

Institut Univ. de Ciència i Tecnologia



Universitat Autònoma de Barcelona

**Alternatives Biotecnològiques a la síntesi
química de la vitamina K3**

Andreu Soldevila Fàbrega
2004

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i Microbiologia

Alternatives Biotecnològiques a la síntesi química
de vitamina K3

Vist-i-plau
El Director de la Tesi

Dr. Rafael Montilla
Arévalo

Memòria redactada per optar al
grau de Doctor en Ciències,
Secció Biològiques, per a la
Universitat Autònoma de
Barcelona,
per Andreu Soldevila Fàbrega

Bellaterra, Març del 2004

	Índex
Resum	4
1 Introducció	6
1.1 Les vitamines	6
1.2 La vitamina K	12
2 Materials i mètodes	44
2.1 Medis de cultiu	44
2.2 Reactius	48
2.3 Aparells	52
2.4 Soques microbianes	55
2.5 Mètodes i protocols d'assaig	58
3 Resultats	80
3.1 Recerca de microorganismes productors de vitamina K3	80
3.2 Identificació de soques salvatges productores de menadiona	95
3.3 Estudi de microorganismes en condicions d'assaig	97
3.4 Producció de vitamina K3 amb Cèl.lules senceres de B-48 amb 2-MNF	100
3.5 Construcció de soques de E.coli	109
4 Discussió	122
4.1 Ús, producció i necessitats de vitamina K3	122
4.2 La producció biotecnològica de la vitamina K3	126
4.3 Estudis mol.leculars de la producció de menadiona	138
5 Conclusions	144
6 Referències bibliogràfiques	147
7 Agraïments	150

RESUM

Aquesta tesi tracta l'estudi de la producció de la vitamina K3 des d'un punt de vista biotecnològic amb l'objectiu de plantejar noves alternatives a la síntesi química clàssica d'aquesta vitamina.

La síntesi clàssica de la vitamina K3 es realitza per un procediment químic que comporta una oxidació del 2-metilnaftalè com a material de partida, mitjançant un agent oxidant molt fort, el dicromat sòdic, en un medi que conté àcid sulfúric, creant-se una reacció que genera una elevadíssima quantitat de residus de crom en aigües àcides.

Així doncs es tracta d'una reacció molt contaminant que alhora té unes limitacions des del punt de vista químic molt important, com és la no utilització d'un catalitzador, la generació de grans quantitats de residus, així com la formació d'un isòmer de la vitamina K3, la 6-metil-1,4-naftoquinona, de manera que es produeix un compost no biològicament actiu, del qual cal desfer-se mitjançant dificultosos processos de purificació.

Els experiments realitzats en aquest treball van estar dirigits cap a la solució d'aquests problemes, és a dir, la utilització de biocatalitzadors en unes condicions suaus per a minimitzar l'impacte ambiental del procediment de síntesi, així com la millora de la selectivitat de la reacció, eliminant-se la formació de l'isòmer de la vitamina K3, punt clau per a l'èxit d'aquest nou sistema de síntesi.

Amb aquests objectius es va treballar amb microorganismes salvatges, així com amb microorganismes de col·leccions internacionals, fins que es va poder determinar que dos microorganismes salvatges aïllats del producte de partida de la reacció, el 2-metilnaftalè, així com tres soques de les col·leccions internacionals, eren capaços de produir vitamina K3 a partir d'aquest substracte.

Un cop obtingudes les soques productores de vitamina K3 es va poder determinar el mecanisme de la reacció, que indicava la formació dels intermediaris 2-metil-1-naftol i 2-metil-4-naftol, seguit del menadiol i finalment la formació de vitamina K3. També es

va poder dur a terme la determinació de que els microorganismes productors de vitamina K3 tenien un 100% de selectivitat pel que fa a la formació de quinones, evitantse la formació de l'isòmer no desitjat, fet determinant per a l'interès del món químic-farmacèutic en una reacció d'aquest tipus.

Es van poder mostrar diferents alternatives de síntesi d'aquesta vitamina utilitzant sistemes enzimàtics, cèl.lules senceres actives i cèl.lules senceres no proliferants, essent la producció amb *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip I en condicions de no proliferació en glucosa, les millor condicions de productivitat.

Des del punt de vista dels estudis mol.leculars, es va poder determinar que la proteïna responsable de la síntesi de vitamina K3, utilitzant com a substrate el 2-metil-1-naftol, era la citocrom aa3-600quinol oxidasa de *Bacillus subtilis*, però no es va poder determinar la proteïna responsable del primer pas de la reacció, l'oxidació del 2-metilnaftalè a 2-metil-1-naftol.

Els resultats obtinguts permeten veure un ventall de possibilitats que donen alternatives reals als processos clàssics de síntesi de la vitamina K3, tot i que són processos en els quals encara s'ha de treballar molt per augmentar-ne la productivitat fins a uns nivells òptims.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Les vitamines.

El concepte de vitamina engloba una sèrie d'estructures biològicament actives que actuen com a coenzims d'una gran diversitat de reaccions del metabolisme. Tenen un paper catalític clau per a una síntesi òptima, conversió i degradació de macromolècules essencials com són els àcids nucleics, lípids, proteïnes i carbohidrats (13).

A principis del segle passat, es creia que la nutrició animal depenia pràcticament en la seva integritat de l'aport de greixos, sucres i proteïnes, a part de minerals i l'aigua. Però experiments amb animals fets per corroborar aquesta tesi donant mescles de derivats de proteïnes, lípids, sucres i minerals, derivava en la mort de l'animal sense tenir una explicació inicial del problema (13). Aquestes experiències varen fer pensar que algun tipus d'element natural estava present en els aliments del qual no es tenia coneixement, però que era essencial per la vida i no el podíem sintetitzar nosaltres mateixos. Funk al 1911 va ser el primer en aïllar un d'aquests factors essencials. Com que es tractava d'una amina i era vital per nosaltres, li va anomenar *vitamina*. (13)

Les vitamines son estructures essencials per a nosaltres, és a dir, que el nostre metabolisme no les pot sintetitzar i per tant les hem d'assimilar amb la ingesta.

La quantitat de vitamines que necessita el cos per a que les funcions metabòliques que depenen d'elles funcionin no és gaire elevat, això fa que la ingesta de vitamines no provoqui grans quantitats de calories, dit d'una altra manera, la ingesta de vitamines no està associada a guany d'energia en quantitat, però és molt necessari que les petites quantitats que necessitem es consumeixin, degut a que en cas de carència, apareixen malalties associades que han estat ben estudiades. Aquestes estructures es divideixen en solubles en aigua, per exemple la B i la C, o bé liposolubles, com són la A, D, E, K. L'estructura de les vitamines esmentades es mostra a la figura 1.1.1.

La vitamina A és liposoluble, intervé en la biosíntesis dels mucopolisacàrids, la síntesi i manteniment de les cèl.lules epitel.lials i forma part de la rodopsina, la mol.lècula sensible a la llum de l'ull. El requisit diari és de 0,75 mg i prové del peix, fetge, llet i ous. La carència de vitamina A produeix ceguesa, diarrea, problemes circulatoris, sequedat de pell, susceptibilitat a infeccions i retardament del creixement (51).

La vitamina B, engloba un grup d'estructures hidrosolubles diferents, la B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂.

La vitamina B₁ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels carbohidrats, també actua en la producció d'energia i el manteniment del sistema nerviós. El requisit diari va des dels 0,8 als 1,6 mg i s'aconsegueix consumint cereals, fetge, carn, vegetals i llevat. La carència d'aquesta vitamina comporta trastorns alimentaris, demència, depressió, desgast muscular i interrupció del sistema nerviós (51).

La vitamina B₂ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels carbohidrats i per al creixement i manteniment cel.lular. El requisit diari va des dels 1,2 als 1,3 mg i s'aconsegueix consumint fetge, carn, vegetals i ous. La carència d'aquesta vitamina comporta anèmia, alteracions en el sistema nerviós, trastorn alimentari, pèrdua de la integritat a les cèl.lules epitel.lials (51).

La vitamina B₃ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels carbohidrats i greixos, síntesis de proteïnes i neurotransmissors com la serotonina, també actua en el manteniment del sistema nerviós, cèl.lules eiptelials, cabell, sistema digestiu, a més de disminuir els nivells de colesterol i triglicèrids. El requisit diari va des dels 10 als 15 mg i s'aconsegueix consumint cereals i fetge. La carència d'aquesta vitamina comporta dermatitis, diarrea, demència, transtorns gastrointestinals, lesions a la pell, pèrdua de la gana (51).

La vitamina B₅ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels carbohidrats, síntesis del colesterol i producció d'hormones. El requisit diari va des dels 10 als 20 mg i s'aconsegueix consumint fetge, ous, vegetals, molasses i cereals. No s'han trobat mai carències d'aquesta vitamina, perquè es troba àmpliament distribuïda.

La vitamina B₆ actua com a cofactor d'enzims responsables de la síntesis de proteïnes, producció d'energia des del glicogen, metabolisme de l'àcid linolènic, conversió de la prostaglandina E1, síntesis de neurotransmissors i manteniment del sistema nerviós. El requisit diari és de 2 mg i s'aconsegueix amb la ingesta de fetge, patates, altres vegetals, carn i llevat. La carència d'aquest tipus de vitamina comporta nanisme, fatiga, pèrdua del cabell i la gana, demència, dermatitis i anèmia.

La vitamina B₈ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels aminoàcids i neurotransmissors. El requisit diari és de 0,3 mg i s'aconsegueix consumint fetge, rovell d'ou, vegetals i molasses de canya. La carència d'aquest tipus

de vitamina comporta nanisme, fatiga, pèrdua del cabell i la gana, demència, dermatitis i anèmia.

La vitamina B₉ actua com a cofactor d'enzims responsables del metabolisme dels aminoàcids i neurotransmissors. El requisit diari és de 0,4 mg i s'aconsegueix consumint fetge, vegetals, carn, llet i cereals. La carència d'aquest tipus de vitamina comporta nanisme, fatiga, pèrdua del cabell i la gana, demència, dermatitis i anèmia.

La vitamina B₁₂ actua com a cofactor d'enzims responsables de la síntesi del DNA, metabolisme dels carbohidrats i greixos, síntesis de proteïnes i eritròcits, manteniment del sistema nerviós i assisteix l'absorció del calci. El requisit diari és de 0,002 mg i s'aconsegueix consumint fetge, carn i llet. La carència d'aquest tipus de vitamina produeix anèmia perniciosa, nanisme, pèrdua de gana, depressió, demència, degeneració del sistema nerviós perifèric, pèrdua de cabell i de la gana.

La vitamina C és hidrosoluble, actua com a cosubstrat per a les monooxigenases, té un paper important en les reaccions redox, en reaccions d'hidroxil·lació d'animoàcids i amines i també intervé en la síntesi d'hormones i absorció del ferro. El requisit diari és de 0,05 mg i s'aconsegueix consumint fruites, vegetals i patates. La carència d'aquest tipus de vitamina comporta sangrat excessiu, problemes inflamatoris i increment de sensibilitat als agents infecciosos.

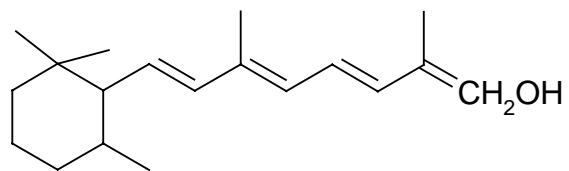
La vitamina D és liposoluble, té un paper important en la regulació del metabolisme del calci i el fósfor. El requisit diari és de 0.5 a 30mg i s'aconsegueix consumint vegetals, fetge, ous i làctics. La carència d'aquest tipus de vitamina provoca neuropaties del sistema nerviós perifèric, pèrdua dels reflexes, anèmia hemolítica, acumulació de greixos en els músculs, mala absorció de greixos i pèrdua del desig sexual.

La vitamina E és liposoluble, té una acció antioxidant vers compostos insaturats con són els àcids grassos, així com el manteniment de la integritat membranar. El requisit diari és de 0,1 mg i s'aconsegueix consumint fetge i vegetals.

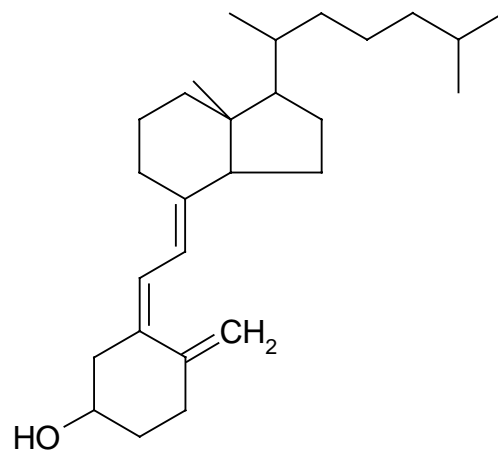
La vitamina K és liposoluble, té una acció essencial en la formació de la protrombina, que és un factor de la coagulació sanguínia, a més actua com a cofactor en la carboxilació dels residus d'àcid glutàmic de les proteïnes. El requisit diari és de 0,1 mg i s'aconsegueix consumint fetge i vegetals. La carència d'aquest tipus de vitamina comporta problemes de coagulació sanguínia.

FIGURA 1.1.1.(51,41)): Estructuras moleculares de les vitamines

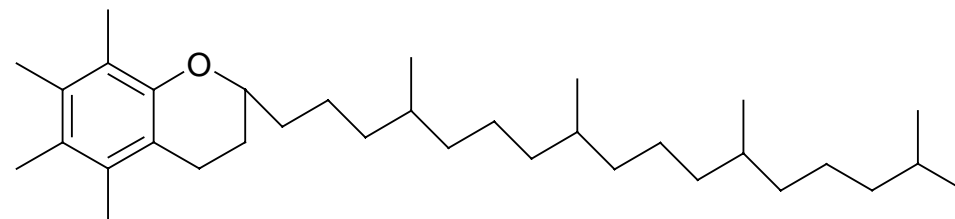
Vitamina A



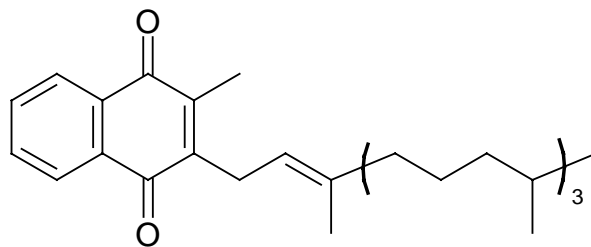
Vitamina D3



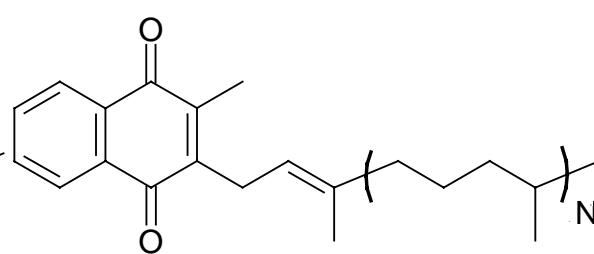
Vitamina E



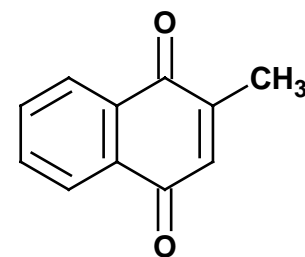
Vitamina K1



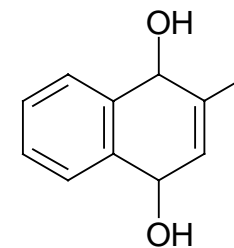
Vitamina K2

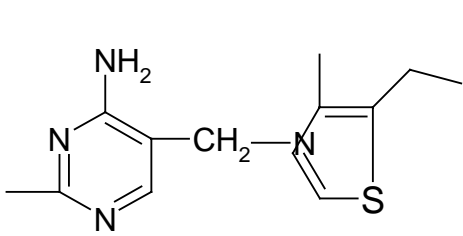


Vitamina K3

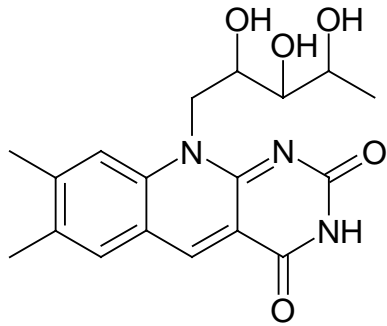


Vitamina K4

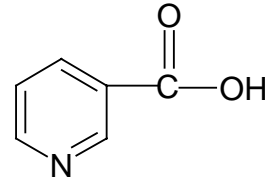




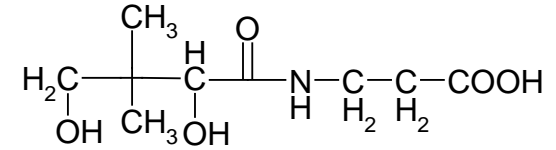
Vitamina B1



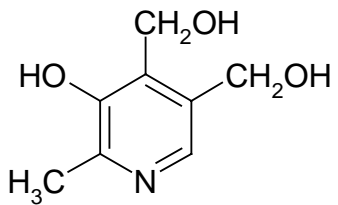
Vi tamina B2



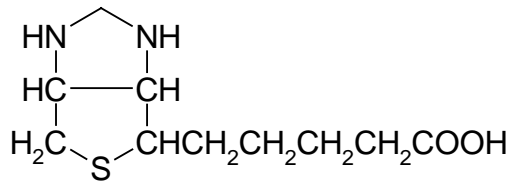
Vitamina B3



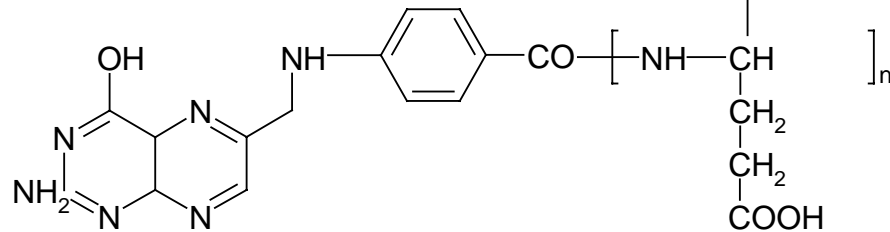
Vitamina B5



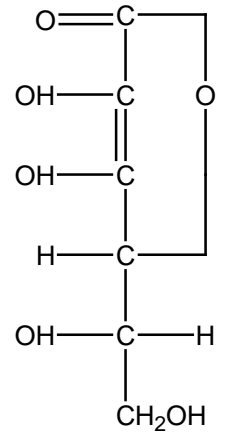
Vitamina B6



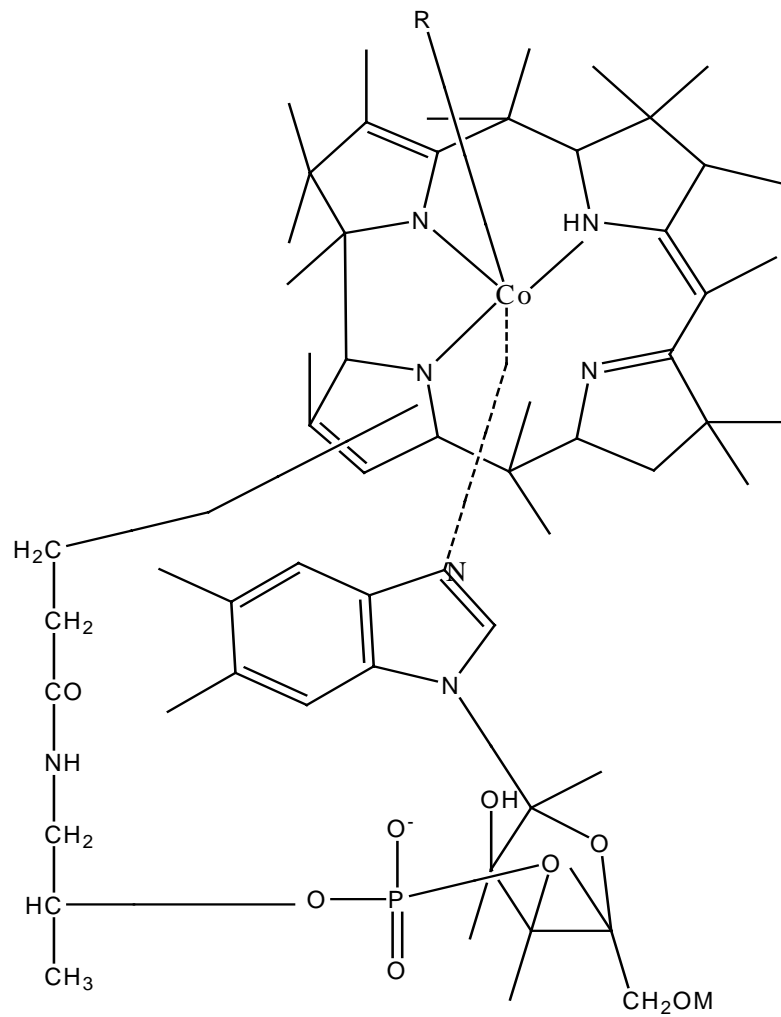
VitaminaB8



Vitamina B9



Vitamina C



Vitamina B12, en que R pot ser OH-, CH-, CH₃ o 5' desoxiadenosil

1.2. La vitamina K.

El terme de Vitamina K va aparèixer el 1929, però fins el 1939 no va poder ser aïllada i purificada, essent l'última vitamina liposoluble a ésser descoberta (13). Engloba una sèrie de compostos naturals o sintètics derivats de la naftoquinona (13).

El grup d'estructures que avui entenem com vitamina K tenen una activitat principal reconeguda, que és l'antihemorràgica.

El primer compost aïllat d'aquesta família de productes va ser la vitamina K1, també anomenada Filoquinona, que es va extreure de l'alfals. Posteriorment es va descobrir que certs grups bacterians eren productors de menaquinones, també anomenades com a Vitamina K2 (13). Més recentment s'han desenvolupat nous productes sintètics com són la menadiona, o vitamina K3, i el menadiol, o vitamina K4, que tenen un elevat interès industrial, sobretot en la indústria química i farmacèutica.

1.2.1. Tipus de vitamines K.

La Filoquinona es pot descriure químicament com (R-(R*,R*-(E))-2-Metil-3-(3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenil)-1,4-naftalendiona, 2-metil-3-fítill-1,4-naftoquinona, 3-fítillmenadiona, o bé noms més senzills com fitonadiona, fitomenadiona o vitamina K1. La seva fórmula es $C_{31}H_{46}O_2$. Té un punt de fusió de 450,71°C, una composició química de C 82,61%, H 10,29%, O 7,10%. És un oli viscos de color groc d'una densitat de 1,5263, activitat òptica de $-0,28^\circ$ i els màxims d'absorció en la franja de l'ultraviolat en dioxà es troben a 242, 248, 260, 269 i 325 nm. És insoluble en aigua i soluble en metanol, etanol, acetona, benzè, éter de petroli, hexà, dioxà, cloroform, éter, altres solvents orgànics i en olis vegetals. És estable en aire i humitat, però és degradat per la llum solar. No li afecten els àcids diluïts, però és destruït per solucions alcalines i agents reductors. És un transportador d'electrons de la fotosíntesi, es troba en els fotosistemes dels cloroplasts i està extès per plantes, algues i bacteries fotosintètiques, per tant, és la principal font dietètica de vitamina K (13).

Presenta una forma hidroxilada que es pot anomenar fitonadiol, dihidrovitamina K1 o filohidroquinona. Té un aspecte de massa cerosa que es dissol en éter i éter de petroli.

També presenta la forma en epòxid anomenada vitamina K1 2,3-epòxid, de composició $C_{31}H_{46}O_3$, és un oli viscos incolor, amb uns màxims a l'ultraviolat en alcohol 95% de 259,305 nm i també és insoluble en aigua.

La forma hidroxilada presenta també la sal sòdica difosfat $C_{31}H_{48}Na_2O_8P_2$, anomenant-se difosfat sòdic de fitomenadiol, té un punt de fusió de $138^{\circ}C$ i és soluble en aigua i metanol (37).

Les menaquinones es poden descriure químicament com 2-metil-tot-trans-poliprenil-1,4-naftoquinones, i estan formades per diferents variants segons el número de residus d'isoprè que hi ha en la cadena lateral, arribant-se fins a 15 repeticions. Aquests compostos de diferent longitud en la cadena lateral són produïts per diversos grups bacterians, principalment els que formen part de la microbiota intestinal, els quals són una font important de vitamina K tant per humans com per certs animals (13).

Les principals variants són la menaquinona -4, 6 i 7. La menaquinona-4 es descriu químicament com (E,E,E)-2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil)-1,4-naftalendiona, i també anomenada menantetreona, MK-4 i Vitamina K2. La seva fórmula es $C_{31}H_{40}O_2$, forma cristalls grocs, té un punt de fusió de $35^{\circ}C$, un màxim d'absorció l'ultraviolat-visible (UV) de 248nm. (37).

La menaquinona-6 es descriu químicament com (tot-E)-2-(3,7,11,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaenil)-3-metil-1,4-naftalendiona, i també s'anomena 2-difarnesil-3-metil-1,4-naftoquinona, farnoquinona, MK6 i Vitamina K2. Forma cristalls grocs, té un punt de fusió de $50^{\circ}C$, uns màxims d'absorció a l'UV en éter de petroli de 243, 248, 261, 270, 325 i 328 nm. (37).

La menaquinona-7 es descriu químicament com (tot-E)-2-(3,7,11,15,19,23,27-heptametil-2,6,10,14,18,22,26-octacosahexaenil)-3-metil-1,4-naftalendiona o també anomenada com Vitamina K2. Forma microcristalls grocs, té un punt de fusió de $54^{\circ}C$ i a partir de $200^{\circ}C$ es degrada. Té uns màxims d'absorció a l'UV en éter de petroli de 243, 248, 261, 270, 325, 328nm i és lleugerament menys soluble que la vitamina K1 al dissoldre en els mateixos dissolvents (37).

La menadiona es descriu químicament com 2-metil-1,4-naftalendiona o bé 2-metil-1,4-naftoquinona i s'anomena menaftona o vitamina K3. La seva fórmula és $C_{11}H_8O_2$, té una composició C 76,73% H 4,68% O 18,58%, i un pes molecular de 172,18. És un producte sintètic que forma cristalls grocs brillants, lleugera olor acre, punt de fusió entre 105 i $107^{\circ}C$. Es degrada amb la llum i és estable a l'aire, és insoluble en aigua i 1 gram es dissol en 60 ml d'alcohol, en 10 ml de benzè i 50 ml d'olis vegetals. Moderadament soluble en cloroform i tetraclorur de carboni. Les solucions es poden escalfar sense degradació fins a $120^{\circ}C$, però és destruïda per àlcalis i agents reductors. La dosis letal 50 (LD50) en ratolins és de 0.5g/kg (37).

També es presenta en forma de bisulfit sòdic, describint-se químicament com 1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-1,4-dioxo-2-naftalensulfonat sòdic, de fórmula $C_{11}H_9NaO_5S$. Pot trobar-se de forma trihidratada i forma cristalls blancs higroscòpics. Es descoloreix i es pot convertir en color púrpura per l'acció de la llum. Es dissol lleugerament en alcohol i gairebé gens en éter i benzè, mentre que en aigua 1 gram es dissol en 2 mililitres.

La forma de bisulfit de dimetilpirimidinol que té la fórmula $C_{17}H_{18}N_2O_6S$, es troba en forma de pols. Un gram és soluble en 100 mililitres d'aigua, és lleugerament soluble en alcohol i insoluble en éter i benzè (37).

