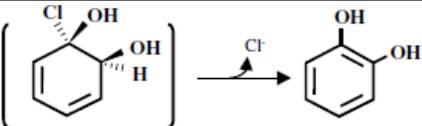
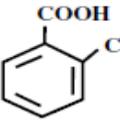
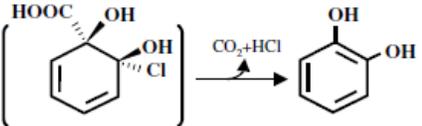
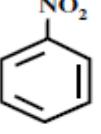
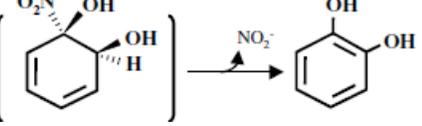
Figura 1.3 Compuestos aromáticos degradados por rutas bacterianas que inician por la hidroxilación del anillo aromático por dioxigenasas. (Tomada de Parales y Resnik, 2000).

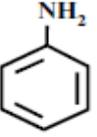
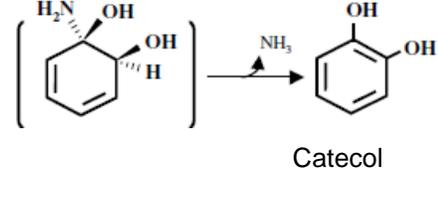
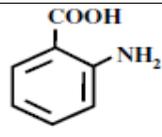
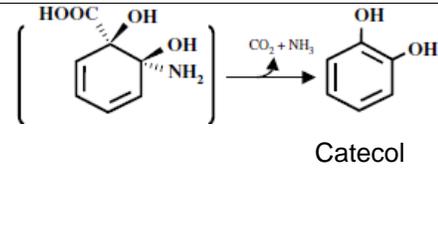
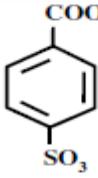
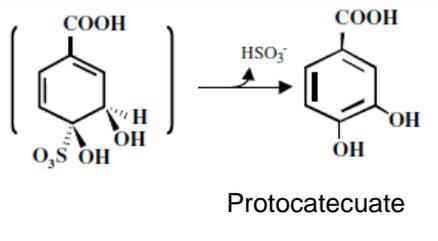
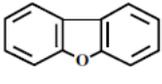
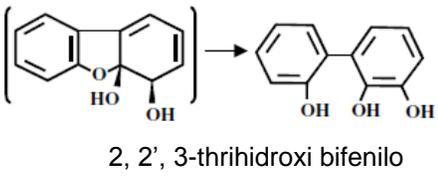
Las dioxigenasas hidroxilasas de anillo aromático son sistemas enzimáticos con multicomponentes (EC 1.14.12.x) que catalizan la dihidroxilación reductiva de sus sustratos, y son diferentes de las dioxigenasas que rompen el anillo aromático (EC 1.13.11.x). Muchas de estas enzimas catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos además de sus sustratos nativos. Sin embargo, al mismo tiempo muchos de estos sistemas enzimáticos son altamente enantioselectivos, produciendo compuestos quirales con alta pureza enantiomérica tales como *cis*-dihidrodiol quiral.

1.2.4.3 Tipos de reacciones que catalizan las dioxigenasas hidroxilasas de anillo aromático

La reacción inicial catalizada, por una dioxigenasa hidroxilante de anillo aromático, en un hidrocarburo aromático y en algunos otros sustratos es una *cis*-dihidroxilación del doble enlace C-C de átomos de carbono adyacentes, no sustituidos. Esta reacción genera un *cis*-dihidrodiol quiral como puede verse con la reacción del naftaleno (Reacción A, Tabla 1.2). La oxidación de ácidos aromáticos, tales como el benzoato, ocurren en un carbono carboxilado y en un carbono adyacente, no sustituido, lo que resulta en la formación de ácidos carboxílicos *cis*-ciclohexadieno dihidroxilados quirales (Reacción B, Tabla 1.2). Este tipo de enzimas también cataliza la descloración de benzoatos, bencenos y de bifenilos clorados Reacciones C y D, Tabla 1.2). La dioxigenación en un carbono con cloro como sustituyente da como resultado la eliminación de cloro. Reacciones similares se han mostrado con nitroaromáticos, aminoaromáticos y sustratos sulfoaromáticos (Reacciones E-H, Tabla 1.2), lo cual resulta en la eliminación de nitrito, amoniaco y sulfito. Otro grupo de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático catalizan una dioxigenación angular por ejemplo con dibenzofurano (Reacción I, Tabla 1.2), carbazol, difeniléteres y con dibenzo-*p*-dioxin (Parales y Resnik, 2000)

Tabla 1.2 Tipos representativos de reacciones de dihidroxilación-*cis* catalizadas por dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (tomada de Parales y Resnik, 2000)

Tipo de Reacción	Substrato	Enzima	Producto
A. <i>cis</i> -dihidroxiación	 Naftaleno	Naftaleno dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Naftaleno <i>cis</i> 1,2-Dihidrodiol
B. <i>cis</i> -dihidroxiación	 Benzoato	Benzoato dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Benzoato <i>cis</i> 1,2-Dihidrodiol
C. <i>cis</i> -dihidroxiación y deshalogenación	 Clorobenceno	Clorobenceno dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Catecol
D. <i>cis</i> - dihidroxiación, deshalogenación y descarboxilación	 2-Chlorobenzoate	Chlorobenzoate dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Catecol
E. <i>cis</i> -dihidroxiación y nitrito eliminación	 Nitrobenceno	Nitrobenceno dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Catecol

F. cis-dihidroxiación y desaminación	 Anilina	Anilina dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Catecol
G. cis- dihidroxiación, desaminación y descarboxilación	 Antranilato	Antranilato dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Catecol
H. cis- dihidroxiación, y desulfonación	 p-sulfobenzoato	p- Sulfobenzoato dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 Protocatecuato
I. Dihidroxiación angular	 Dibenzofurano	Dibenzofurano dioxigenasa $\xrightarrow{O_2}$	 2, 2', 3-trihidroxi bifenilo

1.2.4.4 Clasificación de Dioxigenasas no dependientes de grupo hemo con Fe-S tipo Rieske

❖ Por el sistema Batie

Las oxigenasas con Fe-Rieske sin grupo hemo se clasificaron usando el sistema Batie (Parales y Resnik, 2000). Este sistema se basaba en los componentes de transferencia de electrones presentes en los sistemas de oxigenasas 10 Rieske-Fe sin grupo hemo conocidos en ese tiempo. De acuerdo a este sistema se clasificaron como:

Clase I

Enzimas que tenían dos componentes, una reductasa y una oxigenasa.

Clase II y Clase III

Enzimas que tenían tres componentes, una reductasa, una ferredoxina y una oxigenasa.

Estas clases fueron a su vez divididas en base al tipo de flavina usada como cofactor (FAD o FMN) en la reductasa

Por la presencia o ausencia de centro Fe-S en la reductasa

Por el número de proteínas en la oxigenasa y por si una ferredoxina estaba involucrada.

Por el tipo de centro Fe-S (planta o Rieske) en la ferredoxina

Esta clasificación funcionó bien con un pequeño número de enzimas, pero cuando se identificaron más, no todas las nuevas enzimas podían clasificarse con este sistema.

❖ **Clasificación basada en alineación de secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la oxigenasa**

Esta clasificación fue propuesta por Werlen y col. (1996) y estaba basada en la actividad catalítica de las enzimas dado que la subunidad α de la oxigenasa tiene un papel muy importante en la determinación de la especificidad del sustrato. Se demostró que en general las dioxigenasas relacionadas codificaban para enzimas con sustratos similares. De acuerdo a estas bases se clasificaron cuatro familias:

Familia de naftaleno

Familia de Tolueno/benceno

Familia de bifenilo

Familia de benzoato/tolueno

Nakatsu y col. (1995) agregaron las α_n dioxigenasas (que correspondían con la Clase IA del sistema de Batie) al sistema de Werlen y demostraron que formaban un linaje separado.

❖ **Clasificación basada en la filogenética de las subunidades α de la oxigenasa**

Grupo I: familia de ftalato

Grupo II: familia de benzoato

Grupo III: familia de naftaleno

Grupo IV: familias tolueno/bifenilo

Familia de Gram (+) PAH/Ftalato

Familia de salicilato

Ninguna de las clasificaciones es satisfactoria ya que de acuerdo a análisis filogenéticos actuales, se han encontrado nuevas familias o grupos así como varias enzimas que no se ajustan a las características de ninguno de los grupos o familias propuestos.

Las dioxigenasas bacterianas que hidroxilan un anillo aromático están compuestas de dos tipos de componentes: una hidroxilasa y un componente que sirve como transportador de electrones. Todos los componentes hidroxilasa de dioxigenasas de anillo aromático son oligómeros formados de una o dos subunidades asociadas en diferentes configuraciones α_n o $(\alpha\beta)_n$

1.2.5 Aplicaciones de las oxigenasas

1.2.5.1 Monooxigenasas

Las monooxigenasas citocromo P450 de bacterias catalizan la reducción de oxígeno a una forma reactiva que puede oxidar muchos substratos, incluyendo arenos, poliaromáticos, arilhidrazinas y terpenos (Fruetel y col. 1994). *Pseudomonas putida* Gpo 1 produce una monooxigenasa que cataliza la epoxidación de alquenos terminales (Fang y col. 1995), y de estireno (Panke y col. 1999).

Las hidroxilasas de esteroides son particularmente importantes como biocatalizadores porque hay pocas rutas de síntesis químicas que provean el mismo grado de especificidad de posición. Este tipo de hidroxilaciones también se dan en terpenos y en compuestos bencílicos y alicíclicos. Enzimas que realizan esta función han sido reportadas (Holland,

1992; Holand y Weber, 2000) para bacterias (*Nocardia, sp*) y hongos (*Curvularia lunata*, *Aspergillus ochraeus*).

La ciclohexanona monooxigenasa dependiente de NADH (EC 1.14.13.22), fue la primera enzima reportada capaz de catalizar oxidaciones Bayer-Villiger en donde se producen cetonas con anillos expandidos (Fang y col. 1995). Este tipo de enzimas se encuentran en *Acinetobacter, sp.* (NB9871).

Varias enzimas se han estudiado por su potencial para biorremediación, un ejemplo de ellas es la bifenil monooxigenasa dependiente de flavina aislada de *Pseudomona azelaica* HBP1, esta enzima hidroxila, regioselectivamente, una amplia variedad de 2-alkil y 2-aril fenoles (Suske y col. 1997).

1.2.5.2 Dioxigenasas

La stilbene dioxigenasa de *P. putida* (TMY1009) se ha usado para romper enlaces vinílicos para formar aldehídos y se ha explorado su uso para la producción de vainilla (Hagedorn y Kapehammer, 1994).

Se han usado algunas dioxigenasas aisladas de *P. putida* para la producción de dioles, mediante mutantes bloqueados. Estas cepas mutadas son incapaces de metabolizar los cis-dioles formados (Duetz, 2001).

Dioxigenasas que son regio y enantioselectivas se han utilizado para la obtención de sintones para prostaglandinas y agentes hipotensivos (Deluca y Hudlicky, 1990).

1.3 Caracterización de oxigenasas

En esta sección se describen algunas de las oxigenasas que han sido purificadas, parcial o totalmente y se describen características tales como estructura, temperatura y pH óptimos de actividad, la especificidad, estabilidad y la actividad que presentan.

La monooxigenasa soluble de *Methylococcus capsulatus* (Bath) es una enzima multicomponente, que consiste de tres proteínas que han sido purificadas casi a homeogeneidad. La enzima tiene una amplia especificidad catalítica, es capaz de transformar el metano a metanol así como de insertar oxígeno en una gran variedad de compuestos tales como alcanos, alquenos, éteres y en compuestos alicíclicos, aromáticos y heterocíclicos. Esta enzima tiene un mecanismo de reacción similar a las enzimas citocromo P-450. La evidencia sugiere que la metanomooxigenasa soluble oxida substratos via un mecanismo de reacción no concertado (abstracción de hidrógeno con hidroxilación posterior) usando radicales o carbocationes intermedios (Green y Dalton, 1989). Para la Bath los mismos autores reportaron un valor de afinidad de oxígeno (K_{MO}) de 16.8 $\mu\text{mol O}_2/\text{L}$ de Bath.

Sluis y col. (2002) purificaron parcialmente la butano monooxigenasa soluble de *Pseudomonas butanovora* (sBMO) y clonaron y secuenciaron seis genes estructurales, bmoXYBZDC. la sBMO es un sistema de tres componentes esenciales para la oxidación de substratos. Entre estos tres componentes se tiene una hidroxilasa multimérica con subunidades de 61, 45 y 19 kDa, codificadas por bmoXYZ. Otro de los componentes es una NADH oxidoreductasa de 40 kDa, codificada por bmoC y el tercer componente es una proteína reguladora de 15 kDa codificada por bmoB. El sexto gen estructural (bmoD) codifica una proteína de 9.6 kDa con similitud a mmoD (orfY), una proteína putativa con centro metálico de las metano monooxigenasas solubles. La expresión de los seis genes se detectó en células inducidas con butano. La butano monooxigenasa de *P. butanovora* se asemeja más con las monooxigenasas que no tienen grupo hemo y que contienen un centro diférrico.

Budde y col. (2005) reportan la clonación y expresión en *Escherichia coli*, del gen que codifica la CYP102A2, una oxigenasa de *Bacillus subtilis*. La enzima recombinante formada se purificó por cromatografía de afinidad de quelato de metal inmovilizado (IMAC) por sus siglas en inglés. Esta enzima se caracterizó encontrándose que es una monooxigenasa de una sola cadena polipeptídica de 119 kDa, que tiene un dominio de reductasa y otro de grupo hemo. La reductasa contiene FMN/FAD. La secuencia de

aminoácidos deducida presenta un alto nivel de identidad con las secuencias de aminoácidos de CYP102A1, de *B. megaterium* (59%) y de CYP102A3 de *B. subtilis* (60%). La CYP102A2 cataliza la oxidación de ácidos grasos de cadenas pares o impares, saturadas o insaturadas. En todas las reacciones investigadas, los productos fueron los respectivos ácidos grasos hidroxilados en las posiciones ω -3, ω -2 y ω -1. La actividad más alta se obtuvo con ácido oleico ($K_M = 17.36 \pm 1.4 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 2,244 \pm 72 \text{ min}^{-1}$).

1.4 Fermentación en estado sólido

El término de fermentación en medio sólido indica el cultivo aerobio o anaerobio de microorganismos que crecen en la superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Esta matriz puede estar constituida por un sustrato humidificado o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos (Roussos y Perraud-Gaime, 1996).

Por otra parte, la fermentación en estado sólido es un proceso usado en forma artesanal desde la antigüedad (producción de Koji, quesos fermentados) que poco a poco se ha ido transformando en una tecnología. La fermentación en estado sólido presenta características que la hacen un tema de estudio muy interesante. Por ejemplo Ayres y col. (1952) reportaron que las pectinasas producidas por *Aspergillus foetidus* tienen diferencias bioquímicas notables cuando se producen por fermentación en estado sólido comparadas con las producidas en fermentación sumergida. Alazard y Raimbault (1981) observaron que las amilasas producidas por *Aspergillus niger* en un sistema de fermentación sólida son más termorresistentes que las producidas en cultivo líquido, usando la misma cepa y el mismo sustrato. Barrios-González y col. (1988) encontraron que la producción de penicilina es mayor en fermentación sólida que en el proceso sumergido. Solís-Pereira y col. (1993) señalaron que los patrones de inducción-represión o de activación-inhibición de la síntesis de pectinesterasas por *Aspergillus niger* CH₄ son muy diferentes para cada tipo de fermentación. Córdova (1994) mostró que *Aspergillus niger* No 10 consume más rápido la

glucosa y la sacarosa cuando se cultiva en medio sólido que cuando se cultiva en medio líquido. Robinson y Nigam (2003) concluyeron que el cultivo en medio sólido puede ser una tecnología viable para transformar un residuo de desecho, sin valor nutricional para animales, en un producto con una mayor concentración de proteína que podría ser utilizado para alimento de ganado. Viniegra y col. (2003) presentaron un estudio en donde tratan de explicar la razón de una mayor productividad enzimática en cultivo sólido comparada con la productividad de la misma en cultivo sumergido. Ellos propusieron que en cultivo sólido se alcanzan mayores productividades enzimáticas debido a que se tienen mayores rendimientos enzimáticos y menores niveles de proteólisis, procesos que pueden estar asociados o no a una mayor productividad de biomasa. Una mayor productividad enzimática también la asociaron a una aparente resistencia a la represión catabólica, en caso de enzimas inducibles. Una menor proteólisis, en cultivo sólido, la asociaron a cultivos en mejor condición fisiológica. Y basados en el balance de masa de un sistema de reacción heterogéneo (propuesto por Pirt, 1975) concluyeron que en cultivo sólido se tiene una oxigenación más rápida y un suministro de azúcar más lento que en un cultivo sumergido.

1.5 Características de *Aspergillus niger*

1.5.1 Generalidades de hongos

La palabra hongo viene del verbo latino fungus, florecer. Este término designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Con excepción de las levaduras los hongos verdaderos crecen como una masa de filamentos denominada micelio. El micelio constituye la parte asimilativa del hongo, cada filamento individual del micelio constituye una hifa. Los hongos inferiores poseen hifas no septadas, en tanto que los hongos superiores (Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina) presentan septos. Estos septos están perforados por lo que existe un flujo continuo de citoplasma y migraciones nucleares a través del micelio. De

este modo, el micelio y la hifa funcionan esencialmente como un cenocito (Ulloa y Hanlin, 1978).

Los hongos poseen características intermedias entre las algas y los protozoarios y se clasifican en un reino individual. Los hongos tienen pared celular, pero son heterotróficos en su nutrición, normalmente dependen de la absorción de moléculas orgánicas pequeñas que se difunden. En la mayoría de los casos los hongos son saprófitos. Ellos producen y secretan enzimas digestivas con actividades altas y son los responsables del deterioro rápido de materiales orgánicos tales como madera, telas y pieles en ambientes húmedos o en contacto con la tierra (Norton, 1981)

1.5.2 Clasificación taxonómica de A. niger

Aspergillus niger es un hongo filamentoso de naturaleza ubicua. Pertenece a la familia Moniliacea, orden Moniliales, clase Hyphomycetes, subdivisión Deuteromycotina, división Eumycota del reino Fungi. (Laskin y Lechevalier, 1977).

1.5.3 Reproducción de A. niger

Los hongos se reproducen por procesos sexuales y asexuados. La reproducción sexual constituye el estado perfecto o teleomorfo del hongo, se caracteriza por la unión de dos núcleos que dan lugar a esporas sexuales que contienen en su interior un huevo o cigote (zigosporas, ascosporas, basidiosporas) y tiene importancia taxonómica. La reproducción asexual es el estado imperfecto o anamorfo, puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio (método tálico), o por formación de conidias a partir de una célula madre (blastoconidiasconidias, esporangiosporas, etc.). En algunas especies coexisten las dos formas de reproducción en el mismo organismo por lo que a este tipo de hongo se le denomina holomorfo (Sánchez de Mirt, 2008).

El género *Aspergillus* comprende unas doscientas especies y una gran cantidad de variedades, siendo un grupo heterogéneo de mohos que aparentemente no presentan un estado sexual, llevándose a cabo su reproducción mediante la formación de conidios o esclerotias.

1.5.4 Morfología de A. niger

Los Fungi imperfecti están divididos en clases basados en sus similitudes morfológicas. Los criterios usados son normalmente el color, la forma, la talla y el tipo de septación de los conidios (Alexopoulos y col., 1996).

La clase de los Hyphomycetes se caracteriza porque forman micelio pero carecen de esporocarpio. Las esporas nacen en conidióforos. Los Hyphomycetes pueden ser reconocidos en cultivo por la apariencia polvorulenta y algodonosa de la colonia.

Las esporas de algunas especies de *Aspergillus* son hialinas (sin color), en tanto que algunas otras, como las de *Aspergillus niger* son de color café oscuro (Ulloa y Hanlin, 1978).

A. niger es un hongo cuyo talo es filamentoso, constituido por hifas septadas ramificadas, generalmente multinucleadas. Los septos están centralmente perforados. Posee organelos tales como aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas, lomasomas, aparato de Woronin, lisosomas, vacuolas y microtúbulos, todos ellos inmersos en el citoplasma. (Laskin y Lechevalier, 1977)

1.5.5 Aplicaciones industriales de A. niger

A. niger es ampliamente conocido por su capacidad de producción de ácido cítrico. De hecho, la producción de ácido cítrico por *A. niger* se ha tomado como modelo de proceso de fermentación por hongos (Baker, 2006).

A. niger es un organismo saprófito del suelo que produce una gran variedad de enzimas hidrolíticas y oxidativas involucradas en la degradación de la lignocelulosa de plantas. Varias de esas enzimas de *A. niger* son importantes en la industria de la biotecnología. *A. niger* es también importante como organismo modelo en diferentes áreas de investigación, incluyendo el estudio de la secreción de proteínas de eucariontes, el efecto de varios factores ambientales que suprimen o aumentan la secreción de enzimas degradadoras de biomasa, en el estudio de mecanismos moleculares, críticos, en el desarrollo de procesos de fermentación y de mecanismos involucrados en el control de la morfología de hongos.

El tamaño del genoma de *A. niger* se ha estimado entre 35.5 y 38.5 Mb, dividido entre ocho cromosomas/grupos ligados que varían en tamaño desde 3.5-6.6 Mb.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar la producción de oxigenasas por *Aspergillus niger* para la degradación de hidrocarburos en fermentaciones en estado sólido y en estado líquido. Caracterizar dichas enzimas en términos de actividad, estabilidad y especificidad.

Objetivos particulares

- ❖ Caracterizar el crecimiento de *A. niger* en cultivo líquido y en cultivo sólido usando mezclas de glucosa y hexadecano como fuentes de carbono. Evaluar la producción de la enzima por la desaparición de hexadecano.
- ❖ Seleccionar el medio de cultivo más apropiado, para producir la enzima, en ambos sistemas de fermentación.
- ❖ Evaluar la dependencia de cofactor
- ❖ Evaluar la inductividad de la enzima
- ❖ Evaluar la estabilidad de la(s) oxigenasa(s) producidas en ambos sistemas de fermentación
- ❖ Evaluar la especificidad de la(s) oxigenasa(s) producidas en ambos sistemas de fermentación
- ❖ Identificar bandas de proteína con actividad oxigenasa

Hipótesis

- ❖ Los sistemas enzimáticos de degradación de hidrocarburos, producidos por hongos, en fermentación en estado sólido serán mejores que los producidos en fermentación sumergida, en términos de actividad, especificidad y estabilidad.
- ❖ La adición de glucosa, además de la presencia de hidrocarburo, al medio de cultivo, permitirá tener una mayor cantidad de biomasa con actividad oxigenasa, que cuando se usa solamente el hidrocarburo.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen el microorganismo y los reactivos químicos utilizados. También se describen los experimentos realizados y las metodologías seguidas para la obtención de los resultados de este trabajo.

3.1 Reactivos Químicos

Los reactivos químicos se agruparon de acuerdo al experimento en el cual se usaron. Todos los reactivos utilizados fueron grado reactivo analítico, a menos que se reporten otras especificaciones.

3.1.1 Reactivos para la propagación de la cepa

Agar papa dextrosa y extracto de levadura (Bioxon)

3.1.2 Reactivos para fermentaciones en estado sólido y en estado líquido

Dextrosa (Baker), hexadecano y decano (Sigma, S. A. México, D. F.), medio mineral preparado con reactivos de Baker (tabla 3.1)

3.1.3 Reactivos para preparación de extractos enzimáticos crudos

Coctel inhibidor de proteasas para levaduras y hongos (Sigma P-8215), ditiotreitól (Sigma), nitrógeno líquido

3.1.4 Reactivos para procedimientos analíticos

3.1.4.1 Reactivos para determinación de glucosa

Soluciones estándar de dextrosa: 1.8 g/l (YSI-2776), 5 g/l (YSI-2356), 25 g/l (YSI-2777), solución amortiguadora para glucosa (YSI-2357): 40 g/l NaH_2PO_4 , 10 g/l Na_2HPO_4 en agua desionizada, solución de cloruro de sodio para instalación de membrana (YSI-2392), membranas de glucosa (YSI-2365)

3.1.4.2 Reactivos para determinación de hexadecano

Hexadecano, decano, tetracloruro de carbono, hexano (Sigma, S. A. México, D. F.)

3.1.4.3 Reactivos para determinación de actividad oxigenasa

Sal disódica de dinucleótido de β -nicotinamida adenina (NADH), producto de Sigma (N8129), pureza aprox. 98%. Dihidrocloreuro de o-dianisidina (3,3-dimetoxibencidina), tris-buffer, peróxido de hidrógeno, peroxidasa

3.1.4.4 Reactivos para determinación de proteína

Reactivo de coloración concentrado, Bio-Rad 500-0006. Albúmina sérica de bovino, Bio-Rad

3.1.4.5 Reactivos para caracterización de oxigenasa(s)

Sacarosa, pentano, hexano, heptano, decano, hexadecano, eicosano, benceno, tolueno, naftaleno, fenantreno, pireno, 2, 6, 10, 14 tetrametil-pentadecano para la especificidad de la enzima

3.1.5 Reactivos para determinación de pureza y de proteínas con actividad oxigenasa

Productos de Bio Rad: Acrilamida 99.9 % (1610101), BIS(N, N'-metileno-bis-acrilamida) (1610201), Persulfato de amonio (160700), TEMED (1610800), Azul brillante de Coomasie R-250 (1610400); Tris-HCl (Sigma-Aldrich, 1185-53-1), Metanol, Ácido acético glacial (grado USP, Sigma-Aldrich, A9967).

3.2 Microorganismo

Todos los experimentos del presente trabajo se realizaron con *Aspergillus niger* (ATCC 9642). Para obtener inóculos bajo las mismas condiciones a lo largo de todo el estudio y disminuir variaciones en los cultivos, se propagó la cepa y se recolectaron las esporas.

3.3 Propagación de *A. niger* (ATCC 9642)

Para la propagación de *A. niger* se adicionó una perla porosa impregnada de esporas del microorganismo a 50 ml de agar papa dextrosa (PDA), contenidos en un matraz

Erlenmeyer de 250 ml y a una temperatura aprox. de 37 °C. El matraz se agitó suavemente y se dejó en incubación a 30 °C hasta que el microorganismo esporuló (5-7 días). Posteriormente, se agregaron al matraz, 20 ml de solución Tween 80 (0.1% v/v) estéril y una barra magnética. Se suspendieron las esporas en la solución de Tween por agitación de la barra magnética. Se colocó la suspensión de esporas en un tubo estéril de centrifuga y se centrifugó a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se agregó a viales con perlas porosas (protect-cryoblocks, Technical Service Consultants, Heywood, UK). Se almacenaron los viales a -20 °C.

3.4 Preparación de inóculos

Las suspensiones de esporas, que se utilizaron para inocular el medio de cultivo, de las fermentaciones en medio líquido y en medio sólido, se preparaban agregando una perla impregnada de esporas a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de PDA estéril y a 37°C (aprox.). El matraz se agitaba suavemente y se incubaba de 5-7 días a 30 °C. Una vez esporulado el microorganismo, se agregaban al matraz de PDA esporulado, 25 ml de solución Tween 80 (0.1% v/v) estéril y con un agitador magnético. Las esporas eran resuspendidas en la solución de Tween por agitación de la barra magnética. La suspensión de esporas así preparada se vaciaba a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y de ahí se tomaba una muestra para la cuenta de esporas.

3.5 Cuenta de esporas

Para realizar la cuenta de esporas, se usaba una cámara de Neubauer. Se colocaba 1.0 ml de la suspensión de esporas, descrita anteriormente, en un tubo de ensaye de 16x150 mm y se diluía (1:10v/v) con agua destilada. La mezcla se homogeneizaba con un vortex. Con una pipeta Pasteur se tomaba una muestra de la suspensión diluida de esporas y con ella se llenaba la cámara de Neubauer. La cuenta de esporas se hacía con un microscopio óptico, usando el objetivo 40X. Con esta técnica se obtenían cuentas promedio de 19 esporas por cuadro y una concentración de esporas en la suspensión de 4.8×10^7 esporas ml⁻¹.

3.6 Medios de cultivo

Con el objetivo de comparar la producción de oxigenasas, de *A. niger* en FEL y en FES, relacionando la producción de oxigenasas con el consumo de hexadecano, se partió de un medio de cultivo mineral en el que, de acuerdo a la literatura, se sabe que *A. niger* tiene un buen crecimiento. Este medio es el ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura (<http://www.atcc.org/Attachments/4119.pdf>), descrito en la Tabla 3.1. El medio está diseñado para usarse con 30 g de glucosa como fuente de carbono. Lo que proporciona 12 g L^{-1} de carbono y una relación C:N de 12.12.

Tabla 3.1 Composición mineral del medio de cultivo ATCC 687 Pontecorvo para *Aspergillus* usado para estudiar la producción de oxigenasas de *A. niger* en FEL y en FES.

COMPUESTO	CANTIDAD	*Solución de oligoelementos	
		Compuesto	Cantidad
NaNO ₃	6 g	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	100 mg
KH ₂ PO ₄	1.52 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mg
KCl	0.52 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.52 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	250 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0018 g	Agua destilada	1000 ml (c.b.p)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0014 g		
Ext levadura	0.5 g		
*Solución de oligoelementos	1 ml		
Agua destilada	1000 ml (c.b.p)		

Para este estudio se diseñaron varios medios de cultivo usando como base la composición mineral del medio ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura, adicionado de diferentes relaciones de glucosa y hexadecano (Glu:Hxd) como fuentes de carbono. Las diferentes relaciones Glu:Hxd utilizadas se describen en la Tabla 3.2. Los minerales descritos en la Tabla 3.1 se ajustaron, de manera proporcional, a la concentración de carbono de cada uno de los medios utilizados en FEL y en FES.

La relación C:N se trató de mantener a la recomendada en el medio ATCC 687, en el diseño de los medios de cultivo. Para la concentración de carbono, se tomaron en consideración varios reportes, que mencionan que usando concentraciones altas (50 g L⁻¹ de sacarosa) de ciertos azúcares en FEL se produce represión catabólica (Solis-Pereira y col., 1993; Espinel-González, 1996; Diaz-Godínez y col., 2001).

Tabla 3.2 Descripción de las fuentes de carbono agregadas al medio mineral ATCC 687 usadas para estudiar la producción de oxigenasas de *A. niger* en FEL y en FES

FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO								
*Medio de cultivo	Glucosa (g L ⁻¹)	Hexadecano (g L ⁻¹)	Concentración de carbono (g L ⁻¹)		%C - Glu	% C- Hxd	C:N	
<i>a</i>	0	14	12		0	100	12.12	
<i>b</i>	15	7.1	12		50	50	12.12	
<i>c</i>	30	5	16.24		74	26	16.41	
<i>d</i>	30	0	12		100	0	12.12	
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO								
*Medio de cultivo	Glu (g L ⁻¹)	Glu (g g ⁻¹ PUF)**	Hxd (g L ⁻¹)	Hxd (g g ⁻¹ PUF)**	Concentración de C (g L ⁻¹)	%C - Glu	% C- Hxd	C:N
<i>e</i>	0	0	94.16	0.344	80	0	100	12.12
<i>f</i>	50	0.155	23.5	0.073	40	50	50	12.12
<i>g</i>	100	0.311	47.08	0.147	80	50	50	12.12
<i>h</i>	100	0.321	0	0	40	100	0	12.12

*El volumen del medio de cultivo de las muestras en FEL era de 50 ml c/u. El volumen de medio de cultivo en FES era (en ml) 3.5, 3.63, 4.6 y 3.63 para las muestras *e*, *f*, *g*, y *h* respectivamente

**Las cantidades de PUF usadas fueron (en g) 0.96, 1.13, 1.13 y 1.3 para las muestras *e*, *f*, *g*, y *h* respectivamente.

3.7 Sistemas de fermentación

3.7.1 Fermentación en estado líquido

Los cultivos en estado líquido se preparaban en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales contenían 50 ml del medio mineral ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura. El pH inicial se ajustaba a 5.5 con HCl 1N. Los matraces se esterilizaban a 121 °C por 15 min. En el caso de medios de cultivo que contenían glucosa, se preparaba una solución concentrada de la misma y se esterilizaba por separado, para evitar reacciones de Maillard. Una vez que el medio de cultivo estaba frío, se agregaban hexadecano y solución de glucosa para tener la concentración deseada, de acuerdo a la tabla 3.2. La fermentación se iniciaba por inoculación, de cada matraz, con esporas de *A. niger* para tener una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} de medio de cultivo. Los matraces Erlenmeyer se incubaban a 30 °C en un agitador orbital a 200 rpm al menos por 70 h. Cada matraz constituía una muestra y cada muestra se preparaba por duplicado.

3.7.2 Fermentación en estado sólido

3.7.2.1 Soporte inerte

En este estudio se utilizó como soporte inerte para la FES espuma de poliuretano (PUF), de alta densidad, conocido comercialmente como superfirme 20-24. El poliuretano está fabricado esencialmente de polioxipropilenglicol en un 55 a 70 % y de di-isocianato de tolueno en un 25 a 35 %. El PUF es un material poroso debido a las burbujas que se forman al liberarse CO_2 de la reacción entre el poliol y el isocianato. El PUF es un material inerte que ha sido utilizado en la producción de varias enzimas (Zhu y col. 1994, Treviño y col. 2007).

El PUF se compraba en trozos de estructura cúbica irregular. Antes de ser usado, se lavaba con agua a temperatura cercana a la de ebullición, se enjuagaba con agua fría y se exprimía. Se colocaba en charolas y se secaba a temperatura ambiente. Posteriormente, el PUF se molía en un molino de cuchillas (Brabender OHG 880804) y se tamizaba. El tamaño de partícula utilizado fue menor a 0.4 mm.

La humedad de las muestras se determinó gravimétricamente en una termobalanza (Ohaus modelo 6010).

3.7.2.2 Condiciones de Fermentación

Las fermentaciones en estado sólido se llevaron a cabo en botellas serológicas de 125 ml que contenían 1.3 g de PUF pulverizado y estéril. A cada una de las botellas serológicas se le agregaba medio de cultivo, estéril e inoculado, suficiente para tener una humedad inicial de 70 % y una concentración de esporas de 1×10^7 esporas g^{-1} de materia seca inicial. Los medios de cultivo utilizados tenían la composición mineral descrita en la Tabla 3.1 y las relaciones Glu:Hxd descritas en la Tabla 3.2. Cada botella constituía una muestra y cada muestra tenía un duplicado.

Al preparar los medios de cultivo se trataba de evitar la reacción de Maillard al esterilizar, y la pérdida de hexadecano tanto al esterilizar como al adicionar el medio de cultivo al PUF. Por lo tanto, se preparó una solución concentrada (5 %) del extracto de levadura y se esterilizó por separado. Por otra parte, se pesaban los minerales y la glucosa, se disolvían en agua destilada tomando en consideración el volumen de la solución del extracto de levadura, de hexadecano y de suspensión de esporas que se usarían en cada caso. Se ajustaba el pH a 5.5 con HCl 1N y se esterilizaban a 121 °C por 15 min. Una vez que el medio mineral estéril estaba frío, se agregaba solución de extracto de levadura suficiente para alcanzar la concentración requerida, se añadía la suspensión de esporas y se ajustaba el volumen con agua destilada estéril, para tener la concentración deseada. Si además, se iba a usar hexadecano, se restaba el volumen ocupado por el mismo. Se mezclaban todos los componentes del medio de cultivo, utilizando un agitador magnético estéril.