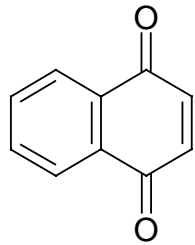
El menadiol es pot definir químicament com 2-metil-1,4-naftalendiol o 2-metil-1,4-naftohidroquinona i és anomenat també com dihidrovitamina K3 o vitamina K4. La seva fórmula és $C_{11}H_{10}O_2$, té un pes molecular de 174,2 i una composició de C 75,84% H 5,79% O 18,37%. És un compost sintètic derivat del naftoquinol i és la matèria de partida per a la preparació sintètica de menaquinones. Forma agulles blanques amb un punt de fusió de 168-170°C, és lleugerament soluble en benzè i cloroform, i fàcilment soluble en acetona i alcohol.

També es presenta en forma de diacetat, definint-se químicament com 1,4-diacetoxi-2-metilnaftalè i també anomenat vitamina K4 o acetomenaftona. Es troba en forma de cristalls amb un punt de fusió de 112-114°C, pràcticament insoluble en aigua, lleugerament soluble en alcohol fred i soluble en 3,3 parts d'alcohol bullent en àcid acètic.

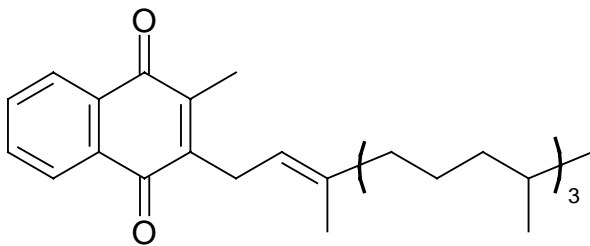
També es presenta en forma de dibutirat, amb una fórmula de $C_{19}H_{22}O_4$, forma cristalls amb un punt de fusió de 53°C, és pràcticament insoluble en aigua i soluble en alcohol, benzè, olis i greixos.

També es presenta una forma de sal sòdica difosfat, definintse químicament com difosforat sòdic 2-metil-1,4-naftalendiol. Es prepara en forma hexahidratada, forma una pols blanca-rosada i és soluble en aigua. Té un gust salat i és pràcticament insoluble en metanol, etanol, éter i acetona (37).

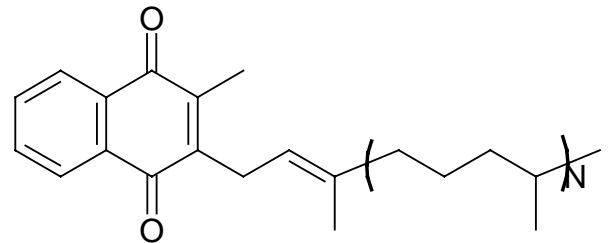
FIGURA 1.2.1. Estructures conegudes de vitamines K i el seu precursor, la naftoquinona (41,50).



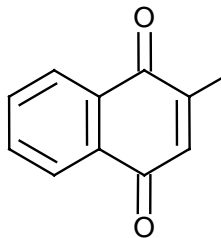
Naftoquinona



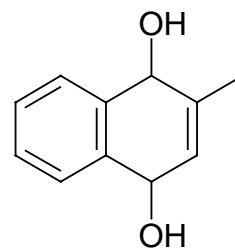
Vitamina K1 (Filoquinona o Fitomenadiona)



Vitamina K2 (Menaquinona)



Vitamina K3 (Menadiona)



Vitamina K4 (Menadiol)

1.2.2. El metabolisme de la vitamina K en humans.

L'absorció de la fitomenadiona i la menadiona en forma liposoluble requereix la presència de bilis per a la seva absorció en l'intestí, mentre que pels seus derivats hidrosolubles no és necessària. La vitamina K que és absorbida, s'acumula al fetge, tot i que només s'emmagatzema per períodes curts. La vitamina K no travessa la placenta i la seva concentració en la llet materna és baixíssima. La fitomenadiona és ràpidament

metabolitzada cap a metabolits més polars i és excretada per la bilis i orina formant conjugats en forma de glucorònids i sulfats. En adults l'absorció de fitomenadiona en les preparacions col·loïdals és més irregular i imprevisible en l'administració intramuscular que no pas en l'administració intravenosa. Quan s'utilitza com a antídote de drogues anticoagulants, cal aplicar la fórmula de forma intravenosa. En neonats la concentració de fitomenadiona plasmàtica després d'haver administrat una dosi oral o intramuscular és superior a la d'adults durant un període de 24 dies (13)

1.2.3. Efectes adversos de la vitamina K.

L'administració intravenosa de fitomenadiona pot provocar hipersensibilitat, anafalaxia, cianosis i col·lapses cardiovasculars. L'administració intramuscular o subcutània pot provocar flebitis, atrofia i necrosis. Les formulacions de menadiona solubilitzada amb lecitina i sals biliars s'haurien d'administrar amb compte a pacients amb problemes de fetge i a neonats prematurs ja que aquesta pot desplaçar la bilirrubina (13).

L'administració de menadiona i menadiol en forma de fosfat sòdic a neonats i dones embarassades pot provocar anèmia hemolítica i hiperbilirrubinèmia a l'infant, a més d'hemòlisis en pacients amb la deficiència glucosa-6-fosfatdeshidrogenasa o deficiència de Vitamina E. La fitomenadiona té un risc menor d'hemòlisis.

Tot i que s'ha dubtat durant anys de la possible capacitat de carcinogènesis de la Vitamina K per administració intramuscular, s'ha demostrat que aquesta possibilitat no existeix, tot i que es deixa a l'elecció dels pares el tipus d'administració oral, intravenosa o intramuscular (13).

Diversos factors, com són els seus baixos requeriments, la baixa concentració en els teixits, els mètodes analítics poc sensibles per la seva valoració i el poc seguiment dels estats subclínic de deficiència, han fet que el coneixement i metabolisme d'aquesta vitamina en el camp de la salut no s'hagi estudiat tant com altres vitamines liposolubles, com són la A i la E (13).

La seva funció s'havia definit només com a antihemorràgica sense conèixer bé el seu funcionament.

No es va despertar un gran interès sobre ella fins que es va observar que molts processos en els que intervé la protrombina i altres factors de coagulació (factors II, VII, IX, X) són vitamina K dependents (13), tant en humans com en animals (13). La cascada de reaccions que es produeixen en la formació d'un coàgul està regulada per un sistema intrínsec, en què tots els factors es troben en el plasma, i un sistema extrínsec,

en què hi ha una alliberació de tromboplastina quan hi ha dany a la pell o un altre teixit. En els dos sistemes d'activació de la formació del coàgul convergeixen en el seu últim component actiu, el factor X, factor que permet l'activació de la protrombina, realitzantse la gamma-carboxilació dels deu primers àcids glutàmics dels quaranta primers residus de l'extrem N-terminal, canviant-la a trombina a la sang.

La trombina facilita la conversió de fibrinogen soluble a un coàgul de fibrina insoluble. La fibrina polimeritza formant fibres i s'enreda formant una malla amb els diferents components de la sang, especialment els glòbuls vermells (13).

Els principals processos involucrats en la coagulació es presenten a la figura 1.2.3.1, il·lustrant la necessitat de la presència de la vitamina K a almenys quatre punts en les reaccions d'activació del factor IX, el factor X, el factor VII i el factor II.

La forma activa de la Vitamina K és la reduïda, la hidroquinona, figura 1.2.3.2, la qual es forma mitjançant la vitamina K reductasa, i un cop ha realitzat la seva funció biològica de cofactor a la gamma-carboxilació dels àcids glutàmics, es transforma en l'epòxid de vitamina K, que és reciclat a vitamina K mitjançant l'enzim epòxid reductasa en el fetge. Aquest cicle de la vitamina K es detalla a la figura 1.2.3.3.

La funció metabòlica de la vitamina K és la d'actuar com a coenzim a l'hora de realitzar la carboxilació de proteïnes que incorporen àcids glutàmics en la seva composició, transformant aquests residus a gamma-carboxiglutàmic. Aquesta reacció es detalla a la figura 1.2.3.2

Figura 1.2.3.1. Cascada d'activació per a la formació d'un coàgul (42)

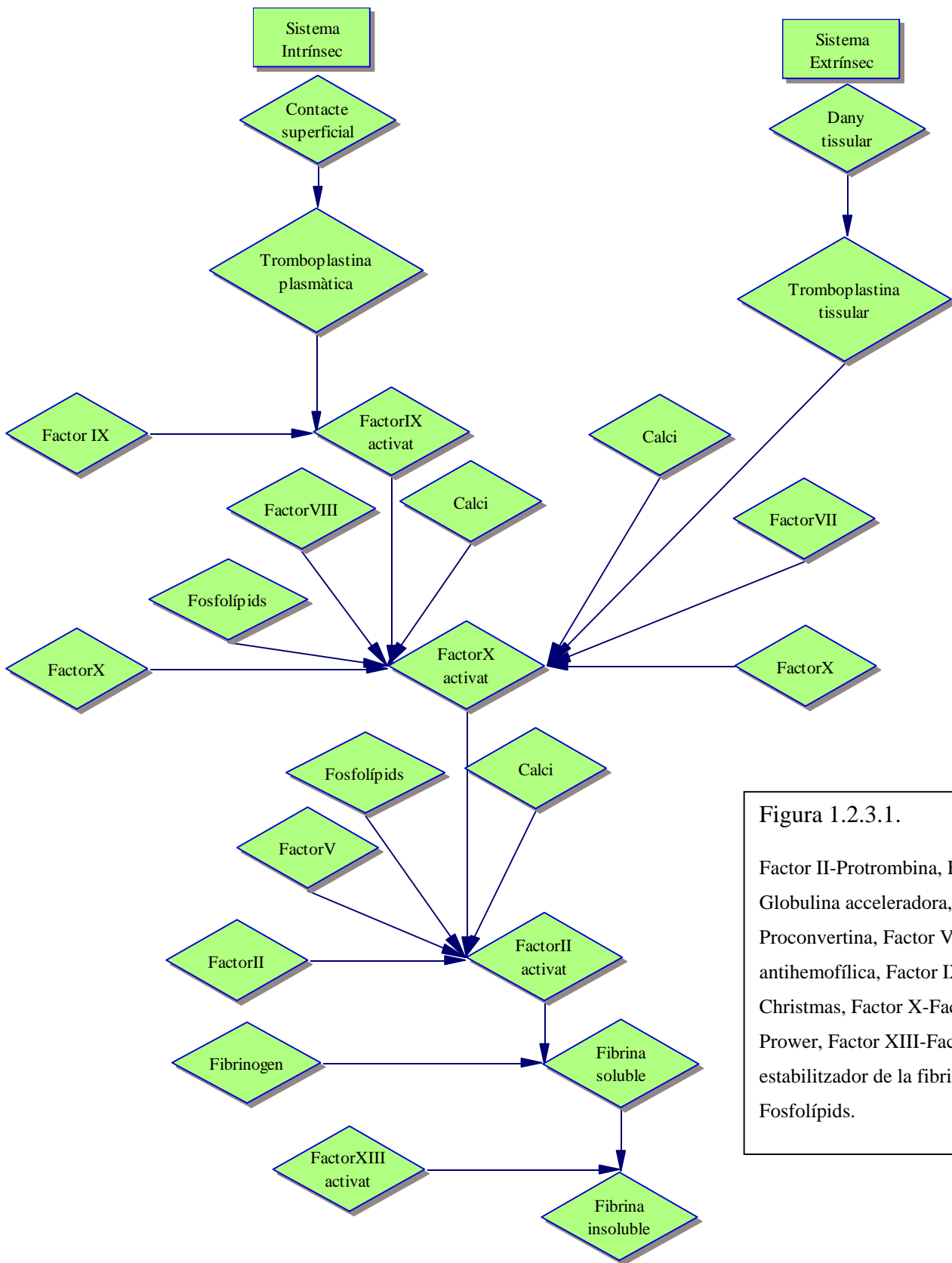


Figura 1.2.3.1.
 Factor II-Protrombina, Factor V-
 Globulina acceleradora, Factor VII-
 Proconvertina, Factor VIII-Globulina
 antihemofílica, Factor IX-Factor
 Christmas, Factor X-Factor Stuart-
 Prower, Factor XIII-Factor
 estabilitzador de la fibrina, PL-
 Fosfolípids.

La carboxilació permet participar a aquestes proteïnes procoagulants en una interacció específica amb ions calci i fosfolípids que és necessària per a que puguin realitzar la seva activitat biològica.

S'ha observat que hi ha una sèrie de proteïnes plasmàtiques vitamina K dependents (C, S, M, Z) que tenen unes activitats anticoagulants, inhibint la coagulació, proteïna C, i inclús provocant fibrinolisis quan es formen complexos C-S. L'acció exacta de les proteïnes M i Z no és coneguda encara (42).

Figura 1.2.3.2. Acció de la vitamina K en la gamma-carboxilació de residus d'àcid glutàmic.

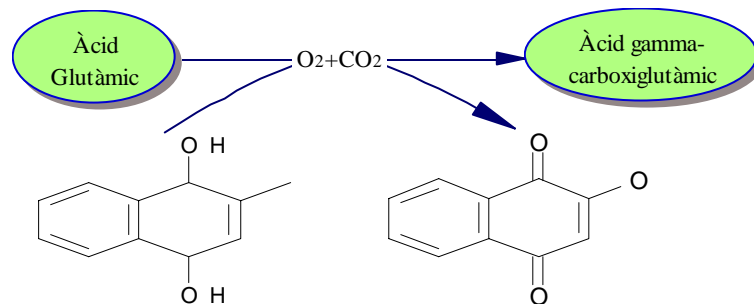


Figura1.2.3.3. Cicle de la Vitamina K (13)

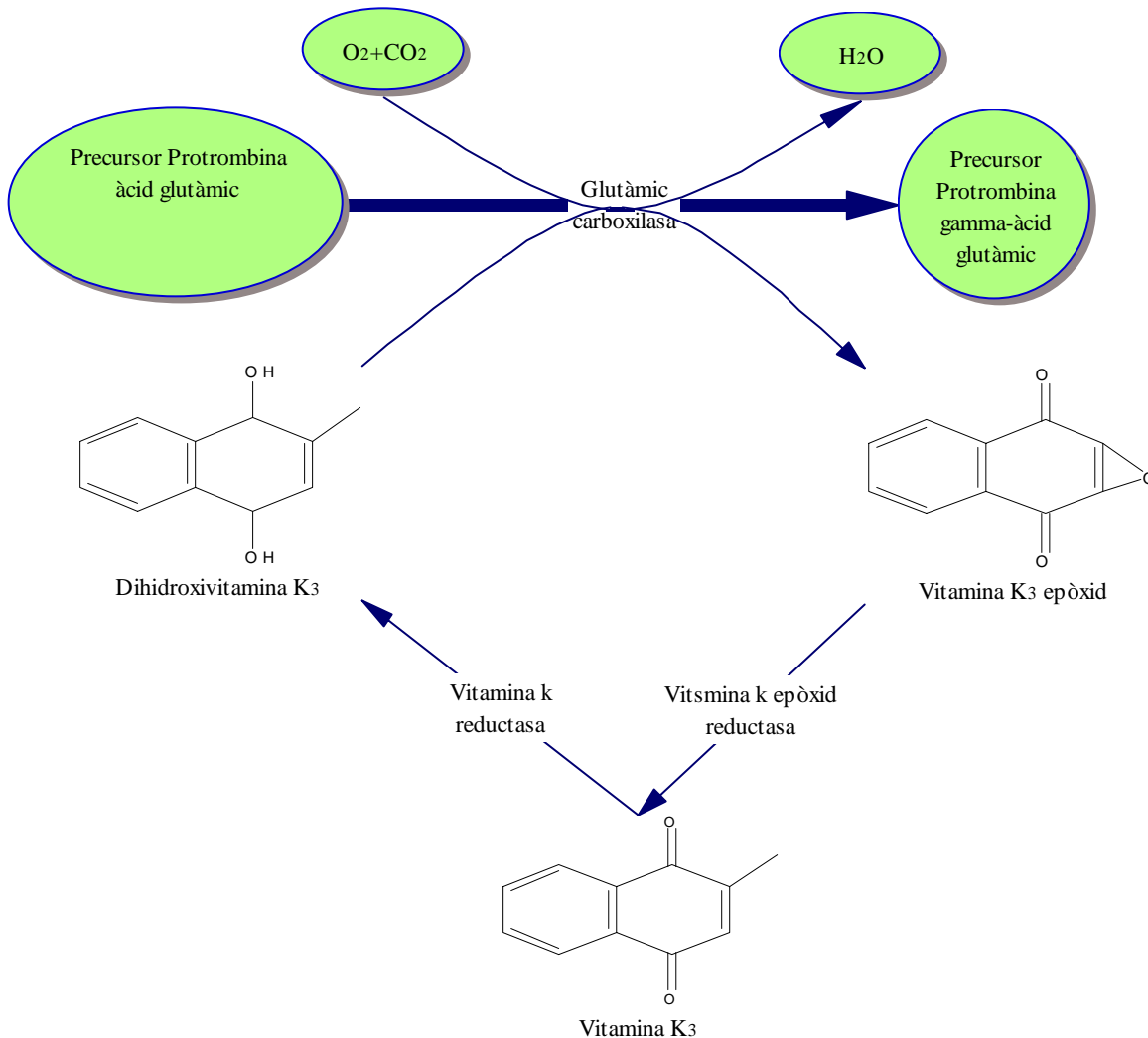


Figura1.2.3.3:

*La warfarina i els fàrmacs cumarínics actuen inhibint l'enzim Vitamina K reductasa i Vitamina K epòxid reductasa.

Una altra proteïna que pateix la gamma-carboxilació mediada per la vitamina K3 és l'osteocalcina, la qual està involucrada en el mecanisme de movilització del calci de l'os mitjançant la vitamina D (42). La vitamina D té la capacitat de regular tant el desplaçament com l'entrada del calci a l'os, millora la capacitat d'absorció de calci a nivell intestinal i augmenta la secreció d'osteocalcina en els osteoblasts. L'osteocalcina, un cop ha estat gammacarboxilada gràcies a l'acció de la vitamina K hidroxilada, té la capacitat d'unirse als ions calci, de manera que segons els nivells de vitamina D, el gruix de l'os i la concentració de calci en sang, l'osteocalcina movilitzarà calci de l'os

per a distribuirlo per la sang o bé en potenciarà la seva absorció i trasllat cap a l'os. El mecanisme de mobilització del calci es detalla a la figura 1.2.3.4.

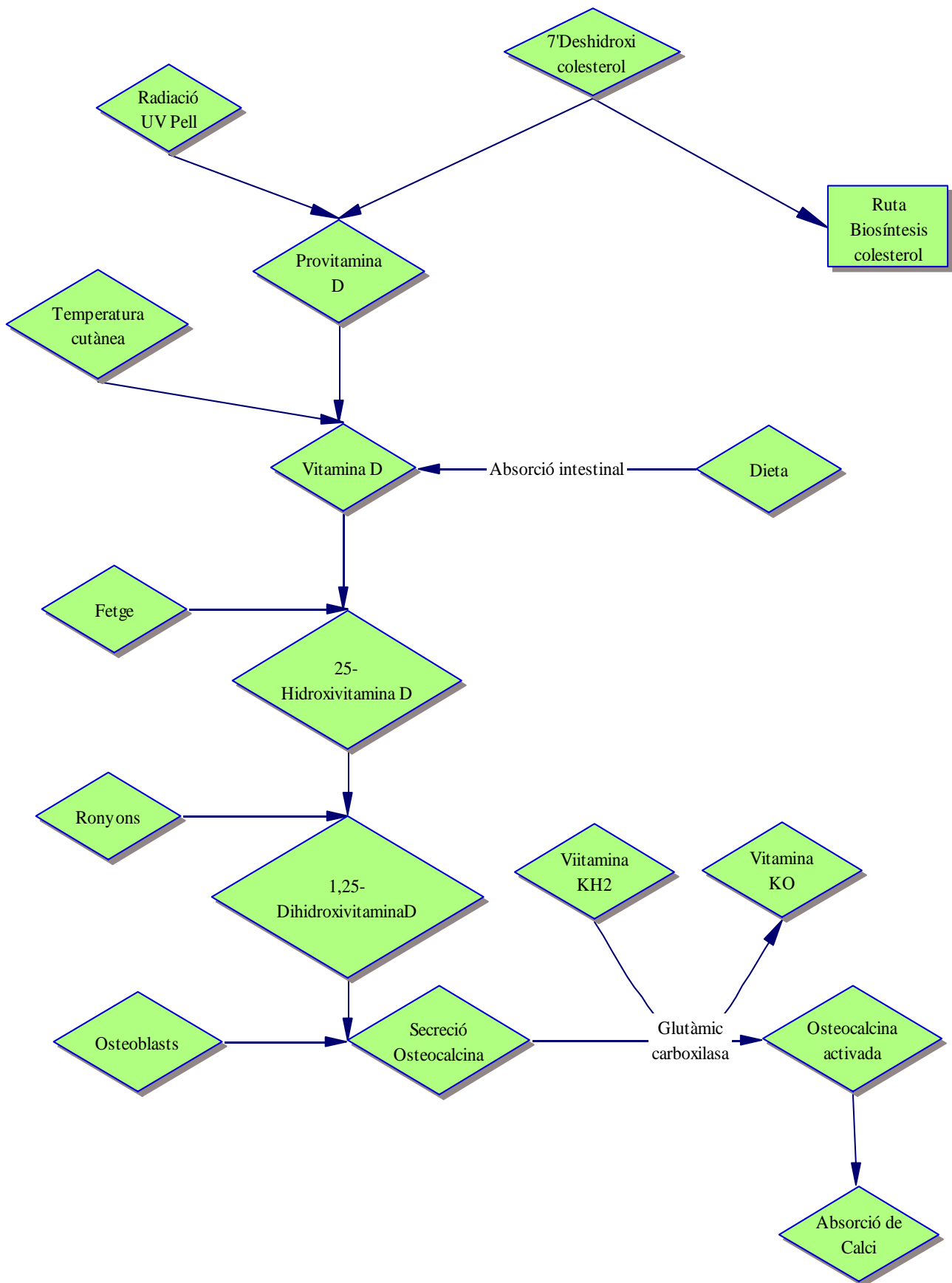
La vitamina D és el nom que es va aplicar a dues substàncies liposolubles, el colecalciferol i ergocalciferol, que tenen la capacitat de prevenir i curar el raquitisme. Tot i que s'anomena com una vitamina, és una hormona que junt amb l'hormona paratiroidea té un paper importantíssim en l'homeòstasi del calci. Es sintetitza en la pell i en condicions ideals no cal ingerir-ne per la dieta ja que la seva síntesi seria suficient. Un cop és activada comporta un augment de la concentració de calci plasmàtic. Aquesta vitamina a part de tenir un paper importantíssim en l'homeostasi del calci, intervé en moltíssims processos ja que existeixen receptors de la vitamina D activada en cèl.lules hematopoiètiques, limfòcits, cèl.lules epidèrmiques, illots pancreàtics i neurones.

La forma activa de la vitamina D és el calcitriol, hormona que interactua amb els receptors dels osteoblasts, cèl.lules que s'encarreguen de la formació de l'os, i en provoca la secreció de diferents proteïnes, entre elles l'osteocalcina, que és una proteïna vitamina K dependent, és a dir que depèn d'aquesta per a que es doni l'activació mitjançant la gamma-carboxilació dels residus d'àcid glutàmic, i aquesta pugui fer la seva feina d'unirse al calci. El procés de síntesis de Vitamina D i l'activació de l'osteocalcina es descriu a la figura 1.2.3.4.

Aquest mecanisme junt amb una clara correlació entre la disminució de nivells de vitamina K i augment de fractures òssies en pacients, indica que aquesta vitamina K té un important paper en patologies òssies com és la osteoporosis.

La gammacarboxilació es realitza amb la forma hidroxilada de la vitmanina K (KH₂) i permet a les proteïnes de coagulació vitamina K dependents unirse al calci, procés que és inhibit per la warfarina, i a més carrega negativament la superfície de fosfolípids en plaquetes i superfície endotelial.

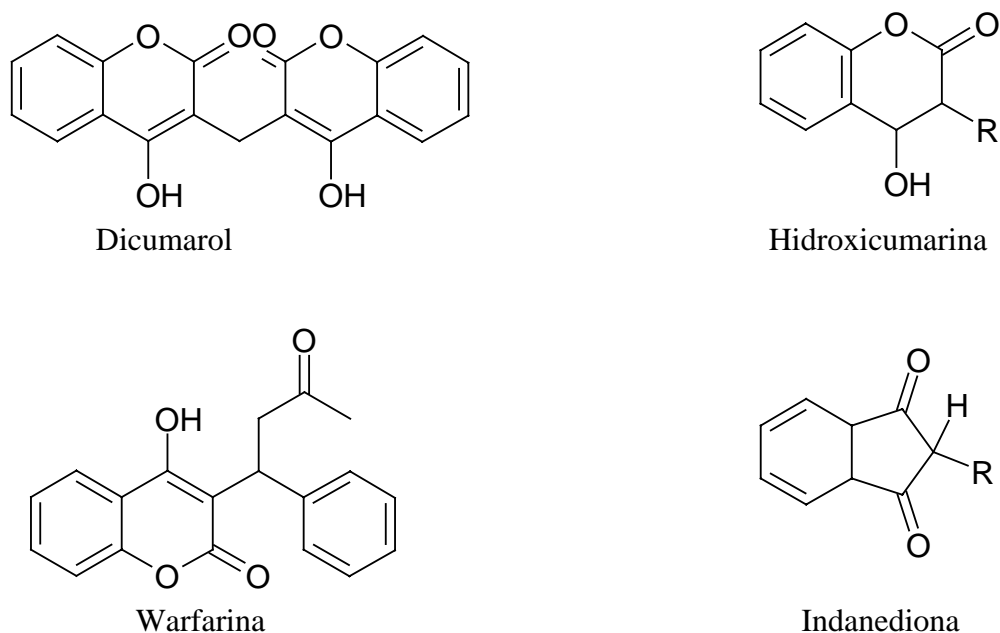
Figura 1.2.3.4 (13). Mecanisme d'absorció del calci



1.2.4. Antagonistes de la vitamina K.

Existeixen una sèrie de productes naturals com són la ja anomenada warfarina, dicumarol, hidroxycumarina o indanediol, que es comporten com antagonistes de la vitamina K, fet que pot portar a un estat de deficiència indirecta.

Figura 1.2.4.1: Estructures mol.leculars dels antagonistes de la vitamina K



La warfarina és una droga anticoagulant que actua a nivell de dos enzims bàsics en el cicle de la vitamina K, com són la vitamina K epòxid reductasa i la vitamina K reductasa, enzims que permeten adquirir la forma activa a la vitamina K, és a dir la forma d'hydroquinona (42). L'administració és via oral o rectal i s'absorbeix en el tracte gastrointestinal sense massa variació i és metabolitzat per l'enzim CYP2C9 en el fetge, formant metabolits amb grups hidroxil i alcohol, que li confereixen nula o baixa activitat anticoagulant, mentre que el metabolit S-Warfarina exhibeix una activitat de 2 a 5 vegades majors respecte a l'isòmer R-warfarina. Els metabolits són excretats per la bilis de forma inactiva i posteriorment són eliminats per l'orina i també per la llet materna (42). A part de l'efecte anticoagulant pot tenir efectes secundaris com són l'eosinofília, anèmia, fins i tot anèmia hemolítica, disminució de l'hemoglobina i un augment en el temps de protrombina.