El medio de cultivo inoculado se agregaba a cada botella para tener la humedad deseada. Finalmente, se añadía el hexadecano requerido, sin esterilizar y se mezclaba con el PUF inoculado, mediante una varilla de vidrio estéril.

Las botellas serológicas se tapaban con un tapón de hule. A cada tapón se le encajaban dos agujas de jeringa; a través de una de ellas, cada botella se conectaba a un cromatógrafo de gases y a través de la otra, se conectaban a un burbujeador. Este tipo de conexiones

permitía, por una parte, adquirir en línea datos de consumo de oxígeno y producción de CO₂ y por otra, mantener la humedad y oxigenación deseadas durante la fermentación. Las botellas se incubaban a 30 °C, en una pecera con agua. La pecera tenía un agitador con termostato para mantener la temperatura constante.

3.7.3 Parámetros cinéticos

Las curvas de crecimiento y de consumo de substratos se ajustaron usando las ecuaciones Logística y de Pirt respectivamente, como lo sugieren Soto-Cruz y col. (2002). La ecuación Logística usada se muestra a continuación

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) e^{-\mu t}},$$

en donde X (g L⁻¹) representa la biomasa calculada, X_{max} y X₀ (g L⁻¹) son los valores de biomasa máxima e inicial, respectivamente; μ (h⁻¹) es tasa específica de crecimiento y t(h) es el tiempo del cultivo. La ecuación de Pirt integrada queda como

$$S(X) = S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}} (X - X_0) - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right)$$

en donde S₀ es la concentración inicial de glucosa o de hexadecano en el t=0.

El rendimiento de biomasa, Y_{X/S}, se calculó usando las siguientes ecuaciones:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_f},$$

$$S_0 = C_{iGlu} + C_{iHxd} ,$$

$$S_f = C_{fGlu} + C_{fHxd}$$

en donde X_{max} y X_0 (gL^{-1}) son los valores de biomasa máxima e inicial, respectivamente. C_{iGlu} y C_{iHxd} (gL^{-1}) son los valores de concentración de glucosa y de hexadecano, respectivamente y C_{fGlu} y C_{fHxd} (gL^{-1}) son los valores de concentración final de carbono, proveniente de glucosa y de hexadecano, respectivamente.

La tasa específica de consumo de sustrato, q_s , se define como:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{\frac{X}{S}}}$$

En donde q_s está dado en gramos de carbono, proveniente de sustratos consumidos por gramo de biomasa por hora.

La fase lag se calculó de la gráfica de CO_2 contra tiempo. Se extrapola una línea recta desde la pendiente correspondiente a la máxima velocidad de producción de CO_2 (dCO_2/dt) al valor de CO_2 inicial y el tiempo que corresponde a la intersección se consideró como la fase lag.

3.8 Producción de oxigenasas

Con la finalidad de estudiar las características de las oxigenasas producidas, en FEL y en FES, se preparó biomasa de *A. niger* con actividad oxigenasa. Con tal propósito, se seleccionaron los medios de cultivo, en los que se observaron un mayor consumo de hexadecano así como una buena producción de biomasa. Los medios de cultivo seleccionados fueron el *c* y el *f* (Tabla 3.2) para FEL y FES respectivamente.

Se realizaron fermentaciones utilizando los medios de cultivo *c* y *f* y las condiciones descritas para cada sistema de fermentación. Este micelio se usó para estudiar la actividad oxigenasa tanto en células completas como en extractos enzimáticos libres de células.

También se realizaron fermentaciones con glucosa como única fuente de carbono, para analizar si las oxigenasas producidas por *A. niger* son constitutivas o inducidas. Y comparar cómo cambia la velocidad de consumo de sustrato cuando se usan sustratos solos (glucosa o hexadecano) que cuando se usa una mezcla de ellos. La composición de estos medios se describe en la Tabla 3.2 (medios *d* y *h*)

3.9 Preparación de extractos enzimáticos libres de células

Los extractos de biomasa obtenida por FES se prepararon como se describe a continuación. Una vez que se detuvo la fermentación (35 h), se tomaron aproximadamente 10 g de PUF con biomasa de *A. niger* (PUF-BioM) y se lavó con 500 ml de agua destilada fría (5 °C), usando un embudo Buchner con papel filtro, Whatman 41. Posteriormente el PUF-BioM se suspendió por 10 min a 5 °C, en 200 ml de solución amortiguadora de 50 mM Tris-tris HCl, pH 7.5 que contenía 0.1 μmol de ditiotreitól ml^{-1} de solución y 20 μl de coctel inhibidor de proteasas. La suspensión se filtró y el PUF-BioM, retenido en el papel filtro, se colocó en un mortero y se congeló usando nitrógeno líquido. La mezcla de PUF con biomasa se molió usando un molino de café (Brown, 2.5 oz). El PUF-BioM molido se envolvió en un trozo de manta de cielo, se descongeló (aprox. 4 °C) y se exprimió, usando una prensa hidráulica (ERCO modelo PH-51) a 2000 psi, alrededor de 130 kg cm^{-2} . La suspensión obtenida se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, a 4 °C. El sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45 μm . El filtrado se guardó en viales (1.5 ml) a -20 °C hasta realizar los análisis enzimáticos.

Los extractos crudos de FEL se prepararon de manera similar a los de FES. La diferencia fue que la biomasa (BioM) obtenida por FEL no estaba ligada al PUF. La fermentación se detuvo a las 45 h y una vez que la BioM se lavó y suspendió en la solución amortiguadora, se filtró, se congeló y se molió con el mortero. Se suspendió nuevamente en solución amortiguadora y se filtró usando membranas de 45 μm . Y se guardó bajo las mismas condiciones que el extracto crudo de FES.

3.10 Procedimientos analíticos

En las figs. 3.1 y 3.2 se presentan diagramas de flujo del tratamiento y de los análisis que se les realizaron a las muestras obtenidas de FEL y de FES respectivamente. Y a continuación se describen las técnicas de análisis usadas tanto para dichas muestras como para las muestras de extractos enzimáticos.

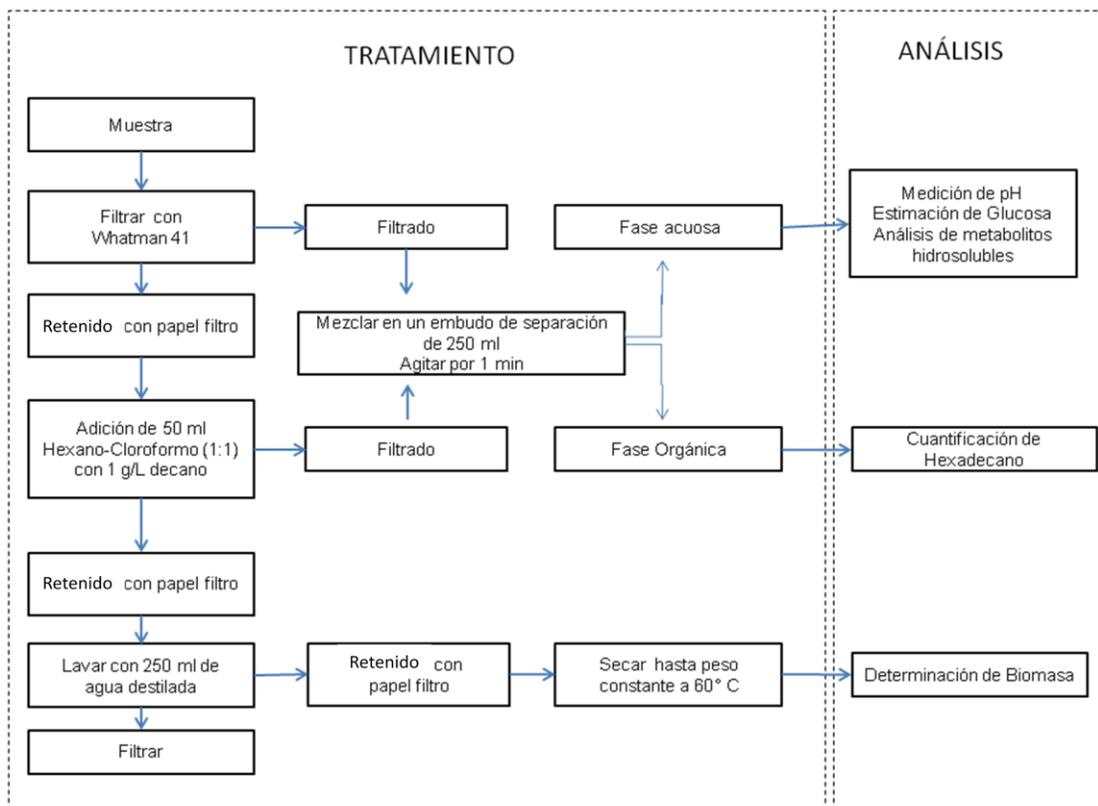


Figura 3.1 Diagrama de los tratamientos que se les hicieron a las muestras obtenidas de fermentación en estado líquido, para la elaboración de análisis microbiológicos y fisicoquímicos de las mismas.

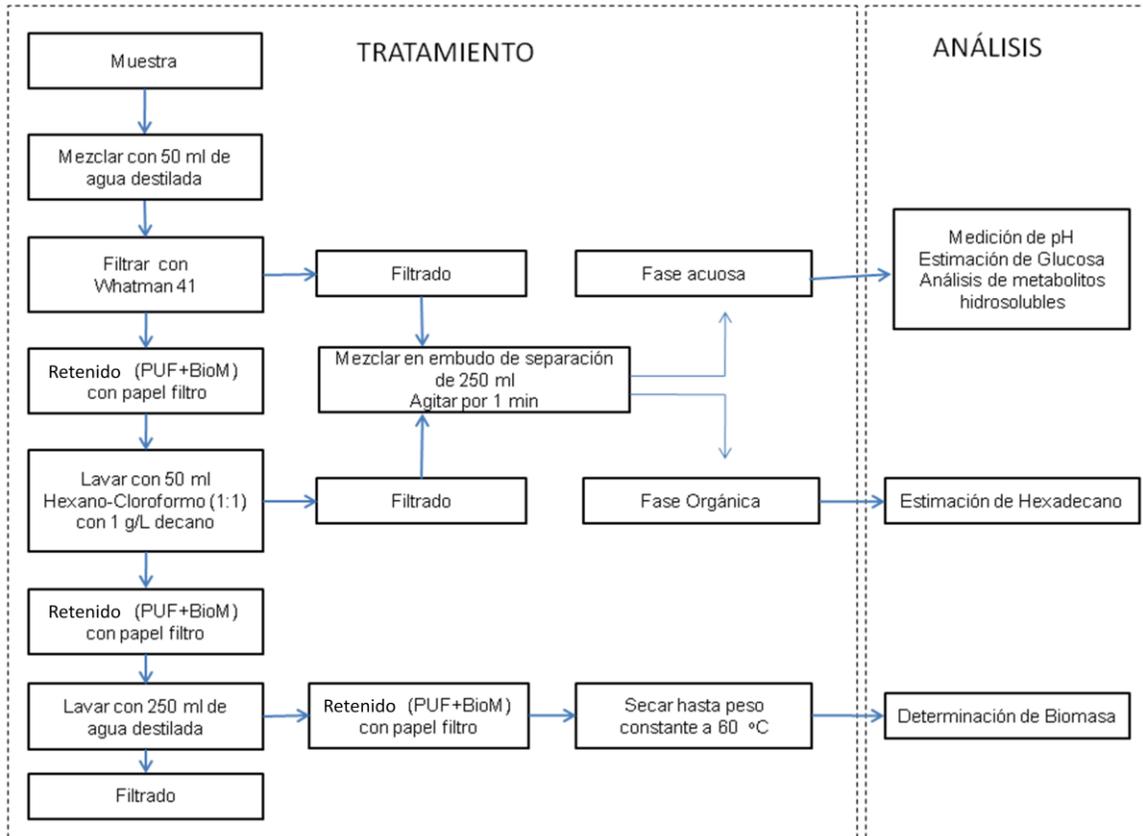


Figura 3.2 Diagrama de los tratamientos realizados a las muestras obtenidas de fermentaciones en estado sólido, para la elaboración de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos de las mismas

3.10.1 Análisis de glucosa

La glucosa se cuantificó por el método enzimático colorimétrico GOD-POD, Spinreact® basado en el método de Trinder (1969) o usando un analizador enzimático (YSI modelo 2700). El método colorimétrico se basa en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, catalizada por glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno, producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Este procedimiento se llevaba a cabo en tubos de ensaye en los cuales se colocaban 20 μl de muestra o estándar y 2 ml de reactivo (mezcla de enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa). Éstos se incubaban durante 20 min a temperatura ambiente (15- 25 $^{\circ}\text{C}$). Las absorbancias de la muestra y del estándar se leían frente al blanco de reactivo. Se preparó una curva patrón para detectar el intervalo, de concentración de glucosa, en el cual la respuesta de la prueba es lineal. Para estos análisis se usó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, el cual se ajustaba a cero con agua destilada. El estándar utilizado era de 1 mg ml^{-1} . La linealidad de este método se conserva hasta 5 mg ml^{-1} ; por lo que si la muestra analizada tenía una concentración mayor, ésta se diluía con agua destilada.

El analizador enzimático (YSI modelo 2700) se basa también en la reacción catalizada por la GOD. En este equipo cuando la muestra se inyecta en la cámara de muestra, la dextrosa se difunde en una membrana que contiene GOD. La dextrosa se oxida inmediatamente transformándose en peróxido de hidrógeno y en D-glucono- δ -lactona. El peróxido de hidrógeno se detecta amperométricamente en la superficie de un electrodo de platino. El flujo de corriente en el electrodo es directamente proporcional a la concentración del peróxido de hidrógeno y por lo tanto a la concentración de dextrosa.

Los pasos a seguir en esta técnica son los siguientes: se calibra el instrumento 2700 SELECT con una solución estándar de 2.5 g L^{-1} de dextrosa. Se comprueba la linealidad de la membrana inyectando una solución de dextrosa de 9.00 g L^{-1} ó de 25.0g L^{-1} . Una vez calibrado el equipo, se aspira la muestra en el equipo y se reporta la lectura.

3.10.2 Análisis de hexadecano

El hexadecano se cuantificó por cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Perkin Elmer autosystem XL, con un detector de ionización de flama. Las condiciones usadas fueron las siguientes: la columna PE1 de 30 m de longitud y un diámetro interno de 0.32 mm; He con un flujo de 15 ml min⁻¹, como gas acarreador; la temperatura del detector y del inyector se mantuvieron constantes a 300 y 250 °C respectivamente; la temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 100 °C por 2 min, se incrementó a 20 °C por min hasta alcanzar una temperatura de 250 °C y se mantuvo ésta por 5 min. Se inyectaron muestras de 1 µl con split y se utilizó decano como estándar interno. Se preparó una curva patrón con cantidades conocidas de hexadecano, con 1 g L⁻¹ de decano (Anexo A.1).

3.10.3 Determinación de biomasa

La biomasa se determinó por peso seco tanto para muestras de FEL como para las de FES (Figs. 3.10.1 y 3.10.2 respectivamente). A los valores de peso seco, obtenidos para las muestras de FEL, se les restó el peso del papel filtro. Para las muestras obtenidas por FES se restó el peso del papel filtro y el del PUF.

3.10.4 Evaluación de metabolitos hidrosolubles

La evaluación de estos metabolitos se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El equipo utilizado fue un cromatógrafo Perkin Elmer mod-250, con una precolumna (Rezex, Phenomenex) y una columna (Rezex ROA-organic acid, Phenomenex). La temperatura de análisis fue 60 °C, se usó ácido sulfúrico 0.005 N como fase móvil a un flujo de 0.6 ml min⁻¹. Se usó un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-30-RI) a 40 °C.

Para la cuantificación se usaron fases acuosas obtenidas durante el tratamiento de las muestras de FES (ver Fig. 3.10.2). La fase acuosa se centrifugaba a 5000 r.p.m. durante 5 min, el sobrenadante se guardaba en frascos de 10 ml a -4°C hasta el tiempo del análisis. Antes de iniciar el análisis se filtraban entre 2 a 3 ml del sobrenadante con membranas de 0.45 µm. Se inyectaban 20 µl en el HPLC. Para conocer la concentración de los

metabolitos, se usaron estándares de concentración conocida para obtener una curva estándar e interpolar la concentración de las muestras problema. Los tiempos típicos de retención se muestran en la Tabla 3.3. En el anexo A.2 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos de las muestras analizadas, así como las curvas de calibración.

Tabla 3.3 Tiempos típicos de retención de estándares para análisis de metabolitos hidrosolubles.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Ácido cítrico	8.86
Glucosa	9.70
Fructuosa	10.77
Ácido láctico	13.63
Ácido acético	16.23

3.10.5 Evolución de la concentración de O₂ y de CO₂

La cuantificación del CO₂ y del O₂ se realizó en línea, a partir de las botellas serológicas, que estaban conectadas a un cromatógrafo de gases (Gow Mac 580) con un detector de conductividad térmica. Se usó una columna CTR1 (Alltech) con un flujo de 40 ml/min con He como gas acarreador. La corriente del detector se fijó en 150 mA; la temperatura del detector y del inyector se mantuvo a 80 °C y la de la columna a 50 °C. Se utilizó un sistema de integración y adquisición de datos Multivia Chroma V.30.

3.10.6 Determinación de actividad oxigenasa

La actividad oxigenasa se cuantificó utilizando tres métodos diferentes. En uno de ellos se usaron células en reposo de *A. niger* y en los otros dos, extractos enzimáticos libres de células. Se usaron estos métodos, debido a que se tenía interferencia del PUF o de algunos substratos por oximetría.

3.10.6.1 Actividad oxigenasa con células en reposo

La actividad oxigenasa, de células en reposo, se midió a través del consumo de oxígeno disuelto. Se comparó el consumo de oxígeno por células de *A. niger* bajo diferentes condiciones: en presencia y ausencia de inhibidores de respiración. Y en presencia y ausencia de hidrocarburos. Con este estudio se pretendía inhibir la respiración endógena y conocer el consumo de oxígeno por la presencia de oxigenasa(s).

El consumo de oxígeno se midió con un monitor de oxígeno (YSI, modelo 5739) que tenía integrado un electrodo tipo Clark y un agitador magnético. Este equipo tenía además un controlador de temperatura que compensaba los cambios de temperatura en la muestra.

Para estos experimentos se utilizó micelio de *A. niger* obtenido por FEL y por FES, con los medios de cultivo *c* y *f*, Tabla 3.2. La biomasa fue cosechada a las 48, 72 y 120 h. En el caso de biomasa obtenida por FES, ésta se encontraba adherida al PUF.

La biomasa se lavaba con agua destilada, se filtraba y se colocaba en frascos de 60 ml con boca esmerilada. Éstos se llenaban completamente con solución amortiguadora de fosfato de potasio (0.04 M, pH 7.25), saturada de oxígeno. La solución amortiguadora contenía además, en algunos casos, 0.1 M de azida de sodio, ó 0.1 M de cianuro de sodio. Las botellas se ponían en baño de agua a temperatura controlada (30 °C). La reacción comenzaba al adicionar el sustrato, 0.5 ml de decano. Por lo tanto, el frasco se sellaba con el electrodo, inmediatamente después de agregado el sustrato. Se accionaba el agitador y se tomaban las lecturas de concentración de oxígeno (mg L^{-1}), cada 30 segundos por 20-30 min. Una vez pasado este tiempo, la biomasa utilizada se filtraba con membrana Millipore de 0.45 μm , previamente tarada. La biomasa con la membrana se ponían a secar a 70 °C, hasta peso constante, con la finalidad de calcular la biomasa usada y cuantificar la actividad en términos de actividad específica. Para medir la respiración endógena se seguía el mismo procedimiento pero no se agregaba el sustrato. En el Anexo A.3 se muestran los cálculos.

3.10.6.2 Actividad oxigenasa de extractos enzimáticos

Para determinar la actividad oxigenasa de extractos enzimáticos se usaron dos metodologías. La primera de ellas es por oximetría y la otra es una modificación del método descrito por Zazueta-Sandoval y col. (2003). Este último, es un método espectrofotométrico que se basa en la propiedad de las oxigenasas de usar oxígeno molecular, para oxidar moléculas de hidrocarburo por medio de un sistema de transporte de electrones. De manera similar, la enzima es capaz de oxidar o-dianisidina, produciendo una solución café. El grado de oxidación de la o-dianisidina se compara por el producido con peroxidasa usando peróxido de hidrógeno como sustrato, en presencia de o-dianisidina.

La cuantificación por oximetría se llevó a cabo utilizando un monitor de oxígeno (YSI 5300, YSI Inc., Yellow Springs, OH, U.S.A) acoplado a un microelectrodo polarográfico de oxígeno, con un tiempo de respuesta de 10 segundos para registrar el 90 % del cambio de cero a saturación de oxígeno con aire, inmerso en una cámara de muestra con agitación magnética. La mezcla de reacción consistía de 1.3 ml de amortiguador 50 mM Tris, pH 7.5, con 0.4 mM ml^{-1} de NADH y 0.3 ml de extracto enzimático crudo. El consumo de oxígeno disuelto se midió después de la adición de 3 μl de sustrato (hexadecano) a temperatura constante (30 °C). Se registraron lecturas cada segundo por un periodo de 5 min. El mismo procedimiento se llevó a cabo, sustituyendo el extracto enzimático por solución amortiguadora, para obtener la tasa de oxidación en ausencia de la enzima. El consumo de O_2 , debido a la reacción enzimática, se calculó restando la tasa de oxidación en ausencia de la enzima a la tasa de oxidación específica (en presencia de enzima). Los cálculos detallados se presentan en el Anexo A.4.

Para la cuantificación de la actividad oxigenasa, usando el método espectrofotométrico, en una celda de cuarzo de 1.5 ml se añadió 1 ml de mezcla de reacción. Ésta consistía de 300 μl de reactivo de dicloruro de o-dianisidina, 480 μl de solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 con 0.4 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de NADH, 20 μl de sustrato y 200 μl de extracto enzimático crudo. El reactivo de o-dianisidina se preparaba con 20 mg de 3,3-

dimetoxibenzidina disueltos en 3 ml de 0.25 M ácido clorhídrico que se agregaban con agitación a 50 ml de solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl pH 8.5. Y se aforaba a 100 ml con la misma solución amortiguadora. Se preparaba una blanco reemplazando 200 μ l de extracto enzimático crudo por 200 μ l de solución amortiguadora. Se preparaba también una muestra de referencia usando 200 μ l de extracto crudo enzimático inactivo (se calentaba el extracto enzimático crudo por 10 min en agua hirviendo).

El análisis se realizaba a 30 °C usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) equipado con un portacelda enchaquetado y con un sistema de recirculación de agua que permitía mantener constante la temperatura durante el tiempo de reacción. La absorbancia a 460 nm, se ajustaba a cero usando agua destilada. Posteriormente, las absorbancias de la muestra y del estándar se leían frente al blanco de reactivo, después de la adición del substrato, cada 15 s durante 5 min. Para cada experimento se realizó una gráfica de absorbancia contra tiempo, se ajustaron los datos a una línea recta y se calculó la pendiente de cada una de ellas. Para calcular la actividad enzimática se restó la pendiente del estándar de la pendiente de la muestra y el valor resultante se interpoló en una curva de calibración de actividad peroxidasa. La curva de calibración se preparó con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno como substrato de la peroxidasa, en presencia de o-dianisidina. Los datos de esta curva así como un ejemplo de los cálculos se presentan en los anexos A.5 y A.6.

3.10.7 Determinación de proteína

El contenido de proteína se determinó usando la técnica de Bio-Rad, basada en el método de Bradford. Se utilizó albúmina sérica de bovino como estándar con la cual se realizó una curva patrón (ver Anexo A.7). El procedimiento empleado fue el microensayo que se describe a continuación: pipetear 800 μ l de muestra en un tubo de ensayo de vidrio. Agregar 200 μ l del reactivo de coloración diluido (1:4 con H₂O destilada y desionizada). Mezclar con vortex. Incubar a temperatura ambiente 5-60 min. Preparar un blanco

sustituyendo la muestra por agua destilada. Medir la absorbancia de la muestra contra el blanco a 595 nm.

3.11 Caracterización de la(s) oxigenasa(s)

3.11.1 Estudio de estabilidad

Se estudió como afecta, a la actividad oxigenasa, concentrar los extractos libres de células obtenidos de FEL y de FES. También, se observó el efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad oxigenasa.

Se prepararon extractos crudos, de biomasa obtenida por FES y por FEL, mediante los procedimientos descritos en el apartado 3.9. Se midió la actividad oxigenasa, por oximetría, de ambos extractos recién preparados. Una muestra (6 ml) de cada uno de los extractos frescos se almacenó a -20 °C. Por otra parte, se introdujeron 20 ml de cada uno de los extractos, por separado, en membranas de diálisis de 12,000 Da (membrana de tubo de Millipore). Se sellaron las membranas por ambos lados con pinzas y se colocaron en una charola, sobre una capa de sacarosa. Las membranas con los extractos se cubrieron con sacarosa y se guardaron en refrigeración, hasta tener la mitad del volumen inicial. Cuando la sacarosa estaba muy húmeda, se cambiaba por sacarosa seca. Una vez concentrados los extractos se vaciaron en viales de 1.5 ml y se almacenaron a -20 °C.

La actividad oxigenasa se cuantificó en los extractos recién concentrados y en todas las muestras, durante el tiempo de almacenamiento (0-84 días). Para todos los casos la actividad se cuantificó por oximetría.

3.11.2 Estudio de especificidad

Se analizó la especificidad de la(s) oxigenasa(s) de ambos extractos crudos. Para este estudio, la actividad se midió por el método espectrofotométrico (Zazueta-Sandoval y col. 2003). Los hidrocarburos usados como substratos se eligieron con diferentes características de la cadena hidrocarbonada. Hidrocarburos de cadena corta y lineal (pentano, hexano y heptano), hidrocarburos de cadena media y lineal (decano y hexadecano), hidrocarburos de cadena larga y lineal (eicosano), hidrocarburos de cadena ramificada (2,6,10,14 tetrametil-

pentadecano), e hidrocarburos aromáticos (benceno, antraceno, fenantreno, pireno y tolueno).

3.11.3 Efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa

El efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa se analizó usando el método espectrofotométrico, con extracto de FES. Las temperaturas de reacción estudiadas fueron 12, 26, 30 y 35 °C. El substrato usado fue decano.

3.12 Análisis de pureza del extracto e identificación de bandas con actividad oxigenasa

El grado de purificación e identificación de proteínas, con actividad oxigenasa, se monitoreó a través de electroforesis, con geles nativos de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis se realizó de acuerdo a lo reportado por Laemmli (1970). Se prepararon geles de resolución de 6% y geles concentradores de 4%. El equipo utilizado fue un Mini Protean II Electrophoresis Cells (Bio-Rad Laboratories). La cantidad de proteína montada en cada pozo variaba entre 35 y 63.5 µg. Se usaron muestras de FES y de FEL, así como un estándar de pesos moleculares, colorido. La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA y 4 °C. Una vez terminada la electroforesis se cortaron los geles en tiras. Algunas de estas tiras, se usaron para determinar aproximadamente el peso molecular de las bandas con actividad oxigenasa, así como la pureza de dichas proteínas. Estas tiras de gel se tiñeron con azul brillante de Coomasie R-250. Otras de las tiras se revelaron como zimogramas.

3.12.1 Zimogramas

Las bandas de proteína, con actividad oxigenasa, se revelaron al sumergir las tiras de gel en una mezcla de reacción, compuesta por: 10 ml de reactivo de o-dianisidina, 9 ml de amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.5 y 1 ml de substrato e incubando el gel a temperatura ambiente con agitación hasta que las bandas aparecen. Los substratos utilizados fueron decano, hexadecano y benceno.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN A Dinámica de *A. niger* en FEL y FES

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN A.

4. Dinámica de *A. niger* en FEL y FES

En este capítulo se presentan los resultados experimentales de las cinéticas de degradación de hexadecano, en presencia y ausencia de glucosa, en fermentación en estado líquido y en fermentación en estado sólido. Así como el análisis de algunos de los metabolitos que se forman en FES y en FEL y un análisis del destino del carbono de los substratos por medio de balances de óxido-reducción.

4.1 Fermentación en estado líquido

Como se mencionó anteriormente, en la sección 3.6 de métodos y materiales, se probaron varias relaciones Glu:Hxd para encontrar las condiciones que nos permitieran tener una mejor degradación de hexadecano y por lo tanto presencia de oxigenasa, con una producción de biomasa alta de donde se pudiera extraer la oxigenasa activa en cantidad suficiente para los estudios de caracterización de la enzima. A continuación se discuten los resultados obtenidos con cada uno de los medios estudiados en FEL. Primero se hace una descripción de los resultados obtenidos con cada medio y posteriormente se hace una comparación entre ellos. En las Tablas 3.1 y 3.2 se presentan las composiciones detalladas de cada uno de los medios usados en FEL.

En la Figura 4.1 se presenta la cinética de degradación de hexadecano en FEL, usando el medio de cultivo *a* (14 g L⁻¹ hexadecano). En ella se puede apreciar que el consumo de hexadecano fue muy bajo (17.9±14.6%) durante el tiempo del cultivo (71 h). Por lo que se produjo una baja concentración de biomasa (0.63 ± 0.17 g L⁻¹).

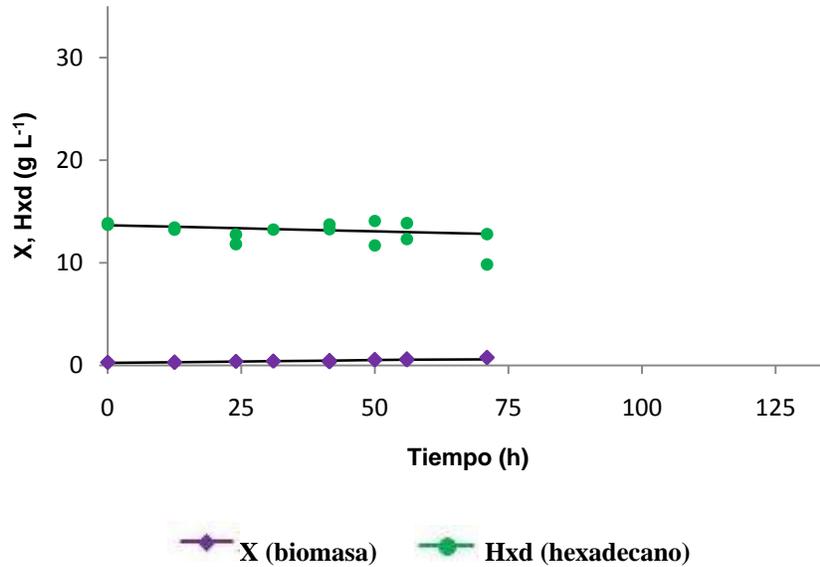


Figura 4.1 Cinética de crecimiento y de consumo de sustratos en cultivo líquido de *A. niger* con el medio de cultivo a: medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 14 g L⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 12 g L⁻¹. C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

Para este tipo de cultivo se tuvo un rendimiento de biomasa muy pequeño respecto al sustrato ($Y_{SX} = 0.40 \pm 0.24$ g X g⁻¹ C-sustrato consumido o $Y_{SX} = 0.2$ g X g⁻¹ Hxd consumido). Volke-Sepúlveda y col. (2003) reportaron para *A. niger* en cultivo líquido con 20 (g L⁻¹) de hexadecano, rendimientos de biomasa con respecto al oxígeno (Y_{OX}) y de oxígeno con respecto al hexadecano consumido (Y_{HxdO}) de 0.29 (mg X mg⁻¹ O₂) y de 3.34 (mmol O₂ mmol⁻¹ Hxd) respectivamente. Con estos datos se calculó un rendimiento de biomasa con respecto al sustrato (Y_{SX}) de 0.14 (mg X mg⁻¹ Hxd). Por su parte García-Peña y col. (2008) reportaron para *Paecilomyces variotii* un $Y_{SX} = 0.2$ (mgX mg⁻¹ benceno). Los rendimientos encontrados en los tres casos, para el consumo de un

hidrocarburo como única fuente de carbono son muy similares. Prenafeta-Boldú y col. (2002) atribuyen la baja degradación de benceno por *Cladophialophora sp* a la acumulación de subproductos de oxidación terminales. Para el caso del consumo de hexadecano no se piensa que se trate de acumulación de subproductos sino más bien a la baja disponibilidad del Hxd, ya que a esa concentración la mayor parte de éste es insoluble.

La velocidad específica de crecimiento (μ) para el medio *a* fue de 0.009 h^{-1} . Bouchez-Nañtali y col. (2001) reportaron valores de μ que van de 0.11 a 0.20 h^{-1} para varias especies de *Rhodococcus equi*, cultivadas con hexadecano (1000 mg L^{-1}). Estos valores de μ están evaluados durante la fase de crecimiento exponencial. Pero no se especifica cuánto tiempo dura esta fase y aunque se menciona que posteriormente se tiene una fase de crecimiento lineal, no se dan valores de μ para dicha fase, la cual se menciona que es muy prolongada. Noordman y col. (2002) reportaron un valor de μ de 0.02 h^{-1} para *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en líquido con hexadecano (0.1 a 2.0 g L^{-1}).

Volke y col. (2003) reportaron para *A. niger* en FEL con 20 g L^{-1} de hexadecano una tasa de producción de biomasa de $0.01 \pm 0 \text{ mg ml}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Esta tasa aumentó a $0.05 \pm 0.02 \text{ mg ml}^{-1} \text{ día}^{-1}$ cuando se tenía una concentración inicial de 60 g L^{-1} de hexadecano y disminuyó a $0.02 \pm 0 \text{ mg ml}^{-1} \text{ día}^{-1}$ cuando la concentración inicial de hexadecano era de 80 g L^{-1} . En el presente trabajo para una concentración inicial de 14 g L^{-1} de hexadecano la tasa de producción de biomasa fue de $0.01 \pm 0 \text{ mg ml}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

En la Figura 4.2 se muestra el consumo de substratos y el desarrollo de *A. niger* en FEL utilizando el medio de cultivo *b* (15 g L^{-1} glucosa, 7.1 g L^{-1} hexadecano). En esta figura podemos observar que la glucosa se consumió totalmente, no así el hexadecano, que permaneció constante hasta cerca de 80 h de fermentación. La máxima formación de biomasa fue de 6.15 g L^{-1} a las 31 h . Con un rendimiento $Y_{SX} = 0.76 \pm 0.06 \text{ (g X g}^{-1} \text{ C-substrato)}$. Los resultados aquí presentados muestran que la formación de biomasa se debió totalmente al consumo de glucosa. La concentración de biomasa alcanzó su valor máximo e

inmediatamente después decreció. En el medio de cultivo *a* se obtuvo una tasa específica de crecimiento (μ) de 0.009 h^{-1} y ésta se incrementó 25.5 veces en el medio *b*. Así mismo la tasa de consumo de sustrato (q_s) se incrementó 4.1 veces para el medio *b*. Sin embargo, la concentración de hexadecano no se modificó en el medio *b*.