El Dicumarol és una altra droga anticoagulant que actua al mateix nivell que la warfarina. L'administració és via oral i es pot administrar juntament amb hidròxid de magnesi per augmentar-ne la seva absorció a nivell del tracte gastrointestinal, després

passa a la sang i es dirigeix cap al fetge, on és metabolitzat per enzims microsomals produint-se hidroxilacions que comporten l'activació de la droga, que serà secretada per la bilis i excretada per l'orina i la llet materna. Com a efectes adversos, cal destacar que pot provocar defectes en la coagulació, eosinofília, agranulocitosis, a nivell cardiovascular, sangrat pericardial i a nivell del sistema nerviós central sangrat cerebroespinal. Degut a que l'absorció d'aquest producte a nivell gastrointestinal és erràtica i que la seva vida mitja en el cos depèn de la dosi aplicada, la seva administració a pacients és poc comú, essent la warfarina el fàrmac aplicat, ja que tenen característiques molt similars pel que fa a activitat (42).

La indanedióna és una altra droga anticoagulant amb efectes i metabolisme similars a les dues anteriors.

La cumarina és un producte natural que prové de la llavor de la tonka, tot i que es pot preparar sintèticament. Els seus derivats, hidroxicumarina i dicumarol, es sintetitzen a partir de la cumarina. Pot provocar dany hepàtic en animals i hi ha evidències que també ho provoca en fetge humà. Ajuda a superar problemes de limfoedema tot i que els tractaments són llargs i no molt eficaços.

1.2.5. Requeriments de vitamina K.

Els requeriments de vitamina K per mamífers s'acompleixen via una acció combinada de la dieta juntament amb l'acció biosintètica dels microorganismes en l'intestí, principalment *Escherichi coli* en humans. Aquest equilibri depèn del tipus de dieta que tenen els diferents mamífers així com la productivitat dels microorganismes. Els rumiants, per exemple, tenen una microbiota que produeix una elevada quantitat de vitamina K, de manera que la deficiència en aquest tipus d'animals no és usual (42).

L'equilibri d'obtenció de vitamina K es pot veure alterat per l'utilització d'antimicrobians, que pot produir una disminució de la producció a nivell intestinal, o bé degut a la ingesta d'aliments contaminats d'antagonistes naturals, fets que poden portar a un estat de deficiència. Degut a aquests processos, o bé que la microbiota intestinal no s'hagi establert, en el cas de nadons, s'aconsella l'administració de vitamina K sintètica en les dietes, essent de 5mg a menors de 6 mesos, i de 10mg de 6 a 10 mesos (42), mentre que en pinsos per a alimentació animal la dosi és variable .

Figura 1.2.5.1. Requeriments de vitamina K per a diferents espècies (42):

Animal	Requeriment
Ovella	Síntesis microbianes
Cabra	Síntesis microbianes
Vaqueria	Síntesis microbianes
Gall d'indi	1-1,75mg/kg
Porc	0,5mg/hg
Gat	0,1mg/kg
Peix	0,5-1mg/kg
Vedell	Síntesis microbianes
Porc de Guinea	5mg/hg
Pollastre	0,5mg/kg
Ànec	4 mg/kg
Cavall	Síntesis microbianes
Gos	1 mg/kg
Rata	1 mg/kg
Humà Infant	5-10µg/dia
Humà Jove	15-30 µg/dia
Humà Adult	45-80 µg/dia

Figura 1.2.5.2. Riquesa en vitamina K dels aliments (42).

Aliment	Concentració ppm
Alfals assecada al sol	19,4
Alfals deshidratat	14,2
Civada	0,2
Col	4
Pastanaga	0,1
Fetge de porc	4-8
Fetge vaca	1-2
Blat de moro i ous	0,2
Peix	2,2
Carn	1-2
Pèsols	0,1-0,3
Patates	0,8
Espinacs	6
Patates	4

1.2.6. Producció de vitamina K.

En condicions normals tant els humans com la resta d'animals no necessitem una dosi extra de vitamina K a la que es rep d'una dieta rica en vegetals (font principal de vitamina K1). L'altra font de vitamina K són els microorganismes, principalment els bacteris grampositius (per exemple *Bacillus*) però també els bacteris gramnegatius (per exemple *Escherichia coli*), uns microorganismes que colonitzen el tracte gastrointestinal d'humans i animals (13). Aquests microorganismes biosintetitzen Vitamina K2, la menaquinona, que és una molècula que intervé en reaccions d'oxido-reducció al llarg de la cadena de transport d'electrons en el procés de la respiració. Aquest procés es realitza en la membrana interna d'aquests microorganismes (13).

En certes ocasions aquestes fonts de vitamina K no són suficients, bé sigui per dietes desequilibrades, dietes que incorporin productes antagonistes de la vitamina K, utilització d'antibiòtics que produeixin l'eliminació de la microbiota intestinal,

problemes de coagulació o problemes en el metabolisme del calci que justifiquin la seva inclusió com a fàrmac o additiu alimentari.

Amb l'objectiu de complir les necessitats d'aquest producte a nivell industrial, tant des del punt de vista farmacèutic com veterinari, s'han desenvolupat nombrosos processos de síntesis. Els processos de producció de vitamina K1, K2, K3 i K4, així com el seu estat de desenvolupament es detallen a continuació:

1.2.6.1. Producció de vitamina K1.

La producció de vitamina K1 s'ha intentat realitzar a nivell d'extracció desde cultius de diferents plantes, entre elles de l'alfals, però la baixa concentració d'aquesta ha estat un punt limitant, de manera que s'han buscat alternatives químiques i biotecnològiques que permetessin una conversió des d'un o diversos substrats relativament semblants (13).

L'alternativa més estudiada és la síntesi química, que addiciona una cadena de fitol natural o bé fitol sintètic en forma de bromur de fitil en posició 2 a l'anell aromàtic del naftalè oxidat en les posicions 1 i 4. Aquesta addició es realitza mitjançant una reacció retro-Diels-Alder i s'obté un producte de vitamina K1 mixte amb isòmer cis i trans (13).

1.2.6.2. Producció de vitamina K2.

La producció de vitamina K2 també es pot realitzar de forma química i biotecnològica, de les quals es detalla els principals mètodes.

La síntesi química de la menaquinona es pot acomplir mitjançant l'oxidació del 2-metilnaftalè (2-MNF), o partint d'un producte més afí com és el menadiol, i una posterior addició d'una cadena alifàtica de 11 carbonis que simula la cadena poliprenílica lateral(2).

Més esforç s'ha realitzat en la recerca de microorganismes que permetin una elevada producció de vitamina K2, de manera que es coneixen bé els microorganismes que biosintetitzen menaquinona, la seva ruta biosintètica i s'han desenvolupat processos fermentatius(3). Els productors més importants de menaquinona són soques de *Flavobacterium meningosepticum* (47) i de *Bacillus subtilis var. natto* (11).

El procediment amb *Bacillus subtilis var. natto* es basa en un cultiu de 4 dies en medi ric que conté soja i glicerol i permet una producció de 40mg/l de K2. Aquesta producció és deguda a que hi ha un operó *Men* que codifica per les proteïnes que fan la síntesi de la menaquinona. La menaquinona intervé com una molècula d'oxido-reducció que permet el transport d'electrons per la membrana, essent reduïda per 3 enzims

diferents, la succinat menaquinona reductasa, NADH menaquinona reductasa i glicerol 3 fosfat menaquinona reductasa i oxidada per les oxidases terminals citocrom c aa3, citocrom aa3, citocrom bc i possiblement per una altra proteïna corresponent a l'operó *Yth* (49) (Figura 1.2.6.2.1)

S'ha realitzat un estudi profund per al que fa a la producció de vitamina K2 mitjançant el microorganisme *Flavobacterium*. Estudis recents s'han centrat amb aquest microorganisme, desenvolupant noves soques mutants que permeten una òptima producció en un temps reduït. Concretament una soca mutant de *Flavobacterium meningosepticum* en unes condicions de creixement de glicerol i peptona permet una producció de 120mg/l (47). La producció es realitza per una ruta biosintètica que prové del producte al qual se li afegeix una cadena poliprenil pirofosfat i s-adenosilmetionina per formar la menaquinona (47), (Figura 1.2.6.2.2.). Tot i aquesta elevada productivitat, aquest procediment es confronta amb una limitació important, i és que l'addició d'aquest producte sintetitzat per *Flavobacterium* no assegura el manteniment de la seguretat en els productes alimentaris (47).

Figura 1.2.6.2.1. Rutes de respiració aeròbica en *Bacillus subtilis* (49).

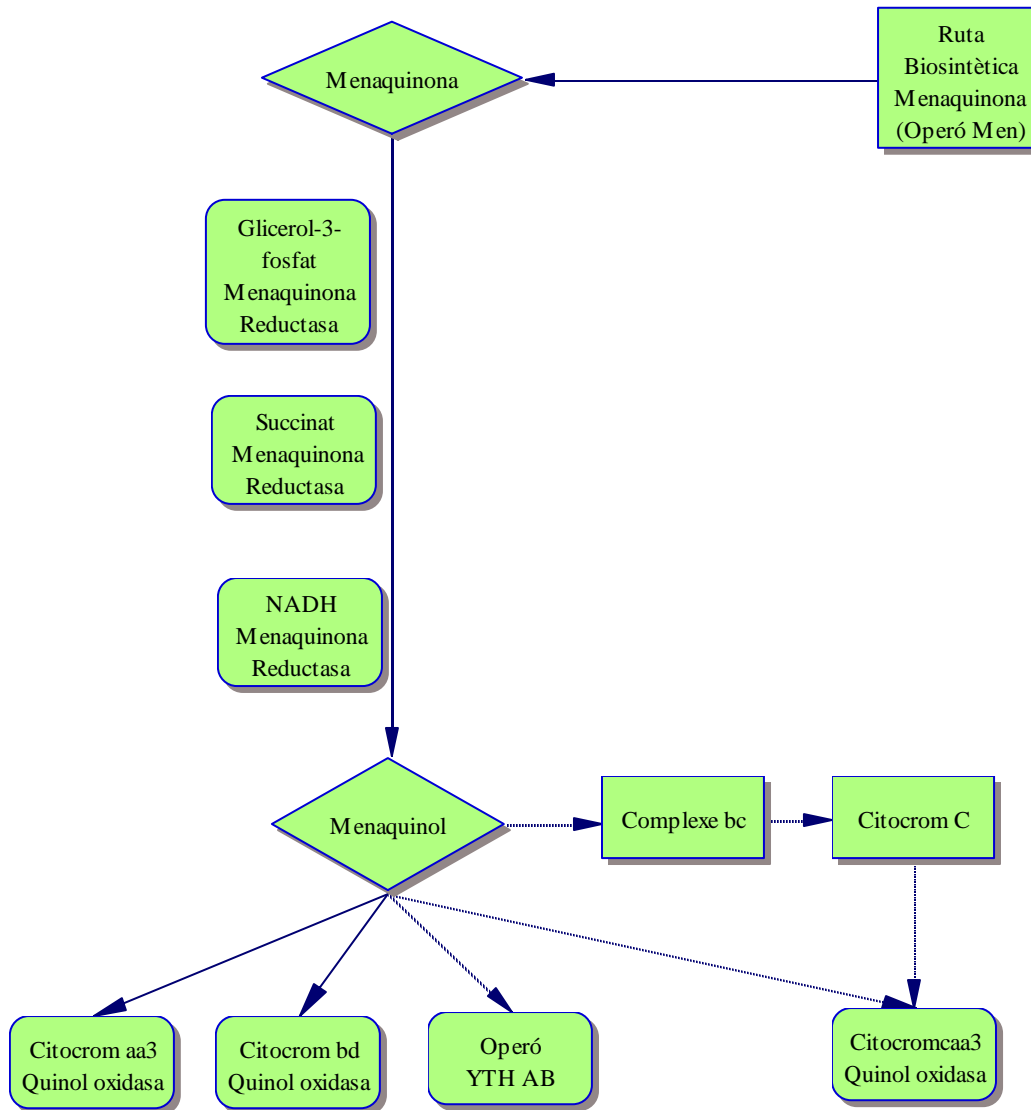
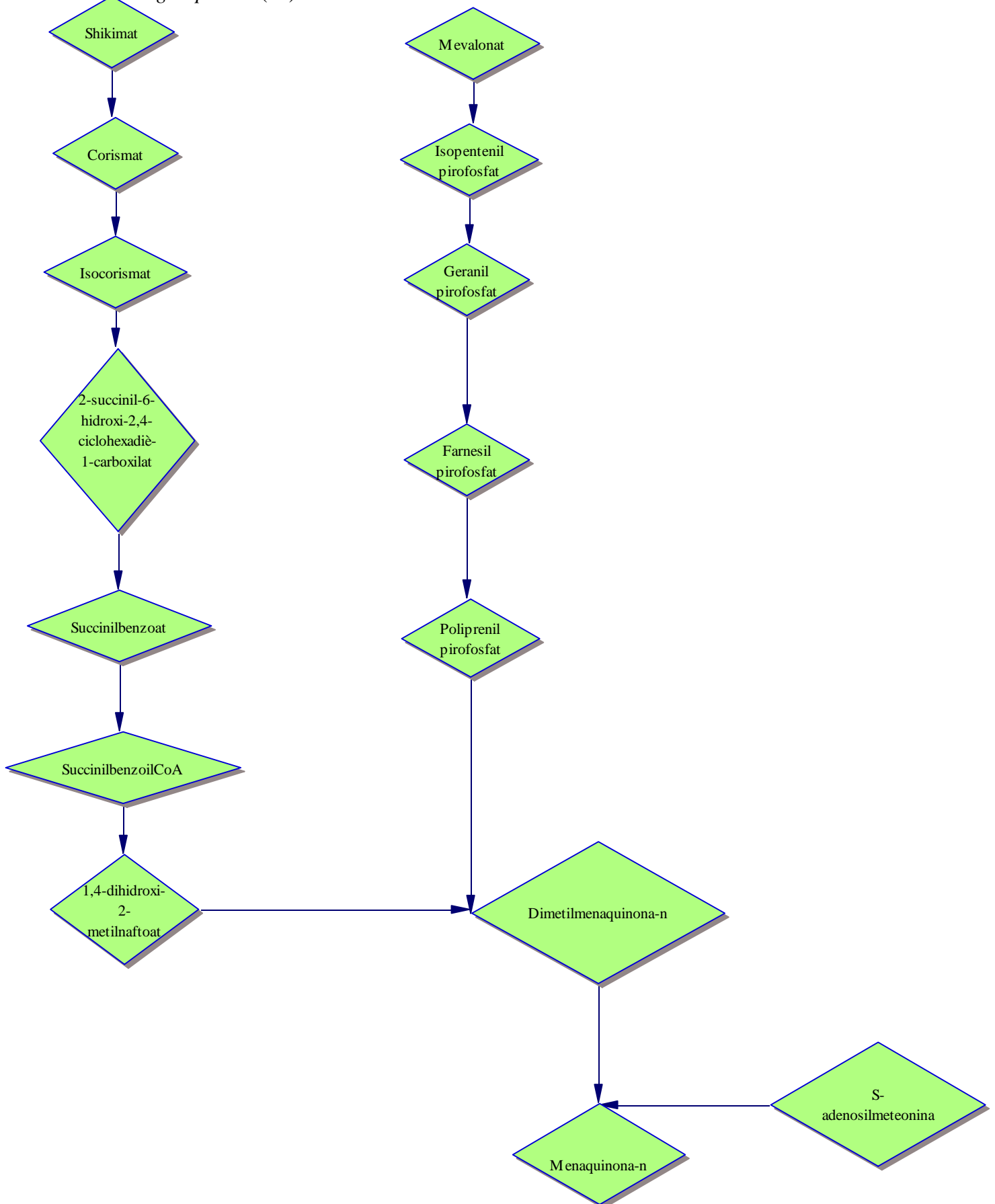


Figura 1.2.6.2.1.

En aquest esquema es detalla el funcionament de la part final de la cadena de transport d'electrons en *Bacillus subtilis*, en el que es veuen dues vies: 1) l'oxidació del *pool* de menaquinol mitjançant les dues quinol oxidases, aa3 i bd, que són les oxidases terminals més actives durant la fase exponencial i estacionària del creixement d'aquest microorganisme, i 2) l'oxidació del *pool* de menaquinol mitjançant la citocrom caa3 oxidasa que domina l'activitat en la fase inicial de creixement.

Les línies en punts suspensius mostren rutes no massa conegudes.

Figura 1.2.6.2.2. Ruta Biosintètica de la menaquinona en *Flavobacterium meningosepticum* (47).



Aquests procediments químics i biotecnològics de síntesis de vitamina K1 i K2 no s'han pogut desenvolupar a nivell industrial, i des d'un principi es va apostar per un altre procés de síntesis que produeix diferents modalitats de la vitamina K, la K3 i la K4 les formes sintètiques de la vitamina K.

Els processos químics de síntesis han pogut abastar el mercat amb un procés altament productiu i econòmic tot i que té certs problemes a diferents nivells, problemes amb els que entrarem més endavant.

1.2.6.3. Producció de vitamina K3

El procés de síntesi de la vitamina K3, més coneguda com menadiona, es pot realitzar des d'una perspectiva biotecnològica, malgrat que actualment predomina la perspectiva química tradicional, perspectiva desde la qual apareixen multitud de processos diferents que apliquen noves tecnologies amb l'objectiu de millorar el procés inicial. A continuació es detallaran els processos industrials coneguts actualment, així com les alternatives químiques i biotecnològiques.

La producció actual de menadiona es pot realitzar en *batch* utilitzant el 2-metilnaftalè (2-MNF) com a substrat, el qual és oxidat per un agent oxidant com és l'òxid de crom en àcid acètic o bé peròxid d'hidrogen en àcid acètic o dicromat sòdic en àcid sulfúric. El mètode més utilitzat és l'últim esmentat degut a la seva productivitat, però tots ells comporten nombrosos problemes com són el control d'una reacció altament exotèrmica, la prevenció del deteriorament del producte per sobreoxidació, l'ús d'un sistema de reacció heterogeni i viscos, així com els problemes d'exposició al personal treballador inherents al sistema de treball i problemes mediambientals per l'ús de productes altament contaminants com els derivats de crom i àcids siguin orgànics com inorgànics. Aquests problemes es van intentar solucionar replantejant el mètode de treball i adoptant un sistema en continu que a més té una productivitat entre cinc i deu vegades major que en *batch*.

El procediment es realitza amb l'addició de 0,5 a 2,5 mols de 2-MNF, de 0,9 a 5 mols d'un compost amb crom hexavalent per mol de 2-MNF, de 1,8 a 16 mols d'un àcid mineral tipus àcid hidrocloàric o sulfúric per mol de 2-MNF i de 0 a 2 litres de dissolvent inert per mol de 2-MNF. Aquests reactius es mantenen a unes temperatures entre 38 i 95°C de manera que l'oxidació de 2-MNF per formar menadiona ocorre entre les 0,5 i 20 hores i els productes de reacció es treuen de forma contínua i separada pel que fa el líquid ric en crom i menadiona. Si s'addiciona a la reacció una quantitat de piridina,

servint aquesta de catalitzador, la productivitat s'augmenta 10 vegades respecte al procés en *batch*.

L'addició del 2-MNF es pot realitzar de forma sòlida, en forma de dispersió o forma líquida utilitzant com a dissolvents inerts l'àcid acètic, tetraclorur de carboni, cloroform, clorur de metilè, dicloretà, dicloretilè, percloroetilè, piridina, benzè, disulfur de carboni o similars.

Els compostos de crom hexavalent que es poden utilitzar són el dicromat sòdic, cromat sòdic, àcid cròmic o similar, i es pot addicionar en forma sòlida, de dispersió o forma líquida, en aquest últim cas es dissoldrà en aigua a unes concentracions de 1 a 8 molar.

La concentració de l'àcid sulfúric pot estar entre el 65 i 80 % de volum.

Un exemple d'una producció de menadiona per aquest procés pot ser el següent:

Els tres reactius utilitzats, àcid sulfúric (o àcid hidroclic) al 78% en volum, una solució de 2-MNF en tetraclorur de carboni (o cloroform) i una solució aquosa d'àcid cròmic (o bicromat sòdic), es poden afegir per tres fonts d'alimentació separades cap al reactor de manera que el temps de residència sigui de 0,5 a 2 hores en el reactor.

El reactor ha de tenir un control de temperatura degut a que la reacció és molt exotèrmica, un agitador múltiple, controladors de nivell, condensadors de refluxe, sistema de refredament extern, termòmetres, entrades per als reactius i sortides per a recuperar els productes (12).

El contingut del reactor es va descarregant contínuament cap a un contenidor amb tetraclorur de carboni i aigua per a refredar el producte. Posteriorment aquesta dilució es filtra per treure els materials insolubles com puguin ser els compostos de crom insolubles, menadiona polimeritzada o similars. El filtrat de tetraclorur de carboni es passa per un separador que separa el líquid de crom en una fase superior i la solució de menadiona en una fase inferior (12).

La fase del crom es passa a la part inferior d'una columna o torre d'extracció i s'enfronta a una contracorrent de tetraclorur de carboni per eliminar-ne les traces de menadiona, que serà extreta per aquest procediment i enviada a la solució de menadiona que s'havia originat anteriorment en el separador (12).

Aquesta solució de menadiona té traces de crom que són extretes en una torre d'extracció enfrontant-se a una contracorrent d'àcid sulfúric diluït (5%) que apareixerà com a residu (12).

La solució de menadiona és rentada en una torre d'extracció amb aigua per eliminar les traces de sulfúric, aquesta aigua també serà tractada com a residu, mentre que la solució

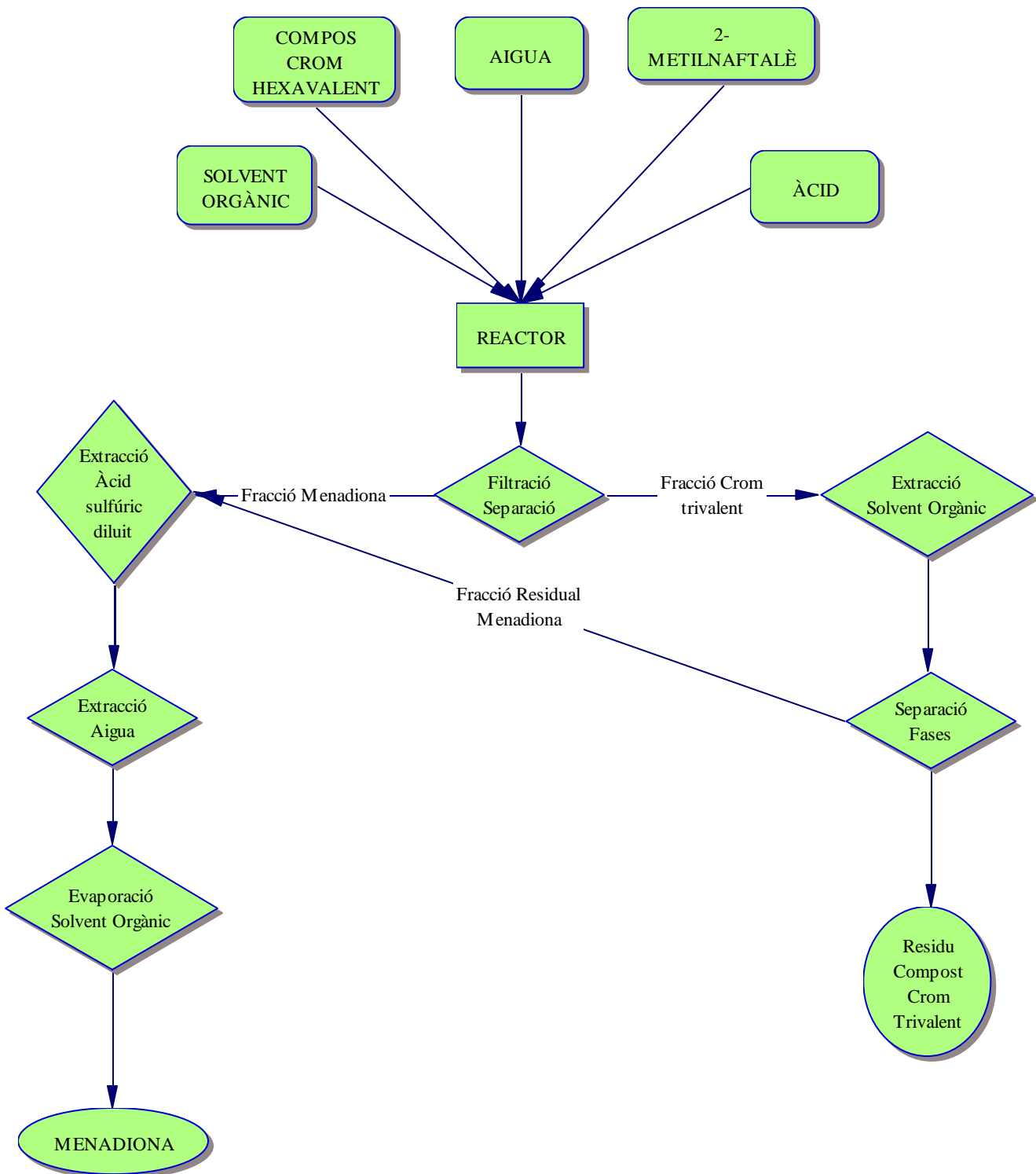
de menadiona que ens apareix es posa en un evaporador per assecar l'aigua, després es diposita en un tanc on el tetraclorur de carboni és destil·lat fins que la concentració de menadiona és prou alta, punt en què ja es pot formar la pols de menadiona (12). El procediment descrit anteriorment es detalla en la figura 1.2.6.3.1.

Aquest sistema es pot utilitzar amb diferents variants com són el procés en continu en un reactor en tub i utilitzant piridina (o sense utilitzar) com a catalitzador, el procés continu utilitzant dos tancs com a reactors enlloc del reactor en tub amb o sense piridina, el procés de *batch* amb i sense piridina (12).

Cal dir que aquest és el procediment més utilitzat actualment, tot i que hi ha lleugeres variacions, principalment pel que fa a l'ús de dissolvents, ja que en el moment de l'invenció s'utilitzaven dissolvents clorats com és el tetraclorur de carboni, un dissolvent que ha anat perdent ús ja que són menys respectuosos amb el medi ambient i a més són més cars.

Aquest procés de síntesis és l'utilitzat actualment per empreses com EastmanKodak, Eisa Co., Henkel, Hofman Laroche, Tiken vitamin o RMC, els quals produeixen una quantitat anual superior a les tres tones, i es comercialitza a un preu aproximat de 1.500 dòlar per kilogram de producte (47), creant un mercat aproximat als 4.500.000 dòlars anuals.

Figura 1.2.6.3.1. Procés continu i tancat per a la preparació de vitamina K3 (12).



La reacció que es dona en el reactor partint del 2-MNF comporta una conversió del 98% i un rendiment del 59% de menadiona, però alhora es forma un isòmer no desitjat que té un rendiment del 3%. La figura 1.2.6.3.2. mostra les reaccions simultànies que es poden donar a partir del 2-MNF.

Figura 1.2.6.3.2 Síntesi química de la menadiona per oxidació amb dicromat sòdic

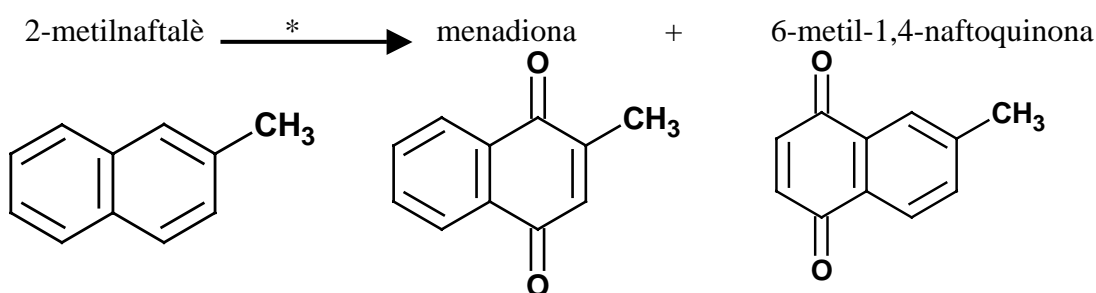


Figura 1.2.6.3.2:*La reacció es produeix amb l'addició de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1.8eq) + H_2SO_4 (1.9eq) + CH_3COOH (5.7eq) o piridina (1eq).