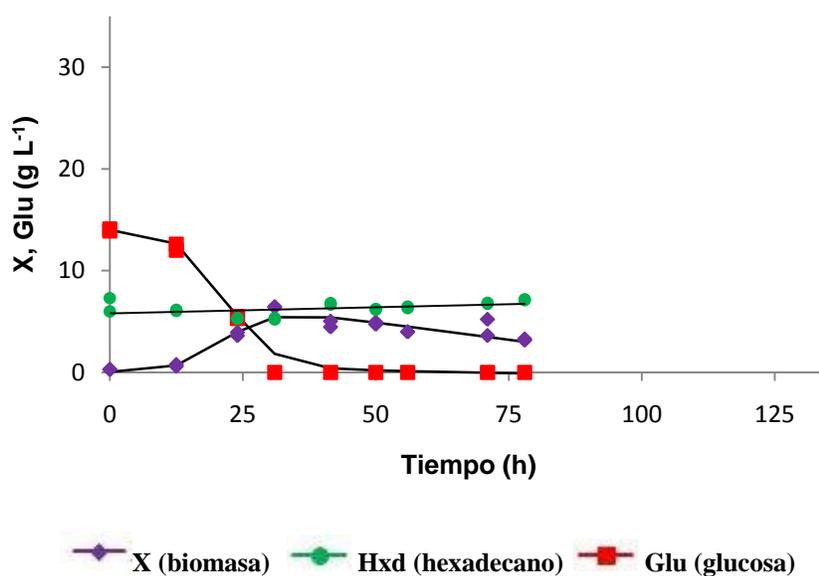


Figura 4.2 Cinética de crecimiento y de consumo de sustratos en cultivo líquido de *A. niger* con el medio de cultivo *b*: medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 15 g L^{-1} glucosa, 7.1 g L^{-1} hexadecano. Concentración total de carbono 12 g L^{-1} , 50% de carbono aportado por la glucosa y el otro 50 % por hexadecano. C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

En la Figura 4.3 se puede observar el desarrollo de *A. niger* a expensas de dos fuentes de carbono, (30 g L^{-1} glucosa, 5 g L^{-1} hexadecano) en un cultivo líquido. En este medio de cultivo (medio *c*) *A. niger* degradó $66.7 \pm 1.8 \%$ de hexadecano en las primeras 48 h. Sin embargo, el 33.3 % restante no cambió aún después de 140 h de cultivo. El consumo de glucosa comenzó desde las primeras horas de fermentación y cuando se había consumido

sólo un 22 % de la glucosa, a las 25 h, *A. niger* consumió también hexadecano. En las primeras 30 horas de la fermentación la q_s fue de 0.41 ± 0.020 g C-substrato $g^{-1} X h^{-1}$. Este comportamiento permaneció hasta que se consumió un 78 % de la glucosa y el 64 % del hexadecano. Posteriormente, el consumo de hexadecano se detuvo y el de glucosa continuó hasta agotarse ésta totalmente. El valor de μ para este cultivo fue de $0.16 h^{-1}$ durante la fase de crecimiento constante, al final de la cual se alcanzó una X_{max} de 5.59 ± 0.09 . El cultivo entró en fase estacionaria alrededor de las 72 h de fermentación. Sin embargo, la glucosa desapareció por completo desde las 56 h y no hubo consumo de hexadecano desde las 30 h, por lo que el crecimiento de *A. niger* que se dio en el periodo de 56-72 h debió ser a expensas de metabolitos acumulados, tales como ácidos orgánicos y polioles.

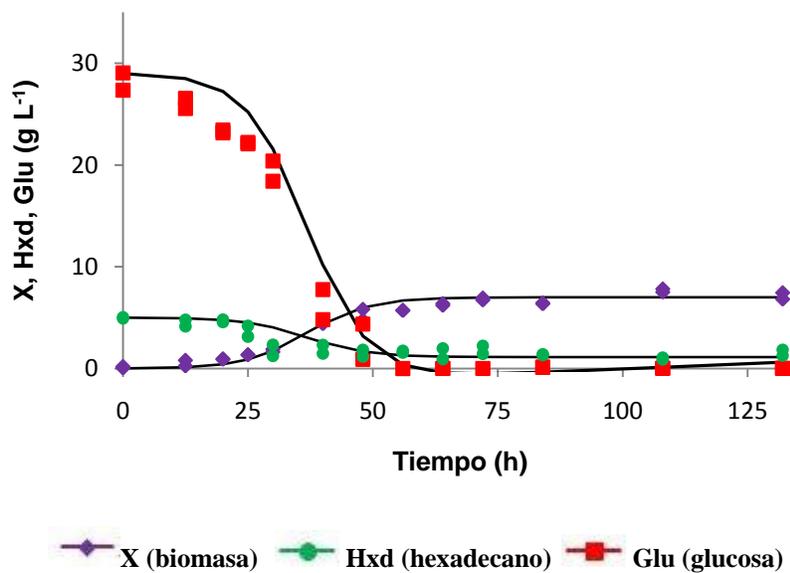


Figura 4.3 Cinética de crecimiento y de consumo de sustratos en cultivo líquido de *A. niger* con el medio de cultivo c: medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con $30 g L^{-1}$ glucosa, $5 g L^{-1}$ hexadecano. Concentración total de carbono $16.24 g L^{-1}$, 74% de carbono aportado por la glucosa y el otro 26 % por hexadecano. C:N 16.41. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

Los valores de q_s y de Y_{sx} fueron 13.6 y 2.5 veces menores respectivamente, para el medio *a* que para el *c*. Lo que demuestra que la adición de glucosa tuvo un efecto positivo tanto para la formación de biomasa, como para el consumo de hexadecano. Por otra parte los datos obtenidos con el medio *b* en el cual no hubo consumo de hexadecano, parecieran contradecir dicha observación. Scow y col. (1989) reportaron la inhibición del consumo de compuestos orgánicos recalcitrantes en presencia de concentraciones altas de substratos más fácilmente asimilables. Basados en este reporte podríamos explicar los resultados obtenidos en el medio *b*, en el cual pareciera haber una inhibición del consumo de hexadecano por la alta concentración de glucosa usada como cosubstrato (0.70 g de glucosa con 0.25 g de hexadecano). Pero esto no explica, por el contrario contradice, los resultados del medio *c* (1.41 g de glucosa con 0.36 g de hexadecano).

Varios autores han estudiado el efecto de la adición de glucosa o de substratos de fácil asimilación en la mineralización de compuestos recalcitrantes y los resultados que han obtenido son similares a los que se han encontrado para el presente trabajo. Por ejemplo, Zaidi y col. (1996) encontraron que *Corynebacterium* Z-4 con una mezcla de p-nitrofenol (20 mg L^{-1}) y glucosa (100 mg L^{-1}), utilizó ambos substratos simultáneamente. En tanto que *Pseudomonas putida* y *Corynebacterium* Z-2 consumieron primero el p-nitrofenol. Zaidi y col., 1995 (reportado por Zaidi y col. 1996) observaron que *Corynebacterium* Z-4 con una mezcla de 26 ng L^{-1} de p-nitrofenol y 100 mg L^{-1} de glucosa e inoculada en agua de lago, utilizó preferentemente la glucosa. Sin embargo, el mismo microorganismo con la misma mezcla pero inoculado en agua de desecho industrial, usó en primera instancia el p-nitrofenol. Ellos concluyeron que requerían más trabajo para caracterizar los factores ambientales que influyen en el uso preferencial de p-nitrofenol, particularmente los que están presentes en agua de desecho industrial.

Schmidt y col. (1987) encontraron que *Pseudomonas sp.* no mineralizó p-nitrofenol a una concentración de 10 ng ml^{-1} , pero lo metabolizó a concentraciones de 50 ng ml^{-1} o mayores. El valor de K_s para la mineralización de p-nitrofenol por *Pseudomonas sp.* fue de 1.1 mg ml^{-1} , mientras que el K_s para la mineralización del fenol y la glucosa fueron de 0.10 y 0.25

$\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente, por lo que plantearon que adicionando cualquiera de estos dos substratos al sistema de fermentación ayudaría en el consumo de p-nitrofenol. Sin embargo, encontraron que la adición de glucosa al medio no ayudó a *Pseudomonas sp* a mineralizar 10 ng de p-nitrofenol por ml. Pero sí incrementó la degradación de concentraciones mayores de p-nitrofenol. Este aumento en la degradación resultó del uso simultáneo de glucosa y p-nitrofenol y el incremento en la tasa de crecimiento de *Pseudomonas sp*. con glucosa. La mineralización de 50 y 100 ng de p-nitrofenol por ml se detuvo antes de que todo el p-nitrofenol fuera mineralizado. Los autores sugieren la existencia de una concentración mínima, por debajo de la cual el sustrato no es mineralizado por el microorganismo.

Los resultados reportados por Schmidt y col. (1987) concuerdan con varios aspectos observados en el trabajo aquí presentado. Por ejemplo, *A. niger* en el medio *c* consume simultáneamente hexadecano y glucosa, pero cuando sólo quedan 3.4 g L^{-1} de hexadecano en el sistema de fermentación éste permanece constante por un largo periodo de tiempo (aproximadamente 100 h). Este comportamiento podría en efecto deberse a que debe haber un umbral de concentración para que se dé la metabolización del hexadecano.

En el caso del medio *b* la razón no pareciera ser que se tenga una concentración de hexadecano debajo de la mínima requerida, ya que inicialmente se tiene 1.4 veces más hexadecano en el medio *b* que en el medio *c*. Una posible causa del comportamiento de *A. niger* en el medio *b* es que el hexadecano forme un gran agregado en la superficie del líquido y que impida la penetración del oxígeno en el medio de cultivo (Leahy y Colwell, 1990). Otra posible razón de dicho comportamiento es que se inhiba la formación de hidrofobinas, las cuales pueden ayudar al transporte del hexadecano al interior de las células fúngicas. Se ha reportado que las hidrofobinas se producen durante la formación de hifas aéreas y de esporangios (Schuren y Wessels, 1990, reportado por van Wetter y col. 2000). El medio *b* tuvo el más alto Y_{SX} ($0.76 \pm 0.06 \text{ g X g}^{-1} \text{ C-substrato}$) de los medios estudiados. Sin embargo, una vez que se alcanzó la X_{max} la biomasa comenzó a decrecer y el micelio formado quedó totalmente sumergido en el agua del medio de cultivo y con una

capa de hexadecano en la superficie del medio que pudo impedir la formación de hifas aéreas. Una última explicación a la falta de consumo de hexadecano en el medio *b* se basa en la suposición de que exista represión catabólica. En este cultivo se observó que la glucosa se consumió totalmente en 31 h y el análisis de metabolitos solubles mostró para este medio de cultivo que no hubo acumulación de algún metabolito. Por lo tanto, al no haber un sustrato que *A. niger* pudiera consumir el cultivo entra en fase de declinación antes de que haya una concentración de oxigenasa adecuada que permita el consumo de hexadecano.

En referencia al medio de cultivo *c* se pueden mencionar algunos trabajos en los cuales se han tenido condiciones similares. Por ejemplo Wang y col. (1996) reportan que *Pseudomona putida* (ATCC 17514) en un cultivo con fenol y glucosa consume ambos sustratos simultáneamente, pero con una tasa de consumo menor que cuando se tiene glucosa como única fuente de carbono. García-Peña y col. (2008) trabajando con *Paecilomyces variotti* encontraron que la degradación de mezclas binarias de benceno y tolueno presentan una tasa de consumo menor que cuando se usan los dos sustratos por separado. Wang y col. (1996) indican que la reducción de la tasa específica de consumo sugiere que las dos sustancias están involucradas en un patrón de inhibición cruzada que se puede clasificar como no competitiva. Para el presente estudio hay consumo simultáneo de glucosa y hexadecano pero la tasa de consumo se incrementa, por lo que en este caso no podemos hablar de inhibición cruzada sino más bien de un efecto sinérgico de la glucosa.

Se estudió también el comportamiento de *A. niger* en FEL con un medio de cultivo que tenía 30 g L^{-1} de glucosa como única fuente de carbono. Este análisis se realizó con el objetivo de comparar los rendimientos de biomasa en presencia y ausencia de hexadecano, así como determinar la fase exponencial de crecimiento para cosechar biomasa de este cultivo y comparar la actividad oxigenasa de biomasa obtenida en presencia y ausencia de inductor (hexadecano). Los resultados se muestran en la Figura 4.4. Para este cultivo se obtuvo una curva típica de Monod, como era de esperarse. La concentración máxima de biomasa fue de $14.5 \pm 0.27 \text{ g L}^{-1}$ a las 64.5 h, con un $Y_{SX} = 1.21 \pm 0.02 \text{ (g X g}^{-1} \text{ C-substrato)}$. La tasa específica de consumo de sustrato para este medio fue de 0.10 ± 0.00

(g C-substrato $\text{g}^{-1} \text{X h}^{-1}$).

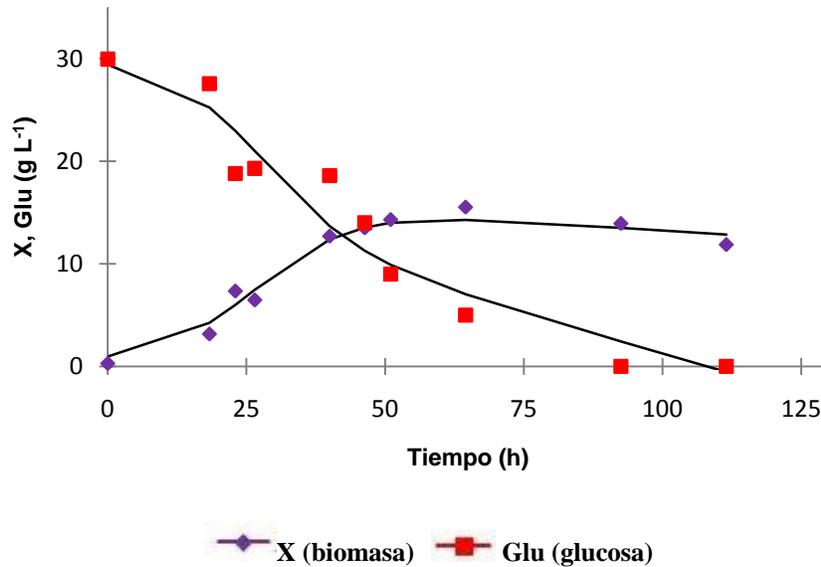


Figura 4.4 Cinética de crecimiento y de consumo de sustratos en cultivo líquido de *A. niger* con el medio de cultivo *d*: medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 30 g L^{-1} glucosa. Concentración total de carbono 12 g L^{-1} . C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

A continuación se presenta un resumen (Tabla 4.1) de los parámetros cinéticos asociados al crecimiento de *Aspergillus niger* y al consumo de los sustratos obtenidos en los cuatro medios de cultivo estudiados en FEL. Haciendo una comparación de los parámetros asociados al crecimiento fúngico podemos concluir que la tasa específica de crecimiento de *A. niger* aumenta cuando se usa glucosa como cosustrato comparada con la tasa obtenida con un solo sustrato. La menor tasa de producción de biomasa se obtiene cuando se usa

hexadecano como única fuente de carbono. La concentración de biomasa tiende a ser menor cuando se consumen glucosa y hexadecano que cuando sólo se consume glucosa.

La tasa de consumo de hexadecano fue de 0.008 (g Hxd g⁻¹ X h⁻¹) para el medio *a* y de 0.012 (g Hxd g⁻¹ X h⁻¹) para el medio *c*. Por lo que se concluye que en el medio *c*, se tuvo una tasa de consumo mayor que para el medio *a* tanto para la mezcla glucosa-hexadecano como para el hexadecano solo.

Tabla 4.1 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento fúngico y al consumo de sustratos en FEL usando diferentes relaciones de Glu:Hxd

Sustratos iniciales		Parámetros*			
Hexadecano (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (g L ⁻¹)	Y_{sx} (g X g ⁻¹ Cs)	q_s (g Cs g ⁻¹ X h ⁻¹)
0	30	0.12	14.5 ± 0.27	1.21 ± 0.02	0.10 ± 0.00
5	30	0.16	5.59 ± 0.09	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.02
7.1	15	0.23	6.15 ± 0.01	0.76 ± 0.06	0.30 ± 0.03
14	0	0.009	0.63 ± 0.17	0.40 ± 0.24	0.03 ± 0.02

μ : tasa específica de crecimiento; X_{\max} : valor máximo de biomasa; Y_{sx} : rendimiento de biomasa con respecto a los sustratos (gramos de biomasa por gramo de carbono de sustratos); q_s : tasa de consumo de sustratos (gramos de carbono de sustratos por gramos de biomasa por hora)

*Parámetros evaluados durante la fase de crecimiento constante. Se presentan valores promedio ±DS (n=2).

De los resultados mostrados hasta el momento, llama la atención que a pesar de que el cultivo de *A. niger* en el medio *c* (30 g L⁻¹ Glu, 5 g L⁻¹ Hxd) presenta la mayor tasa de consumo de hexadecano, con una tasa específica de crecimiento relativamente alta, tenga un rendimiento de biomasa menor que para el cultivo *b* y *d*. Lo que sugiere que en este medio de cultivo se tiene una alta mineralización de sustratos.

4.2 Fermentación en estado sólido

En esta sección se describen los resultados obtenidos en fermentación en estado sólido, con los medios de cultivo *e-h*. En la Tablas 3.1 y 3.2 se pueden ver en detalle las características de composición de dichos medios de cultivo.

En el medio de cultivo *e* en el cual sólo se tenía hexadecano (94.16 g L^{-1}) como fuente de carbono, *A. niger* comenzó a consumir el substrato alrededor de las 50 h de cultivo, con una tasa específica de consumo de $0.06 \pm 0 \text{ g C-substrato g}^{-1} \text{ X h}^{-1}$. Esta tasa se mantuvo hasta cerca de las 171 h momento en el que se paró la fermentación. El consumo de hexadecano en este medio fue de $89.8 \pm 2.1 \%$ del hexadecano inicial. *A. niger* en este medio de cultivo tuvo una fase lag de 40 h y un valor de $\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$. Al final de este experimento la concentración de biomasa fue de $40.19 \pm 0.59 \text{ g L}^{-1}$. Sin embargo, de lo observado en el laboratorio, la biomasa se veía esporulada. Volke-Sepúlveda y col. (2006) reportaron un valor de $\mu = 0.70 \pm 0.02 \text{ día}^{-1}$, para un sistema de cultivo sólido de *A. niger* con una concentración de hexadecano de $360 \text{ mg g}^{-1} \text{ PUF}$. Este valor es el mismo que se obtiene en nuestro caso para el medio *e* ($344 \text{ mg Hxd g}^{-1} \text{ PUF}$) que es igual a 0.72 día^{-1} .

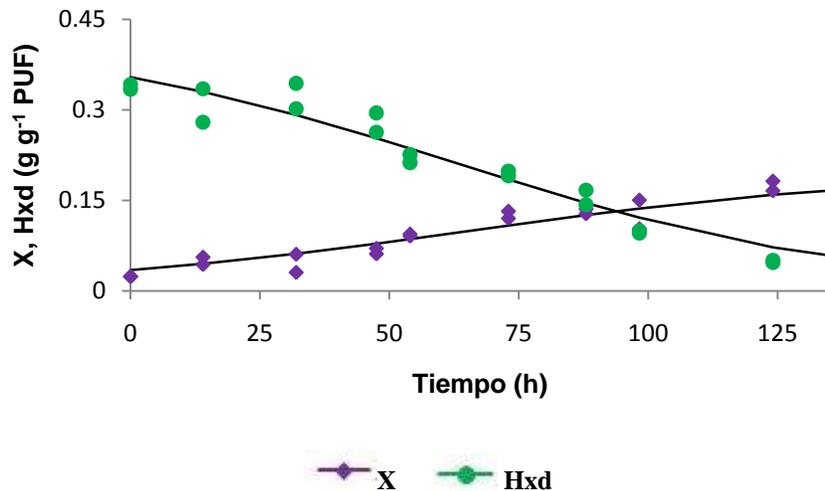


Figura 4.5 Cultivo sólido de *A. niger* en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 94.16 g L^{-1} hexadecano. Concentración total de carbono 80 g L^{-1} , C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

En la Figura 4.6 se muestra la cinética de producción de biomasa y consumo de glucosa y hexadecano con el medio de cultivo *f* (Glu 50 g L⁻¹, Hxd 23.5 g L⁻¹) en FES. Bajo las condiciones de este medio de cultivo *A. niger* presentó una fase lag de 8 h y consumió toda la glucosa presente en 20 h. Cuando la glucosa se agotó totalmente el hongo comenzó a consumir hexadecano. La tasa de consumo de hexadecano fue de 32 mg día⁻¹g⁻¹ PUF y se consumió 95.5 ± 1.9 % del carbono inicial en tan sólo 60 h. La concentración máxima de biomasa se dio alrededor de las 44 h produciéndose 0.069 g g⁻¹ PUF (18.55 ± 0.36 g L⁻¹). El poco hexadecano que quedaba para este tiempo, se siguió consumiendo pero la concentración de biomasa permaneció constante hasta el final del experimento (85 h). La biomasa obtenida con este medio de cultivo no mostraba esporulación antes de las 48 h, pero después de este tiempo presentaba esporulación. Es importante determinar la fase de esporulación porque no es conveniente trabajar con biomasa esporulada.

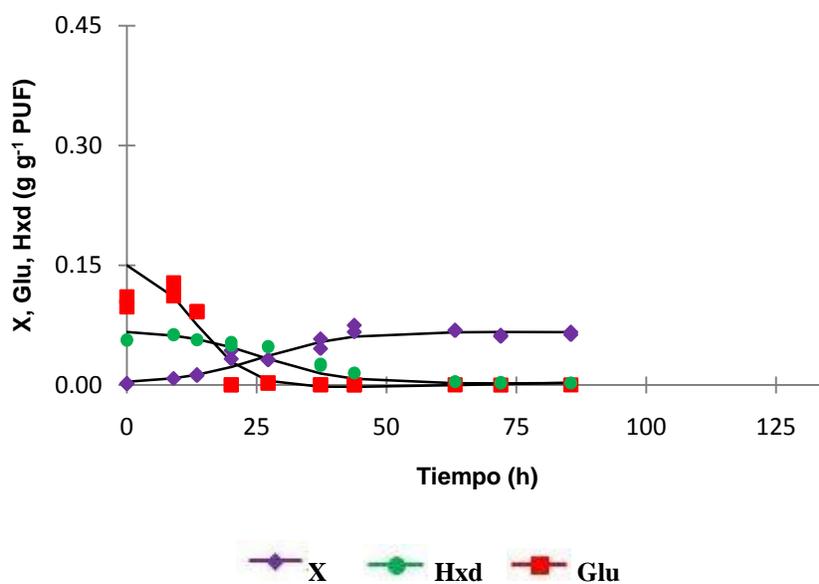


Figura 4.6 Cultivo sólido de *A. niger* en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 50 g L⁻¹ glucosa, 23.5 g L⁻¹ hexadecano. Concentración total de carbono 40 g L⁻¹, 50% de carbono aportado por la glucosa y el otro 50 % por hexadecano. C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

En la Figura 4.7 se presenta el perfil del consumo de hexadecano y de glucosa y la formación de biomasa durante la FES con *A. niger* en un medio de cultivo con 100 g L^{-1} de glucosa y 47 g L^{-1} de hexadecano (medio g). Para este cultivo se calculó una fase lag de 13 h. En esta figura se puede observar un consumo rápido de la glucosa y un consumo retardado del hexadecano. Aparentemente, la alta concentración de glucosa en el medio causó una represión catabólica, que no permitió la expresión de la oxigenasa.

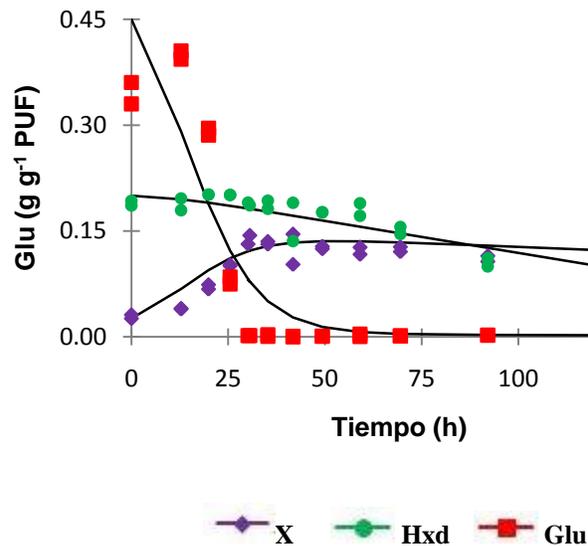


Figura 4.7 Cultivo sólido de *A. niger* en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 100 g L^{-1} glucosa, 47.08 g L^{-1} hexadecano. Concentración total de carbono 80 g L^{-1} , 50% de carbono aportado por la glucosa y el otro 50 % por hexadecano. C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

La tasa específica de producción de biomasa durante la fase de crecimiento constante fue de 0.11 h^{-1} . Al agotarse la glucosa empezó la fase de latencia pero a esta fase no le siguió la característica fase de declinación, sino que alrededor de las 92 horas *A. niger* comenzó a crecer a expensas del hexadecano. La máxima concentración de biomasa fue de $0.109 \text{ gX g}^{-1} \text{ PUF}$ ($23.50 \pm 0.26 \text{ g L}^{-1}$) a las 31 h.

Como podrá apreciarse en la sección 4.5 análisis de metabolitos hidrosolubles, el microorganismo se encontraba en un estado de estrés y hubo un cambio de ruta metabólica que provocó la acumulación de ácido cítrico. Legisa y Matthey (1988) reportan que cuando *A. niger* crece en un medio de alta producción de ácido cítrico, hay un cambio en el metabolismo de los carbohidratos, de la ruta de pentosa fosfato cambia a la ruta de glicólisis. Este cambio de ruta produce una gran cantidad de glicerol que inhibe a la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ lo cual conlleva a una acumulación de ácido cítrico.

En la Figura 4.8 se presentan los datos de la dinámica de crecimiento de *A. niger* en un medio de cultivo (*h*) que contenía 100 g L^{-1} de glucosa. Al igual que en la FEL se estudió este medio para comparar los rendimientos de biomasa en presencia y ausencia de hexadecano, así como determinar la fase exponencial de crecimiento para cosechar biomasa de este cultivo y comparar la actividad oxigenasa de biomasa obtenida en presencia y ausencia de inductor (hexadecano).

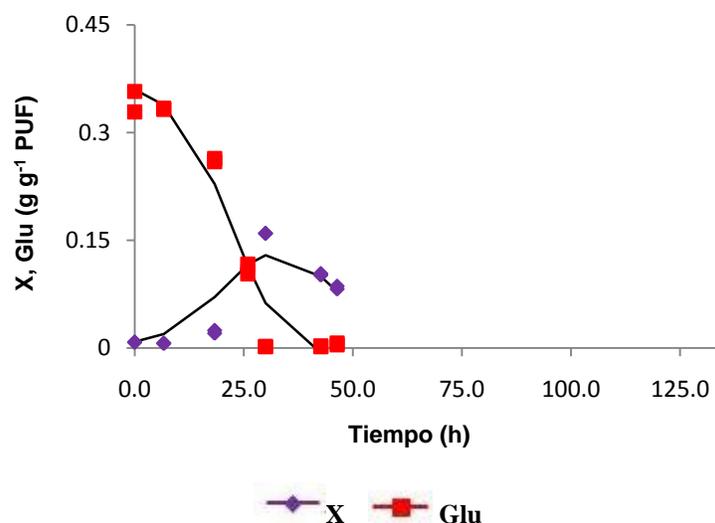


Figura 4.8 Cultivo sólido de *A. niger* en un medio mineral (ATCC 687 con 0.05% de extracto de levadura) con 100 g L^{-1} glucosa. Concentración total de carbono 40 g L^{-1} , C:N 12.12. La línea representa valores calculados y los puntos son valores experimentales

En este sistema se calculó una fase lag de 19.5 h. Se observó un consumo rápido de la glucosa con una producción máxima de biomasa de 0.116 g g⁻¹ PUF (27.04 ± 1.27 g L⁻¹) a las 30 h. La tasa específica de crecimiento es de 0.15 h⁻¹.

En la Tabla 4.2 se resumen los parámetros cinéticos asociados al crecimiento de *A. niger* y al consumo de los sustratos obtenidos en los cuatro medios de cultivo (*e-h*) estudiados en FES. Al comparar los parámetros asociados al crecimiento fúngico se puede ver que el uso de glucosa como cosustrato incrementa la tasa específica de crecimiento, con respecto a la obtenida con el uso de hexadecano como único sustrato. Este aumento es de por lo menos 3.7 veces. Sin embargo, el incremento de μ no va acompañado de una mayor concentración de biomasa. Por el contrario, la concentración de biomasa máxima disminuye con la mezcla de glucosa y hexadecano como sustratos. Lo que sugiere que hay una mayor mineralización del sustrato consumido.

Tabla 4.2 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento fúngico y al consumo de sustratos en FES usando diferentes relaciones de Glu:Hxd

Sustratos iniciales		Parámetros*			
Hexadecano (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X_{max} (g L ⁻¹)	Y_{sx} (g X g ⁻¹ Cs)	q_s (g Cs g ⁻¹ X h ⁻¹)
0	100	0.15	27.04 ± 1.27	1.16 ± 0.01	0.13 ± 0.00
23.5	50	0.13	18.55 ± 0.36	0.68 ± 0.03	0.22 ± 0.00
47.08	100	0.11	23.50 ± 0.26	0.60 ± 0.02	0.18 ± 0.01
94.16	0	0.03	40.19 ± 0.59	0.57 ± 0.01	0.06 ± 0.00

μ : tasa específica de crecimiento; X_{max} : valor máximo de biomasa; Y_{sx} : rendimiento de biomasa con respecto a los sustratos (gramos de biomasa por gramo de carbono de sustratos); q_s : tasa de consumo de sustratos (gramos de carbono de sustratos por gramos de biomasa por hora)

*Parámetros evaluados durante la fase de crecimiento constante. Se presentan valores promedio ±DS (n=2).

Por otra parte, al comparar los parámetros cinéticos asociados al consumo de sustratos (Tabla 4.2) se observa que el uso de glucosa como cosustrato incrementa por lo menos 3 veces la q_s con respecto al uso de hexadecano como único sustrato. Las velocidades de consumo de hexadecano en $\text{g Hxd g}^{-1} \text{ X h}^{-1}$ fueron de 0.012 ± 0 para el medio *e* (100 g Hxd L^{-1}); 0.009 ± 0.001 para el medio *g* (47 g Hxd L^{-1}) y de 0.007 ± 0.001 para el medio *f* ($23.5 \text{ g Hxd L}^{-1}$) lo cual coincide con lo reportado por Volke-Sepúlveda y col. (2006) quienes afirman que a mayor concentración de hexadecano se tiene una velocidad de consumo, del mismo, mayor.

Al comparar las velocidades de consumo de hexadecano en FEL y en FES se tiene la misma velocidad de consumo de hexadecano en el medio *c* (FEL) que en el medio *e* (FES). Sin embargo, el consumo de hexadecano en FES fue constante y tiende a consumir el 100 % del hexadecano presente; en tanto que en FEL el consumo de hexadecano se detuvo cuando aún quedaba un 33.3 % del hexadecano inicial.

En cuanto al Y_{SX} se puede apreciar que éste es mayor cuando se usa glucosa sola que cuando se usa mezcla de sustratos. Sin embargo, el uso de glucosa como cosustrato tiende a aumentar el Y_{SX} comparado con el rendimiento obtenido con hexadecano como única fuente de carbono. Volke-Sepúlveda y col. (2006) reportaron para *A. niger* en FES, pero en ausencia de glucosa, rendimientos de biomasa (Y_{SX}) de $-0.77 \text{ (mg X mg}^{-1} \text{ Hxd)}$ que disminuyen al aumentar la concentración de hexadecano. Esa misma tendencia se ha observado en este estudio.

Los mismos autores, mencionados en el párrafo anterior, establecen que en FES los hongos son capaces de crecer a altas concentraciones de hexadecano sin inhibición de sustrato o represión catabólica. En este estudio se encuentra la misma tendencia de que *A. niger* es capaz de crecer sin inhibición a altas concentraciones de sustrato, glucosa, hexadecano o mezclas de ellos. Sin embargo, en nuestro caso, aparentemente sí se tiene represión catabólica, especialmente cuando se usan altas concentraciones de glucosa. Por otra parte, ellos no pueden hablar de represión catabólica porque no están usando mezcla de sustratos, en particular con un sustrato de fácil consumo.

4.3 Comparación de las cinéticas de consumo de sustratos y producción de biomasa en FEL y en FES

La comparación de las Figs. 4.1-4.8 y de la información de las Tablas 4.1 y 4.2 nos permite observar que los perfiles de consumo de sustratos y de producción de biomasa son diferentes para el caso de FEL y de FES. Entre las principales diferencias se pueden mencionar las siguientes:

1. En la FES independientemente de la concentración inicial de hexadecano, siempre hay degradación del mismo.
2. La degradación del hexadecano en FES siempre tiende a ser del 100%, ya sea en presencia o ausencia de glucosa. La formación de hidrofobinas puede estar involucrada en este comportamiento (Schuren y Wessels, 1990, reportado por van Wetter y col. 2000).
3. Cuando la fuente de carbono está compuesta por 50 % de glucosa y 50 % de hexadecano, aparentemente, hay represión catabólica tanto en FES como en FEL, aunque en FES hay desrepresión de la enzima y en FEL no se presenta, aún después de 80 h de cultivo. Cabe hacer la aclaración de que en FES se utilizaron concentraciones de glucosa mucho mayores que las probadas en FEL.

Existen varios reportes de la represión catabólica que causa la glucosa de varias enzimas. Uno de los trabajos relacionados a la represión catabólica de oxigenasa es el reportado por del Castillo y col. (2007). Ellos mencionan que para un cultivo sumergido de *P. putida* con 16 mM de glucosa y 6 mM de tolueno, como fuentes de carbono, se presentó represión catabólica simultánea. Aunque ambos sustratos fueron consumidos pero con una velocidad menor que cuando se usan los sustratos solos.

Por otra parte, Diaz-Godínez y col. (2001) demostraron que *A. niger* C28B25 tiene mayores productividades de pectinasa en FES que en FEL usando 5 g L⁻¹ de pectina y 50 g L⁻¹ sacarosa. Ellos adjudican los resultados obtenidos a una mayor producción de biomasa en FES y a una mayor degradación de proteína en FEL.

Varios investigadores sugieren que en FES se tiene una mayor tolerancia a la represión catabólica para pectinasas (Ramesh y Lonsane, 1991, Aguilar y col. 2001, Fontana y

Moura da Silveira, 2005). Se menciona que en FES se pueden usar concentraciones de glucosa $\leq 100 \text{ g L}^{-1}$ sin que se cause una gran pérdida de actividad de la enzima, comparada con la pérdida de actividad que se tiene para el mismo tipo de sistema en FEL.

Basados en la evidencia científica, mencionada aquí y en la sección 4.3, se puede concluir que en el medio de cultivo *b* (15 g Glu, 7.5 g Hxd) se tiene limitación de oxígeno y represión catabólica. Y antes de que se desreprima la enzima hay degradación de la biomasa. En FES la formación de hidrofobinas puede ayudar tanto en el consumo de grandes concentraciones de hexadecano como en la desrepresión de la enzima.

4. Los valores de μ tienen la misma tendencia en ambos sistemas y son mayores cuando se consume más glucosa. El uso de la glucosa como cosustrato es especialmente favorable en FEL, ya que incrementa el valor de μ por lo menos 18 veces, con un incremento notable de la concentración de la biomasa (8.9 veces).

5. Cuando en el medio de cultivo se tiene una mezcla de Glu-Hxd como sustratos, los valores de q_s son de 1.36- 2.27 veces mayores para FEL que para FES. Cuando la fuente de carbono en el medio de cultivo es sólo hexadecano la q_s es 2.2 veces más rápida para FES que para FEL. Este comportamiento puede deberse a la mejor asimilación de sustratos hidrofílicos en FEL y el mayor consumo de sustratos hidrofóbicos en FES.

6. En FES se presentan valores mayores para μ , X_{\max} , q_s y Y_{SX} que en FEL, cuando se usa hexadecano como única fuente de carbono.

Como se mencionó anteriormente uno de los objetivos de estudiar la degradación de hexadecano en FEL y en FES fue encontrar las condiciones bajo las cuales las oxigenasas pudieran expresarse. Se trató de relacionar la producción de la enzima con la degradación del hexadecano por *A. niger*. García Peña (2002) reportó que la determinación de actividades enzimáticas de biomasa de *S. apiospermum* permite predecir los consumos o capacidades de eliminación, en un biofiltro fúngico de eliminación de tolueno. Wu y col. (2011) demostraron que el incremento en la actividad de la monooxigenasa P450, de *Burkholderia sp.* GS3c, estaba directamente relacionada con la degradación del hexadecano por dicho microorganismo.

Del análisis de los resultados mostrados hasta aquí, se decidió usar el medio de cultivo *c* para la producción de la oxigenasa en FEL y el medio *f* para la obtención de la enzima en FES. A pesar de que aparentemente el medio *e* tiene mejores características que el medio *f*,

se seleccionó este último porque el consumo de hexadecano comienza mucho más tarde en el medio *e*, aparte de que la biomasa obtenida estaba bastante esporulada.

4.4 Balances de carbono en FEL y en FES

Para evaluar la confiabilidad de los datos mostrados en la tablas 4.1 y 4.2 para la FES y la FEL, así como para evaluar el grado de mineralización de los substratos se hizo un balance de carbono que se muestra en la Tabla 4.3. En esta tabla se puede observar que los balances para los cuatro medios estudiados en FES cierran con un grado de error aceptable, tres de ellos con un error menor al 4 % (recuperación de carbono mayor al 96%) y sólo el medio *e* presenta un error del 9.7%. Los balances en FEL cierran a 100 % puesto que el CO₂ no fue medido sino calculado por medio de balance óxido-reducción.

De los ocho medios analizados, los que presentan la menor mineralización son los medios que contienen solamente glucosa (medios *d* y *h*). Ambos sistemas de fermentación presentan las mismas tendencias:

1. Cuando la fuente de carbono está constituida sólo por un substrato se tiene menor mineralización que cuando se tienen mezclas Hxd-Glu.
2. La mineralización es mayor cuando se usa hexadecano como única fuente de carbono que cuando se usa glucosa.
3. El consumo de hexadecano y de glucosa sea simultáneo o no causa la mayor mineralización de todos los casos.

Volke y col. (2006) reportaron para el mismo hongo y el mismo tipo de sistema pero con hexadecano como única fuente de carbono, la máxima mineralización con la mínima concentración de hexadecano. Este comportamiento no se sigue en presencia de glucosa.

Los resultados de la mineralización comprueban lo que se sugirió a través del análisis de los Y_{SX} y de los valores de μ . De esta manera podemos explicar por qué si tenemos una tasa específica de consumo de substrato mayor y una tasa de producción de biomasa mayor se tiene una concentración de biomasa menor. Como es el caso de los medios *c* y *f* en los cuales se obtienen además las mayores mineralizaciones.

Tabla 4.3 Carbono recuperado como CO₂ durante la FES y la FEL de hexadecano, glucosa y mezclas de ambos por *A. niger*

*Substrato inicial (g)		*Substrato consumido (g)		*X Prod (g)	** CO ₂ Experi- mental (g)	% C como CO ₂	+CR CO ₂ /O ₂	**SF	***M C
Hxd	Glu	Hxd	Glu						
0.00	1.50	0.00	1.50±0.00	0.761±0.03	0.96±0.006	43.4	1.21(1.00)	FEL	<i>d</i>
0.25	1.41	0.17±0.00	1.41±0.06	0.259±0.03	1.99±0.19	82.5	0.90(0.89)	FEL	<i>c</i>
0.36	0.70	0.00	0.70±0.01	0.308±0.00	0.524±0.02	51.1	1.15(1.00)	FEL	<i>b</i>
0.70	0.00	0.12±0.1	0.00	0.024±0.00	0.38±0.13	78	0.61(0.65)	FEL	<i>a</i>
0.00	0.426	0.00	0.424±0.00	0.198±0.00	0.20±0.005	36.1	1.13(1.00)	FES	<i>h</i>
0.064	0.12	0.06±0.00	0.12±0.01	0.071±0.00	0.23±0.006	64.1	0.75(0.78)	FES	<i>f</i>
0.214	0.39	0.13±0.02	0.39±0.02	0.112±0.00	0.80±0.08	82.8	0.81(0.82)	FES	<i>g</i>
0.33	0.00	0.29±0.01	0.00	0.163±0.17	0.45±0.05	56.8	0.57(0.65)	FES	<i>e</i>

* Se presentan valores promedio ±DS (n=2)

** Los valores de CO₂ para FEL se calcularon mediante un balance óxido-reducción

+ CR (coeficiente de respiración) Valor experimental (Valor teórico)

** SF (sistema de fermentación)

*** MC (medio de cultivo). Todas las muestras en FEL tenían 50 ml de medio de cultivo cada una. Para FES los volúmenes de medio de cultivo para cada muestra eran (en ml) 3.5, 4.6, 3.63, and 3.63 para los medios e, g, f y h respectivamente.

El coeficiente de respiración (CR) está relacionado al metabolismo respiratorio del microorganismo y al nivel de oxidación de los substratos (Volke-Sepúlveda y col. 2003). El CR tanto en FEL como en FES varía de manera inversa a la mineralización, esto es, el CR es mayor cuando se consume glucosa que cuando se consume hexadecano. Los valores de CR menores de uno son característicos de compuestos orgánicos alifáticos, que tienen un contenido bajo de oxígeno. Valores de CR mayores de uno son típicos de compuestos orgánicos con un alto contenido de oxígeno (Dilly, 2001).

4.5 Análisis de consistencia

Para validar los datos experimentales de las fermentaciones en estado sólido, se realizaron también análisis de consistencia interna. El método usado fue el modelo de caja negra, en el cual todas las reacciones celulares son agrupadas en una sola reacción y se

considera a la biomasa como una caja negra que intercambia materiales con el medio. Este método consiste en la validación de balances elementales (Soto Cruz, 2002).

4.5.1 Validación de los datos experimentales con el modelo de caja negra

En esta sección se explicará cómo se realizaron los cálculos para el análisis de consistencia usando los datos experimentales obtenidos en una de las fermentaciones. Para los otros casos solamente se presentarán los datos resumidos en la Tabla 4.4. A menos que otra cosa se especifique, la forma de trabajar el método fue consultada en Soto-Cruz (2002).

Como en el modelo de caja negra todas las reacciones celulares están agrupadas en una sola, los coeficientes estequiométricos de esta reacción global estarán dados por los coeficientes de rendimiento, de consumo y de producción, con respecto a la biomasa. De manera general la reacción global es:

$$X + \sum_{i=1}^M Y_{XPi} P_i - \sum_{j=1}^N Y_{Xpj} P_j = 0$$

En donde:

X = Biomasa

$Y_{XPi} = r_{pi}/r_x$ = coeficiente de rendimiento del producto i con respecto a la biomasa

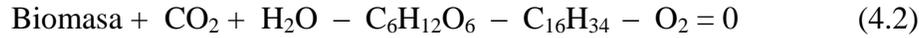
P_i = Producto i

$Y_{Xsj} = r_{sj}/r_x$ = coeficiente de rendimiento del substrato j con respecto a la biomasa

S_j = Substrato j

Los elementos que entran al sistema deben estar balanceados con los elementos que salen del sistema, por ejemplo, el carbono que entra al sistema como substratos tiene que ser recuperado en forma de productos metabólicos y biomasa. Cada elemento que entra al sistema impone una restricción.

La reacción global para nuestro caso será:



Antes de realizar los balances elementales, las fórmulas de cada una de las especies presentes en la reacción global, deben ser normalizadas en base a C-mol. Por otra parte se ha reportado que la fórmula mínima de *A. niger* es $\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.1}$ (Nielsen y Villadsen, 1994). Por lo que la ecuación 4.2 nos queda como:



Para hacer el balance elemental se introduce una matriz con I renglones y M+N+1 columnas, que tendrá la forma de:

$$Er = 0 \quad (4.4)$$

Para nuestro caso:

M = productos aparte de biomasa = 2

N = substratos = 3

I = elementos = 3 = número de restricciones del sistema = balances elementales que se deben cumplir.

r = tasas de reacción = M+N+1 = 6

Los grados de libertad (F) de nuestro sistema serán:

$$F = M+N+1-I = 6-3 = 3$$

De manera que se deben medir al menos 3 compuestos para que el sistema tenga solución única. Para nuestro sistema se midieron 4 por lo que el sistema está sobredeterminado y pueden calcularse las tasas de reacción que no hayan sido medidas.

Las columnas de la matriz tendrán los coeficientes estequiométricos, de cada especie química de la ecuación (4.3), para el elemento que se va a balancear. Por lo tanto la matriz queda como:

$$\begin{array}{c}
 \text{C} \\
 \text{H} \\
 \text{O}
 \end{array}
 \left| \begin{array}{ccccc}
 1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\
 1.7 & 0 & 2 & 2 & 2.125 \\
 0.58 & 2 & 1 & 1 & 0
 \end{array} \right.
 \left. \begin{array}{c}
 1 \\
 Y_{XC} \\
 Y_{XA} \\
 -Y_{XG} \\
 -Y_{XH} \\
 -Y_{XO}
 \end{array} \right| = 0$$

En donde :

Y_{XC} = coeficiente de rendimiento de CO_2 con respecto a la biomasa

Y_{XA} = coeficiente de rendimiento de H_2O con respecto a la biomasa

Y_{XG} = coeficiente de rendimiento de glucosa con respecto a la biomasa

Y_{XH} = coeficiente de rendimiento de hexadecano con respecto a la biomasa

Y_{XO} = coeficiente de rendimiento de O_2 con respecto a la biomasa

Multiplicando las matrices, el balance elemental quedará como:

	$\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.1}$	CO_2	H_2O	CH_2O	$\text{CH}_{2.125}$	O_2	= 0
C	1	Y_{XC}	0	$-Y_{XG}$	$-Y_{XH}$	0	= 0
H	1.7	0	$2Y_{XA}$	$-2Y_{XG}$	$-2,125Y_{XH}$	0	= 0
O	0.58	$2Y_{XC}$	Y_{XA}	$-Y_{XG}$	0	$-2Y_{XO}$	= 0

En la Tabla 4.4 se pueden consultar los coeficientes de rendimiento para cada una de las fermentaciones en sólido estudiadas. A continuación se muestran los balances resueltos, para el lote con medio de cultivo *f*.

	$\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.1}$	CO_2	H_2O	CH_2O	$\text{CH}_{2.125}$	O_2	= 0
C	1	2	0	-1.48	-1.63	0	= -0.11
H	1.7	0	2(2.37)	-2(1.48)	-2.125(1.63)	0	= 0
O	0.58	2(2)	(2.37)	-(1.48)	0	-2(2.85)	= 0

De los tres balances elementales, el único que no cierra a cero es el balance de carbono. Esto puede deberse a un error en la medición de alguno de los componentes analizados en el laboratorio tales como la biomasa, el hexadecano o el CO_2 ; o bien por algún metabolito que no se haya cuantificado. Por lo tanto, se procedió a hacer una corrección para uno de dichos componentes a la vez y con ese nuevo valor se checó el balance elemental por grado de reducción. Como el balance se hizo tomando como base una C-mol de biomasa, se corrigieron el hexadecano y el CO_2 . Para hacer la corrección, se calcula el compuesto que se quiere corregir usando la ecuación del balance de carbono, en vez de usarse el valor medido experimentalmente. Para todos los casos analizados los balances cerraron a cero con la corrección del CO_2 .

El balance por grado de reducción se realiza multiplicando los coeficientes estequiométricos, de los balances elementales, por el número de electrones que tiene para compartir el elemento que se esté balanceando. Por ejemplo: +4 para C, -2 para O y -1 para H. A continuación se muestran las ecuaciones generales para el balance por grado de reducción y posteriormente se usan los datos de la fermentación en medio sólido con el medio de cultivo $f(50 \text{ g L}^{-1} \text{ Glu}, 23.5 \text{ g L}^{-1} \text{ Hxd})$ como ejemplo de cálculo.

	$\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.1}$	CO_2	H_2O	CH_2O	$\text{CH}_{2.125}$	O_2	= 0
C	(4)1	$4Y_{\text{XC}}$	0	$-4Y_{\text{XG}}$	$-4Y_{\text{XH}}$	0	= 0
H	(1)1.7	0	$(1)2Y_{\text{XA}}$	$-(1)2Y_{\text{XG}}$	$-(1)2.125Y_{\text{XH}}$	0	= 0
O	$(-2)0.58$	$(-2)2Y_{\text{XC}}$	$(-2)Y_{\text{XA}}$	$-(2)Y_{\text{XG}}$	0	$-(-2)2Y_{\text{XO}}$	= 0

Por lo tanto el balance para el medio *f* será:

	$\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.1}$	CO_2	H_2O	CH_2O	$\text{CH}_{2.125}$	O_2	= 0
C	4	4(2.12)	0	-(4)1.48	-(4)1.63	0	= 0
H	1.7	0	2(2.37)	-2(1.48)	-2.125(1.63)	0	= 0
O	-1.16	-4(2.12)	-2(2.37)	+2(1.48)	0	+4(2.85)	= 0

Tabla 4.4 Comparación de los datos experimentales con los corregidos por grado de reducción para los compuestos medidos en las fermentaciones en estado sólido con *A. niger*.

Datos experimentales				
**Lote				
*Coeficiente de rendimiento (C-mol/C-mol)	Medio e Glu 0 Hxd 2.04E-02	Medio f Glu 3.93E-03 Hxd 4.51E-03	Medio g Glu 1.30E-02 Hxd 1.30E-02	Medio h Glu 1.24E-02 Hxd 0
Y_{XC}	1.76	2.00	4.35	0.60
Y_{XA}	2.32	2.37	4.53	0.82
Y_{XG}	0	1.48	3.12	1.67
Y_{XH}	2.99	1.63	2.13	0
Y_{XO}	3.44	2.85	5.24	0.53
Error (%)	9.73	3.80	1.88	3.88
Datos corregidos por grado de reducción				
**Lote				
Coeficiente de rendimiento (C-mol/C-mol)	Medio e Glu 0 Hxd 2.04E-02	Medio f Glu 3.93E-03 Hxd 4.51E-03	Medio g Glu 1.30E-02 Hxd 1.30E-02	Medio h Glu 1.24E-02 Hxd 0
Y_{XC}	1.99	2.12	4.25	0.67
Y_{XA}	2.32	2.37	4.53	0.82
Y_{XG}	0	1.48	3.12	1.67
Y_{XH}	2.99	1.63	2.13	0
Y_{XO}	3.44	2.85	5.24	0.53
Error (%)	0	0	0	0

* Rendimientos C-mol en base a 1C-mol de biomasa producida $Y_{XC} = \text{CO}_2/X$, $Y_{XA} = \text{H}_2\text{O}/X$, $Y_{XG} = \text{glu}/X$, $Y_{XH} = \text{Hxd}/X$, $Y_{XO} = \text{O}_2/X$

** La composición de los medios está dada en C-mol

En la Fig. 4.9 se puede ver que la producción de CO₂ por la biomasa (respiración endógena) fue mayor cuando se consumieron hexadecano y glucosa, que era algo que ya se había observado del balance de carbono. De estos datos llama la atención que cuando el medio de cultivo tenía 80 g de C de los cuales 50 % provienen de glucosa y el otro 50 % de hexadecano, el microorganismo estaba en un estado de estrés mayor que cuando se tenía la misma cantidad de carbono, pero proveniente de un solo substrato (94.16 gL⁻¹ hexadecano).

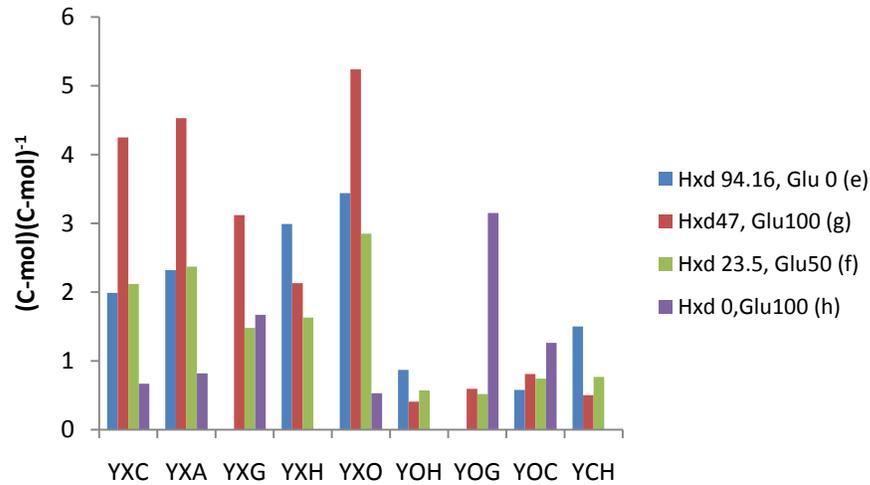


Figura 4.9 Distribución elemental de los substratos (fuentes de carbono y oxígeno) en los productos de las fermentaciones en sólido. La composición de las fuentes de carbono de los medios *e-h* está indicada en g L⁻¹.

$$Y_{XC} = \text{CO}_2/X, Y_{XA} = \text{H}_2\text{O}/X, Y_{XG} = \text{Glu}/X, Y_{XH} = \text{Hxd}/X, Y_{XO} = \text{O}_2/X, Y_{OH} = \text{Hxd}/\text{O}_2, Y_{OG} = \text{Glu}/\text{O}_2, Y_{OC} = \text{CO}_2/\text{O}_2, Y_{CH} = \text{Hxd}/\text{CO}_2$$

El coeficiente de rendimiento de agua con respecto a la biomasa, tiene exactamente la misma tendencia que el CO_2 . Lo cual no es de extrañar ya que al oxidarse una molécula se producen CO_2 y H_2O .

La glucosa que se transformó a biomasa fue similar en los medios *f* y *h*. Sin embargo, en el medio *g* ésta fue menor, por lo que el Y_{XG} de este medio es el doble de los medios *f* y *h*.

El Y_{XH} del medio *e* es casi el doble que para el medio *f* y 1.5 veces mayor que para el medio *g*. Este resultado implica que se tuvo menor formación de biomasa en el medio que sólo tenía hexadecano como fuente de carbono

El mayor consumo de oxígeno por la biomasa se dio para el medio *g*. El Y_{XO} del medio *g* es 1.5 veces mayor que para el medio *e* y 1.8 veces mayor que para el medio *f*. Sin embargo, la diferencia entre el medio *g* y el *h* es de 10 veces. En general el consumo de oxígeno en los medios que contenían hexadecano fue bastante alto comparado con el medio *h* que sólo tenía glucosa. Este consumo alto puede deberse a la actividad de la oxigenasa. Esto se comprueba con el rendimiento de hexadecano con relación al oxígeno, Y_{OH} , en donde vemos que el oxígeno consumido fue mayor en los medios de cultivo en donde se llevó a cabo la mayor degradación de hexadecano (medios *e* y *f*). Para el medio *g* el Y_{XO} es mayor que para *e* y *f* pero el Y_{OH} es menor lo que implica poca formación de biomasa y menor degradación de hexadecano.

El rendimiento Y_{OG} es aproximadamente 6 veces mayor para el medio *h* que para los medios *f* y *g*. Ya se había mencionado anteriormente que la oxidación de moléculas que contienen oxígeno, tal como la glucosa, requieren menos oxígeno que moléculas alifáticas. Los medios *f* y *g* contenían hexadecano además de glucosa de ahí que el consumo de oxígeno haya sido mayor.

El Y_{OC} es de 1.5 a 2 veces mayor para el medio *h* que para los otros tres medios de cultivo. Por lo que se concluye que parte del oxígeno consumido, en los medios que contienen hexadecano, debe encontrarse formando parte de otras moléculas diferentes de CO_2 y de H_2O .

El rendimiento Y_{CH} es 2 y 3 veces mayor para el medio *e* que para el medio *f* y *g* respectivamente. Lo que implica que en el medio *e* se tiene una menor mineralización. Cabe resaltar que el medio *e* tenía una concentración inicial de hexadecano mayor que los medios *f* y *g*. Volke-Sepúlveda y col. (2006) encontraron que la distribución de carbono estaba fuertemente influenciada por la concentración inicial de hexadecano. Y ellos reportaron que a mayor cantidad inicial de hexadecano menor será la transformación a CO_2 .

En general *A. niger* tuvo un comportamiento similar en los medios de cultivo *e* y *f* aun y cuando el medio de cultivo *e* difería bastante del medio *f*. En el primero se tenía hexadecano como única fuente de carbono y el carbono total era de 80 g L^{-1} , mientras que el segundo estaba compuesto de glucosa y hexadecano y el total de carbono era de 40 g L^{-1} . El medio de cultivo *g* tenía la misma cantidad de carbono que el medio *e* y la fuente de carbono era mixta como en el medio *f*. Sin embargo, la distribución elemental de los substratos en los productos fue muy diferente en el medio *g*.

En la Tabla 4.5 se presenta un análisis de consistencia de las fermentaciones en líquido. Para las fermentaciones en líquido todos los balances cierran a cero porque el CO_2 no se obtuvo de forma experimental sino a través de balances por grado de reducción. En la Figura 4.10 se muestran diferentes coeficientes de rendimiento con el objetivo de analizar la distribución de las fuentes de carbono y del oxígeno, en los productos de las fermentaciones en estado líquido realizadas y comparar con los resultados obtenidos para las fermentaciones en sólido.

Tabla 4.5 Datos para análisis de consistencia de las fermentaciones en medio líquido con *A. niger*.

*Coeficiente de rendimiento (C-mol/C-mol)	**Lote			
	Medio a Glu 0 Hxd 5.0E-02	Medio b Glu 2.3E-02 Hxd 2.5E-02	Medio c Glu 4.7-02 Hxd 1.8E-02	Medio d Glu 5.0E-02 Hxd 0
Y_{XCO_2}	9.64 ± 9.12	3.60	7.54	0.77
Y_{XH_2O}	10.45 ± 9.69	3.78	7.92	0.92
Y_{Xglu}	NA	4.28	4.82	1.77
Y_{XHxd}	10.64 ± 9.12	0.31	3.72	NA
Y_{XO_2}	15.16 ± 13.97	3.63	9.38	0.63
Error (%)	0	0	0	0

* Rendimientos C-mol en base a 1C-mol de biomasa producida

** La composición de los medios está dada en C-mol

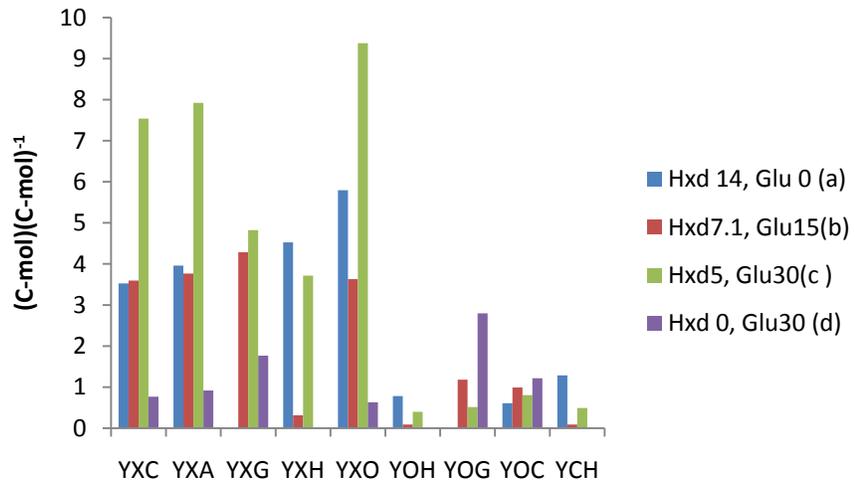


Figura 4.10 Distribución elemental de los substratos (fuentes de carbono y oxígeno) en los productos de las fermentaciones en líquido. La composición de las fuentes de carbono de los medios *a-d* está indicada en g L⁻¹.

$$Y_{XC} = CO_2/X, Y_{XA} = H_2O/X, Y_{XG} = Glu/X, Y_{XH} = Hxd/X, Y_{XO} = O_2/X, Y_{OH} = Hxd/O_2,$$

$$Y_{OG} = Glu/O_2, Y_{OC} = CO_2/O_2, Y_{CH} = Hxd/CO_2$$

La distribución elemental de los substratos en los productos de la fermentación cuando se usó el medio de cultivo *c* en líquido fue similar al comportamiento que se tuvo con el medio de cultivo *g* en sólido. Sin embargo los rendimientos de CO₂, agua, glucosa y oxígeno con respecto a la biomasa son de 1.6 a 1.8 veces mayores para el medio *c* que para el medio de cultivo *g*. Estos resultados implican que en líquido se tuvo una formación de biomasa menor, con respecto al consumo de glucosa, hexadecano y de oxígeno, que la biomasa obtenida en sólido. Además de que la formación de CO₂ y de agua fue mayor para FEL que para FES.

El comportamiento de *A. niger* usando sólo glucosa como fuente de carbono fue similar en FEL y en FES.

4.6 Análisis de metabolitos hidrosolubles

Se analizaron muestras tomadas a diferentes tiempos de la FEL con el medio de cultivo *b* y de las FES con los medio de cultivo *f* y *g*. Estos medios de cultivo contenían 50 % de carbono proveniente de glucosa y el otro 50 % proveniente de hexadecano. El medio de cultivo *b* se preparó con 12 g L⁻¹ C y los medio *f* y *g* con 40 y 80 g L⁻¹ de C respectivamente. Estos análisis se realizaron con el fin de identificar la ruta de degradación y consumo de los substratos.

En las Figs. 4.11 y 4.12 se presentan los perfiles de evolución de los metabolitos evaluados en FES. Como puede verse en ambos perfiles hubo acumulación de ácido cítrico y de fructuosa. En ambos cultivos la X_{max} se presentó alrededor de la hora 40 (ver figs. 4.6 y 4.7). Aparentemente estos metabolitos ya no fueron incorporados a la biomasa sino que se transformaron a CO₂. De ahí que se tengan altas mineralizaciones y que se tenga un coeficiente de respiración mayor que cuando se consume solamente hexadecano.

Para el caso del medio de cultivo *b*, solamente apareció la glucosa. La cual coincide totalmente con el perfil mostrado en la Fig. 4.2. Con este medio no hay acumulación de metabolitos. Esta puede ser la razón por la cual, una vez alcanzada la X_{max} no se presenta un periodo de mantenimiento, sino que se empieza a autolizar la biomasa. Esto comprueba

lo reportado por Córdova (1994) de que con concentraciones bajas de glucosa, no se producen metabolitos extracelulares.

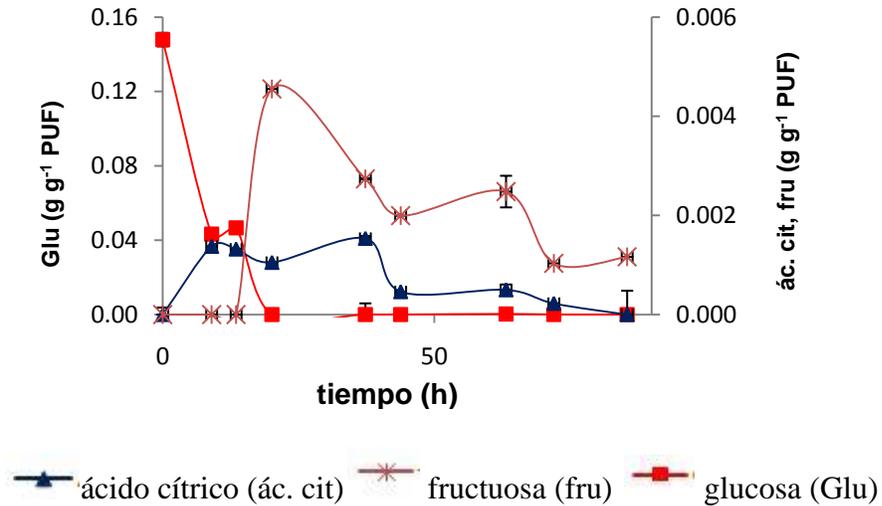


Figura 4.11 Perfiles de producción de metabolitos solubles y del consumo de glucosa durante la fermentación en estado sólido del medio de cultivo *f* (50 g L⁻¹ glucosa, 23.5 g L⁻¹ hexadecano) por *A. niger*

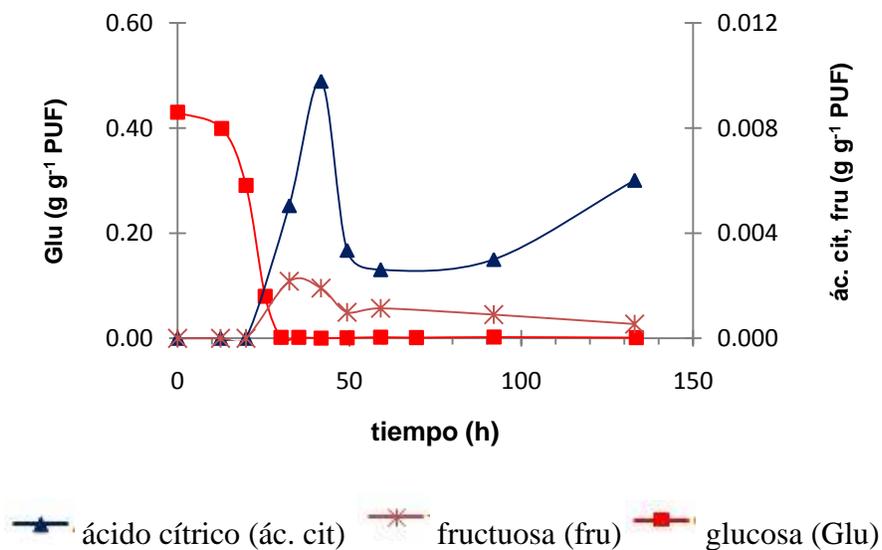


Figura 4.12 Perfiles de producción de metabolitos solubles y del consumo de glucosa durante la fermentación en estado sólido del medio de cultivo *g* (100 g L⁻¹ glucosa, 47.08 g L⁻¹ hexadecano) por *A. niger*

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN B

Caracterización de oxigenasa

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN B

5. Caracterización de oxigenasa

Una vez que se evaluó el consumo de hexadecano por *A. niger*, en FEL y en FES, en presencia y ausencia de cosustrato se procedió a estudiar la enzima responsable de dicho consumo. En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización, en términos de actividad, estabilidad y especificidad, de las oxigenasas producidas en FEL y FES por *A. niger*.

5.1 Actividad oxigenasa con células en reposo obtenidas por FEL

Para analizar la actividad oxigenasa que presentaba la biomasa de *A. niger* obtenida por FEL y FES en los medios seleccionados (*c* y *e*), se llevaron a cabo ensayos de consumo de oxígeno disuelto por células en reposo. Se cuantificó el consumo de oxígeno por respiración endógena de las células (RE) y el consumo de oxígeno en presencia de sustrato (RS). La substracción del oxígeno consumido por RE al RS nos arroja la cantidad de oxígeno consumido por oxigenasas y este consumo está directamente relacionado a la actividad de las oxigenasas (Sun y Wood, 1997). El consumo de oxígeno se cuantificó con células cosechadas a las 48, 72 y 120 h de fermentación. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1. (Los cálculos se pueden consultar en el Anexo A.3).

Como puede observarse (Tabla 5.1) el consumo de oxígeno, para las muestras con sustrato, siempre fue mayor (con una significancia de 0.05) que el consumo endógeno. La actividad oxigenasa es mayor para las células cosechadas a las 48 h (0.5897 ± 0.0693 nkat) y es significativamente diferente de la actividad de células cosechadas a las 72 y 120 h. Lo cual concuerda con la cinética presentada (Fig. 4.3); ya que, a las 48 h, el crecimiento de *A. niger* se encuentra en fase de crecimiento constante. La biomasa de 72 h pierde 82 % de la actividad que tenía a las 48 h y con la misma actividad se mantiene hasta las 120 h. Dado que el consumo de oxígeno por respiración endógena resultó bastante alto, lo cual puede causar errores en la prueba, se decidió utilizar inhibidores de la respiración, azida de sodio y cianuro de sodio. Sin embargo, éstos inhibieron también la actividad enzimática. La azida de sodio la inhibe de manera parcial, pero el cianuro de sodio la inhibe totalmente.

5.2 Actividad oxigenasa con células en reposo obtenidas por FES

El mismo tipo de experimentos se realizó con biomasa de *A. niger* obtenida por FES. Sin embargo, se tenía una interferencia muy alta, tal vez ocasionada por la presencia del PUF (datos no mostrados). Por esta razón se decidió usar otros métodos de análisis de la actividad oxigenasa.

5.3 Actividad oxigenasa con extractos libres de células

Con este tipo de experimentos se pretendía evitar la interferencia del PUF y de la respiración endógena de las células en la cuantificación de la actividad oxigenasa. Se prepararon extractos enzimáticos libres de células y la cuantificación se realizó por oximetría. Se usaron extractos de biomasa obtenida por FEL y por FES con los medio de cultivo *c*, *d*, *e* y *h*. La cuantificación se realizó en presencia y ausencia del cofactor NADH, para determinar si la(s) oxigenasa(s) presentes son dependientes de NADH. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados de estos ensayos.

Tabla 5.2 Actividad oxigenasa en extractos libres de células, de biomasa producida en FEL y FES.

Extracto	Actividad específica de oxigenasa nkat mg ⁻¹ proteína*
Cultivo líquido, medio <i>c</i> (30 g L ⁻¹ glu, 5 g L ⁻¹ Hxd) sin NADH	0.07 ± 0.04 A
Cultivo líquido, medio <i>c</i> (30 g L ⁻¹ glu, 5 g L ⁻¹ Hxd) con NADH	0.23 ± 0.04 B
Cultivo líquido medio <i>d</i> (30 g L ⁻¹ glu) con NADH	0.07 ± 0.01 A
Cultivo sólido, medio <i>f</i> (50 g L ⁻¹ glu, 23.5 g L ⁻¹ Hxd) sin NADH	0.07 ± 0.01 A
Cultivo sólido, medio <i>f</i> (50 g L ⁻¹ glu, 23.5 g L ⁻¹ Hxd) con NADH	1.20 ± 0.07 C
Cultivo sólido medio <i>h</i> (100 g L ⁻¹) con NADH	0.11 ± 0.05 A

* La actividad oxigenasa se midió por oximetría usando hexadecano como sustrato. Se presentan valores promedio ±DS (n=3). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

En la Tabla 5.2 se puede observar que los extractos obtenidos de biomasa, crecida en medios de cultivo con glucosa como única fuente de carbono, tanto en FEL como en FES, así como los extractos en ausencia del cofactor NADH, presentan sólo actividad basal de oxigenasa (≤ 0.06 nkat mg^{-1} proteína). Por lo tanto se puede decir que las oxigenasas producidas por *A. niger*, bajo las condiciones estudiadas aquí, son enzimas inducidas y dependientes del cofactor NADH. En cuanto a la actividad mostrada por el extracto de biomasa crecida en FEL (EBFEL), comparada con la actividad del extracto de biomasa de *A. niger* crecida en FES (EBFES) se puede concluir que esta última es 5 veces mayor que la primera.