Aquest procediment, però, té diferents problemes des del punt de vista químic, ambiental i de seguretat. Des del punt de vista químic el primer té a veure amb la selectivitat de l'oxidació, ja que aquesta reacció produeix un isòmer, la 6-metil-1,4-naftoquinona, un subproducte que cal eliminar ja que no té activitat biològica, a més és molt difícil de separar de l'isòmer correcte, comportant grans problemes pel que fa a la purificació del producte i la seva anàlisi. Des del punt de vista químic i ambiental un altre problema és la utilització del crom en elevadíssimes quantitats, generant-se així tones de residus d'aquest metall pesant. La quantitat generada de residu de Crom per any és superior a 3.948 tones, residu que caldrà gestionar i comporta un cost important. Un altre problema ambiental és la utilització d'àcid sulfúric en la reacció de manera que s'alliberen elevades quantitats d'aigües àcides que s'hauran de tractar, comportant un cost addicional.

El problema de la generació de residus de crom i aigües riques en àcid sulfúric s'ha estudiat a fons per tal de minimitzar-ne els residus. Concretament s'ha dissenyat un sistema que recupera el residu generat mitjançant una filtració del cru de la reacció per

obtenir tots els precipitats, que es tracten pelectròlisis, de manera que es pot reciclar gran part del sulfúric i àcid dicròmic utilitzat en la reacció (39).

Des del punt de vista de seguretat, el treballar a unes condicions d'elevada temperatura, amb àcid sulfúric i dissolvents orgànics en un reactor sempre comporta un problema per als treballadors com per l'empresa que ha de prendre unes mesures de prevenció importants.

Un altre problema per als treballadors és l'ús de piridina com a catalitzador ja que comporta impotència i esterilitat en homes (12).

Amb l'objectiu de millorar aquest procediment clàssic de síntesis de menadiona en tots els aspectes, s'ha treballat extensivament en la troballa de nous mètodes que solucionin els problemes que es plantegen des d'aquest mètode de producció. Sobretot s'ha treballat en el camp de la catàlisi, l'electroquímica(1) i d'una forma més lleugera en el camp de la biotecnologia, buscant millores en el procediment d'oxidació del 2-MNF, o bé partint de productes alternatius com poden ser el 2-metil-1-naftol entre d'altres. A continuació es detallaran els diferents mètodes alternatius desenvolupats fins a l'actualitat.

Una alternativa a l'oxidació estequiomètrica utilitzant crom és realitzar una altra aproximació que inclou la utilització de nous reactius de partida, per exemple la ruta de síntesis que inclou una reacció Diels-Alder entre el 1,3-butadiè i la p-benzoquinona amb la subseqüent oxidació de l'adducte format. Posteriorment es realitza una electròlisi en àcid acètic glacial utilitzant compostos de ruteni i dicromat com a mediadors, formant-se 2-MNF monoacetat i posteriorment 2-metil-1,4-naftoquinona, és a dir menadiona, amb un rendiment superior al 90% (11).

Un mètode similar utilitza el 1,3-butadiè i la 2-metil-1,4-benzoquinona fent servir una reacció tipus Diels-Alder, seguida d'una deshidrogenació en dimetilsulfòxid i presència d'un o més àcids de Lewis o Bronstedt. Després s'afegeix tetraclorur d'estany hidratat i s'escalfa a 160°C per donar un rendiment del 100% de menadiona (27).

També s'ha vist que és possible realitzar l'oxidació del 2-MNF a menadiona pelectroquímica utilitzant sulfúric i acetona (28).

Un altre substrat que es pot utilitzar com a material de partida és el 2-metil-1-naftol, un producte que és més fàcilment oxidable a menadiona, i del qual s'han desenvolupat varis mètodes d'oxidació, com és el cas de l'oxidació del 2-metil-1-naftol, el qual és oxidat en una solució aquosa del catalitzador àcid molibdovanadifosfòric i en presència

d'un metall de transició com pot ser el cobalt, el ferro, el crom, el coure o el manganès (38).

Existeix una altra aproximació pel que fa a la síntesi utilitzant el 2-metil-1-naftol com a material de partida utilitzant diferents catalitzadors, com són el clorur i/o bromur de coure, un clorur metàl·lic alcalí, clorur amònic, clorur de tetralquilamoni, bromurs de metalls alcalins, bromur amònic i bromur de tetralquilamoni en presència de dissolvents que continguin dialquilcarboxamides. Concretament, la millor reacció es dona en dimetilformamida a 0°C durant 90 minuts utilitzant un catalitzador de clorur de coure i bromur sòdic, donant un rendiment del 96%.

Una altra alternativa és oxidar el 2-metil-1-naftol amb oxigen en presència d'una solució aquosa de clorur de coure i liti, toluè i fenol a 50°C durant 3 hores per donar un rendiment del 94% (26).

Un altre grup de mètodes alternatius de síntesis és l'oxidació selectiva del 2-MNF amb peròxid d'hidrogen, procés del que s'han provat multitud de variacions com és el mètode possiblement més efectiu, es tracta d'una solució d'àcid acètic anhidre i una solució aquosa de peròxid d'hidrogen en presència del catalitzador metiltriòxoreni (MTO) que es troba dissolt en àcid acètic, realitzant-se la reacció a 40°C durant 4 hores. El mecanisme de la reacció indica que el peròxid d'hidrogen oxida el MTO i aquest oxida el 2-MNF, obtenint-se un procés d'elevada productivitat i rendiment a més de ser respectuós amb el medi ambient. La conversió del substrat és del 81%, un rendiment del 58% i un rendiment de l'isòmer no desitjat del 9% (12). Per altra part, també s'ha provat l'oxidació amb peròxid d'hidrogen en un solvent peràcid orgànic en presència d'àcid sulfúric i paladi com a catalitzador (12). Altres mètodes són l'oxidació amb peròxid d'hidrogen sobre catalitzadors de zeolita que contenen ferro i titani (36) i l'oxidació en àcid acètic amb solució aquosa de peròxid d'hidrogen, durant 3 hores a 100°C i produint-se un rendiment superior al 90% (35).

Una altra alternativa és l'oxidació del 2-MNF utilitzant hidrogen sulfat de potassi i porfirines sintètiques que contenen Manganès en el centre de reacció com a catalitzadors. La reacció es dona en una solució acetonitril /aigua durant 2 hores a temperatura ambient per tenir una conversió del 86%, un rendiment per la menadiona de 46% i per l'isòmer no desitjat del 40%.

Aquests procediments, però, no s'han pogut industrialitzar degut a problemes de rendiment, cost o producció d'isòmers no desitjats, fets que els impedeixen ser competitius amb el mètode d'oxidació amb el dicromat sòdic i àcid sulfúric. Un cop

sembla que s'acaben les alternatives químiques les empreses productores de menadiona han obert els ulls a una possible via biotecnològica que pugui millorar aquest procediment.

Dins del camp de la biotecnologia s'han realitzat diversos estudis pel que fa a la síntesi de la menadiona a partir del 2-MNF, tot i que la naturalesa del producte de partida no és massa idònia per a poder obtenir un procés alternatiu als processos químics ben establerts. Tot i així s'ha intentat desenvolupar un mètode biotecnològic amb l'objectiu d'evitar la producció de l'isòmer no desitjat, problema que difícilment es soluciona per mètodes químics, l'eliminació de residus del tipus del crom i àcid sulfúric així com evitar els problemes i costos de seguretat.

Fins l'actualitat els esforços no han estat massa fructífers ja que cap d'aquests processos s'ha industrialitzat, però cal destacar un procediment desenvolupat a mitjans dels anys noranta que inclou el microorganisme *Rhodococcus* M192 en aquest procés d'oxidació (45).

El microorganisme utilitzat es va aïllar d'una fracció de terra d'una regió concreta del Japó i es caracteritzà com un bacil grampositiu d'un tamany de 0,5-1,2 micròmetres de grandària, té un metabolisme oxidatiu i fermentatiu, no forma espores, no té mobilitat, és catalasa positiu i citocrom c oxidasa negatiu, produeix colònies de color salmó en medi ric i creix a 35°C i no a 45°C (45).

El microorganisme va ser cultivat en medis mínims addicionant diferents fonts de carboni i posteriorment enfrontat amb el substrat 2-MNF. La preparació d'un precultiu en medi amb una font de carboni que és variable, essent la més comú la glucosa i es troba a una concentració variable del 0.2 al 10%. La font de nitrogen pot ser sulfat amònic, fosfat amònic, urea, nitrat amònic, peptona, extracte de carn o extracte de malta. Com a elements a nivell de traces conté calci, zenc, manganès, cobalt, sal sòdica i sal fèrrica. A més s'hi afegeixen altres agents promotors del creixement com vitamines, aminoàcids, àcids nucleics, tiamina, riboflavina, àcid para-aminobenzoic, piridoxina, biotina i àcid fòlic.

Aquest precultiu es realitza durant 24 hores fins a una densitat òptica a 610nm de 1,0 unitats d'absorbància, després les cèl.lules són centrifugades, rentades amb tampó fosfat. Aquestes cèl.lules s'inoculen en el medi de reacció que conté una concentració de 2-MNF, de entre 0,5 i 100 milimolar, tot i que la concentració òptima és la de 1 milimolar, a més una font de carboni auxiliar que pot ser el 1-propanol, metiletilcetona, etanol, 2-propanol o 2-butanol.

Amb l'addició de 2-butanol, acetona, acetat d'etil, metil-n-propilcetona, metil-n-butilcetona o 2-metil-2-butanona com a fonts de carboni auxiliars i un inhibidor d'oxidació en el metil per evitar la formació de compostos com l'àcid 2-naftoic o el seu intermediari d'oxidació que és l'hidroximetilnaftalè, productes que limitaven el rendiment de la reacció.

Com a inhibidors es poden utilitzar diferents compostos com són la sal trihidratada del dietil carbamat sòdic, l'etilxantogenat de potassi, l'àcid paraclorobenzoic de mercuri, acetat de fenilmercuri, subacetat d'alumini o el 2-mercaptobenzotiazol, essent els dos primers els que donen millors resultats a unes concentracions de treball d'entre 10^{-3} i 10^{-4} molar.

La resta de components del medi de reacció són els típics d'un medi salí tamponat, com són el fosfat de potassi i hidrogen fosfat de potassi, sulfat amònic, clorur amònic, clorur sòdic, clorur de magnesi, a més de traces de vitamines.

La reacció es manté en agitació durant 4 dies a temperatures que es troben entre 20 i 40°C i al final s'extreu amb solvent orgànic i per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) es determina la productivitat de l'intermediari de reacció, el 2-metil-1-naftol, donant lloc a 13 mg/litre reacció, intermediari que és oxidat més fàcilment mitjançant el microorganisme o bé amb un catalitzador de salcomina (45).

Aquest procediment es va publicar com una sol·licitud de patent però no es va executar, i tampoc s'ha adoptat a indústria de manera que els seus procediments es poden utilitzar per a millorar processos biotecnològics posteriors.

1.2.6. 4. La producció de vitamina K4.

La producció de vitamina K4, o menadiol, també es realitza de forma química i s'inclou en certs productes farmacèutics però és una vitamina menys utilitzada, ja que la síntesi de la menadiona és més fàcil, econòmica, i el producte final és molt més estable.

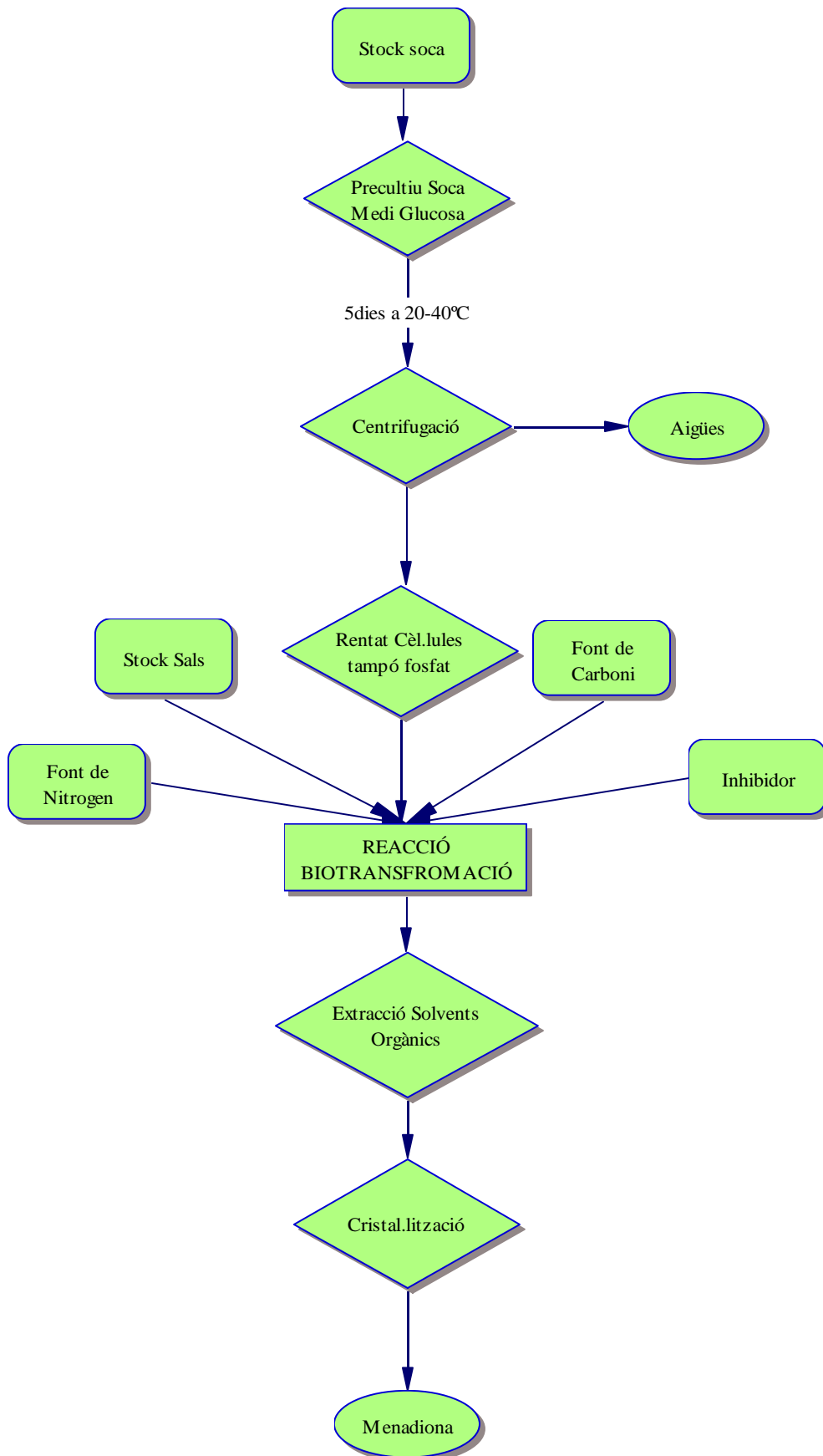
Per augmentar-ne l'estabilitat i la solubilitat es produeix en forma de difosfat sòdic de menadiol, i es pot sintetitzar per diferents mètodes, entre ells destaquem tres dels més importants.

El menadiol es pot sintetitzar des de la menadiona utilitzant menadiona i àcid acètic anhidre en una reacció d'un sol pas, i amb una productivitat del 70% (46), una productivitat que es millora utilitzant el ditionit sòdic, seguit d'una fosforilació en les posicions 1 i 4 amb oxoclorur fosforós i una formació de sal (46).

S'han buscat alternatives més recents com són la síntesi en fluids supercrítics com per exemple el metanol, en unes condicions de pressió de 10Mpa i temperatura de 350°C durant 5 minuts en un autoclau, però el rendiment ha estat pobre, d'un 12% (44).

Existeix també l'alternativa d'utilitzar el substrat 1-naftol, realitzant una oxidació catalítica que és benigne per al medi ambient (33).

Figura 1.2.6.4.1. Biotransformació del 2-metilnaftalè a menadiona mitjançant el microorganisme *Rhodococcus* M192.



1.2.7. Objectius del present estudi.

El mètode de producció de vitamina K3 a nivell industrial mostra unes deficiències que no s'han pogut salvar tot i l'esforç en els anys en què s'ha dut a terme la introducció de millores en els processos, de manera que cal trobar un procés alternatiu que solucioni els problemes des del punt de vista químic, ambiental, de seguretat i econòmic.

Des del punt de vista químic cal millorar la selectivitat de la reacció evitant la formació de l'isòmer, la 6-metil-1,4-naftoquinona.

Des del punt de vista ambiental cal evitar la utilització de reactius tòxics que tenen un problema de seguretat i toxicitat a més d'una elevadíssima producció d'efluents àcids rics en crom que produeixen un gran impacte ambiental.

Des del punt de vista econòmic és evident que fins el moment el mètode utilitzat és el millor, però caldria tenir en compte que és un procés que ja no es pot millorar més, que comporta uns costos per al manteniment de la seguretat i que també hi ha un cost elevat per la gestió de residus.

També cal dir que cap procés alternatiu mencionat anteriorment s'ha industrialitzat, fet que indica les seves limitacions, així doncs cal buscar nous mètodes alternatius als descrits fins ara. Amb aquest objectiu sorgeix el present treball, el qual descriu noves alternatives biotecnològiques per a la síntesi de vitamina K3, procediments que en un futur puguin ser desenvolupats per a un ús industrial.

Aquest projecte sorgeix de la necessitat de les empreses productores de menadiona, que els porta a buscar un mètode que minimitzi els residus formats ja que es tracta d'uns subproductes tòxics i perillosos que requereixen una adequada gestió de residus i per tant un cost addicional que amb el pas del temps cada cop serà més gran degut a la nova legislació que cada cop és més restrictiva. Les empreses necessiten un procés alternatiu que eviti la formació dels residus de crom i aigües àcides, però cal tenir en compte que el nou procés ha de tenir una selectivitat del 100% pel que fa a l'isòmer correcte, el 2-metil-1,4-naftalendiona i no el 6-metil-1,4-naftalendiona, a més d'uns rendiments acceptables per a que una empresa aposti seriosament per un procés nou.

Els processos biotecnològics mediat per microorganismes semblen una bona alternativa als processos químics ja que es caracteritzen per no formar compostos racèmics o isomèrics de gran semblança, a més de posseir enzims que realitzen oxidacions que poden ser útils per a la reacció que es té entre mans. Amb la utilització d'aquests aparells enzimàtics es pot evitar la utilització de productes com el dicromat sòdic o àcid cròmic i l'àcid sulfúric, creant un procés molt més net.

Així doncs aquestes dues característiques poden indicar la idoneïtat d'un procés d'aquest estil, tot i que poden aparèixer certs contratemps com són que els enzims d'oxidoreducció són els menys específics dins dels enzims de les bacteries, així que caldrà comparar els resultats obtinguts en el projecte amb processos químics totalment desenvolupats durant dècades.

El projecte es centrarà principalment en dues línies de treball, com són l'obtenció de microorganismes productors de vitamina K3 i posteriorment un procés de millora de la reacció.

En la primera línia de treball s'hi inclou un estudi bibliogràfic de microorganisme que incorporin enzims amb activitat oxidativa sobre molècules similars al 2-MNF i el 2 - metil-1-naftol.

Un cop s'hagi fet aquest estudi ens centrarem en l'adquisició d'aquests microorganismes mitjançant una compra a col·leccions internacionals i nacionals, a més de realitzar aïllaments de soques d'ambient, concretament en terra, aire i en el substrat de partida.

Es determinaran unes condicions estàndard de cultiu, assaig amb el substrat i anàlisis químic que permetin fer un "screening" de l'activitat desitjada, confirmant-se els resultats positius per diferents tècniques analítiques, i posteriorment una identificació i caracterització dels microorganismes responsables d'aquesta oxidació.

La segona línia de treball inclourà una sèrie d'assaigs amb l'objectiu de realitzar una optimització físico-química de la reacció, variant tots els paràmetres de l'assaig, com poden ser les condicions de creixement dels microorganismes, la utilització de diferents substrats a diferents concentracions, diferents temperatures, utilització de solvents orgànics per fer reaccions bifàsiques, addició d'inhibidors de reaccions competitives de la reacció desitjada i la realització d'assaigs enzimàtics. També és de gran importància l'aplicació de tècniques de biologia molecular amb l'objectiu de crear soques sobreproductores de l'enzim responsable de la reacció, fet que pot donar moltes alternatives al procés de síntesi.

Amb aquest treball s'intentaran mostrar les alternatives que donen els processos biotecnològics per a la síntesi de la vitamina K3 de forma selectiva i neta, així com l'anàlisi de la seva idoneïtat per la seva futura aplicació a la indústria.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Medis de cultiu.

2.1.1. Agar triptona soja (TSA). Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat pel treball rutinari en el laboratori, recomptes i aïllaments no selectius per bacteris no gaire exigents.

2.1.2. Caldo triptona soja (TSB). Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat pel treball rutinari en el laboratori, enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris no gaire exigents.

2.1.3. Agar *Bacillus cereus*(BCA). Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat per l'aïllament de soques de l'espècie *Bacillus cereus*. És un medi selectiu degut a l'addició de polimixina B i diferencial degut a l'indicador de pH blau de bromotimol. Les soques sospitoses donen colònies grans de color blavós, mentre soques d'altres espècies que també poden créixer, com *Bacillus subtilis* donen colònies més petites i grogues, degut a la fermentació del manitol (40).

2.1.4. Agar cetricimida. Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat per l'aïllament de soques de l'espècie *Pseudomonas aeruginosa*. És un medi selectiu degut a l'addició de l'amoni quaternari cetricimida que inhibeix el creixement dels bacteris, excepte de les pseudomones, que són resistents. A més, l'espècie *Pseudomonas aeruginosa* dona colònies més grans que la resta d'espècies i produeix color verdós en el medi per la producció del pigment pioverdina (40).

2.1.5. Agar McConckey. Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat per l'aïllament i recompte de bacteris que pertanyen a la família de les Enterobactèries. És un medi selectiu perquè conté àcids biliars que inhibeixen el creixement de microorganismes no habituats a viure en el tracte intestinal dels animals, i violeta de genciana que inhibeix el creixement dels bacteris grampositius. A part és un medi diferencial per la característica de la fermentació de la lactosa, donant colònies de color púrpura en el cas de que fermentin la lactosa i colònies de color blanquinós en el cas de que no la fermentin(40).

2.1.6. Caldo Nutrient Broth n°2. Recepta segons fabricant. Medi de cultiu dissenyat pel treball rutinari en el laboratori, enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris lleugerament exigents.

2.1.7. Agar Rhizobium II. Medi de cultiu dissenyat per al cultiu, manteniment, recompte i aïllament de l'espècie *Mesorhizobium loti* i microorganismes relacionats.

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Manitol	10,0 g
NaCl	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
CaCO ₃	5,0 g
Extracte de llevat	0,4 g
Agar	15,0g

2.1.8. Luria Bertani. Medi de cultiu dissenyat pel treball rutinari en el laboratori, enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris poc exigents, especialment utilitzat per al cultiu de *E. coli* en treballs de Biologia mol.lecular

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Triptona	10,0 g
extracte de llevat	5,0 g
NaCl	10,0 g

2.1.9.Terrific Broth. Medi de cultiu dissenyat per enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris no massa exigents, especialment utilitzat per al cultiu de *E. coli* en treballs de Biologia mol.lecular per obtenir gran quantitat de biomassa

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Triptona	12,0 g
Extracte llevat	24,0 g
Glicerol	4,0 ml
KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g

2.1.10. 2xYT. Medi de cultiu dissenyat per enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris no massa exigents, especialment utilitzat per al cultiu de *E. coli* en treballs de Biologia mol.lecular per obtenir gran quantitat de biomassa

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Triptona	16,0 g
Extracte llevat	10,0 g
NaCl	5,0 g

2.1.11. Medi White. Medi de cultiu mínim salí al que s'addiciona una font de carboni i energia, segons es desitgi. Ha estat dissenyat per al manteniment, aïllament i enriquiment de *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, així com per a l'estudi del sistema respiratori de *Bacillus* (16).

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Extracte de llevat	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	4,4 g
KH ₂ PO ₄	2,45 g
(NH ₄) ₂ PO ₄	1,98 g
MgSO ₄	0,024 g
MnCl ₂	0,0025 g
FeSO ₄	0,0015 g
Agar (si es desitja)	15 g

Suplement 5,5g de succinat sòdic o glucosa.

2.1.12. Medi S.O.C Medi de cultiu dissenyat per a realitzar enriquiments no selectius en assaigs de transformació de *E. coli*. S'addiciona a la reacció després del xoc tèrmic, amb l'objectiu de tancar els porus per on la bactèria competent adquireix els plàsmids

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Triptona	20,0 g
Extracte de llevat	5,0 g
Clorur sòdic	0,27g
Clorur potàssic	0,9 g
Clorur de magnesi	0,29 g
Sulfat de magnesi	0,6 g
Glucosa	3,6 g

2.1.13. Nutrient Broth. Medi de cultiu dissenyat pel treball rutinari en el laboratori, enriquiments no selectius i obtenció de biomassa per a bacteris no gaire exigents.

Recepta per afegir a un litre d'aigua:

Extracte de carn	3,0 g
Peptona	5,0 g

2.1.14 Medi de conservació de soques congelades.

TSB (2.1.2.)	0,7/0,8 ml
Glicerol	0,3/0,2 ml

Quantitat suficient per un mililitre de medi de conservació.

Les proporcions canvien segons es tracti de congelar les soques a -80°C , o bé a -20°C .

En el primer cas es farà servir glicerol al 30%, en el segons cas al 20%.

2.1.15 Tampó Fosfat.

Recepta per a fegir a 1 litre d'aigua

KH_2PO_4 3,4g

2.2. Reactius.

La taula 2.2 resumeix els reactius emprats en el present estudi.

Taula 2.2.

Codi	Reactiu
2.2.1	2,4-dinitrofenilhidrazina: reactiu per a l'anàlisi químic per detecció de cetones
2.2.2	2-Metil-1-naftol: substrat de la reacció de producció de menadiona
2.2.3	2-Metilnaftalè: substrat de la reacció de producció de menadiona
2.2.4	Acetat d'etil: solvent orgànic utilitzat per extraccions i per fer cromatografia capa fina com a fase mòbil
2.2.5	Acetonitril HPLC: dissolvent orgànic utilitzat per preparar mostres i fase mòbil per anàlisis HPLC
2.2.6	Àcid acètic: solvent orgànic utilitzat per la síntesi de la 6-metil-1,4-naftoquinona
2.2.7	Àcid sulfúric: solvent utilitzat per la síntesi de la 6-metil-1,4-naftoquinona
2.2.8	Agent antioxidant Nupage (Recepta segons fabricant): producte utilitzat en el tampó de recorregut de SDS-PAGE en condicions reductores per evitar l'oxidació de la mostra
2.2.9	Agent reductor Nupage sample reducing agent 10x(Recepta segons fabricant): producte utilitzat en el tampó de mostra per SDS-PAGE per reduir la mostra
2.2.10	Aigua ultrapura: dissolvent utilitzat per preparar mostres i fase mòbil per anàlisis HPLC i Biologia mol.lecular
2.2.11	Ampicil.lina sòdica: antibiòtic addicionat als medis de cultiu per a seleccionar soques recombinants
2.2.12	API20E: sistema d'identificació bioquímica per enterobactèries i grups relacionats
2.2.13	API20NE: sistema d'identificació bioquímica per a bacils gramnegatius no enterobactèries
2.2.14	API50CHB: sistema d'identificació bioquímica per a bacils grampositius
2.2.15	Benchmark protein ladder: marcador de pes mol.lecular de proteïnes per a electroforesis en poliacrilamida
2.2.16	Bio-rad protein assay: sistema de quantificació de proteïnes per espectrofotometria

2.2.17	Cartutxos 8b-S012-KD6: sistema utilitzat per fer extracció en fase sòlida en solucions de dissolvents orgànics
2.2.18	Clorur metilè: solvent orgànic utilitzat per fer extraccions dels cultius
2.2.19	Desoxiribonucleasa I: enzim utilitzat per trencar el DNA en processos de purificació de proteïnes
2.2.20	Dicromat sòdic: agent oxidant per a la síntesi de la 6-metil-1,4-naftoquinona
2.2.21	Dietiltiocarbamat sòdic trihidratat: producte químic que inhibeix l'oxidació en els grups metil
2.2.22	Dimetilsulfòxid: solvent orgànic utilitzat com a vehicle de substrats no solubles en aigua
2.2.23	DNA 1kb plus ladder: marcador de pes mol.lecular de DNA per a electroforesis en agarosa
2.2.24	DNA fag lambda digerit amb HindIII: marcador de pes mol.lecular de DNA per a electroforesis en agarosa
2.2.25	DNA 100bp ladder: marcador de pes mol.lecular de DNA per a electroforesis en agarosa
2.2.26	Enzim de restricció HindIII: enzim de tall en el DNA que permet linearitzar el plàsmid utilitzat en la construcció de soques.
2.2.27	Etilxantogenat potàssic: producte químic que inhibeix l'oxidació en els grups metil
2.2.28	Filtres hidrofíl.lics 0,22µm: filtres per a esterilitzar solucions aquoses
2.2.29	Filtres hidrofòbics 0,22µm: filtres per a esterilitzar solucions orgàniques i aire
2.2.30	Gels agarosa E-gel 0,8-1,2%(Recepta segons fabricant): matriu utilitzada per a l'anàlisi de fragments de DNA
2.2.31	Gels Bis-Trisacrilamida 4-12% Nupage novex (Recepta segons fabricant): matriu utilitzada per a l'anàlisi de proteïnes en condicions desnaturalitzants
2.2.32	Gels Bis-Trisacrilamida 10% Nupage novex (Recepta segons fabricant): matriu utilitzada per a l'anàlisi de proteïnes en condicions desnaturalitzants
2.2.33	Gels Tris-Acetata 10% Nupage Novex (Recepta segons fabricant): matriu utilitzada per a l'anàlisi de proteïnes en condicions natives
2.2.34	Gels Tris-Glycine 4-20% Novex (Recepta segons fabricant): matriu utilitzada per a l'anàlisi de proteïnes en condicions natives o desnaturalitzants

2.2.35	Glicerol: reactiu utilitzat com ingredient en el medi de cultiu Agar Cetrimida, Terrific Broth i en el medi de conservació de soques al congelador
2.2.36	Hexà: solvent orgànic utilitzat per extraccions i per fer cromatografia capa fina com a fase mòbil
2.2.37	Hexadecà: solvent orgànic addicionat als cultius de reacció per a crear ambients bifàsics en aigua per a reduir toxicitat dels productes químics en bacteries
2.2.38	Isoprè: reactiu utilitzat en la síntesi de la 6-metil-1,4-naftoquinona
2.2.39	Isopropiltiogalactopirànòsid: anàleg de la lactosa utilitzat per la inducció de l'expressió en les soques recombinants
2.2.40	Kit Easy DNA: sistema per l'extracció de DNA genòmic de les bacteries
2.2.41	Kit pET102/D/TOPO: sistema per al clonatge i expressió de gens en <i>E.coli</i>
2.2.42	Kit ABI prism Dye Termination Cycle Sequention Ready Reaction: sistema de seqüenciació de DNA
2.2.43	Kit S.N.A.P. Gel Purification: sistema de purificació de DNA procedent d'un gel d'agarosa
2.2.44	Kit S.N.A.P. Miniprep: sistema d'extracció de plàsmids en volums de cultiu de 1-3ml
2.2.45	Kit S.N.A.P. Midiprep: sistema d'extracció de plàsmids en volums de cultiu de 10 a 100ml
2.2.46	Kit tinció Gram: colorants per a tinció de Gram (Cristall violeta, decolorant Aigua:acetona 3:1, lugol, safranina(40) i tinció d'espores(verd malaquita)(40)
2.2.47	Lisozim d'ou: proteïna utilitzada per trencar el peptidoglucà en processos de purificació de proteïnes
2.2.48	Multimark multicolored standard: marcador de pes mol.lecular de proteïnes, pre-tenyit per a electroforesis en poliacrilamida
2.2.49	MES SDS running buffer(Recepta segons fabricant): tampó de recorregut en electroforesis de proteïnes desnaturalitzant
2.2.50	Metanol: solvent orgànic utilitzat en l'el.lució de menadiona en l'extracció en fase sòlida de l'hexadecà
2.2.51	N,N,N',N'-tetrafenilendiamina: reactiu per a la prova bioquímica de la Citocrom C oxidasa
2.2.52	NADH: cofactor per a les reaccions redox realitzades en assaigs enzimàtics

2.2.53	Nupage LDS Sample buffer 4x (Recepta segons fabricant): tampó de mostra en electroforesis de proteïnes desnaturalitzant
2.2.54	Nupage transfer buffer (Recepta segons fabricant): tampó de transferència en la tècnica del Western
2.2.55	p-Benzoquinona: reactiu utilitzat per a la síntesi de la 6-metil-1,4-naftoquinona
2.2.56	Plaques silica TLC ^Polygram SIL G/UV: sistema utilitzat com a fase estacionària en cromatografia de capa fina i detecció per UV
2.2.57	Platinum PCR supermix: còctel enzimàtic amb Taq polimerasa, dNTP's, tampó de l'enzim, MgSO ₄ per a l'amplificació de fragments de DNA per PCR
2.2.58	Platinum Pfx: còctel enzimàtic amb Pfx polimerasa, dNTP's, tampó de l'enzim, MgSO ₄ per a l'amplificació de fragments de DNA per PCR amb elevada especificitat.
2.2.59	Primers: oligonucleòtids comprats a cases comercials per a la detecció de gens diana
2.2.60	Probond purification system: sistema de purificació per afinitat de proteïnes marcades amb etiquetes de 6 histidines
2.2.61	Ringer (Recepta segons fabricant): solució salina per a la preparació d'inòculs bacterians, dil.lucions i rentats de cèl.lules
2.2.62	Simply blue safe stain: colorant de coomassie per a tinció de proteïnes en gels de poliacrilamida
2.2.63	Sulfat sòdic anhidre: producte utilitzat peliminar excés d'aigua en solvents orgànics en procediments d'extracció
2.2.64	Tris-Glycine Native sample buffer 2x (Recepta segons fabricant): tampó de mostra en electroforesis nativa de proteïnes
2.2.65	Tris-Glycine native running buffer(Recepta segons fabricant): tampó de recorregut en electroforesis nativa de proteïnes
2.2.66	Vitamina K3: patró per a anàlisis químic
2.2.67	Westernbreeze chromogenic kit: sistema per a fer transferència de proteïnes a membrana de nitrocel.lulosa i detecció de proteïnes per anticossos lligats a la fosfatasa alcalina que permet una detecció cromogènica

2.3. Aparells.

La taula 2.3 resumeix els aparells i equips que s'han fet servir en el present estudi i la seva funcionalitat.

Taula 2.3.

Codi	Aparell
2.3.1	Autoclau AE 8 litres: utilitzat per a l'esterilització de reactius i medis de cultiu
2.3.2	Autoclau AE 28 litres: utilitzat per a l'esterilització de reactius i medis de cultiu
2.3.3	Autoclau stericlav 75 litres: utilitzat per a l'esterilització de reactius i medis de cultiu
2.3.4	Balança analítica ER-120: utilitzat per a pesades precises de reactius inferiors a 2 g
2.3.5	Balança BL3100: utilitzat per a la pesada de reactius de 1 a 100g
2.3.6	Bany termostàtic 14 litres: utilitzat en la preparació de medis de cultiu
2.3.7	Cabina fluxe laminar BIOIIA: utilitzada en preparació de mostres per PCR i treball en ambient estèril
2.3.8	Centrífuga Mikro20: utilitzada per a centrifugació de tubs eppendorf de 1,5ml
2.3.9	Centrífuga Mikro22r: utilitzada per a centrifugació de tubs eppendorf de 1,5ml i cònics de 50ml
2.3.10	Centrífuga Rotanta460: utilitzada per a centrifugació de tubs de 750ml
2.3.11	Congelador-80°C: utilitzat per a conservació de soques
2.3.12	Cromatògraf de gasos: utilitzat per a anàlisi química de les mostres per cromatografia de gasos amb una columna TR B-5 Tracer de 0,25µm de gruix de fase
2.3.13	Cromatògraf HPLC: utilitzat per a anàlisi química de les mostres per cromatografia líquida
2.3.14	Cubeta electroforesis horitzontal: utilitzada per a electroforesis de DNA
2.3.15	Cubeta electroforesis vertical X-cell surelock: utilitzada per a l'electroforesis de proteïnes
2.3.16	Espectrofotòmetre d'Infraroig: utilitzat per a caracterització de compostos químics
2.3.17	Espectrofotòmetre de fotodiodes UV/visible: utilitzat com a detector de compostos químics en l'anàlisi de HPLC, quantificació DNA, proteïnes i cèl.lules.

2.3.18	Espectròmetre de masses: utilitzat com a detector del cromatògraf de gasos i per identificació de compostos químics
2.3.19	Estufa incubadora incudigit 60l: utilitzada per al creixement de cultius líquids i sòlids de microorganismes
2.3.20	Estufa incubadora orbital Novotron: utilitzada per al creixement de cultius líquids de microorganismes i per reaccions de biotransformació
2.3.21	Font electroforesis PS-304: utilitzat en electroforesis de DNA, provocant la migració d'aquest en una matriu d'agarosa mitjançant la generació d'un camp elèctric sobre una cubeta.
2.3.22	Font electroforesis PS-608: utilitzat en electroforesis de DNA i proteïnes, provocant la migració d'aquests en una matriu de poliacrilamida o agarosa mitjançant la generació d'un camp elèctric sobre una cubeta.
2.3.23	Làmpara ultravioleta: utilitzada per a la detecció de compostos fluorescents en cromatografia de capa fina
2.3.24	Microones Y-76: utilitzat per a preparació de reactius i tincions amb simply blue safe stain
2.3.25	Micropipeta 0,1-2 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius i reaccions de biotransformació i enzimàtiques
2.3.26	Micropipeta 2-10 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius i reaccions de biotransformació i enzimàtiques
2.3.27	Micropipeta 10-100 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius, reaccions de biotransformació, sembres i dil.lucions.
2.3.28	Micropipeta 100-1.000 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius, reaccions de biotransformació, sembres i dil.lucions
2.3.29	Micropipeta 1.000-5.000 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius i reaccions de biotransformació
2.3.30	Micropipeta 2.000 μ l-10.000 μ l: utilitzada per agafar volums en preparació medis de cultiu, reactius i reaccions de biotransformació
2.3.31	Microscopi òptic binocular: utilitzat per a la visualització de cèl.lules tenyides amb colorants
2.3.32	Nevera+4°C/Congelador-20°C: utilitzat per a conservació de reactius, medis, soques, mostres de DNA i vials per anàlisis químic

2.3.33	Rotaevaporador laborota: utilitzat per a concentrar mostres diluïdes de solvents orgànics
2.3.34	Seqüenciador automàtic ABIPRISM377: utilitzat per a seqüenciar fragments de DNA
2.3.35	Termociclador PTC-100: utilitzat per a la tècnica de PCR
2.3.36	Termociclador 9.600PE: utilitzat per a generar el fragment de DNA abans de la seqüenciació
2.3.37	X-cell Blot module: utilitzat per a fer la transferència de proteïnes del gel d'acrilamida a membrana de nitrocel.lulosa dins de cubeta d'electroforesis vertical

2.4. Soques microbianes.

Les soques bacterianes es van adquirir de les col·leccions espanyola CECT (Colección española de cultivos tipo), alemanya DSMZ (Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen) i americana ATCC (American Type Culture Collection) corresponent a les referències de *Bacillus subtilis* CECT 35, *Bacillus cereus* CECT31, *Rhodococcus* CECT3048, *Mesorhizobium loti* CECT4120t, *Paracoccus denitrificans* CECT694, *Bacillus subtilis spizizenii* DSM1087, *Bacillus subtilis subtilis* DSM402 i *Bacillus subtilis* ATCC11774.

Les soques utilitzades per a realitzar els processos de clonatge i expressió de proteïnes recombinants es van realitzar amb les soques *Escherichia coli* TOP10 i *Escherichia coli* BL21, aconseguïdes comercialment junt amb el kit d'expressió 2.2.41.

2.4.1. Aïllament de microorganismes.

Es van utilitzar les tècniques d'aïllament de microorganismes per dil·lució en solució salina i també per estria en medi sòlid a partir de mescles complexes de microorganismes.

2.4.2. Quantificació de microorganismes.

Els microorganismes es van quantificar mitjançant la tècnica de recompte en placa, realitzant dilucions seriades de les mostres amb solució salina ringer i una posterior sembra de 100µl en medi sòlid nutritiu (TSA 2.1.1). El resultat del recompte va ser aquell obtingut de la fórmula següent: nº de colònies x 10 / factor de dilució (ufc/ml o g).

Per a monitoritzar el creixement dels microorganismes en medis líquids es va utilitzar la tècnica de la turbidimetria a una longitud d'ona de 600nm en espectrofotòmetre d'ultravioleta/visible de fotodiodes G1103 (2.3.17), de manera que podem realitzar corbes de creixement dels diferents microorganismes en els diferents medis de cultiu.

2.4.3. Aïllament i Identificació de microorganismes salvatges.

A partir de mostres de sòl, aire i de 2-MNF es varen aïllar colònies bacterianes, mitjançant un enriquiment en medi TSB (2.1.2.) a 30°C durant 18-24 hores. Posteriorment l'aïllament es va fer en placa amb medi TSA (2.1.1.) a 30°C durant 18-24 hores. Inicialment, es va procedir a caracteritzar les colònies de forma superficial, assimilant-se com a *Bacillus sp.* les soques que formaven colònies grans en medis rics i eren bacils grampositius aerobis productors d'espores, i com *Pseudomonas sp.* els bacils gramnegatius no fermentatius citocrom c oxidasa positius.

Posteriorment es va realitzar una identificació detallada de les soques salvatges productores de vitamina K, realitzant-se les proves d'identificació morfològiques macroscòpiques i microscòpiques, proves bioquímiques i de biologia mol.lecular.

Per identificar els *Bacillus* es van realitzar a nivell de microscopia les proves de la tinció de Gram (2.2.46.) (40) i espores amb verd de malaquita (2.2.46) (40). A nivell de proves bioquímiques es va realitzar test de creixement en Bacillus Cereus Agar (2.1.3), Creixement a 4, 30, 45, 50, 55°C, assaigs d'oxidació i fermentació sobre glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, beta-metil-d-xilòsid, galactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbossa, rhamnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, alfa-metil-d-manòsid, alfa-metil-d-glucòsid, n-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melobiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melezitosa, rafinosa, midó, glicògen, xilitol, gentiobiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, gluconat, 2-cetogluconat, 5-cetogluconat (API50CHB 2.2.14)(4).

Pel que fa als aïllats inicialment caracteritzats com a *Pseudomonas*, es va realitzar la tinció de Gram per estudis al microscopi, i proves bioquímiques com són la prova de la citocrom c oxidasa (2.2.51), creixement en agar McConckey (2.1.5) i Agar Ceftrimida (2.1.4), les proves corresponents a l'api20E (2.2.12) (5) i api20NE (2.2.13)(6), i assaigs d'oxidació i fermentació sobre glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, beta-metil-d-xilòsid, galactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbossa, rhamnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, alfa-metil-d-manòsid, alfa-metil-d-glucòsid, n-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melobiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melezitosa, rafinosa, midó, glicògen, xilitol, gentiobiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, gluconat, 2-cetogluconat, 5-cetogluconat (API50CHB 2.2.14) (4).

A nivell mol.lecular es va utilitzar la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzant primers específics per a *Pseudomonas cepacea* i per *Bacillus cereus* (48).

Les condicions de PCR que es van fer servir es determinen a continuació:

Els primers es van afegir a una concentració de 0.3µM cadascun, ADN genòmic extret amb el EASY DNA KIT (2.2.14) a una concentració de uns 200ng/reacció, utilitzant la mescla Platinum PCR supermix (2.2.57) que aporta una polimerasa Taq hot start, que es va utilitzar a unes concentracions de 1-2,5 unitats per reacció, 1mM MgSO₄ (2.2.57) i 0.3mM dNTP's (2.2.57)(31). La reacció es va realitzar en el termociclador (2.3.35)

amb un cicle de temperatures per als dos microorganismes que es detalla a la següent taula:

PAS	Temperatura	Temps
1	94°C	3minuts
2	94°C	1minut
3	50°C	1minut
4	72°C	1minut
5 Anar al pas 2 trenta vegades més	-	-
6	72°C	10minut
7	4°C	Indeterminat

Els productes de PCR es van analitzar pelectroforesis seca d'agarosa al 1,2% amb bromur d'etidi segons 2.5.2.6.

2.4.4. Condicions de cultiu i manteniment de les soques.

El medi de cultiu utilitzat per la soca *Mesorhizobium loti* és el medi Rhizobium II (2.1.7). La resta de soques s'han cultivat en el medi de cultiu inicial de creixement TSA (2.1.1.). En el cas de cultius de *Escherichia coli* recombinants el medi TSA es va suplementar amb ampicilina sòdica (2.2.11) a raó de 200mg per litre.

Els cultius líquids es van realitzar en els medis Nutrient Broth n°2 (2.1.6), TSB (2.1.2.), Luria Bertani (2.1.8), Terrific Broth (2.1.9) i 2xYT (2.1.10), medi White (2.1.11) segons la finalitat de l'experiment.

El medi de cultiu líquid utilitzat per als assaigs de transformació de *E. coli* TOP10 i BL21 amb plàsmids pET102D(TOPO) després del xoc tèrmic és el medi S.O.C (2.1.12).

Els cultius de *E. coli* recombinants s'addicionen amb ampicilina sòdica (2.2.11) a raó de 200 mg per litre.

Les temperatures de creixement han estat entre 25 i 37°C, 25°C per a *Paracoccus denitrificans* i *Mesorhizobium loti*, 28°C per a *Rhodococcus*, de 30 a 35°C per a *Bacillus* i *Pseudomonas*, i de 37°C per a *Escherichia coli* en estufes d'incubació estàtiques o bé en incubador orbital a 200 r.p.m., en períodes de 12 a 24 h.

Les soques es van mantenir en forma de glicerinars al 30% (segons 2.1.14) en un congelador de -80°C (2.3.11), en forma de glicerinars al 20% (segons 2.1.14) a un

congelador estàndard a -20°C (2.3.32), i els cultius en placa a $+4^{\circ}\text{C}$ en nevera estàndard (2.3.32).

2.4.5. Condicions de reacció.

Per a determinar la concentració de treball del substrat, el 2-MNF, així com del seu vehicle de solubilització, el dimetilsulfòxid (DMSO) (2.2.22), es van realitzar assaigs de toxicitat enfront els diferents microorganismes utilitzats en el treball. Es va estudiar la concentració mínima inhibidora del 2-MNF (2.2.3) en un rang de $10\mu\text{g/ml}$ fins a $250\mu\text{g/ml}$, i del DMSO (2.2.22) amb solucions del 0.1% fins al 10%, fent servir TSB (2.1.2.) com a medi de cultiu de creixement.

2.5. Mètodes i protocols d'assaig.

2.5.1 Obtenció de vitamina K3.

2.5.1.1. Assaigs cèl.lules senceres.

Per a l'obtenció de vitamina K3 mitjançant assaigs amb cèl.lules senceres, es va seguir el següent protocol:

1. Creixement de les cèl.lules en medis líquids segons el tipus d'experiment en marxa (2.4.4.).
2. Un cop crescudes en els medis líquids fins a la fase de creixement estacionària o final de fase exponencial, es centrifuguen a 4.500 r.p.m. en la centrífuga (2.3.10) durant 20 minuts.
3. Es descarta el sobrenadant i les cèl.lules es renten amb 10 ml de tampó fosfat (2.1.15), es torna a centrifugar i finalment es resuspenen en 10 ml del mateix tampó fosfat.
4. A continuació s'inoculen en el medi de reacció.

El medi de reacció pot ser qualsevol dels medis líquids descrits a més de variants com són l'ús del medi White sense font de carboni, sense font de nitrogen o bé sense cap de les dues (2.1). La concentració dels substrats, 2-MNF (2.2.3) i 2-metil-1-naftol(2.2.2) ha estat variable, cobrint els rangs entre 25mg/l i 5g/l , es preparen per filtració de solucions amb dissolvents orgànics com són el DMSO (2.2.22) o hexadecà (2.2.37) a través de filtres d'hidrofòbics de $0,22\mu\text{m}$ (2.2.29).

A més, per certs experiments, s'han addicionat inhibidors d'oxidació en grups metil com són el etilxantogenat de potassi (2.2.27) o bé dietiltiocarbamat sòdic trihidratat (2.2.21) a unes concentracions que varien entre $1000\mu\text{M}$ i $10\mu\text{M}$.

Els temps de reacció varien segons els requeriments del cultiu fins a un màxim de 30 dies, temperatures de 25-37°C, segons l'òptim de temperatura de cada microorganisme utilitzat, i que s'ha determinat anteriorment, i amb una agitació de 200 r.p.m.

2.5.1.2 Assaigs enzimàtics.

Els assaigs enzimàtics s'han realitzat amb fraccions parcialment purificades dels extractes cel·lulars obtinguts de les diferents soques de treball.

El protocol de treball va ser el següent:

1. Creixement de les cèl·lules en medis líquids segons el tipus d'experiment en marxa (2.4.4.).
2. Un cop crescudes en els medis líquids fins a la fase de creixement estacionària o final de fase exponencial, es centrifuguen a 4.500 r.p.m. en la centrífuga (2.3.10) durant 20 minuts.
3. Procés de trencament cel·lular. A les cèl·lules crescudes en un litre de medi de cultiu, s'inclou una digestió del mucopolisacàrid amb 150 mg de lisozim (2.2.47), seguit d'un procés de congelació a -80°C en aparell (23.11.) i descongelació a +37°C en bany termostàtic (2.3.6) que es realitza 5 vegades.
4. A continuació es digereix el DNA amb DNAsa I (2.2.19).
5. La fracció resultant s'ha assajat enfront als substractes 2-MNF (2.2.3) i 2-metil-1-naftol (2.2.2) cobrint els rangs entre 25mg/l i 50mg/l. Els dos substractes es van preparar per solucions amb dissolvents orgànics com són el DMSO (2.2.22) o hexadecà (2.2.37), a continuació es varen esterilitzar per filtració a través de filtres hidrofòbics de 0,22µm (2.2.29).
6. La reacció de producció de vitamina K3 es va portar a terme en un medi de reacció que consta d'un tampó fosfat a 50mM (2.1.15) més NADH 0,2M (2.2.29). En aquest medi es van afegir els substractes (punt 5) i les fraccions cel·lulars. Els temps de reacció han variat entre 1 i 5 dies, les temperatures entre 35-37°C i amb una agitació de 200 r.p.m.

2.5.1.3. Sistemes bifàsics.

Tant en els assaigs amb cèl·lules senceres com en els assaigs enzimàtics s'han utilitzat també sistemes bifàsics. Aquests tipus de sistemes s'han aconseguit afegint hexadecà (2.2.37) a proporcions de 100ml per litre de cultiu cel·lular amb l'objectiu d'obtenir microambients que permetin una major disponibilitat del substracte enfront del microorganisme i minimitzant-ne la seva toxicitat. Les condicions de cultiu per sistema bifàsic varen ser les mateixes respecte als sistemes descrits en 2.5.1.1 i 2.5.1.2.

2.5.2. Síntesis del patró 6-metil-1,4-naftoquinona.

Amb l'objectiu de poder realitzar un correcte anàlisi químic de la menadiona és necessari conèixer si està present un isòmer molt semblant a la menadiona que dona certs perfils analítics similars. Com que no es tracta d'un producte comercial, cal obtenir el producte isòmer de la menadiona, la 6-metil-1,4-naftoquinona, sintetitzant-ho. Es va sintetitzar el producte utilitzant mètodes ja descrits (46), utilitzant-se com a reactius de partida la p-benzoquinona (2.2.55) i l'isoprè (2.2.38), que s'obté per una reacció de Diels Alder i una posterior aromatització.

La reacció es va realitzar en flascó durant 3 dies amb 300ml d'àcid acètic glacial (2.2.6), 54g de la p-benzoquinona (2.2.55) i 34g d'isoprè (2.2.38), posteriorment es va filtrar en paper de filtre i es va escalfar a 60°C per treure l'isoprè no reaccionat. A continuació es va afegir 200 g de Na₂CrO₄·4H₂O (2.2.20), 10ml H₂SO₄ (2.2.7) i 125ml d'aigua. Es va deixar en gel tota una nit, es va filtrar en paper de filtre i es va redissoldre en 200ml d'àcid acètic (2.2.6) i 10ml d'aigua amb 10g de Na₂CrO₄(2.2.20) , es va escalfar a 60°C , deixar refredar a temperatura ambient tota la nit per precipitar, filtrar en paper de filtre i cristal·litzar de l'àcid acètic (46) , donant un rendiment del 70%. El producte es va caracteritzar per ultraviolat (2.3.17) i per transformada de Fourier-Infraroig (2.3.16) i es va utilitzar com a patró per a l'anàlisi HPLC (2.3.13).

2.5.3. Anàlisi químic de la vitamina K3.

Per a determinar la formació de vitamina K3 de qualsevol mostra o reacció química o biotecnològica es varen realitzar diferents mètodes, com són l'assaig qualitatiu a la gota de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2.2.1), la cromatografia en capa fina, HPLC-DAD (2.3.13) i GC-MS (2.3.12).

2.5.3.1. Mètode d'anàlisi de la 2,4-dinitrofenilhidrazina.

El mètode de determinació que es va utilitzar en un principi va ser el de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2.2.1), un test ràpid que detecta la formació de cetones en un simple assaig barrejant part de la reacció amb el reactiu, prova que és poc específica perquè qualsevol cetona, com la menadiona, dona una reacció positiva, però que permet descartar aquells microorganismes que no produeixen cap tipus de cetona.

Els microorganismes que produeixen cetones reaccionen en presència de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2.2.1) donant una coloració taronja molt característica al voltant del creixement.

És un bon mètode preliminar i com a screening quan es vol saber si molts aïllats salvatges són sospitosos o no de produir menadiona o qualsevol altre tipus de cetona

2.5.3.2. El mètode d'anàlisi per cromatografia de capa fina.

Es va utilitzar com a alternativa qualitativa tot i que és un procés més elaborat que incorpora l'extracció dels cultius amb solvents orgànics, en el nostre cas es va utilitzar l'hexà.

Es tracta de realitzar una triple extracció de la vitamina amb l'hexà (2.2.36.) a partir del cultiu, utilitzant una quantitat d'hexà corresponent al 10% del volum de la reacció. El solvent es concentra al rotavapor (2.3.33) fins a un volum aproximat de 2ml i s'analitza dipositant el producte en plaques de sílica com a fase estacionària i una mescla de solvents orgànics com a fase mòbil, essent hexà (2.2.36) : acetat d'etil (2.2.4) proporció 4:1, i utilitzant el mètode de detecció sota una làmpara ultraviolat a 254nm (2.3.23).