5.4 Estabilidad de las oxigenasas

En este apartado se describe el comportamiento de la actividad oxigenasa de los extractos enzimáticos libres de células, tanto de FES como de FEL, con el tiempo de almacenamiento y con el proceso de concentración. La actividad se midió por oximetría con hexadecano como sustrato. En la tabla 5.3 se presentan los resultados.

Como puede apreciarse en dicha tabla, el EBFEL pierde 50% de actividad en 2 días de almacenamiento a -20 °C y a los 6 días bajo las mismas condiciones prácticamente ha perdido la actividad oxigenasa. El EBFES pierde 74 % de actividad en 7 días bajo las mismas condiciones. El EBFEL pierde la actividad al concentrarse, mientras que el EBFES conserva un 21% de actividad. Después de la pérdida inicial de actividad del EBFES por almacenamiento o por concentración, la actividad oxigenasa se mantiene casi constante por lo menos 85 días.

De los resultados mostrados aquí se puede concluir que la actividad oxigenasa producida por *A. niger*, en FEL y en FES, usando hexadecano como inductor es bastante lábil y se pierde actividad con tratamientos como el almacenamiento a -20 °C o con el proceso de concentración a 10 °C. Varios autores han reportado la inestabilidad de oxigenasas, especialmente de hongos (Faber y col. 2001). El hecho de que el EBFES mantenga aproximadamente un 20 % de actividad durante 85 días no permite concluir que la(s)

enzima(s) obtenida(s) por FES sea(n) más estable(s) que la(s) obtenida(s) por FEL, simplemente que el EBFES tenía mayor actividad inicial que el EBFEL.

Tabla 5.3 Estudio de estabilidad de la actividad oxigenasa producidas por *A. niger* en cultivo sólido y en cultivo líquido.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	*Actividad específica nkat mg ⁻¹ proteína
Extracto de cultivo líquido con medio c 30 g L ⁻¹ glu, 5 g L ⁻¹ Hxd (EBFEL)	ninguno	0	0.24 ± 0.04 A
	Almacenamiento a -20 °C	2	0.12 ± 0.04 B
	Almacenamiento a -20 °C	6	0.10 ± 0.03 B
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C	0	0.07 ± 0.04 B
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C. Almacenamiento a -20 °C	84	0.06 ± 0.03 B
Extracto de cultivo sólido con medio f (50 g L ⁻¹ glu, 23.5 g L ⁻¹ Hxd) (EBFES)	ninguno	0	1.25 ± 0.22 C
	Almacenamiento a -20 °C	7	0.33 ± 0.16 A,D
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C. Almacenamiento a -20 °C	0	0.26 ± 0.01 D
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C. Almacenamiento a -20 °C	15	0.21 ± 0.03 A
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C. Almacenamiento a -20 °C	29	0.17 ± 0.04 A
	Concentración con membrana de diálisis y sacarosa a 8 °C. Almacenamiento a -20 °C	85	0.31 ± 0.09 A

* La actividad oxigenasa se midió por oximetría usando hexadecano como sustrato. Se presentan valores promedio ±DS (n=3). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

5.5 Especificidad de oxigenasas

Los extractos crudos obtenidos de FES oxidan sustratos alifáticos y aromáticos (Fig. 5.1A). Este tipo de extracto no tiene una especificidad significativamente diferente ($\alpha=0.05$) para sustratos de bajo peso molecular (pentano, hexano, heptano), de peso molecular medio (decano, hexadecano), ni de alto peso molecular (eicosano). Tampoco tiene diferencia de especificidad entre hidrocarburos lineales y ramificados (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano). Sin embargo, para los hidrocarburos aromáticos presenta una actividad significativamente mayor ($\alpha=0.05$) conforme el número de anillos se incrementa. Y el orden de actividad queda como benceno<antraceno<fenantreno<pireno. La actividad con tolueno fue similar a la de pireno.

La especificidad del extracto obtenido de FEL (Fig. 5.1B) no muestra un patrón determinado y se tiene actividad tanto con alifáticos como con aromáticos. Sin embargo hay sustratos con los cuales no muestra actividad, como es el caso del fenantreno y prácticamente con el hexano. Con el único sustrato que muestra actividad diferente significativamente es con el heptano.

Las actividades mostradas por el extracto de FES son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de las mostradas por el extracto de FEL. Las actividades de FEL son menores que las de FES por lo menos 7 veces.

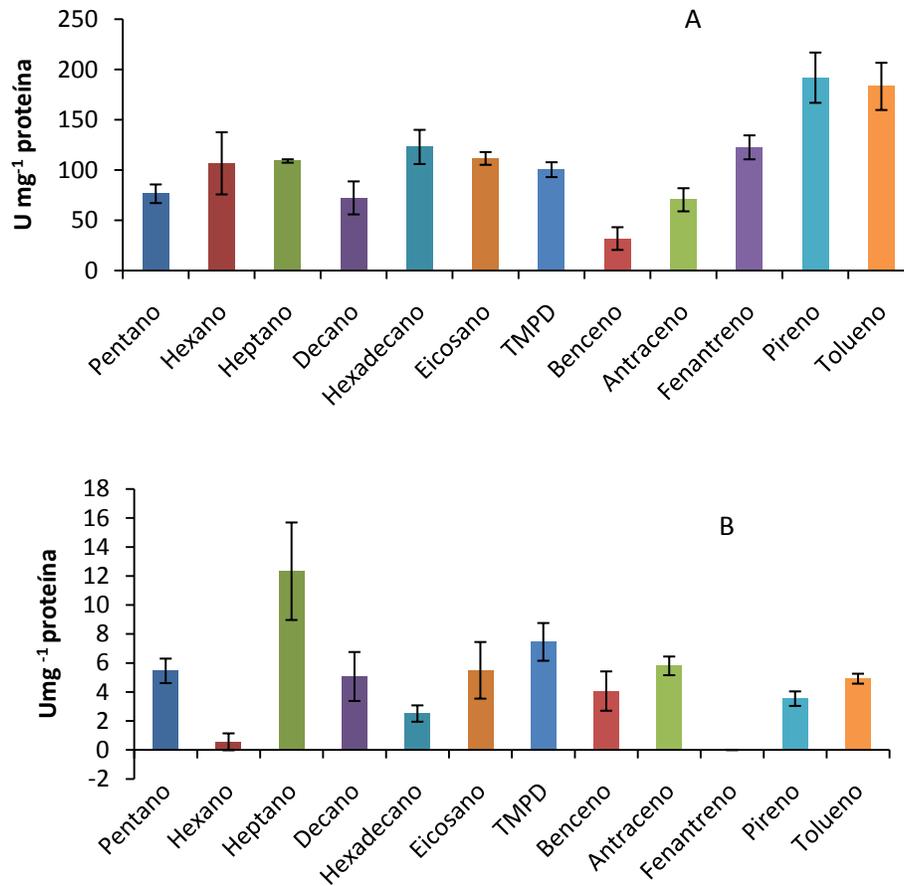


Figura 5.1 Actividad oxigenasa de extractos de biomasa de *A. niger* cultivado en FES (A) y en FEL (B). La actividad se cuantificó por un método espectrofotométrico con o-dianisidina usando diferentes sustratos, los cuales se indican en la figura (TMPD = 2,6,10,14 tetrametil-pentadecano). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que catalizará el consumo de 1 nmol de O₂ por segundo.

5.6 Efecto de la temperatura en la actividad de oxigenasa

En la Fig. 5.2 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad oxigenasa, para el extracto crudo obtenido de FES, a diferentes temperaturas.

De este análisis se encontró que hay dos temperaturas óptimas, una a 26 °C y la otra a 35 °C. Todas las actividades mostradas son diferentes significativamente ($\alpha=0.05$). Estos resultados muestran la dependencia de la actividad con la temperatura.

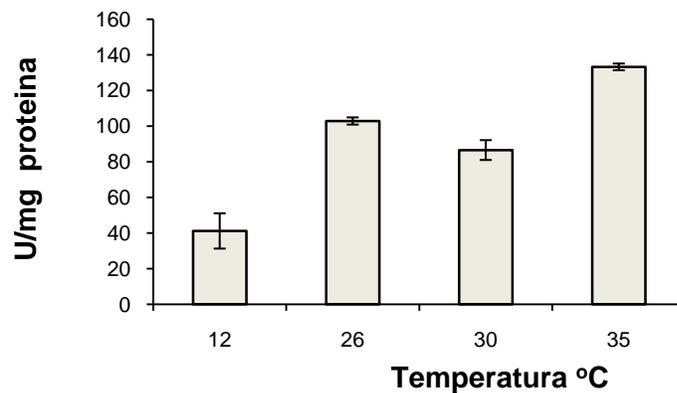


Figura 5.2 Efecto de la temperatura en la actividad oxigenasa. La actividad se midió por el método espectrofotométrico con o-dianisidina. Se usó extracto de FES con 58.6 μg de proteína por muestra. El substrato utilizado fue decano. Los valores mostrados son promedios de dos repeticiones.

Zazueta-Sandoval y col. (2003) no observaron diferencia en la actividad, de la oxigenasa extraída de una cepa desconocida de hongo, a 28 ó 37 °C. Faber y col. (2001) purificaron y caracterizaron una benzoato parahidroxilasa de *A. niger*, la cual es un citocromo P450 (CYP53A1). Sin embargo, ellos no reportaron ninguna temperatura óptima y todos sus estudios los hicieron a temperaturas menores de 28 °C. Vatsyayan y col. (2008) observaron que la temperatura óptima del citocromo P450 aislado de una cepa de *Aspergillus* era de 37 °C. Ellos reportan que la actividad decrece rápidamente a 40 °C y decrece más lentamente por debajo de 37 °C. Ellos no midieron la actividad debajo de 30 °C.

5.7 Análisis de proteínas con actividad oxigenasa

En la Fig. 5.3 se presentan los resultados obtenidos de la electroforesis (PAGE). Las líneas 1-3 se revelaron como zimogramas para detectar la actividad oxigenasa. Las muestras usadas en las líneas 1-3 correspondían a 63 μg de proteína contenidas en 100 μl de extracto de FES. Se montaron las mismas cantidades de proteína para extracto de FEL o en algunos casos hasta cuatro veces mayores. Sin embargo, con ninguno de los substratos probados, mostraron actividad (resultados no mostrados). Las líneas 1 a 3 muestran claramente la presencia de proteína con actividad oxigenasa.

Las líneas 4, 5 tienen 35 μg por pozo de extracto de FES y de FEL respectivamente. Y la línea MW St tiene una muestra de mezcla de proteínas estándar para determinación de peso molecular. Estas tres bandas se tiñeron para proteína. En la línea 4, a la altura en donde se presenta la actividad oxigenasa, se pueden observar dos bandas de proteína (a y b). Sin embargo, en la línea 5 pareciera que sólo se tiene la banda a.

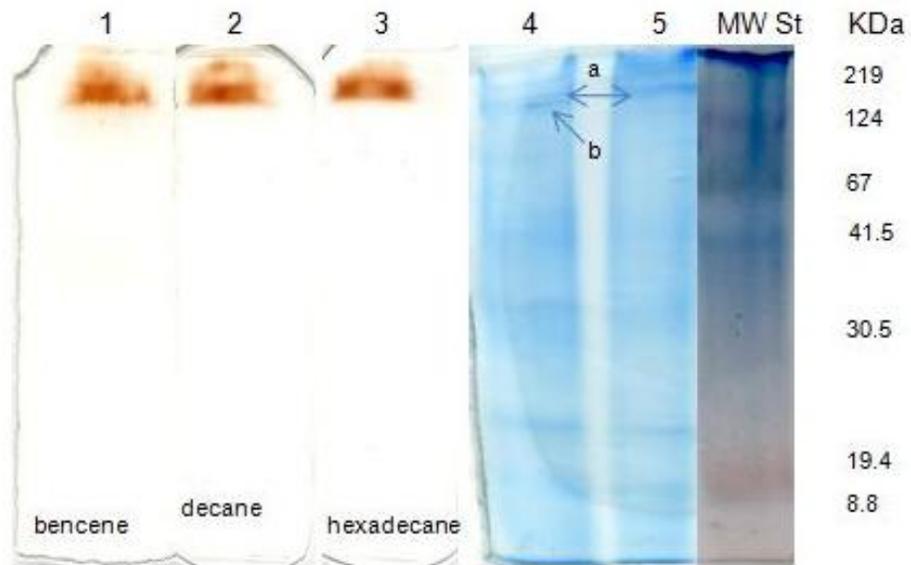


Figura 5.3 PAGE nativo en 6 % acrilamida. Líneas 1-3 se cargaron con extracto crudo de FES (63.5 μg de proteína por pozo). En las líneas 4 y 5 se montaron extractos crudos de FES y de FEL respectivamente (35 μg por pozo). Las muestras 1-3 se revelaron para actividad oxigenasa con los substratos indicados (zimogramas). Las muestras de los pozos 4 y 5 se revelaron con Coomasie R-250 (para detectar proteína). La última fila (MW St) corresponde a un estándar de pesos moleculares, los cuales se encuentran indicados a la derecha.

Los resultados mostrados en esta prueba se pueden explicar por la presencia de dos enzimas, una monooxigenasa y una dioxigenasa. Los substratos alifáticos serían hidroxilados por la monooxigenasa, en tanto que los aromáticos serían hidroxilados por ambas enzimas. Esta suposición explicaría la existencia de dos temperaturas óptimas.

Otra posibilidad es que se tenga un sistema de citocromo P450. Faber y col. (2001) han reportado una CYP53A1 y una NADH:citocromo P450 reductasa (CPR) de *A. niger*. La CYP53A1 tiene una sola banda de masa molecular aparente de 58 kDa y la CPR tiene también una sola banda de 78 kDa. Los autores no muestran los geles y además los geles son desnaturizados. Ellos no describen el comportamiento de esta enzima en un gel natural como es el usado en este trabajo. Vatsyayan y col. (2008) reportan un CYP de *Aspergillus terreus* que tiene una sola banda de 110 kDa, pero ellos también hicieron la determinación en un gel desnaturizado (SDS-PAGE). Por lo que pudiera tratarse de una proteína similar a la encontrada en este estudio.

Si se tiene un sistema de citocromo P450 también se puede explicar el por qué se tienen dos óptimos de temperatura. Se ha reportado que la mayoría de los citocromos P450 de hongos están formados de dos proteínas, una CYP y una (CPR), por lo tanto también cabe la posibilidad de tener dos óptimos de temperatura, si las dos enzimas tienen a su vez temperaturas óptimas diferentes. Y el hecho de que se tenga menor actividad del extracto de FEL pudiera explicarse por la menor concentración de una de estas enzimas.

En cuanto al comportamiento del extracto de FEL, éste coincide con lo reportado por García-Peña y col. (2008). Ellos reportan un zimograma para una oxigenasa producida por *P. variotti* en FEL con tolueno, en presencia y ausencia de glucosa. La enzima obtenida con glucosa presenta menor actividad que la obtenida sin glucosa, a pesar de que durante el cultivo ellos no observaron represión catabólica. Otra evidencia de que en líquido se tiene menor actividad que en sólido, lo demuestra lo publicado por Qi y col. (2002). Ellos comentan que Woertz y Kinney (2000) reportaron que *E. Lecanii-corni* no era capaz de degradar benceno en FEL, mientras que Qi y col.

encontraron, para la misma cepa, que si degradaba benceno en FES. El grupo de Qi no adjudica esta diferencia al tipo de cultivo, sino a las condiciones en las que se hicieron los experimentos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se demostró que en fermentación en estado sólido se producen oxigenasas, enzimas intracelulares, con mayores actividades y con una gama de especificidad más amplia, que las producidas en fermentación en estado líquido. La oxigenasa producida por *A. niger* con hexadecano como inductor presenta una mayor actividad con substratos aromáticos. Esta actividad es mayor entre mayor es el número de anillos del hidrocarburo.

Se demostró que en FEL el uso de glucosa con hexadecano aumenta la tasa de consumo de substrato, comparada con la tasa de consumo de substrato que se tiene cuando solamente se usa hexadecano como fuente de carbono. En FES también se obtuvo una tasa de consumo de substrato mayor con la mezcla glucosa-hexadecano, en base a carbono consumido.

El cálculo de la velocidad específica de consumo de substrato considerando solamente al hexadecano ($\text{g Hxd g}^{-1} \text{ X h}^{-1}$) demostró que la velocidad de consumo de hexadecano es mayor entre mayor es la concentración inicial de hexadecano, independientemente de la presencia o ausencia de la glucosa. Comparando las velocidades de consumo de hexadecano en FEL y en FES tomando, para esta comparación, los medios de cultivo en donde se tuvieron las mayores velocidades específicas de consumo se encontró que éstas son iguales en FEL y en FES, aunque en FEL el consumo de hexadecano no se da al 100 %.

El uso de glucosa con hexadecano también incrementó la velocidad específica de crecimiento, tanto en el sistema en líquido como en sólido, comparada con la velocidad que se tiene con hexadecano como única fuente de carbono.

Se demostró que la FES muestra una mayor tolerancia a la represión catabólica. Pues, aunque ésta se presente en un periodo de tiempo no muy largo, se puede desreprimir la enzima y la degradación del hidrocarburo se realiza a mayores velocidades que cuando se tiene el hidrocarburo solo.

Es necesario realizar aún bastante trabajo para identificar plenamente la(s) proteína(s) con actividad oxigenasa. Se recomienda realizar los zimogramas y las pruebas de actividad con diferentes substratos, usando un extracto crudo obtenido en FES con hexadecano como única fuente de carbono.

Para purificar la enzima tal vez sea necesario utilizar técnicas de clonación y de expresión. Aunque de acuerdo a lo reportado por Faber y col. (2001) ellos solamente pudieron aumentar 6 veces la actividad de la benzoato-p-hidroxilasa y de la CPR que purificaron. Por lo que con lo que se aumenta la actividad de la enzima en sólido puede ser suficiente para purificarla. Si esto pudiera lograrse sería un gran avance porque se ahorrarían muchos pasos.

También sería interesante estudiar las moléculas que actúan como señales para la represión catabólica y estudiar la represión catabólica por glucosa desde un punto de vista fisiológico y molecular, para entender mejor este proceso en hongos.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. A., Jia, Z. (2005). Structural and biochemical evidence for an enzymatic quinine redox cycle in *Escherichia coli* – Identification of a novel quinol monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 280, 8358-8363.
- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry.*, 36, 565-570.
- Alazard, D. y Raimbault, M. (1981). Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 12, 113-117
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology.* 4th ed. Wiley, New York.
- Arp, D. J., Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomas europea*. *Arch. Microbiol.* 178, 250-255
- Ayres, A., Dingle, J., Phipps, A., Reids, W. W. y Solomons, C. L. (1952). Enzymatic degradation of pectic acid and the complex nature of polygalacturonase. *Nature London* 170, 834-836.
- Bailey, M. A. M., Herrera, E. A. y Ruiz, H. J. (1997). Biología molecular de hongos de importancia agrícola. *Avance y perspectiva* 16, 27-36.
- Baldwin, T. O., Ziegler, M. M. (1992). The biochemistry and molecular biology of bacterial bioluminescence. In: Müller, F. (Ed.). *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes.* CRC Press, Boca Raton FL. pp. 467-530
- Barrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-Gonzalez, G. and Lopez, L. (1988). Penicillin production by solid state fermentation. En: *Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-industrial Raw Material*, (M. Raimbault, Ed.), Pp. 39-51. ORSTOM, Montpellier France

- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128-145.
- Black, S. D. y Coon, M. J. (1987). Cytochromes P450: structure and function. *Adv. Enzymol.* 60, 35-87.
- Bouchez-Naïtali, M., Blanchet, D., Bardin, V. and Vandecasteele, J. P. (2001). Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology*, 147, 2537-2543.
- Boyd, D. R. Sharma, N. D., Allen, C. C. R. (2001). Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 564-573.
- Budde, M., Maurer, S. C., Schmid, R. D. and Urlacher, V. B. (2005). Cloning, expression and characterization of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbio. Biotechnol.*, 66, 180-186.
- Bühler, B., Schimid, A., Hauer, B., Witholt, B., 2000. Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in *Escherichia coli* JM101. *J. Biol. Chem.* 275, 10085-10092.
- Burton, S. (2003). Oxidizing enzymes as biocatalysts. *TRENDS in Biotechnol.*, 21(12), 543-549.
- Córdova, J. (1994). Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa), México, D.F.
- Cresnar, B. y Petric, S. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 29-35.
- del Castillo, T. and Ramos, J. L. (2007). Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *J. Bacteriol.*, 189(18), 6602-6610.

- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C. and Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J. Ind. Microbio. Biotechnol.* 26(5), 271-275
- Deluca, M. E. and Hudlicky, T. (1990) Microbial oxidation of naphthalene derivatives. Absolute configuration of metabolites. *Tetrahedron Lett.*, 31, 13-16
- Dilly, O. (2001). Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biol. & Biochem.*, 33, 117-127.
- Duetz, W. A. (2001). Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 419-425.
- Entsch, B. (1990). Hydroxybenzoate hydroxylase, en: Lidstrom, M. E. (Ed.). *Methods in Enzymology. Academic Press.* San Diego, CA. pp. 138-147
- Espinel-González, A. E. (1996). Estudio de la represión catabólica por glucosa en *Candida utilis*. Tesis doctoral, Universidad complutense de Madrid.
- Faber, B.W., van Gorcom, R. F. M., and Duine, J. A. (2001). Purification and characterization of benzoate-para-hydroxylase, a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochem. and Biophysics.* 394(2), 245-254. doi: 10.1006/abbi.2001.2534.
- Fang, J. M. (1995). Enzymes in organic synthesis: oxidoreductions. *J. Chem. Soc.*, 967-977.
- Feingersch, R., Shainsky, J., Wood, T. K., Fishman, A., 2008. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of chiral sulfoxides. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1555-1566.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, Z., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., wang, L. (2007). Genome and protome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5602-5607

- Fetzner, S. (2002). Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 243-257.
- Finnerty, W. R. (1977). The biochemistry of microbial alkane oxidation: new insights and perspectives. *Trends Biochem. Sci.*, 2, 73-75.
- Fisher, M. T. y Sligar, S. G. (1987). Temperature jump relaxation kinetics of the P450cam spin equilibrium. *Biochem.* 26(15), 4797-4803.
- Fitzpatrick, P. F., 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 355-381
- Fontana, R.C. and Moura da Silveira, S.S.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 371-377.
- Fruetel, J. A., Mackman, R. L., Peterson, J. A. y Ortiz de Montellano, P.R. (1994). Relationship of active site topology to substrate specificity for cytochrome P450_{terp} (CYP108). *J. Biol. Chem.*, 269, 28815-28821.
- Gadda, G. y Francis, K., (2010). Nitronate monooxygenase, a model for anionic flavin semiquinone intermediates in oxidative catalyst. *Arch. Biochem. Biophys.* 493,53-61
- Gallagher, S. C., Cammark, R., Dalton, H., (1997). Alkene monooxygenase from *Nocardia coralline* B-276 is a member of the class of dinuclear iron proteins capable of stereospecific epoxidation reactions. *Eur. J. Biochem.* 247, 635-641.
- García-Peña, E. I. (2002). Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. Metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
- García-Peña, I., Ortiz, I., Hernández, S. y Revah, S. (2008). Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 442-447.
- Green, J. y Dalton, H. (1989). Substrate specificity of soluble methane monooxygenases. Mechanistic Implications. *J. Biol. Chem.* 264, 17698-17703

- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S. y Favela-Torres, E. (1995). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Letters*. 17, 219-224.
- Hagedorn, S. y Kapehammer, B. (1994). Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 773-800.
- Harayama, S. y Kok, M. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565-601
- Holland, H. L. (1992). Organic Synthesis Oxidative Enzymes, VCH Publishers, pp 5-40
- Holland, H. L. y Weber, H. K. (2000). Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 547-553.
- Kamerbeek, N. M., Janssen, D. B., van Berkel, W. J. H. y Fraaije, M. W. (2003). Baeyer-Villiger monooxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.* 345, 667-678.
- Kemp, G. D., Dickinson, M. F., y Ratledge, C. (1994). Occurrence of fatty alcohol oxidase in alkane and fatty-acid-utilizing yeast and moulds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 873-875.
- Kumar, P. K. R. y Lonsane, B. K. (1987). Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 267-271.
- Laden, B. p., Tang, Y. Z., Porter, T. D. (2000). Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 381-388
- Laemmli , V. K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laskin, A. y Lechevalier, H. (1977). Organismic microbiology. En: Handbook of Microbiology, CRC Press, USA.

- Leahy, J. G., Batchelor, P. J., Morcomb, S. M. (2003). Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 449-479
- Lee, S. W., Keeney, D. R., Lim, D. H., Dispirito, A. A., Semrau, J. D., 2006. Mixed pollutant degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing either soluble or particulate methane monooxygenase: can the tortoise beat the hare? *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7503-7509.
- Legisa, M. and Mattey, M. (1988). Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of the citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 33-36
- Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.
- Levin, E. Y., Levenberg. B., Kaufman, S. (1960). Enzymatic conversion of 3, 4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.* 235, 2080-2086
- Li, S., Podust, L. M., Sherman, D. H. (2007). Engineering and analysis of a self-sufficient biosynthetic cytochrome P450 PikC fused to the RhFRED reductase domain. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12490-12941
- Lisowska, K., Szemraj, J., Rozalska, S. y Dlugonski, J. (2006). The expression of cytochrome P-450 and cytochrome P-450 reductase genes in the simultaneous transformation of corticosteroids and phenanthrene by *Cunninghamella elegans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 175-180.
- Merkel, G. J. y Perry, J. J. (1977). Increased cooxidative biodegradation on malathion in soil via cosubstrate enrichment. *J. Agric. Food Chem* 25, 1011-1012.
- Merkx, M., Koop, D. A., Sazinsky, M. H., Blazyk, J. L., Mülles, J., Lippard S. J. (2001). Dioxygenactivation and methanes hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2782-2807

- Miethe, D., Riis, V., Babel, W. (1994). The relationship between the microbial activity of the autochthonous microorganisms of pristine and contaminated soils and their potential for the degradation of mineral oil hydrocarbons. *Acta Biotechnol.* 14, 131-140.
- Murrel, J. C., Gilbert, B., McDonald, I. R. (2000). Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* 173, 325-332
- Nakatsu, C. h., Straus, N. A. and Wyndham, R. C. (1995). The nucleotide sequence of the Tn5271 3-chlorobenzoate 3,4-dioxygenase genes (cbaAB) unites the class IA oxygenases in a single lineage. *Microbiol.*, 141, 485-495
- Nebert, D. W. y Gonzalez F. J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem.* 56, 945–993.
- Nelson, D. R., Koymans, L. Kamataki, t., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. (1996). P450 Superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.
- Nieboer, M., Kingma, J., Witholt, B., (1993). The alkane oxidation system of *Pseudomonas oleovorans*: induction of the alk genes in *Escherichia coli* W3110 (pGEC47) affects membrane biogenesis and results in overexpression of alkane hydroxylase in a distinct cytoplasmic membrane subfraction. *Mol. Microbiol.* 8, 1039-1051
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003). *Bioreaction Engineering Principles*, segunda ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 56
- Noordman, W. H., Wachter, J. H., de Boer, G. J., Janssen, D. B. (2002). The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *J. Biotechnol.*, 94, 195-212.
- Norton, C. F. (19881). The fungi. En: *Microbiology*. Ed. Addison Wesley.137-187.

- Panke, S., Meyer, A., Huber, C. M., Witholt, B., y Wubbolts, M. G. (1999). An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals. *Applied and Environm. Microbiol.* 65, 2324-2332.
- Parales, R. E. and Resnick, S. M. (2000). Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. En: *Pseudomonas Volume 4 Molecular Biology of Emerging Issues* (J-L Ramos y R. C. Levesque, eds), Pp287- 340. CSIC, Granada.
- Pikus, J. D., Studts, J. M., Achim, C., Kauffmann, K. E., Münch, E., steffan, R. J., McClay, K., Fox, B. G. (1996). Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex. *Biochemistry* 35, 9106-9119.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Porter, T. D., Coon, M. J. (1991). Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266, 13469-13472.
- Prenafeta-Boldu, F. S., Vervoort, J., Grotenhuis, J. T. C., van Groenestijn, J. W. (2002). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora sp.* strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2660-2665
- Ramesh, M. V. and Lonsane, B. K. (1991). Ability of solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 591-593.
- Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J. (2002). Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus sp.* *J. Bacteriol.* 184, 3898-3908
- Robinson, T. y Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 197-203.
- Roussos, S. and Perraud-Gaime, I. (1996) Physiology and biochemistry of microorganisms used in solid state fermentation processes. En: *Fronteras en Biotecnología y*

- Bioingeniería. Ed Enrique Galindo. Cuernavaca Morelos, Mex.
http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_45-46/010006834.pdf
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., AECkersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. W., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature* 372, 455-458.
- Sakai, Y., Maeng, J. H., Kubota, S., Tani, A., Tani, Y., y Kato, N. (1996). A non conventional dissimilation pathway for long chain n-alkanes in *Acinetobacter sp.* M-1 that starts with dioxygenase reaction. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 31(4), 286-291.
- Sánchez de Mirt, A. (2008). Estructura subcelular de los hongos. Atlas de micología, <http://atlasdemicologia.blogspot.com>
- Staijen, I. E., Hatzimanikatis, V., Witholt, B. (1997). The AlkB monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans*-synthesis, stability and level in recombinant *Escherichia coli* and the native host. *Eur. J. Biochem.* 244, 462-470.
- Staijen, I. E., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2000). Expression, stability and performance of the three-component alkane monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans* in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 267, 1957-1695.
- Scow, K. M., Schmidt, S. K. and Alexander, M. (1989). Kinetics of biodegradation of mixtures of substrates in soil. *Soil Biol. Biochem.* 21, 703-708.
- Schmidt, S. K., Scow, K. M. and Alexander, M. (1987). Kinetics of p-nitrofenol mineralization by a *Pseudomonas sp.*: effects of second substrates. *Appl. environment. Microbiol.*, 53(11), 2617-2623.
- Shen, B., Hutchinson, C. R., 1993. Tetracenomycin F1-monooxygenase – Oxidation of a naphthacene to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin-C in *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry* 32, 6656-6663.

- Sluis, M. K., Sayavedra-Soto, L. A. y Arp, D. J. (2002). Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from *Pseudomonas butanovora*. *Microbiology*, 148, 3617-3629.
- Schmidt, S. K. y Alexander, M. (1985). Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 822-827.
- Solís-Pereira, S.E., Favela-Torres, E., Viniegra-Gonzalez, G., Gutierrez-Rojas, M. (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* CH₄ in submerged and absorbed substrate fermentation. *Appl. Microb. Biotechnol.* 39(1), 36-41.
- Soto-Cruz, O. (2002). Contribución al estudio de la fisiología y el metabolismo de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. Uso de modelos no estructurados y análisis de flujos metabólicos. Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F.
- Staijen, I. E., Hatzimanikatis, V., Witholt, B., 1997. The AlkB monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans*-synthesis, stability and level in recombinant *Escherichia coli* and the native host. *Eur. J. Biochem.* 244, 462-470.
- Sun, A. K. and Wood, T. K. (1997). Trichloroethylene mineralization in a fixed-film bioreactor using a pure culture expressing constitutively toluene ortho-monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.*, 55(4), 674-685.
- Suske, W. A., Held, M., Schmid, A., Fleischmann, T., Wubbolts, M. G. y Kohler, H. P. E. (1997) Purification and characterization of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a novel NADH-dependent, FAD-containing aromatic hydroxylase from *Pseudomonas azelaica* HBP1. *J. Biol. Chem.* 272, 24257-24265.
- Sutton, W. B. (1957). Mechanism of action and crystallization of lactic oxidative decarboxylase from *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 226, 395-405

- Taguchi, H., Armarego, W. L. F. (1998). Glyceryl-ether monooxygenases [EC 1,14,16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. *Med. Res. Rev.* 18, 43-89
- Taylor, D. G., Trudgill, P. W. (1986). Camphor revisited – studies of 2.5 – diketocamphane 1, 2 – monooxygenase from *Pseudomonas putida* ATCC 17453. *J. Bacteriol.* 165, 489-497
- Torres Pazmiño, D. E., Baas, J. B., Janssen, D. B., Fraaije, M. W. (2008). The kinetic mechanism of phenylacetone monooxygenase from *Thermobifidafusca*. *Biochemistry* 47, 4082-4093
- Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., Glieder, A., and Fraaije, M. W. (2010). Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 146, 9-24.
- Treviño, L., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, C. N. (2007). Effects of polyurethane matrices on fungal tannase and gallic acid production under solid state cultura. *J. Zheijang Univ. Sci B*, 8(10), 771-776.
- Trinder, P. (1969). *Ann Clin Biochem.* 6, 24-33. Citado por Spinreact (<http://www.idcca.com/images/sustratos/glucosa.pdf>).
- Ulloa, M. y Hanlin, R. (1978). Atlas de micología básica. Editorial Concepto, S. A. México.
- van Beilen. J. B., Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation, *Appl. Microbiol.* 74, 13-21
- van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., Fraaije, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 670-689
- van den Brink, J. M., Punt, P. J., van Gorcom, R. F. M. y van den Hondel, C. A. M. J. J. (2000). Regulation of expression of the *Aspergillus niger* benzoate para-hydroxylase cytochrome P450 system. *Mol. Gen. Genet.*, 263, 601-609.