2.5.3.3. El mètode d'anàlisi per la tècnica de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).

És un mètode que s'utilitza per a la detecció i quantificació de la menadiona. És un mètode més sensible i precís que els altres esmentats.

Es tracta de realitzar una triple extracció de la vitamina amb l'hexà (2.2.36.) a partir del cultiu, utilitzant una quantitat d'hexà corresponent al 10% del volum de la reacció.

Posteriorment, s'afegeix a l'hexà sulfat sòdic anhidre (2.2.63), prèviament activat a 100°C durant 3h, per tal d'extreure l'excés d'aigua. A continuació es filtra l'hexà en paper de filtre per treure la sal, s'evapora l'hexà (2.2.36) al rotavapor fins a sequedat. A continuació es resuspèn en solució acetonitril (2.2.5):aigua (2.2.10) a proporcions variables de entre 15:85 i 80:20 segons els tipus de mostra.

Les mostres s'analitzen punxant un volum de 20µl al cromatògraf amb una columna de fase reversa C18 i una fase mòbil d'acetonitril (2.2.5):aigua (2.2.10) 40:60. Els productes es detecten amb el detector de fotodiodes (2.3.17) que permet realitzar espectres de cada pic a una longitud d'ona de 260nm, dins d'un rang de 200 a 592nm. En el cas de la menadiona, es va fer servir un programa d'anàlisi de 15% d'acetonitril (2.2.5) entre 0-1minut, 80% acetonitril (2.2.5) entre 1-32 minuts i de 15% d'acetonitril (2.2.5) entre 32-40minuts. Es va obtenir un mètode que permet eluir la menadiona (2.2.66) a 2,5 minuts i el 2-metilnaftalè (2.2.3) a 5,5-6 min.

Amb la finalitat de conèixer si el mètode de detecció de menadiona permet diferenciar la menadiona de l'isòmer 6-metil-1,4-naftoquinona, es van realitzar una sèrie d'assaigs, per tal d'observar la separació cromatogràfica dels dos isòmers. Els assaigs varen ser:

1. Anàlisi cromatogràfic simultani i per separat dels dos patrons (menadiona i 6-metil-1,4-naftoquinona).

2. Anàlisi simultani del patró 6-metil-1,4-naftoquinona amb una mostra experimental positiva per a la producció de menadiona.
3. Anàlisi d'una mostra experimental positiva per a la producció de menadiona sense l'addició de cap patró.

Els dos isòmers s'aconsegueixen separar modificant les condicions cromatogràfiques, és a dir la proporció de la fase mòbil a 70:30 i comparant l'espectre d'absorció de la menadiona i l'isòmer que és lleugerament diferent.

2.5.3.4. El mètode d'anàlisi per cromatografia de gasos i espectrometria de masses.

És un mètode que s'utilitza per a la detecció i quantificació de la menadiona. Presenta l'avantatge de poder identificar el producte pel seu espectre de masses.

A partir del medi de reacció, es procedeix a separar les cèl.lules per centrifugació a 4.500 r.p.m. durant 20 minuts. El líquid de reacció s'extreu amb solvents orgànics, utilitzant-se hexà (2.2.36) o diclorometà (2.2.18) al 10% del volum de reacció per triplicat. A continuació és assecat amb sulfat de sodi anhidre (2.2.63), es filtra amb paper de filtre i es concentra al rotavapor (2.3.33) fins a un volum final de 2 ml. Posteriorment és analitzat al cromatògraf (2.3.12).

Les reaccions realitzades en sistemes bifàsics es processen d'una forma igual pel que fa a la fase aquosa, però anteriorment a l'extracció es decanta l'hexadecà fent servir un embut de decantació (2.2.37). Posteriorment la fase aquosa és processada d'igual manera, segons el paràgraf anterior.

Paral·lelament s'extreu l'hexadecà (2.2.37) en fase sòlida utilitzant uns cartutxos Strata8B-S012-KD6 (2.2.17) prèviament acondicionats amb 5ml d'hexà (2.2.36). Un cop s'ha passat l'hexadecà (2.2.37) pel cartutxo, aquest és assecat i després es neteja amb 10ml d'hexà (2.2.36). Finalment s'elueix amb 10 ml de metanol (2.2.50), un volum que és evaporat amb el rotavapor (2.3.33) fins a un volum de 2 ml.

Un cop es tenen els volums de mostra a 2 ml es punxa al cromatògraf amb una columna TR B-5 Tracer de 0,25µm de gruix de fase (2.3.12). Les condicions de la cromatografia inclouen una temperatura d'injector de 280°C, una temperatura de forn inicial de 60°C, una rampa d'augment de 10°C/minut fins a 168°C i de 15°C/minut fins a 300°C. El fluxe total és de 22,5ml/minut i la temperatura del detector és de 280°C. La detecció es realitza per espectre de masses i s'aconsegueixen uns temps de retenció al voltant de 10 minuts per al 2-MNF (2.2.3) i de 13minuts per a la menadiona (2.2.66).

2.5.3.5 Quantificació de DNA per espectrofotometria.

La quantificació de DNA en una mostra s'ha realitzat per absorció a l'ultraviolat a 260nm (29), realitzant una dil·lució 1/10, utilitzant l'espectrofotòmetre d'ultraviolat/visible de fotodiodes G1103 Agilent 8453 (2.3.17) i utilitzant el factor d'equivalència de 1 unitat d'absorbància=50µg/ml.

2.5.3.6 Electroforesis de DNA en gels d'agarosa.

Els productes de PCR, els assaigs de restricció, extraccions de DNA genòmic i plasmídic es van analitzar pelectroforesis seca d'agarosa al 0,8 i 1,2% amb bromur d'etidi (2.2.30), a una corrent continua de 70mV generada per una font Appelex PS-608 (2.3.22), utilitzant com a estàndard de migració el marcador 1KB DNA plus (2.2.23), 100bpDNA ladder (2.2.25) o bé fag lambda digerit amb HindIII (2.2.24) i visualitzantse el resultat sota llum ultravioleta a 254nm.

2.5.3.7 Electroforesis de proteïnes.

2.5.3.7.1 Nativa.

A partir d'un cultiu d'un litre de microorganisme, es centrifuguen les cèl.lules a 4.500 r.p.m., es descarta el sobrenadant i s'afegeixen 25 ml d'aigua. Les cèl.lules es trenquen amb 150mg lisozim per litre de cultiu durant 30 minuts en gel, seguit de 3 cicles de congelació ràpida -80°C (Congelador 2.3.11) i descongelació a 37°C en bany termostàtic (2.3.6). S'agafen 10 µl de mostra i s'hi afegeix 10µl de tampó de mostra Tris-Glycine Native sample buffer 2x (2.2.64). A continuació s'inoculen de 5 a 20 µl en els pouets del gel. Com a marcador de migració s'utilitza el Multimark multicolored standard (2.2.48) inoculant de 5 a 10 µl, i el tampó de recorregut és el Tris-glycine native running buffer (2.2.65). Una vegada preparada la mostra, es diposita en gels Nupage Novex Tris -Acetat al 10% de 10 pous i 1mm de gruix (2.2.23) o bé gels Novex Tris-Glycine gels al 4-20% de 1mm de gruix i 10 o 12 pous (2.2.34). Els gels es monten en una cubeta Xcell Surelock Minicell (2.3.15) que es conecta a una font Appelex 608PS (2.3.22) a voltatge continu de 120V durant 1-12 hores.

2.5.3.7.2 Desnaturalitzant.

La mostra amb les proteïnes a estudiar són inicialment cèl.lules senceres que es concentren en un factor entre 2 i 10 per centrifugació de 1 ml a 6.000 r.p.m. A continuació s'afegeix 30 µl d'aigua i 10 µl de tampó de càrrega Nupage LDS sample buffer 4x (2.2.53) amb 2,5 µl de Nupage sample reducing agent 10x (2.2.9). Posteriorment es realitza un tractament a 70°C durant 10 minuts i s'inoculen en el gel de 5 a 20 µl de mostra total. El marcador utilitzat com a patró de migració és el Benchmark

protein ladder (2.2.15) carregantse de 5 a 10 µl. El tampó de recorregut és el MES SDS running buffer (2.2.49) amb l'addició de Nupage antioxidant (2.2.8). Per l'electroforesis desnaturalitzant es van utilitzar els gels preparats Nupage Novex de Bis-Trisacrilamida al 10% de 1mm de gruix i 10 pous (2.2.32) o bé els gels Nupage Novex al 4-12% de Bis-Trisacrilamida de 1mm de gruix i de 10 o 12 pous (2.2.31).

Els gels es monten en una cubeta Xcell surelock minicell (2.3.15) que es connecta a una font Appalex 608PS (2.3.22) a un voltatge continu de 200V durant períodes que van desde 1 a 2 hores.

2.5.3.7.3 Detecció de proteïnes per Tinció.

Una vegada realitzada l'electroforesis, es desmonten els cassettes del gel i es passa a la detecció de les proteïnes amb blau de Coomassie G-250 amb el mètode Simply blue safe stain (2.2.62) que té un límit de detecció de 5ng/pou d'albumina de sèrum boví(16). En aquest protocol els gels de poliacrilamida es dipositen en un recipient amb 100ml d'aigua i es posa al microones (2.3.24) a 1000W durant 1 minut, s'agita en incubador orbital (2.3.20) durant 2 minuts, repetintse el procediment dues vegades més. Posteriorment es treu l'aigua, s'afegeixen 20ml del colorant Simply blue safe stain (2.2.62) i es posa al microones 1 minut a 1000W, s'agita en orbital durant 10 minuts. Finalment es treu el colorant i es renta el gel amb 100ml d'aigua, s'agita durant 10 minuts i s'afegeix 20ml d'una solució de Ringer al 20% (2.2.61) (21).

2.5.3.8 Quantificació proteïnes.

Per a determinar el rendiment de la purificació de proteïna recombinant així com per a la quantificació proteïnes totals s'utilitza el mètode Bio-rad protein assay (2.2.16) que es basa en el principi del canvi en el màxim d'absorbància desde 465nm cap a 595nm d'una solució àcida de blau brillant de coomassie G-250 quan hi ha unió a proteïnes. Aquest mètode té les avantatges de ser un mètode ràpid, senzill i robust comparat amb altres mètodes com són el de Lowry, Bradford, Biuret, Kjeldahl o absorbància (7).

El reactiu de coomassie concentrat es dilueix 1:5 en aigua ultrapura (2.2.10) i es passa per paper de filtre, reactiu que es manté en estat òptim durant 2 setmanes, mentre que el patró de proteïna utilitzat és l'albumina sèrica bovina que es troba liofilitzada, que al reconstituirse amb 20ml d'aigua ultrapura es troba a una concentració de 1,4mg/ml i es guarda a -20°C .

Per a la quantificació de la proteïna en una mostra es fa una recta patró d'albumina sèrica bovina a unes concentracions de 0, 20, 40, 60, 80 i 100µg/ml , es dipositen 100µl de cada un dels punts del calibrat de patró així com de la mostra en un tub de 10ml,

s'afegeixen 5ml del reactiu coomassie diluït, s'agita al vortex i entre els 5 minuts i 60 minuts de fer la mescla es mesura la densitat òptica a 595nm, es fa una recta amb el patró i s'extrapola el resultat de la mostra. En el cas de tenir mostres amb una concentració de proteïna inferior als 20µg/ml s'utilitza un microassaig en que es fan patrons de 0, 1, 5, 10, 15 i 20 µg/ml, dels quals 800µl, així com de la mostra, s'enfronten a 200µl de reactiu comassie concentrat, s'agita al vòrtex i entre els 5 minuts i 60 minuts es mesura la densitat òptica a 595nm en espectrofotòmetre (2.3.17), es fa una recta amb el patró i s'extrapola el resultat de la mostra (7).

2.5.4 Construcció de soques recombinants.

Per a la construcció de soques recombinants d'*Escherichia coli* amb gens de *Bacillus subtilis* que eren objecte d'estudi, es va dissenyar la següent estratègia metodològica:

1. Amplificació dels fragments genòmics objecte d'estudi per tècnica PCR.
2. Anàlisi dels fragments amplificats pelectroforesis d'agarosa.
3. Purificació de DNA.
4. Lligació al vector.
5. Clonatge de caracterització en *E. Coli* TOP10.
6. Minipreparació del vector plasmídic a partir de *E. Coli*.
7. Anàlisi de transformants per PCR colonial o enzims de restricció.
8. Maxipreparació del vector plasmídic.
9. Seqüenciació de la cadena amplificada.
10. Clonatge en soca expressió *E.coli* BL21.
11. Assaigs de sobreexpressió de la proteïna.
12. Anàlisi pelectroforesis SDS-PAGE desnaturalitzant.
13. Anàlisi pelectroforesis nativa per proteïnes.
14. Obtenció de la proteïna per trencament cel.lular i purificació per cromatografia d'afinitat d'histidines.
15. Identificació de la proteïna per Westernblott.

2.5.4.1 Amplificació dels fragments genòmics objecte d'estudi per tècnica PCR.

Els primers utilitzats (2.2.59) per a la detecció dels gens QOX A (1kb), QOX B (1,9Kb), QOX C (500pb), QOX D (300pb), CYDA (1kb), CYD B (1,7kb) i dels operons QOX (3,9kb) i CYD (2,7kb) de *Bacillus subtilis* es van dissenyar utilitzant el genoma publicat de *Bacillus subtilis* (52) i seguint les recomanacions del manual del vector utilitzat per al seu clonatge, el pET102Dtopo (2.2.41), destacant-se l'addició de la seqüència CACC en l'extrem 5' del primer forward per a realitzar un clonatge

direccional, a més d'evitar el codó STOP en el primer reverse de manera que es pugui obtenir la proteïna de fusió desitjada amb la cua de 6 histidines que en facilitarà la purificació i identificació en processos posteriors. La llargada d'aquests primers és al voltant de 30 nucleòtids amb l'objectiu de tenir un gran marge en la temperatura d'anellament, fet especialment important a l'hora d'utilitzar certes DNA polimerases que treballen en un tampó, la composició del qual, pot disminuir fins a 20°C les temperatures de fusió(25). Els primers utilitzats per realitzar l'amplificació dels gens QOX A (1kb), QOX B (1,9Kb), QOX C (500pb), QOX D (300pb), CYD A (1kb), CYD B (1,7kb) i dels operons QOX (3,9kb) i CYD (2,7kb) són els següents:

GEN	Seqüència	T ^a Fusió
QOX	FORWARD5'→3' CACCGAGAAAAGATTTTGAGGAAGTATGCACTTC REVERSE5'→3' GTATAATTCGTTATGGCCTGAATGCTCTG	79°C 75°C
QOXA	FORWARD5'→3' CACCGAGAAAAGATTTTGAGGAAGTATGCACTTC REVERSE5'→3' GCAGGCTTCCTCCTTTCCTGATCAATAA	79°C 76°C
QOXB	FORWARD5'→3' CACCTGATCAGGAAAGGAGCAAGCCTGCATG REVERSE5'→3' GTTCATAACTCACGCCTCCTAATTCGG	82°C 78°C
QOXC	FORWARD5'→3' CACCCCGAATTAGGAGGCGTGAGTTATGGAA REVERSE5'→3' GATTTGTTTGCCTTTTAAACAGACCCCC	81°C 76°C
QOXD	FORWARD5'→3' CACCTGGGATTGGGGGGTCTGTAAAATGGC REVERSE5'→3' GTATAATTCGTTATGGCCTGAATGCTCTG	82°C 75°C
CYD	FORWARD5'→3' CACCCCATTAATAAGTCATAGGCTCCTTATGGC REVERSE5'→3' GTAGTGAGCAAATAAACAGTTTAAACCGG	80°C 74°C
CYDA	FORWARD5'→3' CACCCCATTAATAAGTCATAGGCTCCTTATGGC REVERSE5'→3' CAACAGATCCATTAAGTCAGGAGGTATAACC	80°C 77°C
CYDB	FORWARD5'→3' CACCTGCCATGGTATACCTCCTGACTTAATGG REVERSE5'→3' GTAGTGAGCAAATAAACAGTTTAAACCGG	81°C 74°C

Aquests primers es van utilitzar a una concentració final de 0,3µM cadascun

Per a l'extensió dels fragments es va utilitzar la DNA polimerasa Platinum Pfx (2.2.58), a unes quantitats finals de 1 a 2,5 unitats. És una polimerasa recombinant de la soca *Pyrococcus sp.* KOD, permet una polimerització amb correcció d'errors, té una elevada

capacitat de processament, sensibilitat, rendiment, a més d'especificitat deguda a la seva unió al seu anticòs que la inactiva fins que s'aconsegueix una temperatura de 94°C (24). També s'utilitzen el tampó de l'enzim, dNTP's a una concentració de 0,2-0,3mM (2.2.58), MgSO₄ a una concentració de 1mM (2.2.58) i DNA genòmic *de Bacillus subtilis* de entre 100 i 500ng.

El DNA genòmic es va extreure seguint les indicacions del kit d'extracció Easy DNA kit (2.2.40), que incorpora un pas de lisis cel.lular, addició de sal per fer una precipitació, addició de cloroform i centrifugació. La fase aquosa (superior) conté el DNA que és precipitat amb etanol absolut, rentat amb etanol diluït al 70% V/V, assecat a l'aire i resuspès amb Tris 10 mM-EDTA 1 mM (2.2.40). Finalment s'afegeix RNAsa que durant 30minuts a 37°C degrada el RNA (23).

El termociclador utilitzat és el 2.3.35, la temperatura d'anellament s'ha fixat a 60°C per a totes les reaccions i la duració de l'extensió varia degut a la diferent llargada dels gens a amplificar, essent el programa bàsic el següent:

Pas	Temperatura	Temps
1	94°C	3minuts
2	94°C	1minut
3	60°C	1minut
4	68°C	De 1 a 5 minuts*
5 Tornar al pas 2 30 vegades més	-	-
6	68°C	7minuts
8	4°C	Indeterminat

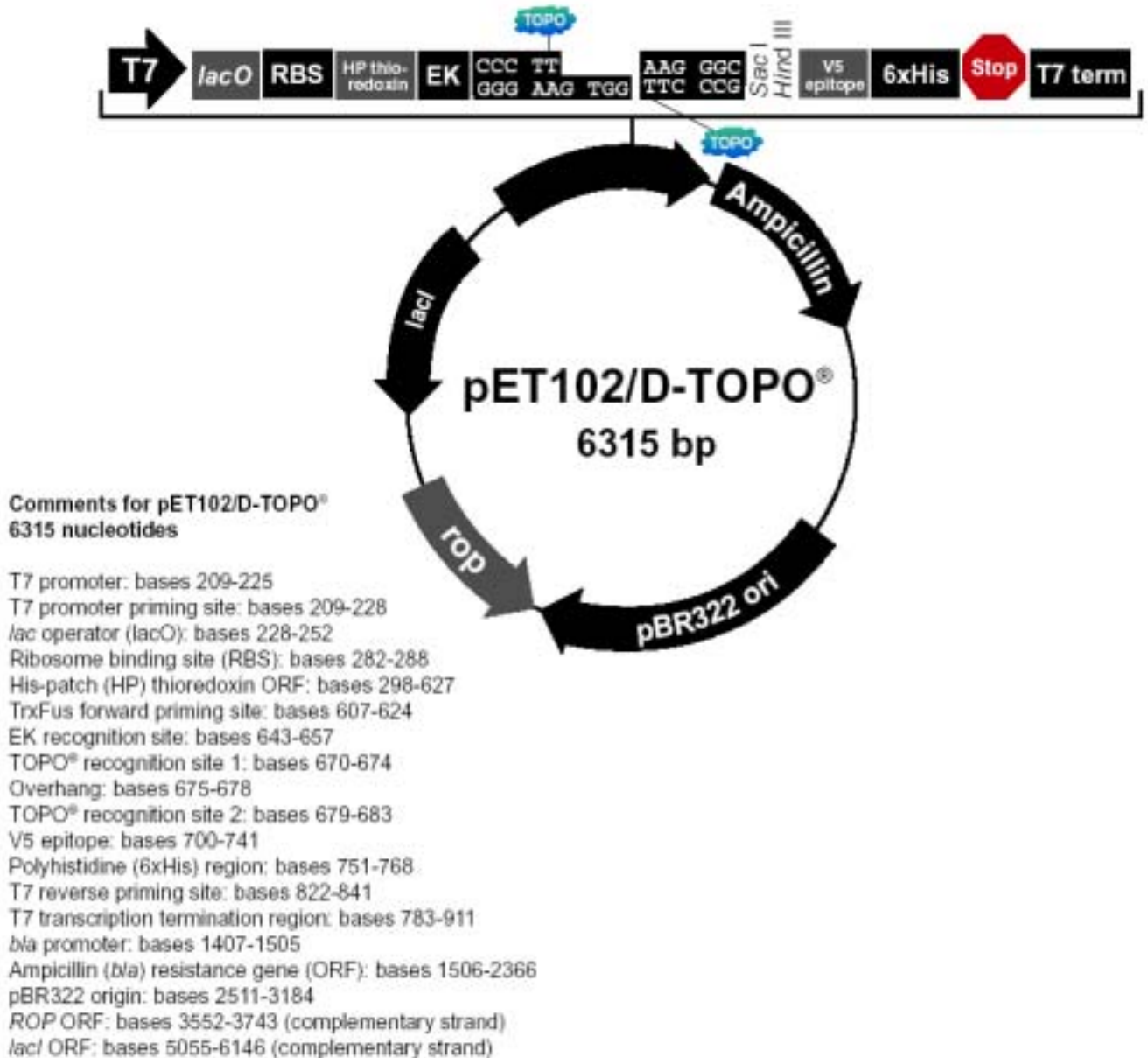
*El temps d'extensió per als gens QOXC i D és de 1minut, per a QOX A i B i CYD A i B és de 2 minuts, per a CYD és de 3 minuts i per a QOX és de 5 minuts.

Els productes de PCR es van analitzar pelectroforesis seca d'agarosa segons 2.5.2.6 i les bandes de DNA corresponents al tamany dels gens que s'estaven buscant es van extreure i purificar amb el Gel Purification kit (2.2.43). Els gels preparats es van obrir amb el E-gel opener (2.2.43) i es van tallar les bandes amb un ganivet de laboratori. Els fragments d'agarosa que contenen el DNA es van digerir amb una solució de iodur sòdic 6,6M i sulfat sòdic 16mM (2.2.43) a 50°C durant 10 minuts. A la solució es va afegir clorur de guanidini 7M (2.2.43), solució que es passa per unes columnes on s'hi enganxa el DNA. Es fan rentats amb clorur sòdic 100mM (2.2.43),

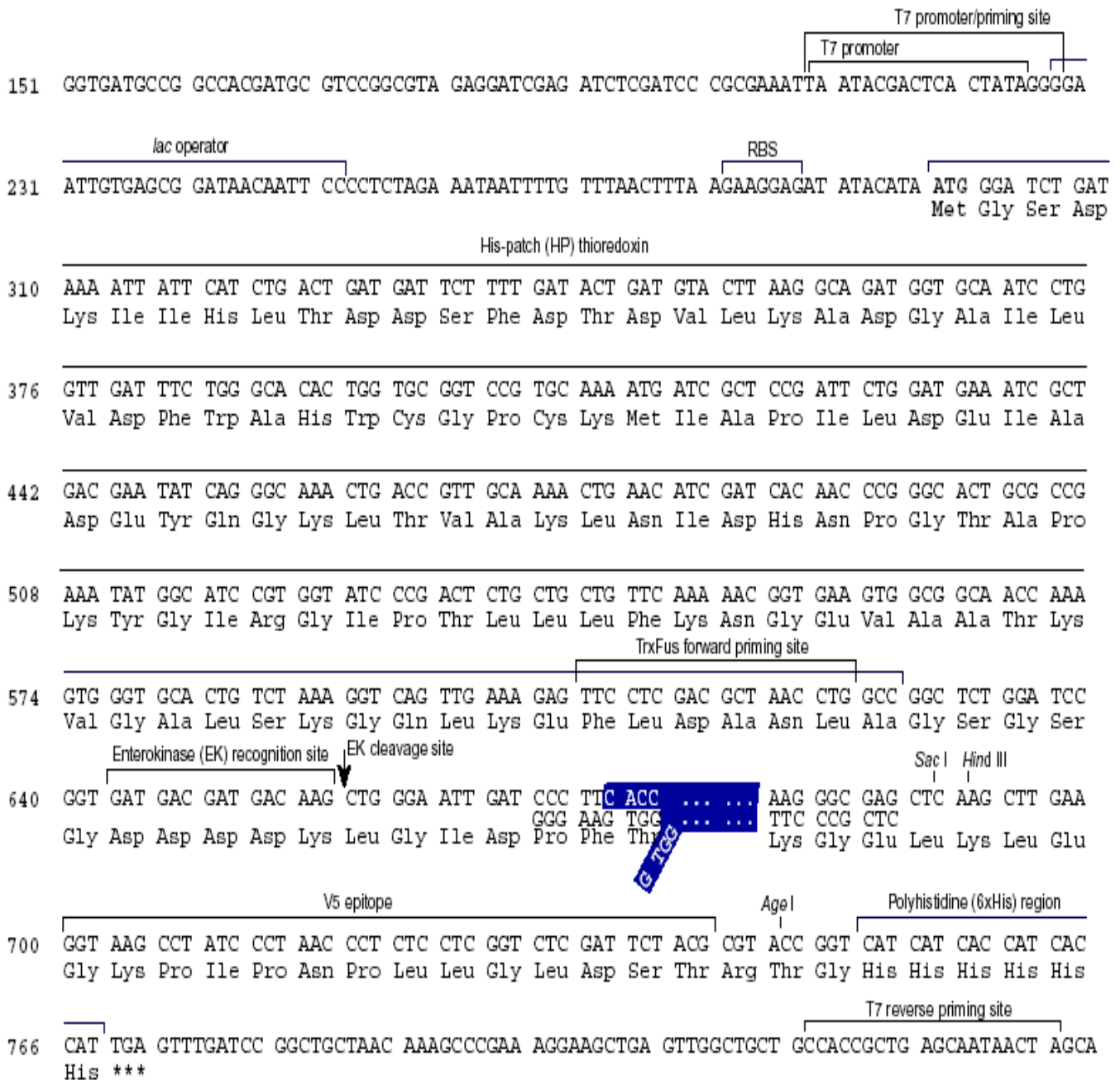
s'asseca la columna a l'aire i s'elueix el DNA amb aigua estèril (20). La puresa de la solució es verifica pelectroforesis 2.5.3.6 i la quantificació es fa a l'ultraviolat 2.5.3.5.

2.5.4.2 Lligació dels inserts al vector.

El vector utilitzat per a lligar els fragments de DNA és el pET102D(TOPO) (2.2.41), mapa del qual es veu a continuació (14):



La seqüència de la zona de clonatge, indicant cadascuna de les característiques més rellevants que incorpora aquest vector es detalla a continuació, incorporant un teòric producte de PCR que té la seqüència CACC en l'extrem 5' del primer forward que li permet el clonatge direccional(color blau)(14):



El vector pET102D(TOPO) permet un clonatge direccional de fragments de DNA amb extrems roms sense una prèvia restricció ni del fragment ni del vector. Es tracta d'un vector de 6315 pb que té l'origen de replicació del pBR322 i té el gen de la beta-lactamasa que li confereix la capacitat de resistència a l'ampicil·lina a les soques que incorporin el plàsmid, característica que en permetrà la seva selecció (18).

Una característica important és que incorpora el sistema d'expressió de la T7RNA polimerasa (enzim que incorporen les soques d'expressió compatibles amb aquest sistema, com són *les E.coli* BL21) a més de la zona del promotor, fet que permet una expressió de gens heteròlegs en *E.coli* amb alta especificitat i activitat mitjançant l'inducció amb Isopropiltiogalactopiranosid (IPTG) (2.2.39). En el cas d'absència de IPTG el repressor de la lactosa redueix al mínim la transcripció basal de la proteïna.

Per a un clonatge eficient incorpora una seqüència de 4 bases, GTGG, que en presència d'una seqüència CACC en l'extrem 5' dels productes de PCR que es volen clonar, es produeix una hibridació de les dues seqüències. Aquesta unió és catalitzada per la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, un enzim que es troba anclat en els dos extrems del vector on s'incorpora el nou DNA mitjançant un enllaç covalent entre el fosfat 3' de l'últim nucleòtid de la cadena del vector, juntament amb un residu de la Tirosina-274 de la topoisomerasa. D'aquesta manera s'aconsegueix un clonatge direccional, amb la correcta orientació de l'insert, en un procés ràpid que evita la restricció del producte de PCR i del vector amb enzims de restricció.

També incorpora diferents proteïnes de fusió com són la His-Tioredoxina, que augmenta la traducció i solubilitat de la proteïna, una etiqueta de 6 histidines, que, juntament amb l'epítip V5, permet una detecció ràpida mitjançant anticossos específics, així com una simplificació en la purificació de la proteïna resultant mitjançant una cromatografia d'afinitat degut a l'afinitat de les histidines a resines carregades amb níquel.

També té unes dianes de restricció SacI i HindIII, que permetran la linearització del vector en situacions d'anàlisi de cèl·lules transformants per restricció, a més de tenir una diana de tall per la enterokinasa K amb l'objectiu de desfer-se de la tioredoxina si és necessari(14).

Les reaccions de lligació s'han portat a terme a temperatura ambient durant 5-30 minuts depenent del tamany dels inserts. Es barreja 1µl del vector (2.2.41), una quantitat de producte de PCR que varia entre 10 i 100ng de DNA amb un volum d'aigua de 3µl i 1µl

de solució salina concentrada (2.2.41) que dóna unes concentracions de 200mM NaCl i 10mM MgCl₂ (14).

2.5.4.3 Assaigs de Transformació.

2.5.4.3.1 Protocol de transformació.

Aquestes reaccions de lligació s'utilitzen per la transformació de cèl.lules de *E.coli*. La soca utilitzada és *E.coli* Top10 químicament competents amb tractament de CaCl₂ (2.2.41). El protocol de transformació inclou l'addició de 3-6µl de la reacció de lligació a un vial de cèl.lules competents, es refreda en gel 30 minuts, es realitza un xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons, es refreda en gel, s'afegeix 250µl de medi S.O.C (2.1.12) , es deixa créixer en agitació de 200 r.p.m. a 37°C i després es realitza sembra en placa en medi TSA (2.1.1) suplementat amb 200µg/ml d'ampicil.lina (2.2.11) i s'incuba a 37°C durant 24h(14).

2.5.4.3.2. Anàlisi de transformants.

Les colònies transformades es van analitzar per PCR o per restricció amb l'objectiu d'identificar almenys un clon correcte dins de cada reacció. L'anàlisi per PCR es va realitzar amb els primers de seqüenciació Trx FusForward i T7Reverse (2.2.41):

PRIMER	SEQÜÈNCIA
TrxFusForward	5'TTCCTCGACGCTAACCTG3'
T7Reverse	5'TAGTTATTGCTCAGGGGTGG3'

L'enzim de polimerització utilitzat va ser el Platinum Pfx DNA polimerasa (2.2.58), el tampó de l'enzim (2.2.58), dNTP's (2.2.58) a una concentració de 0,2-0,3mM, MgSO₄ (2.2.58) a una concentració de 1mM. Pel que fa al motlle de DNA(24), aquest es va obtenir de dues maneres diferents, en el cas dels fragments inferiors a 1,5Kb d'insert, es va realitzar una PCR colonial, que consisteix en l'addició de la colònia a analitzar en la mescla de PCR, afegint un pas inicial de 10 minuts a 100°C en el primer pas al termociclador, amb l'objectiu de trencar les cèl.lules i que el DNA plasmídic s'alliberi i quedi disponible per a la polimerasa. En el cas d'inserts majors a 1,5Kb es va realitzar una extracció del DNA plasmídic amb el Miniprep kit (2.2.44).

El protocol inclou:

1. El creixement de la colònia a analitzar en 2-3ml de medi Nutrient Broth n°2 (2.1.6) suplementat a 200µg/ml d'ampicil.lina (2.2.11).

2. Centrifugació a 4.500 r.p.m. (Centrífuga 2.3.8) durant 1 minut.
3. El sobrenedant es decanta i es resuspenen les cèl.lules amb 150µl de Tampó de resuspensió (2.2.44).
4. Lisis cel.lular, afegint 150µl de la solució de NaOH 0,2M més SDS 0,1% (2.2.44).
5. Precipitació de les restes cel.lulars, afegint 150µl d'acetat de potassi 3.5M (2.2.44).
6. Centrifugació a 14.000 r.p.m. (Centrífuga 2.3.8) durant 5 minuts.
7. A la fase superior hi ha el DNA plasmídic, es transfereix a nou tub i s'afegeix 600µl de clorur de guanidini 7M (2.2.44).
8. La mescla es passa per una columna SNAP Miniprep (2.2.44) que té afinitat pel DNA.
9. Es centrifuga 30 segons a 3.000 r.p.m.
10. Es renta la columna afegint 500µl d'una solució de clorur de guanidini 5M i MOPS 50mM (2.2.44).
11. Es centrifuga 30 segons a 3.000 r.p.m. i es descarta el líquid del tub col·lector.
12. Es renta la columna amb 900µl de 100mM clorur sòdic (2.2.44) i s'asseca centrifugant a 14000 r.p.m. (Centrífuga 2.3.8) 1 minut.
13. El DNA s'el.lueix de la columna amb 60µl de Tris-HCl 50mM-EDTA 10mM (2.2.44).
14. El DNA es quantifica per absorció a l'ultraviolat segons el protocol 2.5.3.5 i es visualitza la puresa pelectroforesis seca d'agarosa segons el protocol 2.5.3.6.
15. El DNA plasmídic obtingut s'analitza per PCR, afegint una quantitat de 200ng de DNA quantificat prèviament 2.5.3.5, amb les mateixes condicions però sense un pas previ de 100°C.

El programa utilitzat al termociclador per a la confirmació de les colònies transformants correctes és el següent:

Una vegada obtingut el DNA per estudiar, l'amplificació es realitza seguint el procediment indicat en la taula 2.5.4.3.2.1.

Taula 2.5.4.3.2.1.

Pas	Temperatura	Temps
1	100°C	10minuts (Només PCR colonial)
2	94°C	1minut
3	50°C	1minut
4	68°C	De 1 a 5 minuts*

5 Tornar al pas 2,30 vegades més	-	-
6	68°C	7minuts
8	4°C	Indeterminat

*El temps d'extensió per als gens QOXC i D és de 1minut, per a QOX A i B i CYD A i B és de 2 minuts, per a CYD és de 3 minuts i per a QOX és de 5 minuts.

La confirmació de les colònies transformants per anàlisi de restricció es va realitzar amb el DNA plasmídic extret per miniprep(21) i una posterior restricció amb l'enzim HindIII amb l'objectiu de linearitzar el plàsmid i poder veure'n la llargada i determinar el tamany de l'insert. La reacció es realitza amb 1µl d'enzim HindIII (2.2.26), 2µl del tampó React buffer nº2 (2.2.26) i 17µl de DNA plasmídic, durant 1-2 hores en un bany termostàtic (2.3.6) a 37°C i posteriorment s'analitza pelectroforesis seca d'agarosa segons 2.5.3.6.

Les colònies amb l'insert correcte es van cultivar en 100ml de Nutrient Broth nº2 (2.1.6) a 37°C durant 12 hores i a partir d'aquest es van guardar les soques glicerinades al 30% (2.1.14) en un congelador de -80°C (2.3.11), en forma de glicerinars al 20% (2.2.14) a un congelador estàndard a -20°C (2.3.32), i els cultius en placa a +4°C en nevera estàndard (2.3.32).

La resta de cultiu es va utilitzar per realitzar una extracció de gran quantitat de DNA plasmídic per a guardar com a stock a -20°C(2.3.32) i per a la seva seqüenciació. L'extracció es va fer amb el SNAP Midiprep kit (2.2.45) (22) que inclou un protocol amb els següents passos:

1. Centrifugar a 4.500 r.p.m (Centrífuga 2.3.9) i descartar el sobrenedant.
2. Resuspendre les cèlules amb 4 ml de Tris-HCl 50mM-EDTA 10mM (2.2.45).
3. Lisis cel.lular amb 4ml d'una solució de NaOH 0.2M més SDS 0.1% (2.2.45) durant 3 minuts.
4. Precipitar les restes cel.lulars amb acetat de potassi 3M durant 5 minuts.
5. Transferir a una columna A SNAP Midiprep kit (2.2.45).
6. Filtrar les restes cel.lulars per centrifugació a 3.000 r.p.m. (centrífuga 2.3.9) durant 5 minuts.
7. Afegir-hi 12ml de clorur de guanidini 5M (2.2.45) al filtrat i passar-ho a la columna B d'afinitat DNA SNAP Midiprep (2.2.45).

8. Centrifugar 2 minuts a 200 r.p.m. (centrífuga 2.3.9) i descartar el líquid.
9. Rentar la columna amb 5 ml d'una solució de clorur de guanidini 5M i MOPS 50mM (2.2.45).
10. Centrifugar 2 minuts a 2.000 r.p.m. (centrífuga 2.3.9).
11. Afegir 10ml de clorur sòdic 100mM (2.2.45).
12. Centrifugar a 2.000 r.p.m. (centrífuga 2.3.9) durant 2 minuts i descartar el líquid.
13. Centrifugar 2 minuts a 4.500 r.p.m. per assecar la columna.
14. Transferir la columna a un tub nou i el.luir amb 750µl Tris-HCl 50mM-EDTA 10mM (2.2.45).
15. Centrifugar a 4.500 r.p.m. (centrífuga 2.3.9) durant 5 minuts.
16. La solució de DNA es quantifica per absorció a l'ultraviolat 2.5.3.5 i es visualitza la puresa pelectroforesis seca d'agarosa 2.5.3.6.

La seqüenciació dels inserts es va dur a terme a les instal.lacions de Sistemas Genómicos S.A. del Parc tecnològic de València. Les reaccions d'amplificació es van realitzar amb el kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (2.2.42), amb els primers del TrxFus Forward i T7Reverse (2.2.41) en un termociclador 9600PE (2.3.36). Per al gen QOX es van realitzar 10 reaccions consecutives per a cobrir tota la llargada del gen, per a QOX A es van fer 3 reaccions, per QOXB 5 reaccions, QOX C i QOX D 2 reaccions, per CYD 6 reaccions, CYD A 3 reaccions i CYD B 4. Els productes de PCR obtinguts es van analitzar amb el seqüenciador automàtic ABIPRISM 377 de PE i finalment es va realitzar un ensamblatge i edició de les seqüències obtingudes en les diferents reaccions en un sol marc de lectura.

2.5.5 Expressió de les proteïnes recombinants.

Un cop caracteritzats els plàsmids per PCR, restricció i seqüenciació, aquests es van utilitzar per a expressar la proteïna de fusió generada al lligar el gen desitjat al vector pET102D(TOPO) (2.2.41).

Els plàsmids es van utilitzar per transformar la soca d'expressió *E.coli* BL21 Star DE3(2.2.41) que porta el gen de la T7RNA polimerasa sota el control del promotor lacUV5, de manera que l'expressió de la T7RNA polimerasa és dependent de la presència de l'isopropiltiogalactopiranosid(14) (IPTG) (2.2.39), que és un anàleg de la lactosa, factor que permet regular l'expressió de la proteïna de fusió recombinant.

El procediment de transformació és el següent:

1. Addició de 1 a 5µl de la solució de DNA plasmídic a les cèl.lules de *E.coli* BL21 químicament competents, ja que han estat prèviament tractades amb CaCl₂ (2.2.41).

2. La mescla es refreda a 0°C (en gel) 30 minuts.
3. Es realitza un xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons i es torna a refredar a 0°C 30 minuts.
4. A continuació s'afegeix 250µl de medi S.O.C (2.1.12) i es deixa incubar en agitació de 200 r.p.m. a 37°C durant 1 hora.
5. Es realitza una sembra en medi líquid Nutrient Broth n°2 (2.1.6) suplementat amb 200µg/ml d'ampicil.lina (2.2.11) i s'incuba a 37°C durant 24h per seleccionar les colònies que s'han transformat.

Per a l'expressió pilot de la proteïna de fusió es van realitzar cultius de 2ml de medi Nutrient Broth n°2 amb 200µg/ml d'ampicil.lina en tubs de 50ml a 37°C, 200 r.p.m., fins arribar a densitats òptiques a 600nm d'aproximadament 0,5 unitats d'absorbància, punt en què s'afegia l'IPTG a concentracions de 25, 50, 100, 150 i 200µg/ml amb un temps d'expressió fenotípica entre 4 i 24h.

Per a la producció de les proteïnes es va treballar amb tubs erlenmeyer de 2 litres amb 1 litre de medi de cultiu Nutrient Broth n°2 (2.1.6) amb 200µg/ml d'ampicil.lina i una inducció amb IPTG (2.2.39) a 150 µg/ml durant un temps de 8 a 12 hores.

Per a analitzar la productivitat dels cultius es va utilitzar electroforesis de poliacrilamida en condicions natives per a QOX i CYD, mentre que per QOXA, B, C, D, CYDA i B es va utilitzar electroforesis de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, segons 2.5.3.7.1 i 2.5.3.7.2 respectivament.

2.5.6 Detecció de les proteïnes recombinants (Western blott).

La detecció de les proteïnes recombinants es pot determinar a simple vista comparant els nivells d'expressió a les diferents concentracions de IPTG (2.2.39). Tot i així, en el present estudi, es va utilitzar la detecció amb anticossos. La detecció amb anticossos de la proteïna recombinant va permetre observar si la proteïna s'expressava i a més veure si hi havia alguna mutació que provoqués un corriment del marc de lectura, ja que la zona a detectar amb l'anticos es troba en l'extrem C-terminal de la proteïna(18).

La diana per a la detecció és l'etiqueta de 6 histidines de l'extrem C-terminal de la proteïna de fusió. Es va detectar amb el sistema WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection kit (2.2.67).

Prèviament a la detecció, es va realitzar la electrotransferència de les proteïnes del gel de poliacrilamida utilitzant el Xcell Blot module(2.3.37), que s'acobla a la cubeta d'electroforesis Xcell surelock Mini-cell (2.3.15), en el que es monta el sandwich que consta d'un paper de filtre (2.2.67), el gel de poliacrilamida amb les proteïnes, la

membrana de nitrocel.lulosa (2.2.67) on es farà la transferència i un altre paper de filtre (2.2.67). A aquest sandwich se li afegeixen dues membranes absorbents (2.2.67) a la part superior i dos més a la part inferior i es col.loquen en el mòdul de transferència tenint en compte que el gel s'ha de trobar al pol negatiu i la membrana de nitrocel.lulosa (2.2.67) al pol positiu, a més que tant les membranes absorbents, la membrana de nitrocel.lulosa (2.2.67), com el paper de filtre s'han de trobar humectats prèviament amb el tampó de transferència (2.2.54)(17).

El tampó de transferència es prepara a partir del concentrat comercial Nupage transfer buffer 20x (2.2.54). A 50ml del concentrat se li afegeix 100ml de metanol (2.2.50) i 850ml d'aigua desionitzada. El tampó dil.luït es carrega a la càmera interior del mòdul de transferència fins que es cobreix el sandwich, mentre que a la cambra exterior s'afegeix 650ml d'aigua desionitzada i es connecta el mòdul a la font d'electroforesis Appalex 608PS (2.3.22) a un voltatge continu de 25V i una intensitat al voltant de 100mA durant 3 hores. Un cop finalitzat el procediment de transferència es va avaluar l'eficàcia d'aquesta tenyint els gels amb simply blue safestain (2.2.62) amb el protocol anteriorment descrit a 2.5.3.7.3, i per a detectar la proteïna en la membrana es va realitzar un procés d'immunodetecció. Un cop les membranes eren seques.

El protocol d'immunodetecció consta en línies generals de tres passos:

1. Rentar la membrana amb 20ml d'aigua durant 5 minuts.
2. Detecció amb un anticòs primari de ratolí antihistidines (2.2.67) de l'extrem C-terminal.
3. Visualització amb un anticòs secundari anti-ratolí lligat a la fosfatasa alcalina (2.2.67).

El protocol al detall d'immunodetecció consta:

1. Incubació de la membrana durant 30 minuts a 60 r.p.m. en solució bloquejant de caseïna en tampó salí i detergent (2.2.67).
2. Decantar la solució bloquejant i afegir 10ml de solució de l'anticòs primari antihis C-terminal (2.2.67) a una concentració de 1µg/ml en solució bloquejant (2.2.67) i es deixa a temperatura ambient durant 1 hora.
3. Decantar la solució d'anticòs primari i rentar la membrana amb 20ml de antibody wash (2.2.67).
4. Decantar el líquid i afegir 10 ml de la solució de l'anticòs secundari (2.2.67).

5. Deixar a temperatura ambient durant 30 minuts, decantar el líquid i rentar la membrana amb 10ml de antibody wash (2.2.67) durant 5 minuts.
6. Decantar el líquid i rentar de la mateixa forma 3 vegades més.
7. Realitzar tres rentats amb 20 ml d'aigua desionitzada durant 2 minuts i passar a la detecció cromogènica.
8. La detecció es realitza incubant la membrana amb 5 ml d'una solució de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfat (BCIP) (2.2.67) i nitroblau de tetrazolium (NBT) (2.2.67) durant 60 minuts fins que apareixen unes bandes de color porpra, després es fan 3 rentats amb 20 ml d'aigua ultrapura (2.2.10) de 2 minuts cadascun i finalment s'asseca a l'aire o sota la llum infraroja(19).

2.5.7. Purificació de les proteïnes recombinants.

Les proteïnes de fusió es van purificar per cromatografia d'afinitat a ions metàl·lics segons el sistema probond purification system (2.2.60) que es basa en el principi d'afinitat de l'etiqueta de les 6 histidines de l'extrem C-terminal a reïnes carregades amb ions de níquel. Aquestes reïnes estan formades per una matriu d'agarosa, en la que hi ha un lligand quelant, l'àcid iminodiacètic que s'uneix al Ni²⁺ per tres punts(15).

La purificació de les proteïnes de cèl.lules de *E.coli* recombinants es va realitzar seguint el protocol següent:

1. Cultiu de 50ml de *E.coli* induïda per a l'expressió d'aquesta proteïna.
2. Centrifugació a 4.500 r.p.m. durant 10 minuts (Centrífuga 2.3.9) per a recollir les cèl.lules.
3. Resuspensió de les cèl.lules amb el native binding buffer (2.2.60), que consta de 30ml de native purification buffer i 100µl d'imidazol 3M.
4. Addició de 8mg de liozím (2.2.47) per a degradar el peptidoglucà de la membrana.
5. Incubació a 0°C en gel 30 minuts, seguit de 5 cicles de congelació a -80°C (2.3.11) i descongelació a 37°C en un bany termostàtic (2.3.6). Finalment s'afegeix 40µg de DNAsa I (2.2.19) per rebaixar la viscositat del llisat cel.lular.
6. A partir d'aquest llisat cel.lular es purifiquen les proteïnes solubles en condicions natives i les proteïnes insolubles en condicions desnaturalitzants.
7. Aquests dos tipus de proteïnes es separen per centrifugació a 3.000 r.p.m.(centrífuga 2.3.9).

El protocol d'obtenció de la part proteínica soluble és el següent:

1. La part superior del llisat centrifugat es purifica en condicions natives afegint els 8ml que hi ha aproximadament a una columna amb la reïna probond (2.2.60). La

columna s'ha preparat prèviament dipositant 4ml de reïna a la columna (2.2.60), s'extreu l'excés de solució alcohòlica al 20% que permet la seva conservació, es renta amb 6ml d'aigua destil.lada, es centrifuga la columna a 800 r.p.m. i s'extreu l'excés d'aigua. Finalment s'acondiciona la columna amb dos rentats amb native binding buffer (2.2.60) que conté NaPO_4 50mM i 500mM de NaCl.

2. Un cop s'ha addicionat la part soluble del llistat a la columna, aquesta es manté en agitació de 70 r.p.m. durant 60 minuts.
3. Es deixa sedimentar la reïna centrifugant a 800 r.p.m. i s'extreu el sobrenedant, que es guarda a 4°C.
4. Posteriorment es fa un rentat amb 6ml de native wash buffer (2.2.60) que conté imidazol 20mM, més NaPO_4 50mM i 500mM NaCl.
5. Es sedimenta amb centrifugació a 800 r.p.m.(2.3.9) i es guarda el sobrenedant a 4°C, pas que es repeteix 3 vegades més.
6. Finalment s'el.lueix la proteïna que es troba retinguda a la reïna amb 8 ml de native elution buffer (2.2.60) que conté imidazol 250mM, més NaPO_4 50mM i 500mM NaCl, es talla la part inferior de la columna i es recullen fraccions d'un mililitre (4).

El procediment descrit fins ara correspon a la purificació de proteïnes natives, i és el principal mètode que s'ha utilitzat en aquest treball, tot i que també s'ha provat un mètode similar, per a proteïnes d'una sola subunitat, però en condicions desnaturalitzants en un principi i condicions natives després amb l'objectiu de renaturalitzar les proteïnes i així obtenir una proteïna funcional. Nombrem doncs aquest procediment de purificació com un sistema híbrid.

El procediment híbrid consta:

1. Cultiu cel.lular que conté la proteïna de fusió.
2. Centrifugació cel.lular a 4.500 r.p.m.durant 10 minuts i descartar el sobrenadant.
3. Lisis del sedimentat amb 8ml de guanidinium lysis buffer (2.2.60) que conté clorur de guanidini 6M més NaPO_4 20mM i NaCl 500mM durant 10 minuts.
4. Es centrifuga a 3.000 r.p.m.(2.3.9) durant 15 minuts de manera que s'obté un pellet de restes cel.lulars i el sobrenadant. Aquest últim s'aplica a una columna amb la reïna probond (2.2.60). La columna s'ha preparat prèviament dipositant 4ml de reïna a la columna, s'extreu l'excés de solució alcohòlica al 20% que permet la seva conservació, es renta amb 6ml d'aigua destil.lada, es centrifuga la columna a 800 r.p.m. (2.3.9). i s'extreu l'excés d'aigua. Finalment s'acondiciona la columna amb

dos rentats amb denaturing binding buffer (2.2.60) que conté urea 8M, NaPO₄ 20mM i NaCl 500mM .

5. Un cop s'ha addicionat la part soluble del llistat a la columna, aquesta es manté en agitació de 70 r.p.m. durant 15-30 minuts.
6. Es deixa sedimentar la reïna centrifugant a 800 r.p.m. i s'extreu el sobrenedant, que es conserva a 4°C per si fos necessari.
7. Posteriorment es fa un rentat de la reïna amb 6ml de denaturing binding buffer (2.2.60) urea 8M més NaPO₄ 20mM i NaCl500mM.
8. Es centrifuga a 800 r.p.m. durant 1 minut i es conserva el sobrenadant a 4°C per si fós necessari.
9. Es torna a rentar amb 4ml de denaturing wash buffer (2.2.60) que conté urea 8M, NaPO₄ 20mM i NaCl 500mM.
10. Es centrifuga a 800 r.p.m. durant 1 minut i es conserva el sobrenadant a 4°C per si fós necessari.
11. Es renta finalment amb 8ml de native wash buffer per tornar a conformar les proteïnes. El tampó conté imidazol 20mM, NaPO₄ 50mM i 500mM NaCl (2.2.60.).
12. S'elueix la proteïna recombinant amb 8 ml de native elution buffer (2.2.60) que conté imidazol 250mM, NaPO₄ 50mM i 500mM NaCl, es talla la part inferior de la columna i es recullen fraccions d'un mililitre.

Per determinar l'eficàcia de la purificació es realitza un cicle electroforètic amb gels de poliacrilamida en condicions natives segons 2.5.3.7.1, es tenyeix segons 2.5.3.7.3 , i es quantifiquen les proteïnes purificades segons 2.5.3.8.

3. RESULTATS

3.1 Recerca de microorganismes productors de vitamina K3.

3.1.1. Aïllament dels microorganismes.

Per l'aïllament de microorganismes productors de vitamina K3, es van processar mostres de terra, aire i del producte de partida de la reacció química, és a dir 2-metilnaftalè.

Es va aïllar un total de 100 microorganismes salvatges fent servir el protocol d'aïllament (2.4.1).

A més, es van introduir en l'estudi 6 soques de referència de diferents col·leccions oficials, caracteritzades com a productores de metabolits relacionats amb la vitamina K3.

La taula 3.1. mostra totes les soques salvatges aïllades, el codi, el seu origen i la seva caracterització inicial segons 2.4.3.

Taula 3.1

Soca	Origen	Identificació
B-1	Sòl	Bacillus
B-2	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-3	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-4	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-5	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-6	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-7	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-8	Sòl	Pseudomonas
B-9	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-10	Sòl	Pseudomonas
B-11	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-12	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-13	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-14	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-15	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-16	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-17	Sòl	<i>Bacillus</i>

B-18	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-19	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-20	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-21	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-22	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-23	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-24	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-25	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-26	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-27	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-28	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-29	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-30	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-31	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-32	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-33	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-34	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-35	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-36	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-37	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-38	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-39	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-40	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-41	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-42	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-43	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-44	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-45	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-46	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-47	2-metilnaftalè	<i>Pseudomonas</i>
B-48	2-metilnaftalè	<i>Bacillus</i>
B-49	2-metilnaftalè	<i>Bacillus</i>
B-50	2-metilnaftalè	<i>Bacillus</i>

B-51	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-52	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-53	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-54	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-55	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-56	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-57	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-58	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-59	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-60	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-61	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-62	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-63	Sòl	<i>Pseudomonas</i>
B-64	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-65	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-66	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-67	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-68	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-69	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-70	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-71	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-72	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-73	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-74	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-75	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-76	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-77	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-78	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-79	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-80	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-81	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-82	Sòl	<i>Bacillus</i>

B-83	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-84	Sòl	<i>Bacillus</i>
B-85	Aire	<i>Pseudomonas</i>
B-86	Aire	<i>Pseudomonas</i>
B-87	Aire	<i>Pseudomonas</i>
B-88	Aire	<i>Pseudomonas</i>
B-89	Aire	<i>Bacillus</i>
B-90	Aire	<i>Bacillus</i>
B-91	Aire	<i>Bacillus</i>
B-92	Aire	<i>Bacillus</i>
B-93	Aire	<i>Bacillus</i>
B-94	Aire	<i>Bacillus</i>
B-95	Aire	<i>Bacillus</i>
B-96	Aire	<i>Bacillus</i>
B-97	Aire	<i>Bacillus</i>
B-98	Aire	<i>Bacillus</i>
B-99	Aire	<i>Bacillus</i>
B-100	Aire	<i>Bacillus</i>

3.1.2. Screening de microorganismes productors de menadiona.

3.1.2.1. Toxicitat del 2-MNF i DMSO a les soques de col.lecció.

Abans de començar l'estudi de la detecció de vitamina K3 en els diferents microorganismes, es va portar a terme un estudi d' idoneïtat pel què fa als medis de cultiu que s'emprarien per a la detecció de vitamina K3, específicament pensant en dos ingredients que podien ser tòxics per als microorganismes, és a dir, el reactiu de partida (2-MNF) i el seu vehicle de solubilització, el dimetilsulfòxid (DMSO). Es van escollir tres espècies bacterianes presumptes productores de vitamina K3 i que per tant tenien més probabilitat de ser escollides en el futur com a productors industrials de la vitamina. L'estudi de toxicitat es va portar a terme observant les biomasses obtingudes després de cultivar el microorganisme amb un medi nutritiu (TSB 2.1.2) en presència del presumpte agent inhibidor a diferents concentracions.