- Van den Heuvel, R. H. H., Tahallah, N., Kamerbeek, N. M., Fraaije, M. W., van Berkel, W. J. H., Janssen, D. B., Heck, A. J. R. (2005). Coenzyme binding during catalysis is beneficial for the stability of 4-hydroxyacetophenone monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 280, 32115-32121.
- van der Werf, M. J. (2000). Purification and characterization of a Beyer-Villiger monooxygenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 involved in three different monocyclic monoterpene degradation pathways. *Biochem. J.* 347, 693-701
- van Wetter, M. A., Wöster, H. A. B. y Wessels, J. G. H. (2000). SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Molecular Microbiol.*, 36 (1), 201-210.
- Vatsyayan, P., Kiran Kumar, A., Goswami, P. and Goswami, P. (2008). Broad substrate cytochrome P450 monooxygenase activity in the cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Bioresource Technology.*, 99, 68-75.
- Viniegra-González, G., (1997). Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. En: *Advances in solid state fermentation*. Eds. S. Roussos, B. K. Lonsane. Kluwer Academic Publishers.
- Viniegra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E., 2006, Why solid state fermentation seems to be resistant to catabolite repression?, *Food Technology and Biotechnology*, 44, 397-406.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gómez, S. J., Díaz-Godínez, G. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation Systems. *Biochem. Eng. Journal* 13, 157-167.
- Viniegra-González, G., Minjares, A., Loera, O., Sánchez, C., and Aguirre, J. (1993). Evaluación morfológica de cepas de hongos resistentes a la desoxiglucosa. *Biotechnología*, 3 (1-2), 93-102.
- Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity and structure function relationships of insect luciferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1833-1850

- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.*, 87, 81-86.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. *Bioresource Technol.*, 97, 1583-1591.
- Wang, K., W., Baltzis, B. C. and Lewandowski, G. A. (1996). Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose. *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1), 87-94
- Wainwright, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. (1992). Ed. Acribia S. A., España.
- Waller, B. J., Lipscomb, J. D. (1996). Dioxygen activation by enzymes containing binuclear non-heme iron clusters. *Chem. Rev.* 96, 2625-2657
- Waxman, D. J. y Azaroff, L. (1992). Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression. *Biochem. J.*, 281, 577-592.
- Werlen, C., Kohler, H. P., and van der Meer, J. R. (1996). The broad substrate chlorobenzene dioxigenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain P51 are linked evolutionary to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J. Biol. Chem.*, 271, 4009-4016
- Whited, G. M. y Gibson, D. T. (1991). Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* 173, 3010-3016.
- White-Stevens, R. H. y Kamin, H. (1972). Studies of a flavoprotein, salicylate hydroxylase. 1. Preparation, properties and uncoupling of oxygen reduction from hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 247, 2358-2370
- Wu, R. R., Dang, Z., Yi, X. Y., Yang, C., Lu, G. N., Guo, C. L. and Liu, C. Q. (2011). The effects of nutrient amendment on biodegradation and cytochrome P450 activity of an

- n-alkane degrading strain of Burkholderia sp. GS3C. *J. of Hazardous Materials*, 186, 978-983.
- Wunder, T., Kremer, S., Sterner, O., y Anke, H. (1994) Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Appl Environ Microbiol* 42, 636–641.
- Xu, F., (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1(1), 38-50. doi:10.1089/ind.2005.1.38
- Yu, Y., Ramsay, J. A., Ramsay, B. A., 2009. Production of soluble methane monooxygenase during growth of *Methylosinus trichosporium* on methanol. *J. Biotechnol.* 139, 78-83.
- Zaidi, B. R., Mehta, N. K., Imam, S. H. y Greene, R. V. (1996). Inoculation of indigenous and non-indigenous bacteria to enhance biodegradation of p-nitrophenol in industrial wastewater: effect of glucose as a second substrate. *Biotechnol. Letters*, 18 (5), 565-570.
- Zazueta-Sandoval, R., Zazueta-Novoa, V., Silva-Jimenez, H. and Cabrera-Ortiz, R. (2003). A different Method of Measuring and detecting mono- and dioxygenase activities. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 105(108), 725-736.
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W. and Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Letters*, 16(6), 643-648.
- Ziegler, D. M. (2002). An overview of the mechanism, substrate specificities and structure of FMOs. *Drug Metab. Rev.* 34, 503-511

ANEXOS

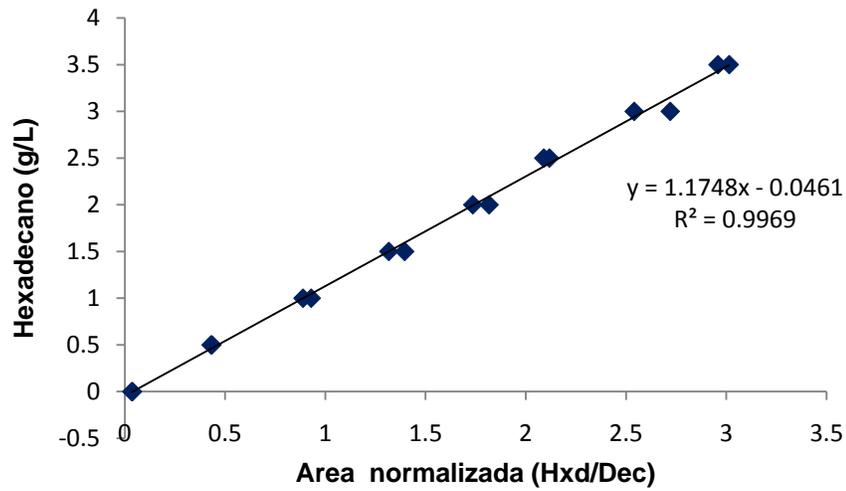
Anexo A. Cálculos y calibraciones**Anexo A.1. Curva de calibración de hexadecano con decano como estándar interno**

Figura A.1.1 Curva de calibración de hexadecano. (Cromatógrafo de gases Perkin Elmer autosystem XL). $Y = 1.1748x - 0.0461$, $R^2 = 0.997$

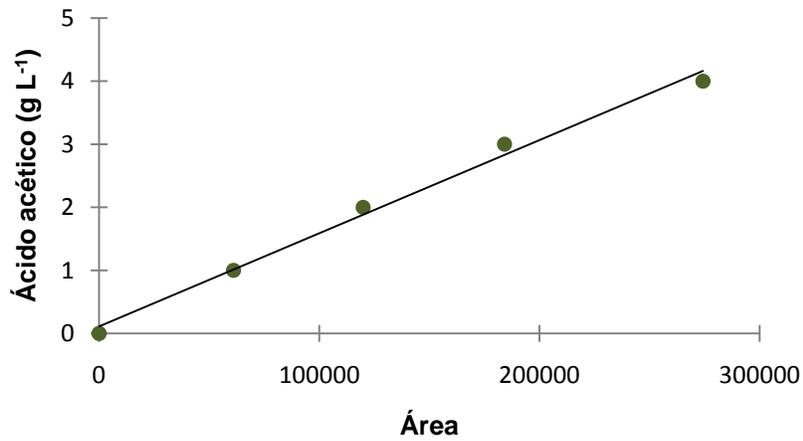
Anexo A.2. Curvas de calibración y Cromatogramas de HPLC

Figura A.2.1 Curva de calibración de ácido acético. (Cromatógrafo HPLC, Perkin Elmer mod-250). $Y = 1E-05x+0.1114$, $R^2 = 0.992$

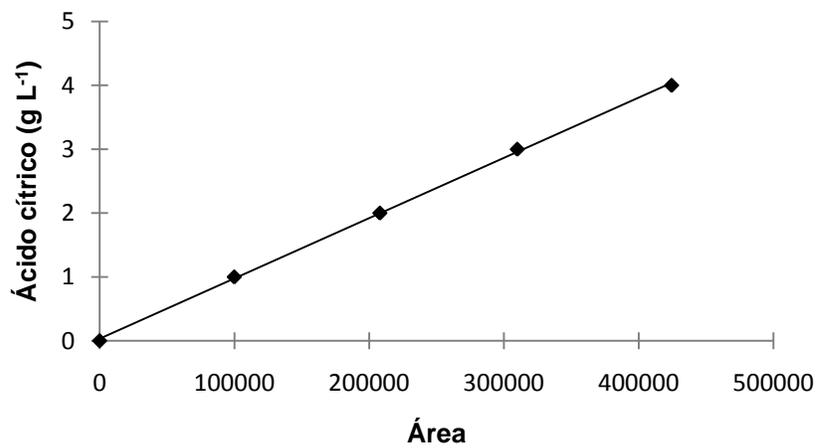


Figura A.2.2 Curva de calibración de ácido cítrico. (Cromatógrafo HPLC, Perkin Elmer mod-250). $Y = 9E-06x+0.0325$, $R^2 = 1.0$

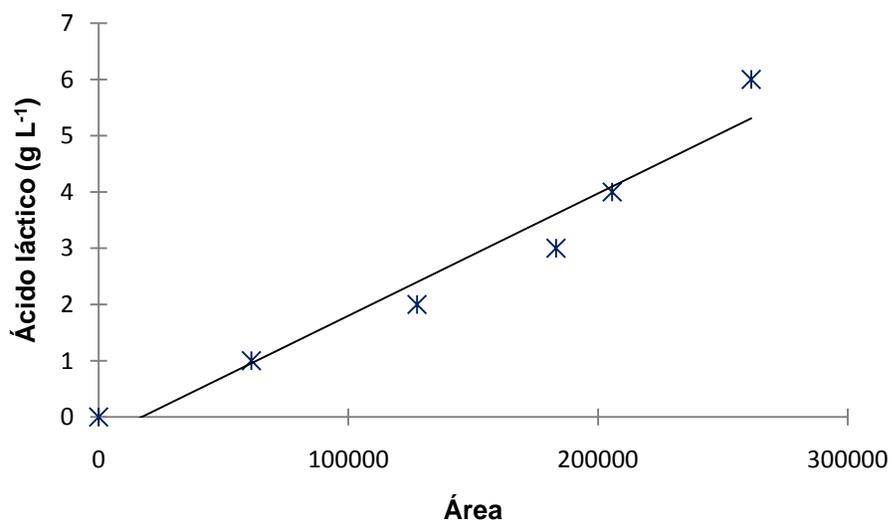


Figura A.2.3 Curva de calibración de ácido láctico. (Cromatógrafo HPLC, Perkin Elmer mod-250). $Y = 2E-05x - 0.3742$, $R^2 = 0.950$

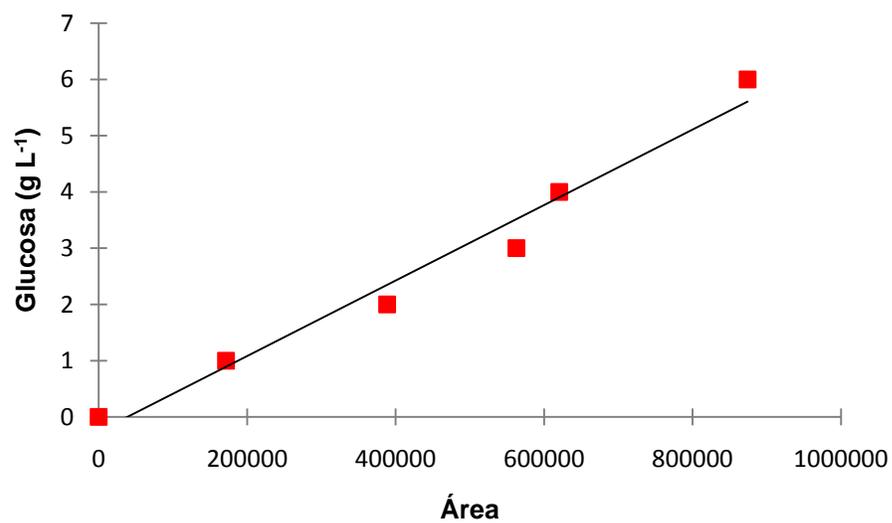


Figura A.2.4 Curva de calibración de glucosa. (Cromatógrafo HPLC, Perkin Elmer mod-250). $Y = 7E-06x - 0.26$, $R^2 = 0.973$

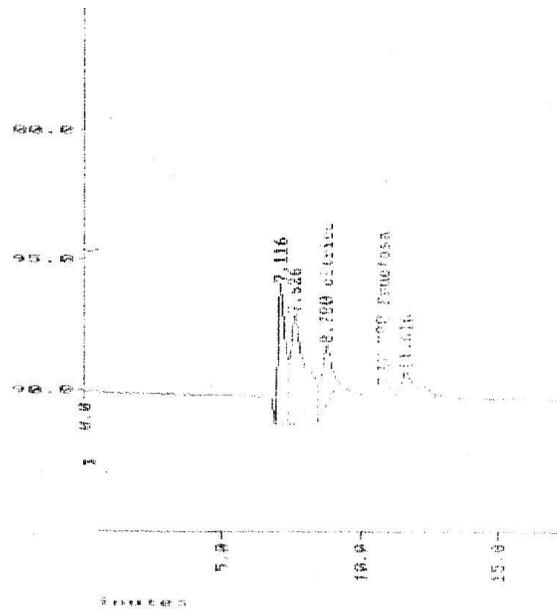


Figura A.2.5 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo e ($94.162 \text{ gL}^{-1} \text{ Hxd}$) a las 160h

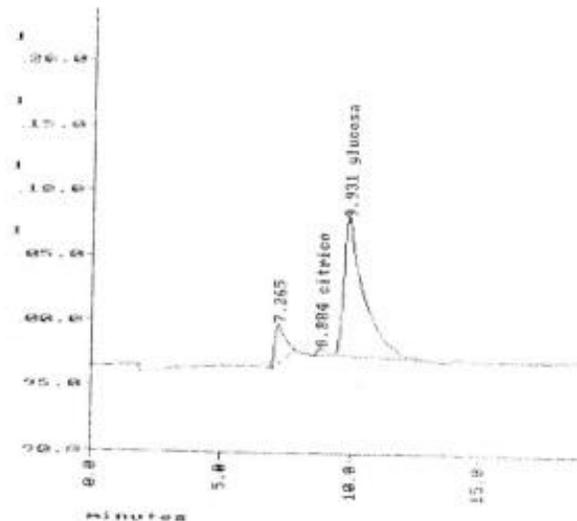


Figura A.2.6 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo f ($23.5 \text{ gL}^{-1} \text{ Hxd}$, $50 \text{ gL}^{-1} \text{ Glu}$) a las 13.5h

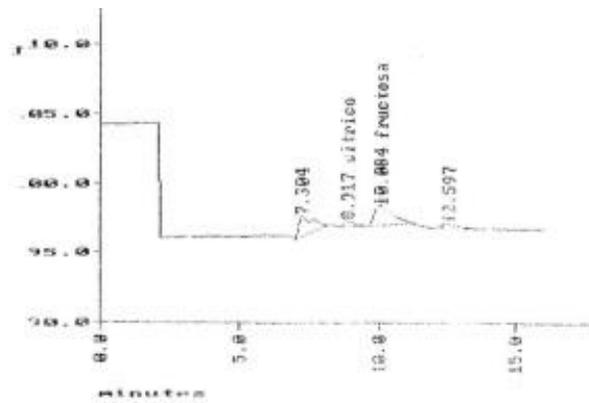


Figura A.2.7 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo f ($23.5 \text{ gL}^{-1} \text{ Hxd}$, $50 \text{ gL}^{-1} \text{ Glu}$) a las 20h

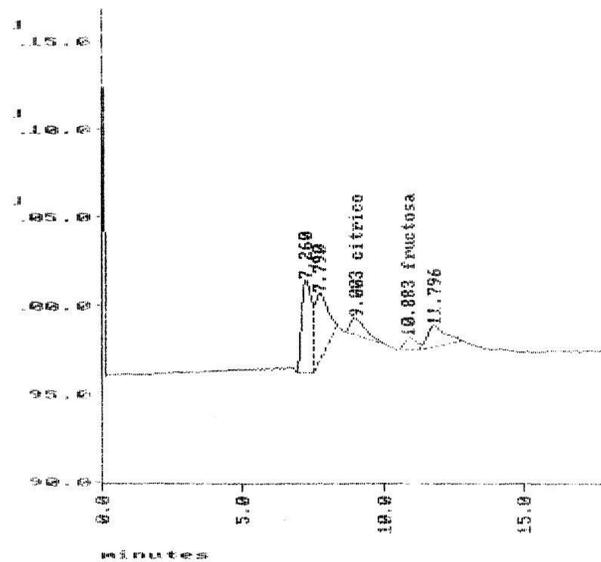


Figura A.2.8 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo g ($47.1 \text{ gL}^{-1} \text{ Hxd}$, $100 \text{ gL}^{-1} \text{ Glu}$) a las 35h

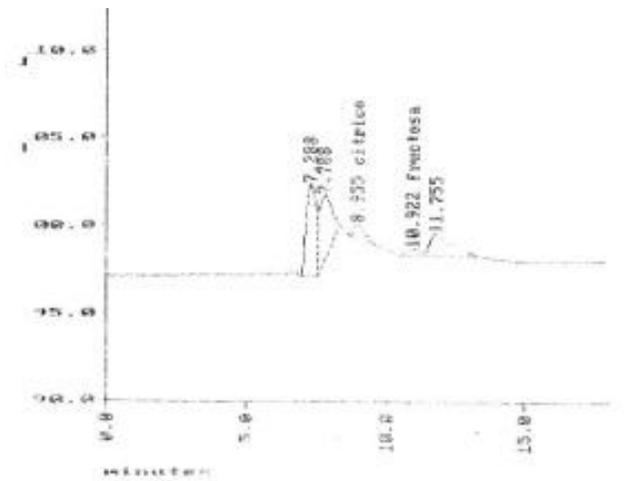


Figura A.2.9 Cromatograma de metabolitos solubles formados durante la fermentación en FES con el medio de cultivo g ($23.5 \text{ gL}^{-1} \text{ Hxd}$, $50 \text{ gL}^{-1} \text{ Glu}$) a las 60h

Anexo A.3. Cálculo de actividad oxigenas con células en reposo

A continuación se presentan los datos de consumo de oxígeno por células de *Aspergillus niger* en estado de reposo. El consumo de oxígeno en ausencia de hidrocarburo (Figura A.3.1) corresponde a la respiración endógena (RE). La biomasa usada en estos experimentos se cosechó a las 48, 72 y 120 h. El medio usado para crecer la biomasa fue el medio de cultivo *f* ($50 \text{ g L}^{-1} \text{ Glu}$, $23.5 \text{ g L}^{-1} \text{ Hxd}$). Los datos obtenidos fueron ajustados por regresión lineal. A la derecha de cada curva se presenta la ecuación correspondiente a cada serie de datos, así como el factor de correlación.

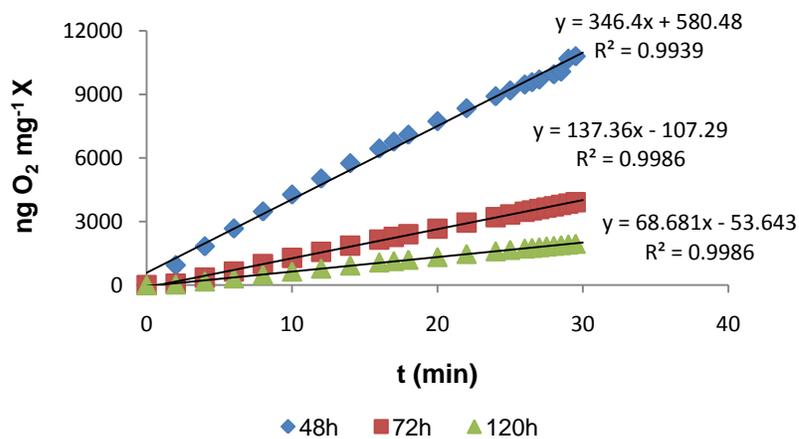


Figura A.3.1 Consumo de oxígeno por células de *A. niger* en ausencia de hidrocarburo (respiración endógena)

En la Figura A.3.2 se muestran los resultados del consumo de oxígeno por células en reposo de *A. niger* en presencia de hidrocarburo. Este consumo de oxígeno se debe tanto al consumo endógeno por la biomasa como al consumo de oxígeno por la oxigenasa (RS). La biomasa se obtuvo de la misma manera que para el análisis de la respiración endógena.

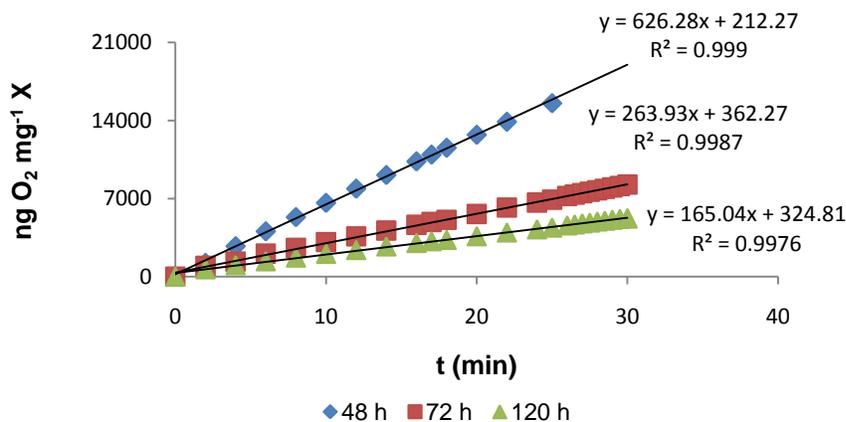


Figura A.3.2 Consumo de oxígeno por células de *A. niger* en presencia de hidrocarburo (RS)

En la Figura A.3.3 se observan los resultados del consumo de oxígeno debido a la actividad oxigenasa. Para obtener estos resultados se restaron los consumos de oxígeno por respiración endógena (Fig. A.3.1) a los consumos de oxígeno por respiración en presencia de sustrato (Fig. A.3.2). Las pendientes de cada una de las líneas se usó para el cálculo de las tasas de consumo de oxígeno presentadas en la Tabla 5.1.

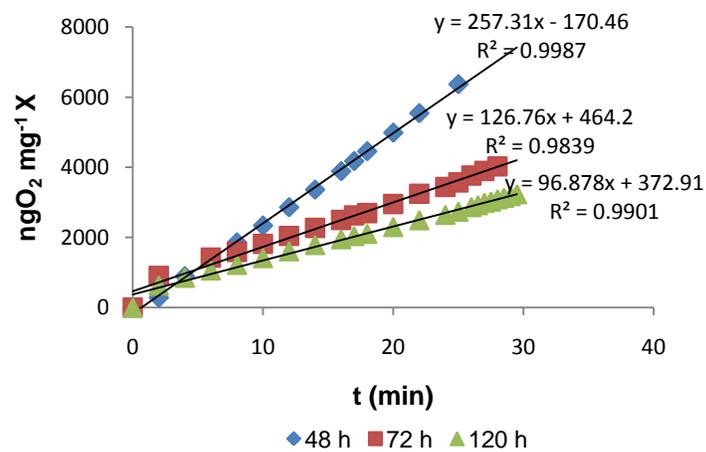


Figura A.3.3 Consumo de oxígeno por oxigenasa presente en biomasa de *A. niger*

Anexo A.4. Cálculo de actividad oxigenasa por oximetría con extracto enzimático

Cálculo de oxígeno disuelto

% de O ₂ en el aire		0.21			
Presión en el DF		0.77 atm			
Presión parcial de O ₂		0.1617			
Densidad del agua		1000 g/L (55.56 mol/L)			
Temperatura (°C)	Constante de Henry (H) Fracción mol líquidoAtm ⁻¹)	P parcial de Oxígeno (atm)	Fracción mol	Concentración (mol L ⁻¹)	Concentración (mg L ⁻¹)
0	2.55E+04	0.1617	6.34E-06	3.52E-04	11.3
10	3.27E+04	0.1617	4.94E-06	0.00027472	8.79102956
20	4.01E+04	0.1617	4.03E-06	0.00022402	7.1687448
30	4.75E+04	0.1617	3.40E-06	0.00018912	6.05192982
40	5.32E+04	0.1617	3.04E-06	0.00016886	5.40350877

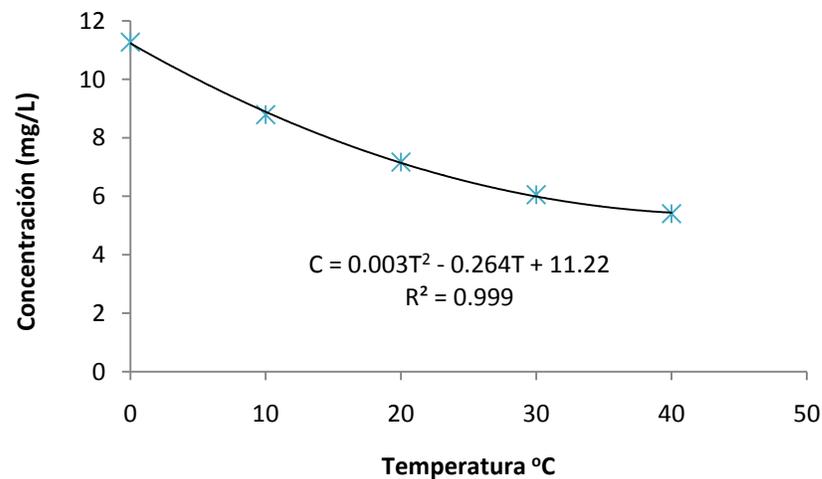


Figura A.4.1 Concentraciones de O₂ en saturación (mg L⁻¹)

Para calibrar el sensor de oxígeno disuelto se tomó la lectura en mV al 100 % de saturación de oxígeno. Con ese dato en mV y con el valor de concentración de saturación de oxígeno de la curva de la Figura A.4.1 se traza una curva de concentración de oxígeno vs mV. Por ejemplo, para una lectura máxima de 921 mV a 30 °C, al 100 % de saturación se tendrían los siguientes datos:

Concentración de O ₂ (mg L ⁻¹)	mV
0	0
6.05	921

De esta gráfica se obtiene una pendiente de 0.0066. Este valor se usa para hacer el cálculo de consumo de O₂ disuelto como se muestra en la siguiente ecuación

$$\frac{nmolO_2}{s} = \frac{14.899mV}{min} * \frac{0.0066mgO_2}{mVL} * 0.0004L * \frac{0.0016L}{0.0004L} * \frac{1x10^6nmol}{1mmol} * \frac{1min}{60s} = 75.71 \frac{nmolO_2}{s}$$

$\frac{31.25mgO_2}{mmolO_2}$

Este cálculo se hace para la muestra con sustrato y sin sustrato y la actividad de oxigenasa estará dada por la diferencia entre la muestra con sustrato y la muestra sin sustrato.

Anexo A.5. Curva de calibración de actividad peroxidasa

Para realizar la curva de calibración de actividad peroxidasa se siguió el procedimiento descrito en la Tabla A.5.1

Tabla A.5.1. Procedimiento para la elaboración de la curva peroxidasa

Reactivo A: 1.2 ml de regulador Tris-HCl, 50mM, pH 8.5 + 10 μ L de o-dianisidina al 1% en HCl 0.025M				
Reactivo B: peroxidasa al 0.4 % en Tris-HCl, pH8.5				
Número de Tubo	Tris-HCL 50 mM, pH 8.5 (μ l)	H ₂ O ₂ (μ g)	Reactivo A (μ l)	Reactivo B (μ l)
Blanco	218	0	778	4
1	208	10	778	4
2	208	10	778	4
3	198	20	778	4
4	198	20	778	4
5	178	40	778	4
6	178	40	778	4
7	158	60	778	4
8	158	60	778	4
Después de adicionar la peroxidasa se dejan los tubos incubando a temperatura ambiente, hasta que hay coloración, aproximadamente 10-15 min. Al término de este tiempo se mide la absorbancia a 460 nm.				

Los resultados de este ensayo aparecen en la Figura A.5.1

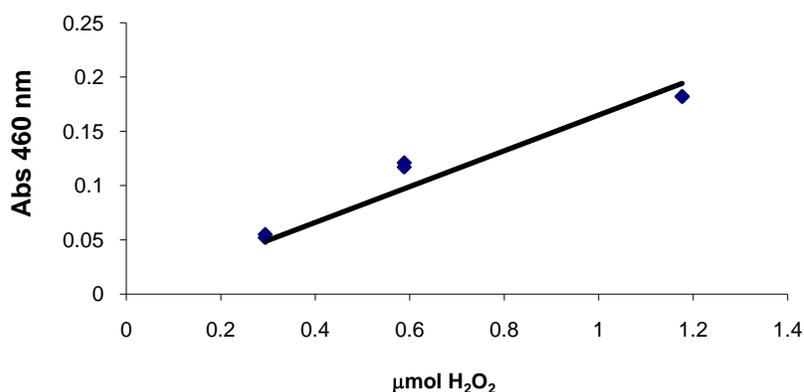


Figura A.5.1 Curva de calibración de peroxidasa (Cromatógrafo UV-visible Shimadzu). $Y = 0.1651x$, $R^2 = 0.9202$

Anexo A.6 Cálculo de actividad oxigenasa por el método espectrofotométrico

En la Figura A.6.1 se presentan los resultados de la absorbancia a 460 nm de muestras de estándar, decano y de pireno, durante la reacción con o-dianisidina bajo las condiciones descritas en la sección 3.10.6.2. Las absorbancias obtenidas se ajustaron a una línea recta. A los valores de las pendientes de las muestras de pireno y de decano se les restó el valor de la pendiente del estándar. Los valores resultantes de la substracción se transformaron a Abs/mg de proteína x min y se usaron para interpolarlos en la curva de calibración de peroxidasa para calcular los nmol de O_2 consumidos como se muestra a continuación.

Substrato	Abs/s	Abs/min	Abs/mg min	nmol O_2 /mgprot min
Decano	$1\text{E-}05 - 1\text{E-}06 = 9.00\text{E-}06$	$9.00\text{E-}06 \times 60$	$5.40\text{E-}04 / 0.0354$	$1.53\text{E-}02 / 0.165 = 9.24\text{E-}02$
Pireno	$2\text{E-}05 - 1\text{E-}06 = 1.90\text{E-}05$	$1.90\text{E-}05 \times 60$	$1.14\text{E-}03 / 0.0354$	$3.22\text{E-}02 / 0.165 = 1.95\text{E-}01$

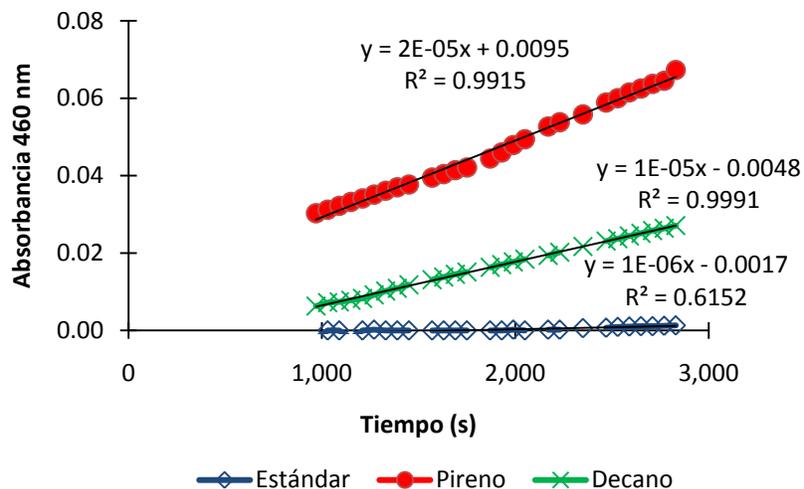


Figura A.6.1 Resultados de la reacción de una muestra estándar, una de decano y una de pireno con ortodinisidina.

Anexo A.7 Curva de calibración de proteína

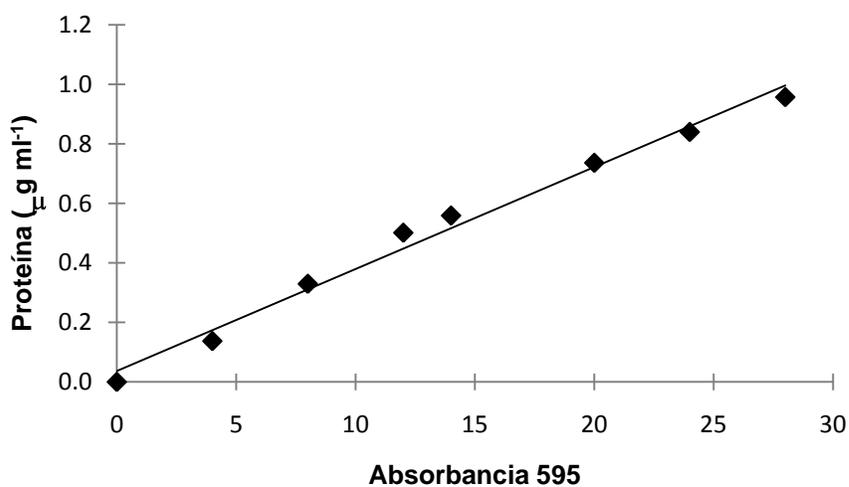


Figura A.7.1 Curva de calibración de proteína. (Cromatógrafo UV-visible Shimadzu). $Y = 0.0343x + 0.988$, $R^2 = 0.997$

Anexo B. Nomenclatura

C_{iGlu} = concentración inicial de glucosa

C_{iHxd} = concentración inicial de hexadecano

C_{fGlu} = concentración final de glucosa

C_{fHxd} = concentración final de hexadecano

Glu = Glucosa

Hxd = Hexadecano

μ = Tasa volumétrica de producción de biomasa ($g L^{-1} h^{-1}$)

Pi = Producto i

q_s = Tasa específica de consumo de sustrato

Sj = Sustrato j

X = Biomasa

X_0 = Biomasa inicial

X_{max} = Biomasa Máxima

$Y_{xpi} = r_{pi}/r_x$ = coeficiente de rendimiento del producto i con respecto a la biomasa

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de conversión del sustrato a biomasa (C-mol/C-mol).

$Y_{xsj} = r_{sj}/r_x$ = coeficiente de rendimiento del sustrato j con respecto a la biomasa

Y_{xc} = coeficiente de rendimiento de CO₂ con respecto a la biomasa

Y_{xa} = coeficiente de rendimiento de H₂O con respecto a la biomasa

Y_{xg} = coeficiente de rendimiento de glucosa con respecto a la biomasa

Y_{xh} = coeficiente de rendimiento de hexadecano con respecto a la biomasa

Y_{xo} = coeficiente de rendimiento de O₂ con respecto a la biomasa



COMPARATIVE STUDY FOR OXYGENASES PRODUCED BY *Aspergillus niger*, ATCC 9642, IN SOLID-STATE AND SUBMERGED FERMENTATION

ESTUDIO COMPARATIVO DE OXIGENASAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus niger*, ATCC 9642, EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y SUMERGIDO

T.C. Flores-Flores^{1*}, M. Gutiérrez-Rojas², S. Revah³ and E. Favela-Torres²

¹Departamento de Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y García Cubas S/N, Col. Alfredo Bonfil, C.P. 38010 Celaya, Gto., México.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 México, DF, México.

³Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Avenida Constituyentes 1054, Col. Lomas Altas, Delegación Miguel Hidalgo, C. P. 11950, México, D. F., México.

Received 25 of October 2010; Accepted 18 of April 2011

Abstract

In recent years, solid state fermentation (SSF) has shown much promise in the development of several bioprocesses and products. Some of these applications include bioremediation and biodegradation of hazardous compounds, biological detoxification of agroindustrial residues, production of micotoxins, antibiotics, gibberellins, biopesticides, organic acids, flavour compounds, enzymes, etc. This study deals with the comparison of the oxygenases, produced by *Aspergillus niger*, ATCC 9642, under submerged fermentation (SmF) and SSF using hexadecane as inducer, in the presence and absence of glucose. In addition, the characterization of both systems is also presented here. The results show higher biomass yield ($Y_{x/s}$), higher specific growth rates (μ) and higher rates of hexadecane consumption (q_s) for SSF than for SmF, when only hexadecane is used as substrate. Mineralization is higher, for both systems, when a mixture of glucose and hexadecane is used as substrate. The oxygenase produced under SSF has no specificity difference for aliphatic hydrocarbons (linear and non linear). But, it increases for aromatic substrates as the complexity of the ring increases. Oxygenase produced under SmF has lower activities, at least 7-folds, compared to SSF.

Keywords: oxygenases, solid state culture, aromatic hydrocarbons, hexadecane, polyurethane matrix support, *A. niger*.

Resumen

En los últimos años, la fermentación en estado sólido (SSF) se ha considerado como un proceso con un gran potencial, en el desarrollo de bioprocesos y de productos de alto valor agregado. Algunas de sus aplicaciones incluyen: la bioremediación y la biodegradación de compuestos peligrosos, la detoxificación de residuos agroindustriales, la producción de micotoxinas, antibióticos, giberelinas, biopesticidas, ácidos orgánicos, saborizantes, enzimas, etc. En este estudio se hace la comparación de oxigenasas producidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida (SmF) y en SSF, usando hexadecano como inductor, en presencia y ausencia de glucosa. Se presenta también la caracterización de ambos sistemas. Los resultados muestran un mayor rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y velocidades específicas de crecimiento (μ) y de consumo de hexadecano (q_s) más altas, para SSF que para SmF, cuando se usa hexadecano como único sustrato. La oxigenasa producida en SSF no muestra diferencia de especificidad con hidrocarburos alifáticos (lineales o ramificados). Sin embargo, la especificidad para compuestos aromáticos se incrementa con la complejidad del anillo. La oxigenasa producida en SmF muestra actividades que son por lo menos 7 veces menores comparadas con las actividades de oxigenasa producida en SSF.

Palabras clave: oxigenasas, fermentación en estado sólido, hidrocarburos aromáticos, hexadecano, soporte de poliuretano, *A. niger*.

*Corresponding author. E-mail: tere@iqcelaya.itc.mx
Tel.: +461-611-7575 ext 136, Fax: +461-611-7744

1 Introduction

Oxygenases are a group of intracellular enzymes with significant roles in metabolism and biosynthesis. They are important in the design of pharmaceuticals and the production of specialty chemicals (Burton, 2003; Kamerbeek *et al.*, 2003; Hartman *et al.*, 2006; Fraatz *et al.*, 2009; Torres Pazmiño *et al.*, 2010; Cresnar and Petric, 2011).

Besides, oxygenases are involved in biodegradation of hydrocarbons and related compounds that, due to their improper storage, use, and disposal have been released into the environment, where they are considered environmental pollutants. Some examples of these are chlorinated biphenyls (Dmochewitz and Ballschmitter, 1988); oil spills (Van Hamme *et al.*, 2003; Radwan, 2008); nitrobenzene, 2,4- and 2,6-dinitrotoluene (Lessner *et al.*, 2002; Parales *et al.*, 2005); polycyclic aromatic hydrocarbons (Gibson and Subramanian, 1984; Romero *et al.*, 2002; Feitkenhauer *et al.*, 2003; Golubev *et al.*, 2009); Short chain hydrocarbons (Hamamura *et al.*, 2001); medium chain hydrocarbons (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2006; Bouchez-Naitali and Vandecasteele, 2008) and volatiles aromatics collectively indicated as BTEX (Qi *et al.*, 2002; Nikolova and Nenov, 2005, Maestre *et al.*, 2007; García-Peña *et al.*, 2008).

Although fungi have an important role in several ecosystems and they have predominance over bacteria in soil, oxygenases have been extensively studied in liquid cultures with bacteria, and analogous data for fungi are scarce. The use of fungi instead of bacteria offers some advantages with respect to stability and activity of the population, especially under reduced water activity and low pH conditions, which often prevail in soil bioremediation and in air biofilters.

On the other hand, several works dealing with remarkable differences between solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) have been described (Alazard and Raimbault, 1981; Barrios-González *et al.*, 1988; Solís-Pereira *et al.*, 1993; Viniestra *et al.*, 2003; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003; Hölker, *et al.*, 2004; Fontana *et al.*, 2005; Barrios-González *et al.*, 2008). It is worth stressing that several biotechnological advantages have been reported for SSF compared to SmF, such as production of extracellular enzymes with higher activities, higher fermentation productivity, higher end-concentration of products, higher product stability, lower catabolic repression, higher hydrocarbon degradation, cultivation of microorganisms specialized for water-

insoluble substrates or mixed cultivation of various fungi, and lower demand on sterility.

Among other factors, microbial synthesis of enzymes in a SSF system can be affected by: selection of a suitable substrate; pre-treatment, particle size and water content of the substrate; relative humidity; type and size of the inoculum; fermenting matter temperature, period of cultivation; maintenance of uniformity in the environment of SSF system, and the gaseous atmosphere (Pandey *et al.*, 1999; Hölker, *et al.*, 2004).

Most of the works dealing with enzyme production in SSF have been carried out for extracellular enzymes, although there are several reports of hydrocarbons degradation involving oxygenases, in SSF (Holden *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2002; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003 and 2006; García-Peña *et al.*, 2008). The aim of this work is to study the factors that affect *Aspergillus niger* oxygenase production in SSF and SmF in the presence and absence of glucose and using hexadecane as inducer. And to compare the characteristics (activity, specificity, stability) of the oxygenase(s) expressed under these conditions.

2 Materials and methods

2.1 Strain and conditions for inoculum preparation

Aspergillus niger (ATCC 9642) spores were stored at -20°C in protect-cryoblocks (bead storage system, Technical Service Consultants, Heywood, UK). Inocula were prepared by transferring a cryoblock in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of potato dextrose agar (PDA), incubating for 5-7 days at 30°C . Spores were then scraped with a magnetic bar and 20 ml of sterile 0.1 % Tween 80 solution. Spores suspensions were used to inoculate culture media for SmF and SSF.

2.2 Cultivation systems and culture media

First of all, several fermentations were carried out, under both type of systems, SmF and SSF, where the glucose and hexadecane were used in different concentrations. The purpose of these fermentations was to assess the conditions, under which the enzyme was expressed, by relating the production of the oxygenase with the hexadecane degradation by *A. niger*.

SmF and SSF were carried out with the mineral ATCC medium 687 with 0.05% yeast extract. The medium composition, for 12 g L⁻¹ of total carbon and a C/N = 12.12, is described in Table 1. All the components were adjusted as required, depending on the amount of total carbon and on the C/N desired. The carbon source, in the culture medium, was supplied by different glucose:hexadecane ratios (Glu:Hxd) as shown in Table 2.

SmF were prepared in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of inoculated culture medium. Liquid cultures were started by inoculation of 1 × 10⁶ spores ml⁻¹ of *A. niger*. The initial pH was adjusted to 5.5 with 1N HCl. Erlenmeyer flasks were incubated at 30 °C in an orbital shaker at 200 rev min⁻¹ for at

least 70 h. Every flask constituted a sample and each sample was prepared in duplicate.

SSF were carried out in 125 ml serological bottles containing approximately 1.13 g of grounded, sterilized polyurethane foam (PUF) and the inoculated culture medium described below. PUF was used as inert support to impregnate the culture medium (Zhu et al., 1994). Every bottle constituted a sample and each sample was prepared in duplicate.

Mineral composition of the SSF culture medium was the same used in SmF (Table 1). The carbon source, in the culture medium, was supplied by the Glu:Hxd ratios shown in Table 2. After sterilization

Table 1. Composition of mineral culture medium ATCC 687 Pontecorvo for *A. niger*.

Component	Quantity	*Trace Elements Solution	
		Component	Quantity
NaNO ₃	6 g	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	100 mg
KH ₂ PO ₄	1.52 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mg
KCl	0.52 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.52 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	250 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0018 g	Distilled water	1000 ml (qs)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0014 g		
Yeast extract	0.5 g		
*Trace elements solution	1 ml		
Distilled water	1000 ml (qs)		

Table 2. Description of the carbon sources added to the mineral medium ATCC 687 used for *A. niger* oxygenases production in SmF and SSF

SUBMERGED FERMENTATION								
*Culture Medium	Glucose (g L ⁻¹)	Hexadecane (g L ⁻¹)	Carbon concentration (g L ⁻¹)	% C -Glu	% C- Hxd	C:N		
<i>a</i>	0	14	12	0	100	12.12		
<i>b</i>	15	7.1	12	50	50	12.12		
<i>c</i>	30	5	16.24	74	26	16.41		
<i>d</i>	30	0	12	100	0	12.12		
SOLID STATE FERMENTATION								
*Culture Medium	Glu (g L ⁻¹)	Glu (g g ⁻¹ PUF)**	Hxd (g L ⁻¹)	Hxd (g g ⁻¹ PUF)	Carbon concentration (g L ⁻¹)	% C -Glu	% C- Hxd	C:N
<i>e</i>	0	0	94.16	0.344	80	0	100	12.12
<i>f</i>	50	0.155	23.5	0.073	40	50	50	12.12
<i>g</i>	100	0.311	47.08	0.147	80	50	50	12.12
<i>h</i>	100	0.321	0	0	40	100	0	12.12

* Culture medium volumes for SmF were 50 ml each. Culture medium volumes for SSF were (in ml) 3.5, 3.63, 4.6 and 3.63 for samples *e*, *f*, *g*, and *h*, respectively

**The amounts of PUF used were (in g) 0.96, 1.13, 1.13 and 1.3 for samples *e*, *f*, *g*, and *h* respectively.

of the serological bottles containing the PUF, culture broth was added to each bottle to have 70% humidity, and 1×10^7 spores g^{-1} of dry initial matter. The initial pH was 5.5. The bottles were sealed with rubber caps that were connected by means of syringe needles to GC equipment and to a water saturate air flow (2 ml min^{-1}). Serological bottles were incubated in a water bath at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for at least 85 h.

2.3 Kinetic parameters

Growth curves were fitted by a Maquardt "Solver" computer program (Excel, Microsoft) using logistic equation as follows:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0}\right)} e^{\mu t},$$

where X (g L^{-1}) represents the biomass calculated, X_{\max} and X_0 (g L^{-1}) are the maximum and initial biomass values, respectively, μ (h^{-1}) is the specific growth rate, and t (h) is the culture time. Substrate consumption curves were fitted using Pirt equation as follows:

$$S(X) = S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}}(X - X_0) - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln\left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X}\right)$$

where S_0 is the glucose or hexadecane concentration at $t = 0$.

The biomass yield, $Y_{X/S}$, was calculated using the next equations:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{(X_{\max} - X_0)}{S_0 - S_f},$$

$$S_0 = C_{iGlu} + C_{iHxd},$$

$$S_f = C_{fGlu} + C_{fHxd}$$

where X_{\max} and X_0 (gL^{-1}) are the maximum and initial biomass values, respectively. C_{iGlu} and C_{iHxd} (gL^{-1}) are the initial carbon concentration values from glucose and hexadecane, respectively, and C_{fGlu} and C_{fHxd} (gL^{-1}) are the final carbon concentration values, from glucose and hexadecane, respectively.

The specific substrate uptake rate, q_s , is defined as follows:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{\frac{X}{S}}},$$

Where q_s is given as grams of carbon, from substrates consumed, per gram of biomass per hour.

2.4 Oxygenase(s) production

Once the hexadecane degradation was studied in both types of systems, culture media c and f (Table 2) were selected to produce oxygenase(s) by SmF and SSF respectively. The fermentation conditions for oxygenase(s) production were the same as described before for hexadecane degradation. *A. niger* mycelium of 48, 72 and 120 h of growth was harvest from SSF and SmF and used to detect oxygenase activity. The oxygenase activity was analyzed by measuring the dissolved oxygen uptake rates, by resting cells, in the presence of substrate (above background respiration rate) and in the absence of it (background respiration rate or endogenous respiration). These rates were normalized with the total amount of biomass in the reaction vials and reported as nanomoles of oxygen removed per second per milligram of biomass. The oxygenase activity was then calculated by subtracting the oxygen uptake rate in the absence of substrate (RE) to the uptake rate in the presence of it (RS) and reported as units of enzyme (Sun and Wood, 1997). One unit of enzyme (U) was defined as the amount of enzyme that will catalyze the consumption of 1 nmol O_2 per second.

2.5 Cell free crude enzyme extracts preparation

To study the characteristics of the induced oxygenases, cell free crude enzyme extracts were prepared from biomass growth in both types of cultures as explained above. Extract from SSF was prepared by washing the mycelium attached to the PUF (PUF-BioM), approx. 10 g, with 500 ml cold water ($5 \text{ }^\circ\text{C}$). Then it was suspended for 10 min in 200 ml cold ($5 \text{ }^\circ\text{C}$) 50 mM tris buffer, pH 7.5 with $0.1\text{-}\mu\text{mol}$ dithiotreitol ml^{-1} and 1ml protease inhibitor cocktail (Sigma P-8215) per 20 g cells wet weight. The suspension was filtered through Whatman 41. The PUF-BioM was frozen with liquid nitrogen and disrupted in a coffee grinder (Brown, 2.5 oz). Afterwards, the PUF-BioM was wrapped in cheesecloth, unfrozen (around $4 \text{ }^\circ\text{C}$) and squeezed in a hydraulic press (ERCO model PH-51) at 2000 psi, around $130 \text{ kg (cm}^2\text{)}^{-1}$. The obtained suspension was centrifuged at 10,000 g for 15 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. The supernatant was filtered with $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ membrane and the filtrate was kept in vials (1.5 ml) at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until enzyme analyses.

Crude enzyme extract from SmF was prepared alike the extract from SSF. The only difference was that after the mycelium was washed and frozen, it was

disrupted with a mortar, suspended in the buffer and finally treated as the SSF crude extract.

2.6 Analytical procedures

Schematic flow diagrams of the sample treatment and analyses for SmF and for SSF are given in Fig. 1 and Fig. 2 respectively. Glucose was measured using an enzymatic analyser (YSI model 2700). Hexadecane was determined by gas chromatography (Perkin Elmer autosystem XL) with a flame ionization detector under the following conditions: column, PE1 of 30 m length and 0.32 mm I.D; carrier gas, helium (15 ml min^{-1}); the injector and detector temperature were constant at 250 and 300 °C respectively; the column temperature was kept initially at 100 °C for 2 min, increasing by 20 °C min^{-1} to 250 °C and then holding for 5 min. Samples of $1 \mu\text{l}$ were injected and decane was used as internal standard. Biomass concentration was determined as dry matter content.

Oxygen and carbon dioxide evolution on SSF were followed by gas chromatography (Gow Mac 580) with

thermal conductivity detector. The column used was CTR8700 (Alltech), current detector 150mA, detector and injector temperature 80 °C, column temperature 50 °C. Acquisition and integration system Multivia Chroma V.30.

Oxygenase activity assays were performed, in cell free crude enzyme extracts. Two methods were used: oxygen uptake rate (oxymetry), based on a method described by Sun and Wood (1997) and a modified spectrophotometric method described by Zazueta-Sandoval *et al.* (2003).

Activity assays by oxygen consumption were done using an O_2 micro-electrode (YSI 5300 Biological Oxygen Monitor; YSI Inc., Yellow Springs, OH, U.S.A.). The reaction mixture consisted of 1.3 ml 50mM Tris pH 7.5, 0.4 mM ml^{-1} NADH and 0.3 ml crude enzyme extract. After equilibration at the desired oxygen concentration, the reaction was started by adding $3 \mu\text{l}$ of substrate (hexadecane). O_2 -uptake was calculated by the difference in O_2 concentration before and after substrate addition. The oxygenase

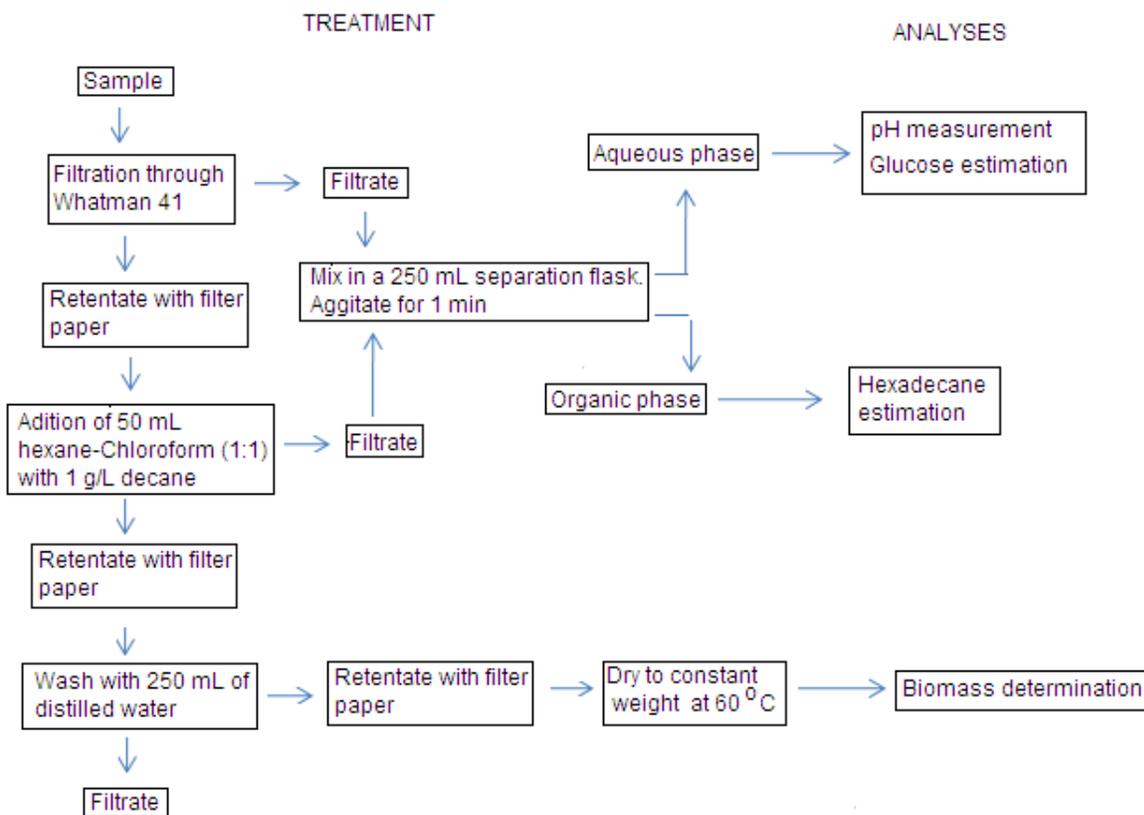


Fig. 1. Schematic diagram for treatment of the SmF samples for microbiological and physico-chemical analyses.

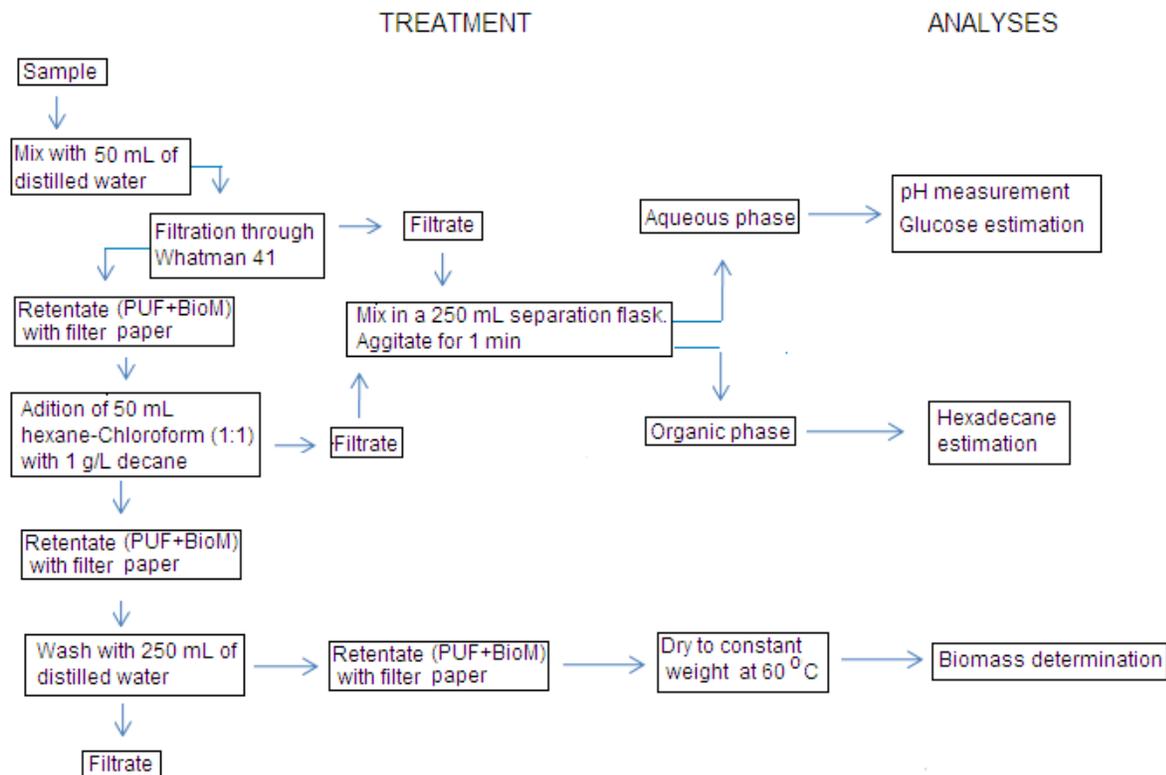
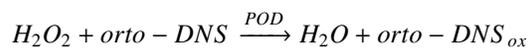
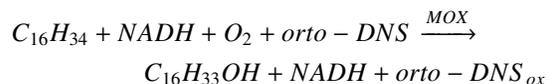


Fig. 2. Schematic diagram for treatment of the SSF samples for microbiological and physico-chemical analyses.

activity was reported as specific activity ($U\ mg^{-1}$ protein). One unit of enzyme (U) was defined as the amount of enzyme that will catalyze the consumption of 1 nmol O_2 per second. Oxygenase activity measurements using the spectrophotometric method were carried out in the following way. In a 1.5 ml quartz cuvette, 1 ml of reaction mixture was added. This consisted of 300 μ l of *o*-dianisidine dihydrochloride reagent (20 mg 3,3'-dimetoxibenzidine dissolved in 3 ml 0.025 M hydrochloric acid, added with agitation to 50 ml of 50 mM tris buffer pH 8.5 and brought up to 100 ml with the same buffer), 480 μ l of 50 mM tris buffer pH 8.5 added with 0.4 μ mol of NADH, 20 μ l of substrate and 200 μ l crude enzyme extract. Measurements were performed at 30 °C by using a spectrophotometer (Shimadzu UV-160A) equipped with a thermostated cuvette holder and a water circulation system, absorbance at 460 nm was followed for one hour, against a blank, after the addition of substrate. The blank was prepared replacing 200 μ l crude enzyme by 200 μ l of buffer, besides a reference was made replacing the substrate by 20 μ l of buffer.

Enzyme activity was calculated subtracting reference slope (absorbance at 460 nm vs time) from sample slope and interpolating this value on a peroxidase activity calibration curve made with different concentrations of hydrogen peroxide as substrate of the enzyme in the presence of *o*-dianisidine (Zazueta-Sandoval *et al.*, 2003). This method is based in the characteristics of *ortho*-dianisidine (*ortho*-DNS) which is a chromogenic acceptor of oxygen and in the action of oxygenase on hydrocarbon molecule and peroxidase (POD) on hydrogen peroxide, accordingly with the next two net reactions, using hexadecane as example of substrate for a monooxygenase (MOX):



In the first reaction for each consumed oxygen molecule, one molecule of hexadecane and one molecule of *ortho*-DNS are oxidized. Meanwhile, in the second reaction for each molecule of hydrogen peroxide reduced, one atom of oxygen is introduced

in orto-DNS molecule. Therefore, through the interpolation of the absorbance value, generated from the first reaction, in the POD calibration curve, it is possible to know the amount of oxygen consumed in the first reaction. The oxygenase activity was reported as specific activity (U mg^{-1} protein). One unit of enzyme (U) was defined as the amount of enzyme that will catalyze the consumption of 1 nmol O_2 per second.

The protein content was determined using the Bio-Rad Protein Assay, based on the method of Bradford, with bovine serum albumin as a standard.

2.7 Characterization of the oxygenase(s)

The concentration and storage effects on the enzyme activity and stability were examined by O_2 -uptake rate. Crude extracts from SSF and SmF were concentrated against sucrose with a 12,000 Da membrane (Millipore tubing membrane). They were stored at -20°C from 0 to 84 days. Samples without concentrate were also kept at the same temperature. All these samples were used for O_2 -uptake analyses.

Oxygenase(s) substrate specificity was analyzed by the spectrophotometric method (Zazueta *et al.*, 2003). Short (pentane, hexane, heptane), medium (decane, hexadecane) and large (eicosane) chain hydrocarbons as well as branched (2,6,10,14 tetramethyl-pentadecane) and aromatic (benzene, anthracene, phenanthrene, pyrene and toluene) compounds, were used as substrates.

The effect of temperature in oxygenase activity was measured by the spectrophotometric method. The amount of protein used in these assays were $58.60\ \mu\text{g}$ per sample contained in $200\ \mu\text{l}$ of crude extract. The temperatures tested were 12, 26, 30 and 35°C . Decane was used as substrate.

2.8 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The degree of purification and identification of proteins with oxygenase activity was monitored on native PAGE and zymograms. Native PAGE was performed according to Laemmli (1970), with 6% resolving and 4% stacking gels. Samples were electrophoresed at 10 mA and 4°C through 1.5 mm gel in a vertical slab gel unit Mini Protean II Electrophoresis Cells (Bio-Rad Laboratories). The gels were loaded with $35\ \mu\text{g}$ of protein from cell free extracts obtained from SmF and SSF. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. A

kaleidoscope prestained standard was also loaded as molecular weight standard.

Zymograms. Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed with both types of crude extracts as described before. Oxygenase activity was revealed by submerging the gel in a reaction mixture composed by 10 ml of 50 mM tris buffer pH 8.5 added with $0.4\ \mu\text{M ml}^{-1}$ of NADH, 6.25 ml of o-dianisidine reagent (see section 2.5) and 1 ml of substrate (decane, hexadecane or benzene) and incubating the gel at room temperature with gentle agitation until the activity bands appeared. The protein loaded was $63.5\ \mu\text{g}$ per lane.

3 Results and discussion

3.1 Growth of *A. niger* in SmF

Fig. 3 shows glucose and hexadecane degradation profiles in SmF. From this data it was evaluated that *A. niger* degraded $66.7\pm 1.8\%$ of hexadecane in the presence of glucose (c), in only 48 h. However, the remaining 33.3 % did not undergo any change even after 140 h. Meanwhile, a small amount (17.9 ± 14.6) of the added hexadecane was degraded when it was used as sole substrate (a), during the time of analyses (75 h) and none of it was degraded when the carbon source was 50 % from glucose and 50 % from hexadecane (b).

Another remarkable result in medium c (Fig. 3c) was the way that hexadecane was consumed. The first 20 h, *A. niger* consumed glucose only, but around 25 h, it consumed hexadecane and glucose simultaneously. Around 50 h the glucose has been totally consumed and the hexadecane uptake stopped. The biomass production of *A. niger* ATCC 9642, in SmF, reached the highest value ($14.5 \pm 0.27\ \text{g L}^{-1}$) in the culture medium d (glucose alone), whereas medium a (hexadecane alone) gained the lowest value ($0.63\pm 0.17\ \text{g L}^{-1}$). Table 3 presents the values of the kinetic parameters associated with the fungal growth: the specific growth rate (μ) and the maximum growth (X_{max}).

The specific growth rate increased when glucose plus hexadecane were used as substrates (mediums b and c). The highest value for μ ($0.23\ \text{h}^{-1}$) corresponded to medium b. But it had zero hexadecane consumption. Noordman *et al.* (2002) reported a μ value of $0.02\ \text{h}^{-1}$ for *P. aeruginosa* grown in a liquid culture with hexadecane concentrations ranging from 0.1 to $2.0\ \text{g L}^{-1}$, this value is 2.2 times

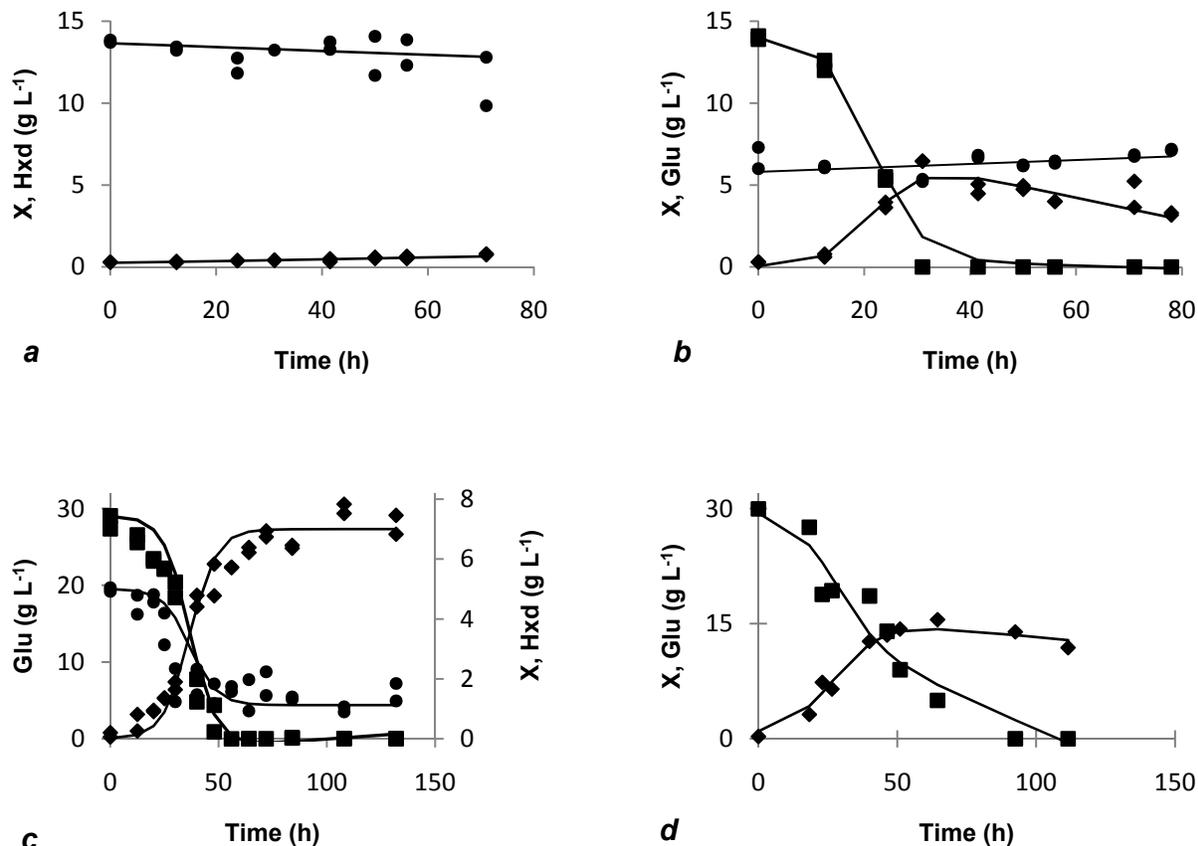


Fig. 3. Liquid culture of *A. niger* in a mineral medium ATCC 687 with 0.05% yeast extract, added with (a) 14 g L⁻¹ hexadecane; (b) 15 g L⁻¹ glucose, 7.1 g L⁻¹ hexadecane; (c) 30 g L⁻¹ glucose, 5 g L⁻¹ hexadecane; (d) 30 g L⁻¹ glucose. ♦ X (biomass growth), ●Hxd (hexadecane conversion), ■ Glu (glucose consumption). Lines represent calculated values and points are experimental values.

Table 3. Kinetic parameters associated to fungal growth in SmF and SSF

*Substrate		**Parameter		Fermentation System
Glucose (g L ⁻¹)	Hexadecane (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X_{max} (g L ⁻¹)	
0	14	0.009	0.63 ± 0.17	SmF
15	7.1	0.23	6.15 ± 0.01	SmF
30	5	0.16	5.59 ± 0.09	SmF
30	0	0.12	14.5 ± 0.27	SmF
0	94.16	0.03	40.19 ± 0.59	FES
50	23.5	0.13	18.55 ± 0.36	FES
100	47.08	0.11	23.50 ± 0.26	FES
100	0	0.15	27.04 ± 1.27	FES

μ : Specific growth rate; X_{max} : Maximum biomass values

*The substrates correspond to culture mediums a to h from top to bottom

**This parameters were evaluated during the constant growth phase

higher than the μ value obtain in the present work for *A. niger*, under SmF, when only hexadecane was used as substrate. However, the μ values for bacteria

are known to be higher than that of fungi (Volke-Sepúlveda et al., 2006).

Table 4 shows the kinetic parameters associated

to substrate consumption. It can be observed that substrate uptake rate (q_s) increased when mixtures of hexadecane plus glucose were used as substrates, compared with the q_s of culture medium with glucose or hexadecane alone. The biomass/substrate yields (Y_{SX}) had higher values when *A. niger* growth at the expense of glucose only and smaller values when hexadecane was consumed, either alone or in the presence of glucose. This implies a higher mineralization when hexadecane was consumed. Volke-Sepúlveda et al. (2003) reported biomass/oxygen and oxygen/hexadecane yields, for an initial hexadecane concentration of 20 (g L⁻¹) under SmF, of 0.29 (mg X mg⁻¹ O₂)

and 3.34 (mmol O₂/mmol Hxd) respectively. With these data a biomass/substrate yield (Y_{SX}) of 0.14 (mg X mg⁻¹ Hxd) can be calculated. García-Peña et al. (2008) reported a $Y_{SX} = 0.13$ (mg X mg⁻¹ benzene). In our study for medium a (14 g L⁻¹ hexadecane) $Y_{SX} = 0.2$ (mg X/mg Hxd). In all these cases when the hydrocarbon was the only carbon source the biomass/substrate yields were very low. Prenafeta-Boldú et al. (2002) attributed a low degradation pattern of benzene by *Cladophialophora* sp to the accumulation of dead-end oxidation sub products, however

Table 4. Kinetic parameters associated to substrate uptake in SmF and SSF

*Substrate		**Parameter		Fermentation system
Glucose (g L ⁻¹)	Hexadecane (g L ⁻¹)	*Y _{SX} (g X g ⁻¹ Cs)	**q _S (g Cs g ⁻¹ X h ⁻¹)	
0	14	0.40 ± 0.24	0.03 ± 0.02	SmF
15	7.1	0.76 ± 0.06	0.30 ± 0.03	SmF
30	5	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.02	SmF
30	0	1.21 ± 0.02	0.10 ± 0.00	SmF
0	94.16	0.57 ± 0.01	0.06 ± 0.00	FES
100	47.08	0.60 ± 0.02	0.18 ± 0.01	FES
50	23.5	0.68 ± 0.03	0.22 ± 0.00	FES
100	0	1.16 ± 0.01	0.13 ± 0.00	FES

*Y_{SX}: Biomass/substrate yield (grams of biomass per grams of carbon from substrate)

*q_S: Substrate uptake rate (grams of carbon from substrate per grams of biomass per hour)

**These parameters were evaluated during the phase of constant growth. Average values ±DS (n = 2) are presented

Table 5. Carbon recovered as CO₂ during SmF and SSF of hexadecane, glucose and mixtures of them by *A. niger*

Substrate (g)		**Consumed substrate (g)		**X Prod (g)	**Experimental CO ₂ (g)	% C as CO ₂	++RQ CO ₂ /O ₂	FS(S*)
Hxd	Glu	Hxd	Glu	(g)	(g)			
0.70	0.00	0.12±0.1	0.00	0.024±0.00	0.38±0.13 ⁺	78	0.61(0.65)	SmF(a)
0.25	0.70	0.00	0.70±0.01	0.308±0.00	0.524±0.02 ⁺	51.1	1.15(1.00)	SmF (b)
0.36	1.41	0.17±0.00	1.41±0.06	0.259±0.03	1.99±0.19 ⁺	82.5	0.90(0.89)	SmF (c)
0.00	1.50	0.00	1.50±0.00	0.761±0.03	0.96±0.006 ⁺	43.4	1.21(1.00)	SmF (d)
0.33	0.00	0.29±0.01	0.00	0.163±0.17	0.45±0.05	56.8	0.57(0.65)	SSF (e)
0.214	0.39	0.13±0.02	0.39±0.02	0.112±0.00	0.80±0.08	82.8	0.81(0.82)	SSF (g)
0.064	0.12	0.06±0.00	0.12±0.01	0.071±0.00	0.23±0.006	64.1	0.75(0.78)	SSF (f)
0.00	0.426	0.00	0.424±0.00	0.198±0.00	0.20±0.005	36.1	1.13(1.00)	SSF (h)

* FS (fermentation system), S (sample). All the samples in SmF had culture medium volumes of 50 ml each. For SSF the culture medium volumes were (in ml) 3.5, 4.6, 3.63, and 3.63 for samples e, g, f and h respectively).

** Average values ±DS (n = 2) are presented

⁺CO₂ values were calculated by means of an oxidation reduction balance.

⁺⁺Experimental value (Theoretical value)

in the case of hexadecane the reason of low hexadecane degradation in FEL is attributed to the low hexadecane solubility in water.

From the data shown so far it can be observed that even though, the amount of carbon consumed for medium *c* was the highest under SmF and it had the highest substrate uptake rate ($0.35 \text{ g C-substrate g}^{-1} \text{ X h}^{-1}$), the X_{max} was only $5.59 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$ and the substrate yield was one of the lowest under SmF, $0.40 \text{ (gX g}^{-1} \text{ C-substrate)}$. These results suggest high mineralization, which was confirmed by a carbon balance; data is presented in Table 5.

The degree of mineralization was higher when hexadecane was consumed, either alone or in the presence of glucose, than when only glucose was uptaken. This confirms what was suggested through the analysis of Y_{SX} . The respiratory quotients (RQ) are also presented in Table 5. RQ is related to the respiratory metabolism of the microorganism and to the substrate oxidation level (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003). The RQ for SmF varied in the opposite direction than the degree of mineralization, i.e. higher for glucose uptake and smaller for hexadecane consumption. RQ values smaller than 1 are an indication of predominant mineralization of aliphatic organic compound, having low oxygen content. Ratios greater than 1 are obtained when organic compounds with high content of oxygen are extensively decomposed (Dilly, 2001).

In a similar study Wang *et al.* (1996) found for *Pseudomonas putida* (ATCC 17514) that when glucose was the sole carbon and energy source, the culture utilized glucose following Monod kinetics. When phenol was the sole carbon and energy source, the culture biodegraded it following Andrews (inhibitory) kinetics. When both glucose and phenol were present in the medium, the culture used them simultaneously but with lower specific rates. They stated that reduction of the specific substrate utilization rates indicates that the two substances are involved in a cross-inhibitory pattern which can be classified as uncompetitive. García-Peña *et al.* (2008) working with *Paecilomyces variotti*, found that the degradation of binary mixtures of BTEX rates obtained with single substrates (BTEX) and binary combinations of them were sensibly reduced in the mixtures. The results shown here are similar to Wang *et al.* (1996) results, except that in this work higher specific substrate utilization rates were obtained with mixtures of substrates. An increment in the specific substrate utilization rate suggests a synergistic effect of glucose in hexadecane consumption in culture

medium *c*. However, in culture medium *b*, glucose inhibits hexadecane consumption, that could be by glucose repression. However, once glucose was depleted the enzyme was not derepress, or at least its action was not observed.

3.2 Growth of *A. niger* in SSF

Fig. 4 shows glucose and hexadecane degradation profiles in SSF. It can be observed that *A. niger* degraded hexadecane in the presence and absence of glucose, regardless of concentration and type of carbon source. The highest hexadecane degradation was attained in culture medium *f*, $95.5 \pm 1.9 \%$ of the initial hexadecane in less than 60 h, followed by medium *e* with $89.8 \pm 2.1 \%$ and $62.7 \pm 7.2 \%$ for medium *g*. *A. niger* in the presence of glucose and hexadecane (Fig. 4 *f* and *g*) started consuming glucose first and once this was completely exhausted, *A. niger* consumed hexadecane. Apparently there was catabolite repression which was more severe for culture medium *g* which contained the double of glucose than medium *f*. In Fig. 4 (*f* and *g*) it can be seen that hexadecane consumption started around 20 h for medium *f*, immediately after all the glucose was assimilated, while it started after 50 h for *g*, although glucose was depleted in 30 h.

In SSF higher X_{max} were attained for culture mediums with glucose or hexadecane as sole carbon sources (see Table 3). In cultures mediums with glucose and hexadecane X_{max} decreased with an increase in glucose and hexadecane concentration. The specific growth rates in SSF (Table 3) were similar for all the culture mediums studied, except for the culture medium *e* (hexadecane as sole carbon source) that was 3.6 times slower. For *A. niger* with an initial hexadecane concentration of $360 \text{ mg g}^{-1} \text{ PUF}$, Volke-Sepúlveda, *et al.* (2006) reported a μ value of 0.70 ± 0.02 that is similar to the one reported here in the presence of $344 \text{ mg g}^{-1} \text{ PUF}$ of hexadecane (0.72).

Table 4 shows the kinetic parameters associated to substrate consumption in SSF. It can be seen that substrate uptake rates (q_s) had the same trend as in SmF. The biomass/substrate yields (Y_{SX}) were higher for glucose alone and had the minimum value when hexadecane is the sole source of carbone. From data reported by Volke-Sepúlveda *et al.* (2003) a $Y_{SX} = 0.67 \text{ (mg X mg}^{-1} \text{ Hxd)}$ was calculated for a sample with 90 g L^{-1} of initial hexadecane concentration. In the present study for medium *e* (94.16 g L^{-1}) $Y_{SX} = 0.56 \text{ (mg X mg}^{-1} \text{ Hxd)}$.

The mineralization and the RQ for SSF are shown

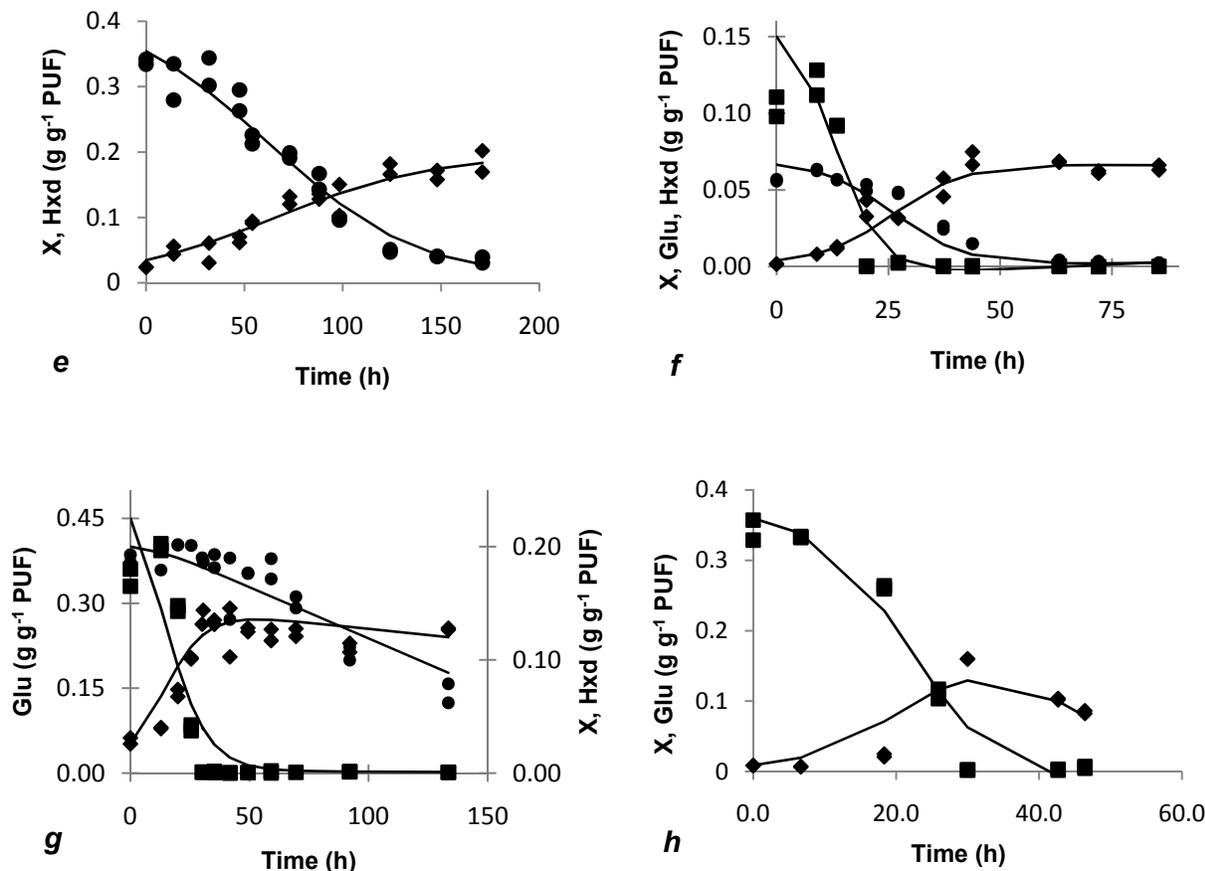


Fig. 4. Solid culture of *A. niger* in a mineral medium ATCC 687 with 0.05% yeast extract, added with (e) 94.16 g L⁻¹ hexadecane; (f) 50 g L⁻¹ glucose, 23.5 g L⁻¹ hexadecane; (g) 100 g L⁻¹ glucose, 47.08 g L⁻¹ hexadecane; (h) 100 g L⁻¹ glucose. ♦ X (biomass growth), ● Hxd (hexadecane conversion), ■ Glu (glucose consumption). Line represents calculated values and points are experimental values.

in Table 5. As for SmF the higher mineralization was attained when glucose and hexadecane were present in the culture medium. The RQ also had the same trend as in SmF, the lowest RQ values were found for cultures mediums where only hexadecane was consumed. Volke-Sepúlveda *et al.* (2006) reported, for degradation of hexadecane in SSF with *A. niger*, that RQ values were nearly independent of the hexadecane concentration and they were higher in C/N variable (0.73 ± 0.03) than in C/N constant (0.66 ± 0.02). For hexadecane degradation under SmF Volke-Sepúlveda *et al.* (2003) reported higher and variable RQ values. In the present work, degradation of hexadecane alone under SSF or SmF, produced RQ values smaller (0.57 and 0.64 respectively) than the values reported by them. These results must be related to the higher mineralization that was attained in our case.

3.3 Solid state fermentation compared to submerged fermentation

Examination of figs. 3 and 4 shows very different profiles of substrates consumption and biomass production for liquid vs. solid cultures. Among the principal differences the following can be mentioned: 1) In SSF independently of the initial hexadecane concentration, always there was hexadecane degradation. 2) Hexadecane degradation tended to 100% in all the culture media studied in SSF. 3) When the carbon source was 50% from glucose and 50% from hexadecane apparently there was catabolic repression under SmF as well as in SSF. However, in SSF the enzyme was derepress and hexadecane was consumed, even when high glucose concentrations were used. While, under SmF glucose was depleted, hexadecane degradation never

started and biomass concentration started decreasing. Some authors working with similar systems have reported that high hydrocarbon concentrations can be associated with heavy undispersed oils slicks in water, inhibiting biodegradation due to a nutrient and/or oxygen limitation (Leahy and Colwell, 1990). del Castillo and Ramos (2007) reported that under SmF in a minimal medium with 16 mM of glucose and 6 mM of toluene as carbon sources there was simultaneous catabolite repression, however both substrates were consumed, although with lower rates than the separated substrates. Diaz-Godinez *et al.* (2001) have shown for *A. niger* C28B25 using SmF and SSF with a mixed substrate (5 g/L pectin and 50 g/L sucrose), better pectinase productivity because of higher biomass production and lower protein breakdown in SSF. Several authors have proposed that SSF system minimizes the catabolite repression (Ramesh and Lonsane, 1991; Aguilar, *et al.*, 2001; Fontana and Moura da Silveira, 2005). Generally they report lower catabolite repression with glucose concentrations ≥ 100 g L⁻¹, compared to SmF. In light of the findings it appears that breakdown of biomass occurred, before the enzyme is derepressed in culture medium *b* (15 g L⁻¹ glucose and 7.1 g L⁻¹ hexadecane) and this could be due to oxygen limitation. 4) The values for μ were similar for both systems and are higher when more glucose is consumed. Glucose had a stimulatory effect because provides easily accessible carbon source, which gives rise to an increased biomass (Östberg *et al.*, 2007). 5) When the culture medium had glucose and hexadecane the q_s values were 1.36-2.27 times faster for SmF than for SSF. For culture medium with hexadecane as sole source of carbon, q_s was 2.2 times faster for SSF than for SmF, this could be due to a better hydrophilic substrate assimilation in SmF and a better hydrophobic substrate uptake in SSF.

As it was said before one of the objectives of studying the degradation of hexadecane under SmF and SSF was to assess the conditions, under which the enzyme was expressed, by relating the production of the oxygenase with the hexadecane degradation by *A. niger*. Wu *et al.* (2011) reported that an increase in P450 cytochrome monooxygenase activity was linearly correlated with hexadecane degradation. Other purpose of this type of study was to find the conditions under which a considerable amount of biomass with good characteristics, i.e. with the

enzyme induced and non sporulating, was formed.

Evaluation of the parameters mentioned above resulted in the selection of medium *c* and *f* (see Table 2) to grow *A. niger*. Mycelium was harvested at 48, 72 and 120 h to evaluate the production of oxygenase(s) and to observe if the enzyme activity corresponded with the time of hexadecane consumption.

3.4 Production of oxygenase(s)

Culture media *c* and *f* were selected to produce oxygenase(s) by SmF and SSF respectively. The oxygenase activity was measured using resting cells as described in section 2.4. The results are shown in Table 6.

It can be observed in Table 6 that background respiration (RE) rate was relatively high. To avoid the interference of endogenous respiration with the oxygenase activity, two respiration inhibitors were used (NaN₃ and NaCN). The two inhibitors drastically reduced the background respiration rate. However, they also reduced the oxygenase activity. This essay did not give reproducible results for SSF (data not shown). Resting cells from SmF showed higher activity for the 48 h mycelium. It was observed that 48 h coincided with the period of steady growth of *A. niger* and with the time that hexadecane was consumed, in culture medium *c*, under SmF (Fig. 3).

Since oxygen uptake rate by *A. niger* resting cells was not an appropriate method of measuring oxygenase activity, it was decided to use a cell free crude enzyme extract to achieve this objective. The time selected to harvest biomass for crude extracts preparation was 35 h for SSF and 45 h for SmF.

3.5 Characterization of the oxygenase(s)

3.5.1 Enzyme stability

Figure 5 shows the concentration by dehydration and storage effects on the oxygenase(s) stability. First able it can be observed that oxygenase activity is at least 3.7 times higher for SSF sample than for SmF. Crude extracts from both types of fermentations had a drastic loss of activity, around 75%, when they were concentrated or stored at -20 °C for more than 7 days. Samples dehydrated and stored for 84 days at -20 °C had no further decrease of activity. The loss of activity with time of storage can be due to the disappearance

Table 6. Oxygenase activity of *A. niger* resting cells, harvest from FEL.

*SAMPLE	** $^{+}O_2$ -uptake rate nmol O_2 (mgX s) $^{-1}$	$^{+}O_2$ -uptake rate by oxygenase nmol O_2 (mgX s) $^{-1}$	$^{++}$ Oxygenase activity (U)
RE(48h)	0.2126±0.0155 A		
RS (48h)	0.3352±0.0051 B		
RS-RE (48 h)		0.1226±0.0144 a	0.5897±0.0693
RE(72 h)	0.1333±0.0016 C		
RS (72 h)	0.1479±0.0077 D		
RS-RE (72 h)		0.0146±0.0064 b	0.1080±0.0477
RE(120 h)	0.0713±0.0017 E		
RS (120 h)	0.0780±0.0152 C		
RS-RE (120 h)		0.0068±0.0125 b	0.0415±0.0766
RENa N_3 (48 h)	0.0154±0.0006 C		
RSNa N_3 (48 h)	0.0374±0.0006 F		
RS- RENA N_3 (48h)		0.0220±0.0007 b	0.1072±0.0035
RENaCN (48 h)	0	0	0
RSNaCN	0	0	0

* RE (O_2 -uptake in the absence of substrate), RS (O_2 -uptake in the presence of substrate), RS-RE (O_2 -uptake by oxygenase activity). RENA N_3 (O_2 -uptake in the absence of substrate and in the presence of respiration inhibitor, sodium azide), RSNa N_3 (O_2 -uptake in the presence of substrate and in the presence of respiration inhibitor Na N_3), RS- RENA N_3 (O_2 -uptake by oxygenase activity in the presence of respiration inhibitor Na N_3), RENA CN (O_2 -uptake in the absence of substrate and in the presence of respiration inhibitor Na CN), RSNa CN (O_2 -uptake in the presence of substrate and in the presence of respiration inhibitor Na CN).

** O_2 -uptake rate by biomass harvest from SmF at the time indicated. The units are nmol O_2 per mg of biomass per second. O_2 -uptake was measured by oxymetry, with hexadecane as substrate.

+ Average values \pm DS ($n = 2$) are presented. Data with the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$). Uppercase and lowercase letters represent independent statistical tests.

$^{++}$ One unit of enzyme (U) was defined as the amount of enzyme that will catalyze the consumption of 1 nmol O_2 per second.

of the cofactor. It is known that most of oxygenases are cofactor dependent. Among the cofactors we can cite NADH, FAD, NADPH. These cofactors are continuously forming while the microorganism is intact, however, in the extract there is a small amount of it that is lost very easily since this type of molecules are very labile. Another reason for the lost of activity it could be an adduct formation (Gray, 1989).

3.5.2 Oxygenase(s) substrate specificity

Crude extracts from SSF oxidized aliphatic and cyclic substrates (Fig. 6A). There was no significant difference ($\alpha = 0.05$) in substrate specificity for low (pentane, hexane, heptane), medium (decane, hexadecane) and high (eicosane) molecular weight aliphatic hydrocarbons, as well as for linear compared to non linear (2,6,10,14 tetramethyl-pentadecane). However, for aromatic substrates, activity was significantly higher ($\alpha = 0.05$) as the number of the rings increased (benzene <

anthracene < phenanthrene < pyrene). The activity with toluene was relatively high, similar to that presented by pyrene. Substrate specificity for crude extracts obtained from SmF showed no specific pattern and the activities were lower for them, at least 7-folds compared to SSF (Fig. 6B).

van Beilen *et al.* (1994) studied the hydroxylation of a wide range of linear, branched, and cyclic alkanes and alkylbenzenes by the alkane hydroxylase system of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 *in vivo* and *in vitro*. *In vitro* hydroxylation was determined with a reconstituted hydroxylase system consisting of AlkB (the membrane-bound catalytic monooxygenase component), AlkG (rubredoxin), and spinach ferredoxin reductase. van Beilen *et al.* (1994) found that this system was able to oxidize all types of substrates, except when a tertiary or quaternary carbon was present.

Zazueta-Sandoval *et al.* (2003) partially purified

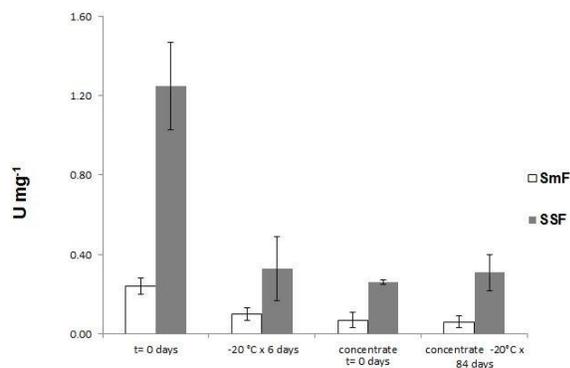


Fig. 5. Effect of concentration and time of storage of crude enzyme extract on oxygenase stability. One unit of enzyme (U) was defined as the amount of enzyme that will catalyze the consumption of 1 nmol O₂ per second.

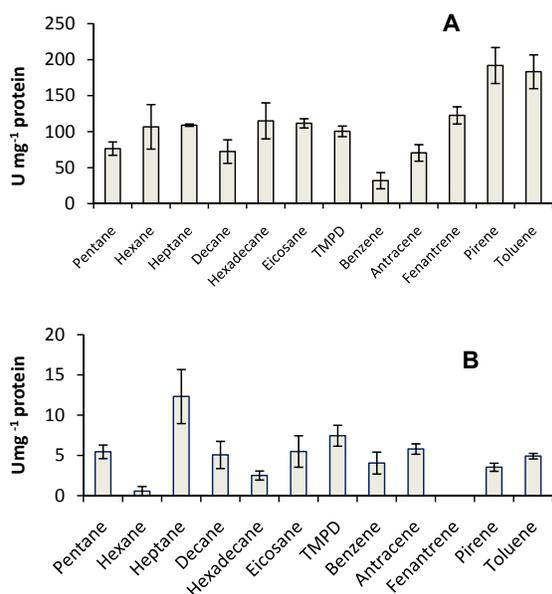


Fig. 6. Oxygenase activity from *A. niger* ATCC 9642, using the substrates shown. TMPD (2,6,10,14 tetramethyl-pentadecane). Activity was measured by a spectrophotometric assay with o-dianisidine. A) Activity of crude extract from SSF. B) Activity of crude extract from SmF. Each bar represents the average value of two replicates (\pm SD).

an oxygenase from an unknown fungus strain, grown in liquid culture. They reported for it a higher activity with cyclic substrates than with aliphatic ones and they found a decrease in activity as the complexity of the substrate molecule increased. They conclude the

existence of one enzyme with activity as mono and dioxygenase.

Vatsyayan *et al.* (2008) found a cytochrome P450 monooxygenase (CYP) of *Aspergillus terreus* grown in hexadecane (cytosolic fraction) and in glucose (membrane bound). The CYP studied by them have similar specificities than the ones found in this work under SmF, albeit the activities are different. For example they report $1.28 \pm 0.011 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein for hexadecane equivalent to $21.33 \text{ nmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. This is one of the highest activities reported for the enzyme extract obtained from *A. terreus* growth with hexadecane. The enzyme was active also with octane, tetracosane, benzene and toluene among other substrates. All the activities shown for the CYP were smaller than the ones calculated in this work under SSF, but higher than in SmF.

3.5.3 The effect of temperature on oxygenase(s) activity

There are two optimum temperatures for the oxidation of decane as shown in Fig. 7. One is at 26 °C and the other is equal or greater than 35 °C. This result together with the ones showed above suggests the presence of more than one enzyme. In addition the results show the dependence of enzyme activity with temperature. Zazueta-Sandoval *et al.* (2003) did not observe effect of incubation temperature at 28 or 37 °C, for the unknown strain they used. Faber *et al.* (2001) purified and characterized a benzoate-parahydroxylase of *A. niger*. This enzyme is a cytochrome P450 (CYP53A1). They did not report an optimum temperature. Vatsyayan *et al.* (2008)

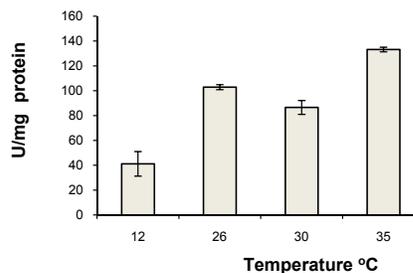


Fig. 7. Temperature effect in oxygenase activity in crude extract from SSF. Activity was measured using a spectrophotometric method with o-dianisidine. The amount of protein used was 58.6 μg per sample. Decane was used as substrate. Each bar represents the average value of two replicates (\pm SD). All the mean values are significantly different ($\alpha = 0.05$).

observed that the optimum temperature for CYP activity was 37°C. They report that activity is rapidly lost at 40 °C and it decreases slower when the temperature is below 37 °C. They did not study the activity below 30°C.

3.6 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Figure 8 exhibits the results of PAGE. Lanes 1-3 were revealed for oxygenase activity (zymogram). They were loaded with cell free extract from SSF. Crude extract from SmF presented no activity with any of the substrates used even though, the amount of protein was the same for both kind of extracts or even 4 times greater for SmF (results not shown). The rest of the lanes were revealed for protein. Lane 4, was loaded with SSF sample and lane 5 with SmF extract, 35 µg of protein were used for each lane. The last lane corresponds to a molecular weight standard. It can be observed that the SSF samples show two well defined protein bands (*a*, *b*). As for SmF sample only band *a* is clear. Protein bands *a* and *b* matches with decane, hexadecane and benzene activities. Because, activity bands are too broad, it is not possible to allocate such activity to one of the protein bands *a* or *b*. Besides, both proteins have similar molecular weights, around 219 kDa. Vatsyayan *et al.* (2008) reported a CYP with a molecular weight that is half of the calculated in this work. Although, they run an SDS-PAGE so it may be a similar protein than the reported here.

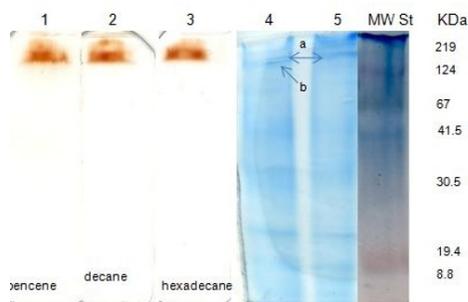


Fig. 8. Native PAGE in 6% acrylamide. Lanes 1-3 were loaded with crude extract from SSF (63.5 µg of protein per lane). Lanes 4 and 5 were loaded with crude extract from SSF and SmF respectively (35 µg per lane). Lanes 1-3 were revealed for oxygenase activity (zymogram) using the substrates indicated. Lanes 4 and 5 were developed for protein. The last lane corresponds to a molecular weight standard.

García-Peña *et al.* (2008) reported a zymogram for an oxygenase produced by *P. variotti* grown under SmF with toluene and with a mixture of toluene and glucose. The zymogram was revealed with benzene. They found that bands corresponding to the enzyme produced with toluene and glucose shown less activity, despite the fact that they did not observe catabolite repression during the toluene degradation. These results totally agree with our observations. Although in our case no bands of activity were visible for SmF.

Qi *et al.* (2002) commented that Woertz and Kinney (2000) reported that *E. Lecanii-corni* was not able to degrade benzene in liquid cultures. While they found, for the same strain, it was able to degraded benzene under solid culture.

The results shown for characterization of oxygenase(s) can be explained by the presence of a cytochrome P450 system. Faber *et al.* (2001) reported a CYP53A1 and a NADH:cytochrome P450 reductase (CPR) from *A. niger*. The CYP51A showed only one band of apparent mass of 58 kDa and the CPR had also only one band of 78 kDa. However, this mass was calculated in SDS-PAGE like Vatsyayan *et al.* (2008) did.

Conclusions

The results discussed above show the importance of the type of fermentation since not only extracellular enzymes, but also intracellular enzymes, can be obtained with better characteristics by SSF. The enzymes induced by SSF had not only higher activity but also a broader specificity. Enzyme stability, of the intracellular oxygenases studied here, does not depend of the type of fermentation system. *A. niger*, ATCC 9642, produces labile oxygenases under SSF and SmF as well.

One possible reason for the higher oxygenase activity found by SSF compared with the results by SmF is the higher biomass production. Another reason could be the direct contact of the hifas of *A. niger* with the hydrocarbon when the fungus is grown by SSF, that promotes a better enzyme induction. Meanwhile in liquid culture *A. niger* grows as pellets and only a small surface is in contact with the substrate.

A. niger is a filamentous fungus that can be used to degrade hydrocarbons such as hexadecane in SSF, in the presence or absence of glucose as a cosubstrate. However, the Glu:Hxd should be carefully selected to reach the extent of degradation desired at a reasonably period of time. Or to select a Glu:Hxd depending if the objective is to have a small amount of biomass with

highly active enzyme (as for the case of biofilters) or to produce a high amount of biomass with oxygenase activity (as for the case of bioremediation).

Highly active oxygenases that can oxidize a broad spectrum of substrates (linear, non linear and aromatic hydrocarbons) can be induced in *A. niger*, under SSF using hexadecane as inducer. It is important to highlight the high activity presented by oxygenases of *A. niger* with recalcitrant compounds such as pyrene, toluene and phenanthrene.

Much work needs to be done in order to elucidate the type of enzymes that are induced. It will be desirable to do zymograms with enzyme extracts from SmF and SSF using hexadecane as sole carbon source in order to observe if the activity for SmF sample increases. It is also recommended to change the conditions for the PAGE to have a better resolution of the proteins. To further purify the enzyme(s) it will be useful to use cloning and expression techniques.

It will be interesting to look for molecules that act as signal molecules in catabolite repression. Besides to study glucose repression from the physiological and molecular points of view.

Acknowledgements

The results presented here are part of the research conducted for F-F,T.C. in order to obtain the degree of Doctor in Biotechnology from UAM. This author thanks Conacyt and ITC for the financial support received. F-F,T.C. also thanks Dr R. Zazueta-Sandoval for his help in conducting PAGE and zymograms.

References

- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36, 565-570.
- Alazard, D. and Raimbault, M. (1981). Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 12, 113-117.
- Barrios-González, J., Baños, J. G., Covarrubias, A. A. and Garay-Arroyo, A. (2008). Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 79(2), 179-186.
- Barrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-Gonzalez, G. and López, L. (1988). Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters* 10(11), 793-798.
- Bouchez-Naïtali, M. and Vandecasteele, J.P. (2008). Biosurfactants, a help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1901-1907.
- Burton, S. (2003). Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology* 21(12), 543-549.
- Cresnar, B. and Petric, S. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814, 29-35.
- del Castillo, T. and Ramos, J. L. (2007). Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *Journal of Bacteriology* 189(18), 6602-6610.
- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C. and Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26(5), 271-275.
- Dilly, O. (2001). Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 117-127.
- Dmochewitz, S. and Ballschmiter, K. (1988). Microbial transformation of technical mixtures of polychlorinated biphenyls (PCB) by the fungus *Aspergillus niger*. *Chemosphere* 17(1), 111-121.
- Faber, B. W., van Gorcom, R. F. M. and Duine, J. A. (2001). Purification and characterization of benzoate-para-hydroxylase, a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 394(2), 245-254.

- Favela-Torres, E., Córdova-López, J., García-Rivero, M. and Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry* 33(2), 103-107.
- Feitkenhauer, H., Müller, R. and Märk, H. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 °C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 14, 367-372.
- Fontana, R.C. and Moura da Silveira, S.S.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 371-377.
- Fraatz, M. A., Berger, R. G. and Zorn, H. (2009). Nootkatone- a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 35-41.
- García-Peña, I., Ortiz, I., Hernández, S., Revah, S. (2008). Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 442-447.
- Gibson, D.T. and Subramanian, V., (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Organic Compounds* (Gibson, D.T. ed.) Pp. 181-252. Marcel Dekker, New York.
- Golubev, S.N., Scheludko, A.V., Muratova, A.Y., Makarov, O.E. and Turkovskaya, O.V. (2009). Assessing the potential of *Rhizobacteria* to survive under phenanthrene pollution. *Water, Air, & Soil Pollution* 198, 5-16.
- Gray, M. (1989). Substrate inactivation of enzymes in vitro and in vivo. *Biotechnology Advances* 7, 527-575.
- Hamamura, N., Yeager, C. M. and Arp, D. J. (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11), 4992-4998.
- Hartman, R. Hany, R., Plestcher, E., Ritter, A., Witholt, B. and Zinn, M. (2006). Tailor made olefinic medium chain length poly ([R]-3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 737.
- Holden, P.A., La Montagne, M.G., Bruce, A.K., Miller, W.G. and Lindow, S.E. (2002). Assessing the role of *Pseudomonas aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2509-2518.
- Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(2), 175-186.
- Kamerbeek, N.M., Janssen, D.B., van Berkel, W. J. H., Fraaije, M.W. (2003). Baeyer-Villiger monooxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis* 345(6), 667-678.
- Leahy, J. G., Colwell, R.R.(1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- Laemmli, V. K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lessner, D.J., Johnson, G.R., Parales, R.E., Spain, J.C. and Gibson, D.T., (2002). Molecular characterization and substrate specificity of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas* sp. strain JS765. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2), 634-641.
- Maestre, J. P., Gamisans, C., Gabriel, D. and Lafuente, J. (2007). Fungal biofilters for toluene biofiltration: evaluation on the performance with four packing materials under different operating conditions. *Chemosphere* 67, 684-692.
- Nikolova, N. and Nenov, V. (2005). BTEX degradation by fungi. *Water Science & Technology* 51(11), 87-93.
- Noordman, W. H., Wachter, J. H., de Boer, G. J., Janssen, D. B. (2002). The enhancement by surfactans of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate

- availability. *Journal of Biotechnology* 94, 195-212.
- Östberg, T. L., Jonsson, A. P., Bylund, D. and Lundström, U. S. (2007). The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60, 334-341.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R. and Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences* 77(1), 149-162.
- Parales, R.E., Huang, R., Yu, C.L., Parales, J.V., Lee, F.K.N., Lessner, D.J., Ivkovic-Jensen, M. M., Liu, W., Friemann, R., Ramaswamy, S. and Gibson, D.T. (2005). Purification, characterization, and crystallization of the components of the nitrobenzene and 2-nitrotoluene dioxygenase enzyme systems. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7), 3806-3814.
- Prenafeta-Boldu, F. S., Vervoort, J., Grotenhuis, J. T. C., van Groenestijn, J. W. (2002). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2660-2665.
- Qi, B., Moe, W. M. and Kinney, K. A. (2002). Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 684-689.
- Radwan, S. (2008). Microbiology of oil-contaminated desert soils and coastal areas in the Arabian Gulf region. In: *Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology 13, (P. Dion and C. S. Nautiyal Eds.) Pp 275-298. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ramesh, M. V. and Lonsane, B. K. (1991). Ability of solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, 591-593.
- Romero, M.C., Salvioli, M.L., Cazau, M.C. and Arambarri, A.M. (2002). Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution* 117(1), 159-163.
- Solís-Pereira, S.E., Favela-Torres, E., Viniegra-Gonzalez, G., Gutierrez-Rojas, M. (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* CH₄ in submerged and absorbed substrate fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39(1), 36-41.
- Sun, A. K. and Wood, T. K. (1997). Trichloroethylene mineralization in a fixed-film bioreactor using a pure culture expressing constitutively toluene ortho-monoxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* 55(4), 674-685.
- Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., Glieder, A., and Fraaije, M. W. (2010). Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology* 146, 9-24.
- van Beilen, J. B., Kingma, J. and Witholt, B. (1994). Substrate specificity of the alkane hydroxylase system of *Pseudomonas oleovorans* GPo1. *Enzyme and Microbial Technology* 16(10), 904-911.
- Van Gorcom, R. F. M., Boschloo, J. G., Kuijvenhoven, A., Lange J., Van Vark, A. J., Bos, C. J., Van Balken, J. A. M., Pouwels, P. H. and Van den Hondel, A. A. M. J. (1990). Isolation and molecular characteristics of the benzoate-para-hydroxylase gene (bpha) of *Aspergillus niger*. A member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. *Molecular and General Genetics* 223, 192-197.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4), 503-549.
- Vatsyayan, P., Kiran Kumar, A., Goswami, P. and Goswami, P. (2008). Broad substrate cytochrome P450 monooxygenase activity in the cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Bioresource Technology* 99, 68-75.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gómez, S. J., Díaz-Godínez, G. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid

- fermentation Systems. *Biochemistry and Bioengineering Journal* 13, 157-167.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 87, 81-86.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. *Bioresource Technology* 97, 1583-1591.
- Wang, K., W., Baltzis, B. C. and Lewandowski, G. A. (1996). Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose. *Biotechnology and Bioengineering* 51(1), 87-94
- Wu, R. R., Dang, Z., Yi, X. Y., Yang, C., Lu, G. N., Guo, C. L. and Liu, C. Q. (2011). The effects of nutrient amendment on biodegradation and cytochrome P450 activity of an n-alkane degrading strain of *Burkholderia* sp. GS3C. *Journal of Hazardous Materials* 186, 978-983.
- Zazueta-Sandoval, R., Zazueta-Novoa, V., Silva-Jimenez, H. and Cabrera-Ortiz, R. (2003). A different Method of Measuring and detecting mono- and dioxygenase activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105(108), 725-736.
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W. and Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters* 16(6), 643-648.