Les taules 3.1.2.1.1 i 3.1.2.1.2. expressen els resultats obtinguts. Taula 3.1.2.1.1. Resultat de l'estudi de toxicitat amb el DMSO en Caldo triptona soja. Mesures de biomassa segons 2.4.2

Microorganisme	0.1%	1%	5%	10%
<i>B.subtilis</i> CECT35	1.51	1.45	0.8	0.3
<i>Paracoccus</i> Denitrificans CECT694	1.4	1.1	0.5	0.15
<i>Rhodococcus sp</i> CECT3048	1.2	1.2	0.9	0.5

Els resultats indiquen que el DMSO té un clar efecte antimicrobià en els microorganismes estudiats. Degut a que el DMSO és un vehicle necessari per a la solubilització del 2-metilnaftalè i que la diferència entre els resultats obtinguts al 0,1% i el 1% no eren força importants, es va escollir el 1% com a concentració de treball pel DMSO.

Taula 3.1.2.1.2 Resultat de l'estudi de toxicitat del 2-metilnaftalè al 1% de DMSO en Caldo triptona soja. Mesures de biomassa segons 2.5.2.6

Microorganisme	10µg/ml	40µg/ml	62.5µg/ml	125µg/ml	250µg/ml
<i>B.subtilis</i> CECT35	1.2	1.1	0.8	0.6	0.3
<i>Paracoccus</i> Denitrificans CECT694	0.4	0.2	0.1	0	0
<i>Rhodococcus sp.</i> CECT3048	1.1	1	0.5	0.3	0

Els resultats indiquen que el 2-MNF té un clar efecte antimicrobià progressiu així que s'augmenta la concentració del producte en el medi de cultiu. Per aquest motiu els experiments de producció de vitamina K3 es van portar a terme després de fer créixer el microorganisme productor en un medi carent de 2-MNF inicialment, afegint el reactiu una vegada s'obtenia una biomassa considerable després de 18 hores d'incubació en el medi de partida.

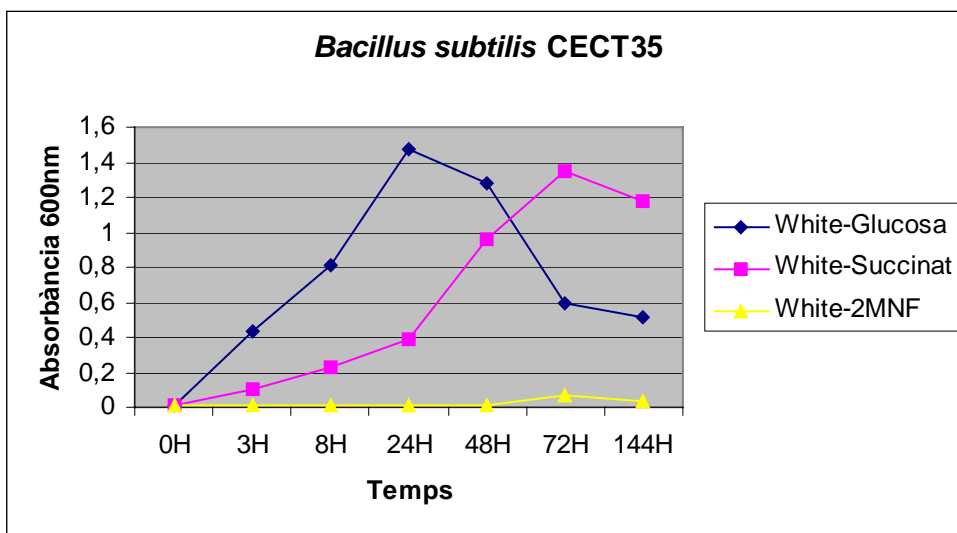
Una vegada obtingudes les condicions inicials més idònies, es va procedir a l'estudi dels medis de cultiu de creixement.

3.1.2.2. Estudi de creixement en medis mínims per a les soques de col·lecció.

Per a determinar la idoneïtat dels medis de cultius mínims per a realitzar assaigs de biotransformació, es va estudiar el creixement de les soques de col·lecció en els medis white glucosa (WG), white succinat (WS) i white 2-MNF, essent el medi caldo white l'escollit com a medi base més idoni per a l'expressió de quinoloxidasses, segons la bibliografia consultada.

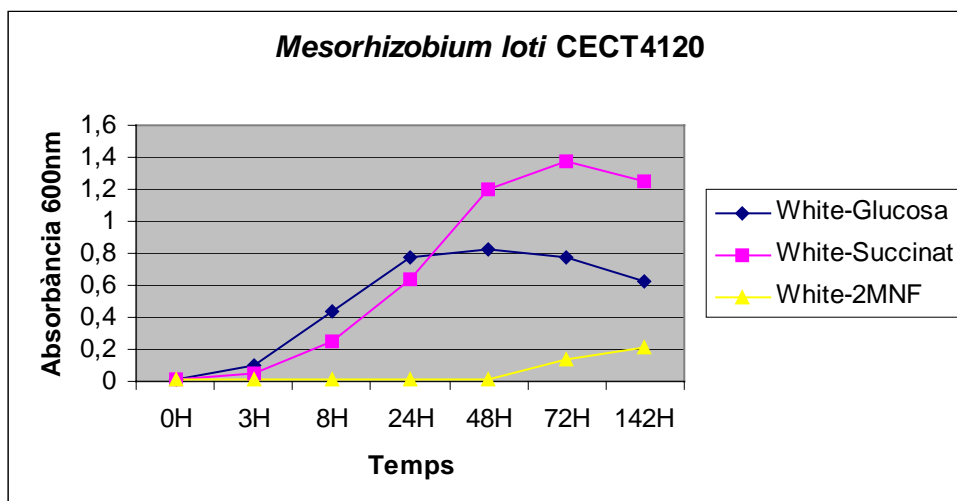
La mesura del creixement es va realitzar segons el protocol descrit en 2.4.2 i es van obtenir els resultats de les figures 3.1.2.2.1, 3.1.2.2.2., 3.1.2.2.3 i 3.1.2.2.4, que indiquen un creixement òptim en WG, WS però no amb 2-MNF.

La figura 3.1.2.2.1. mostra la corva de creixement de *B.subtilis* CECT 35. La temperatura d'incubació fou de 35°C.

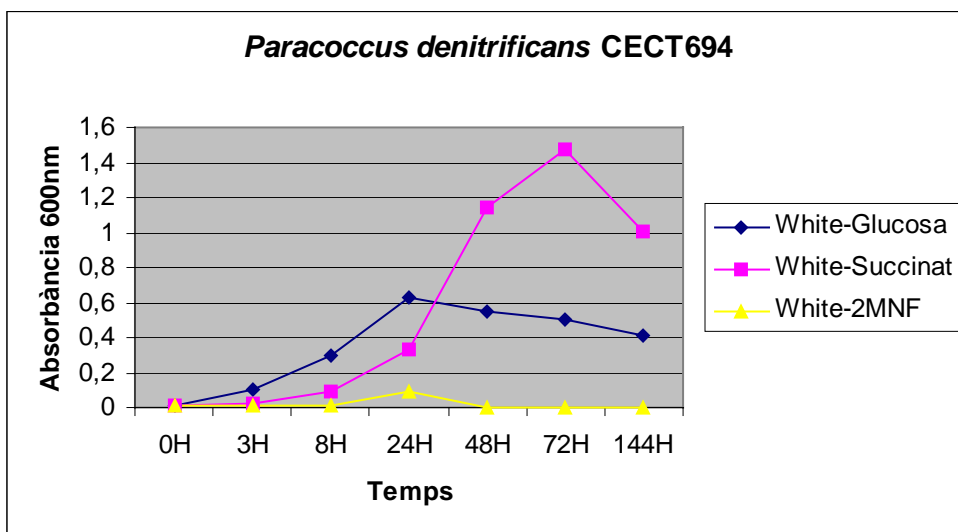


La figura 3.1.2.2.2. mostra la corva de creixement de *Mesorhizobium loti* CECT 4120.

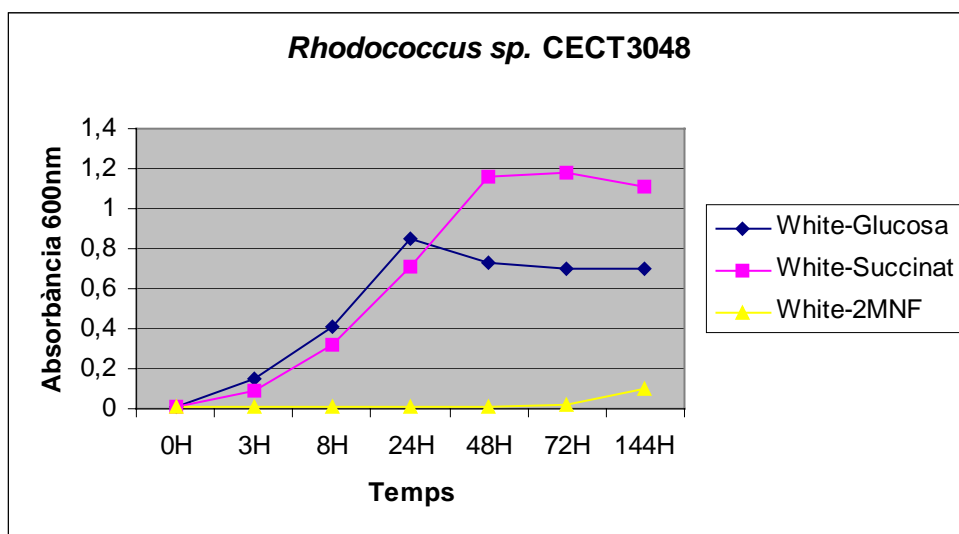
La temperatura d'incubació fou de 35°C .



La figura 3.1.2.2.3. mostra la corva de creixement de *Paracoccus denitrificans* CECT 694. La temperatura d'incubació fou de 35°C .



La figura 3.1.2.2.4. mostra la corva de creixement de *Rhodococcus sp.* CECT 3048. La temperatura d'incubació fou de 35°C .



3.1.2.3. Screening de microorganismes productors de menadiona.

Per tal de veure si les soques salvatges i les de referència produïen vitamina K3 es va procedir a la detecció de la vitamina fent servir diferents metodologies analítiques:

3.1.2.3.1. Detecció amb 2,4-dinitrofenilhidracina.

La primera estratègia d'anàlisi emprada va ser la reacció a la gota de 2,4-dinitrofenilhidracina per a la detecció de cetones, segons el punt 2.5.3.1. És un mètode d'anàlisi general, gens específic amb el qual no es pot saber si la soca produeix vitamina K3, però si es pot saber si la soca no la produeix i per tant és un bon mètode per cribar aquelles soques que no donaven positiu per la reacció. Tot i així, la prova va ser positiva per al 99% de les soques aïllades de l'ambient i el 100% de les soques de col·lecció.

3.1.2.3.2 Detecció per Cromatografia de capa fina.

Per la detecció presumptiva de vitamina K3 es va fer servir un mètode d'anàlisi més sensible que l'anterior, és la utilització de la cromatografia en capa fina segons 2.5.2.2, sobre reaccions en 250 ml de medi de cultiu WG amb 100µg/ml de 2-MNF, al 1% de DMSO, durant 48h. Els resultats obtinguts són qualitius i indiquen presumpta producció de menadiona com a resultat de la reacció positiva, és a dir el Rf d'una de les taques corresponents a la reacció del microorganisme coincideix amb el Rf del patró de la vitamina K3. En total, 5 de les 6 soques de col·lecció assajades i 11 de les 100 soques salvatges van ser identificades com a presumptes productores de vitamina K3. A les taules 3.1.2.3.2.1. i 3.1.2.3.2.2 s'observen els resultats obtinguts.

Taula 3.1.2.3.2.1 Resultats soques de col·lecció.

Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat
<i>M.loti</i> CECT4120	-	<i>P.denitrificans</i> CECT694	+	Rhodococcus sp CECT3048	+
B.subtilis CECT35	+	B.subtilis DSMZ402	+	B.subtilis DSMZ 1087	+

Taula 3.1.2.3.2.2 Resultats soques salvatges.

Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat
B-1	+	B-26	-	B-51	-	B-76	-
B-2	-	B-27	-	B-52	-	B-77	-
B-3	-	B-28	-	B-53	-	B-78	-
B-4	-	B-29	-	B-54	-	B-79	+
B-5	-	B-30	-	B-55	-	B-80	-
B-6	-	B-31	-	B-56	-	B-81	-
B-7	+	B-32	-	B-57	-	B-82	-
B-8	-	B-33	-	B-58	-	B-83	-
B-9	-	B-34	+	B-59	-	B-84	-
B-10	-	B-35	-	B-60	-	B-85	-
B-11	-	B-36	-	B-61	-	B-86	-
B-12	-	B-37	-	B-62	-	B-87	+
B-13	-	B-38	-	B-63	-	B-88	-
B-14	-	B-39	+	B-64	-	B-89	-
B-15	-	B-40	-	B-65	-	B-90	-
B-16	-	B-41	-	B-66	+	B-91	-
B-17	-	B-42	-	B-67	-	B-92	-
B-18	-	B-43	-	B-68	-	B-93	-
B-19	+	B-44	-	B-69	-	B-94	-
B-20	-	B-45	-	B-70	-	B-95	+
B-21	-	B-46	-	B-71	-	B-96	-
B-22	-	B-47	-	B-72	-	B-97	-
B-23	-	B-48	+	B-73	-	B-98	-
B-24	+	B-49	-	B-74	-	B-99	-
B-25	-	B-50	-	B-75	-	B-100	-

Els resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica qualitativa van indicar que les soques salvatges, la B-1, B-7, B-19, B-24, B-34, B-39, B-48, B-66, B-79, B-87, B-95 així com *B. subtilis* DSMZ402, *B. subtilis* CECT35, *B. subtilis* DSMZ 1087, *P. denitrificans* CECT694 i *Rhodococcus sp.* CECT3048 produïen una substància que tenia fluorescència sota llum ultraviolat a 254nm i tenia el mateix Rf que la menadiona, fet que feia sospitar la producció de menadiona en els assaigs realitzats amb aquests microorganismes

3.1.2.3.3. Detecció per HPLC .

Un cop realitzat l'anàlisi qualitatiu per cromatografia de capa fina, es van assajar les soques de col·lecció i les soques salvatges amb cultius de 1l en els medis WG, WS i white 2-MNF a una concentració de 100µg de substrat/ml de medi de cultiu al 1% de

DMSO. La concentració de 100µg/ml de 2-MNF va ser escollida degut a la seva toxicitat i a l'obtenció d'un rendiment mínim que permetés la seva detecció.

Les anàlisis es van dur a terme per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC), utilitzant un detector de fotodiodes (DAD) segons 2.5.3.3, obtenint-se tres soques de col·lecció i dues soques salvatges productores de menadiona. A les taules 3.1.2.3.3.1 i 3.1.2.3.3.2, s'observen els resultats obtinguts, i a les figures 3.1.2.3.3.1, 3.1.2.3.3.2, 3.1.2.3.3.3, 3.1.2.3.3.4 i 3.1.2.3.3.5, es veuen els cromatogrames corresponents als assaigs positius.

Taula 3.1.2.3.3.1. Resultats corresponents a les soques de col·lecció.

Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat
<i>M.loti</i> CECT4120	-	<i>P.denitrificans</i> CECT694	+	Rhodococcus sp CECT3048	+
B.subtilis CECT35	-	B.subtilis DSMZ402	+	B.subtilis DSMZ 1087	-

Taula 3.1.2.3.3.2. Resultats corresponents a les soques salvatges.

Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat	Soca	Resultat
B-1	-	B-26	-	B-51	-	B-76	-
B-2	-	B-27	-	B-52	-	B-77	-
B-3	-	B-28	-	B-53	-	B-78	-
B-4	-	B-29	-	B-54	-	B-79	-
B-5	-	B-30	-	B-55	-	B-80	-
B-6	-	B-31	-	B-56	-	B-81	-
B-7	-	B-32	-	B-57	-	B-82	-
B-8	-	B-33	-	B-58	-	B-83	-
B-9	-	B-34	-	B-59	-	B-84	-
B-10	-	B-35	-	B-60	-	B-85	-
B-11	-	B-36	-	B-61	-	B-86	-
B-12	-	B-37	-	B-62	-	B-87	-
B-13	-	B-38	-	B-63	-	B-88	-
B-14	-	B-39	+	B-64	-	B-89	-
B-15	-	B-40	-	B-65	-	B-90	-
B-16	-	B-41	-	B-66	-	B-91	-
B-17	-	B-42	-	B-67	-	B-92	-
B-18	-	B-43	-	B-68	-	B-93	-
B-19	-	B-44	-	B-69	-	B-94	-
B-20	-	B-45	-	B-70	-	B-95	-
B-21	-	B-46	-	B-71	-	B-96	-
B-22	-	B-47	-	B-72	-	B-97	-
B-23	-	B-48	+	B-73	-	B-98	-
B-24	-	B-49	-	B-74	-	B-99	-
B-25	-	B-50	-	B-75	-	B-100	-

3.1.3. Caracterització química del producte obtingut.

3.1.3.1. Síntesis i caracterització de l'isòmer de la menadiona, la 6-metil-1,4-naftoquinona.

La síntesi química de l'isòmer de la menadiona, la 6-metil-1,4-naftoquinona es va obtenir amb un rendiment del 75% (pes/pes). Posteriorment es va caracteritzar per cromatografia de capa fina, observant-se que es tractava del producte amb l'adequada puresa per posteriors proves. Finalment es va cristal·litzar. La caracterització del producte per punt de fusió i espectrofotometria d'infraroig, que va donar els següents resultats: Un espectre d'infraroig característic pel producte (figura 3.1.3.1.1.), que comparat amb l'espectre de la menadiona (3.1.3.1.2.) s'observa que són lleugerament diferents, no essent suficient com per a distingir-los. El punt de fusió és de 89,8°C-90,2°C.

Per altra banda l'espectre de masses d'ambdós compostos es troba a les figures 3.1.3.1.3, i 3.1.3.1.4. respectivament, es pot observar que son pràcticament idèntics.

Figura 3.1.3.1.1: Espectre Infraroig 6-metil-1,4-naftoquinona

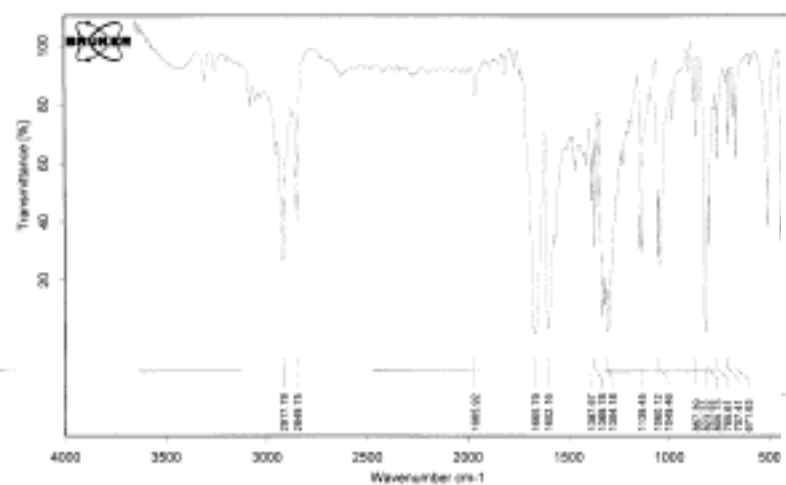


Figura 3.1.3.1.2: Espectre Infraroig de la vitamina K3

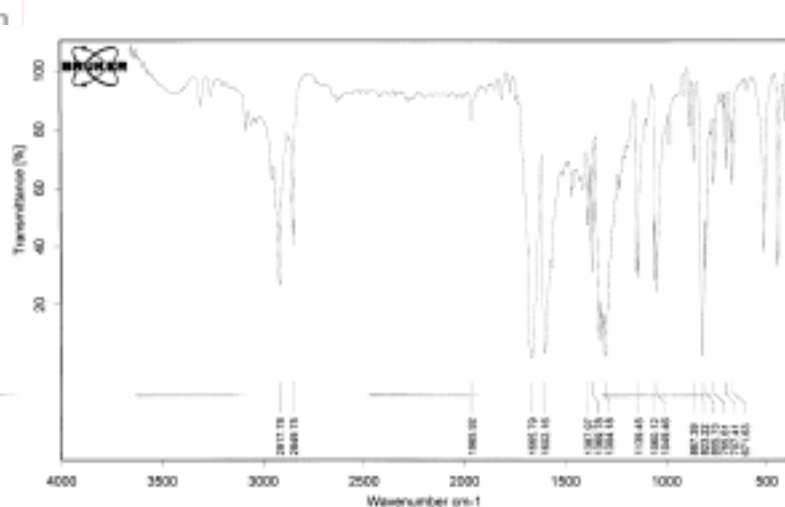


Figura 3.1.3.1.3 Espectre de masses de 6-metil-1,4-naftoquinona

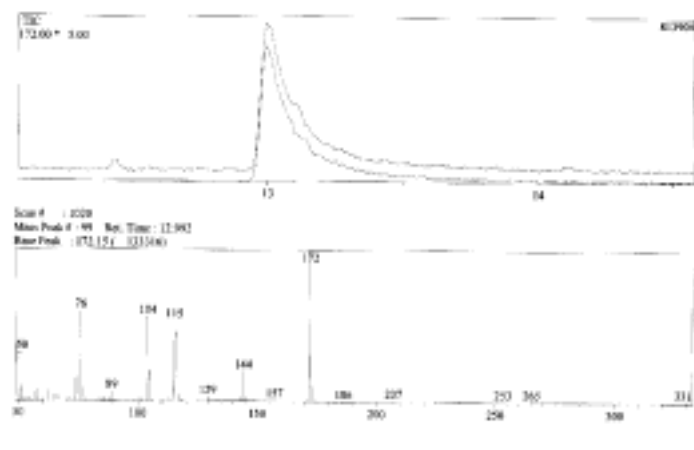
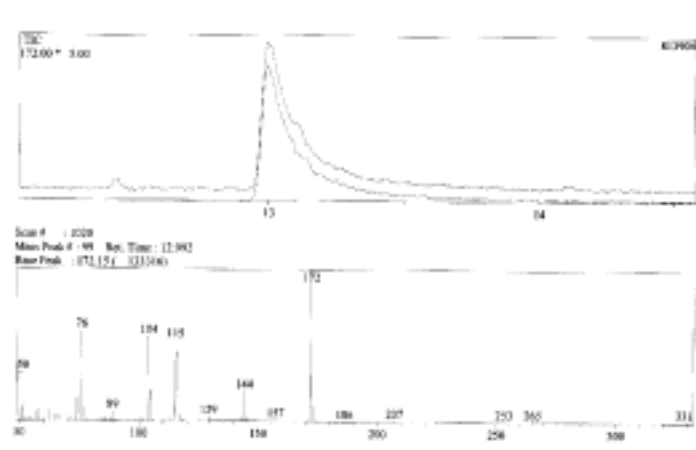


Figura 3.1.3.1.4: Espectre de masses de la vitamina K3



3.1.3.2. Confirmació de la síntesi biotecnològica de la menadiona.

Per a la confirmació que el producte produït per les soques salvatges és vitamina K3 i no el seu isòmer, es van portar a terme dos experiments independents. Per una banda es va analitzar el producte obtingut de la reacció biotecnològica segons 2.5.3.4 de la soca B-48 mitjançant GC-MS, com a tècnica que dóna una informació analítica més fiable de les assajades (Figura 3.1.3.2.1).

Per altra banda es va barrejar producte obtingut de la reacció biotecnològica segons 2.5.3.3 de la soca B-48 amb la 6-metil-1,4-naftoquinona obtinguda segons 3.1.3.1. Posteriorment es va analitzar la mescla dels productes per HPLC-DAD (Figura 3.1.3.2.2), tècnica amb la qual es diferencien els isòmers per temps de retenció diferent. Com es pot observar a les figures anomenades en aquesta secció, el producte obtingut en la reacció de biotransformació correspon a la vitamina K3 i no a 6-metil-1,4-naftoquinona.

Figura 3.1.3.2.1: Cromatograma GC i espectre de masses de Mostra B-48

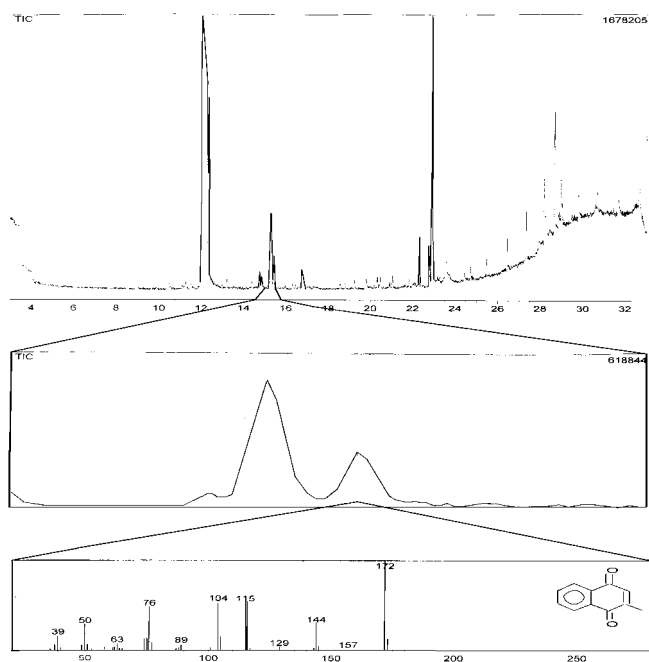
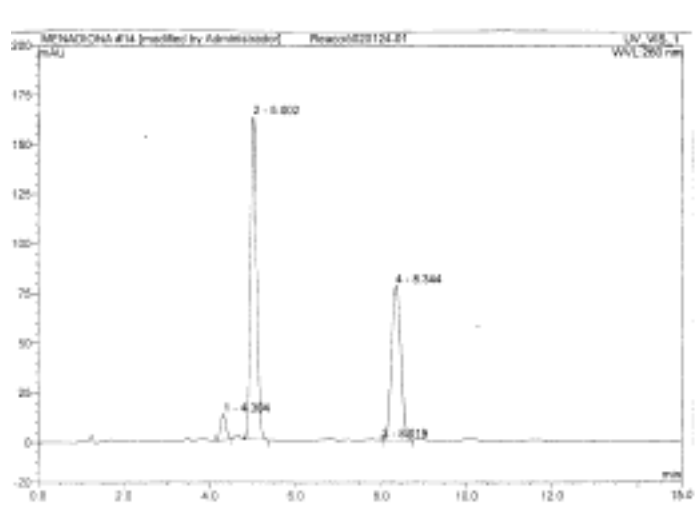


Figura 3.1.3.2.2: Cromatograma HPLC-DAD Mostra B-48 dopada amb 6-metil-1,4-naftoquinona



3.2. Identificació de les soques salvatges productores de menadiona.

3.2.1 Identificació de la soca salvatge B-48.

És un bacil grampositiu amb espora central no deformant, el·líptica i s'allibera per la zona equatorial de la cèl.lula. El perfil bioquímic es va realitzar segons 2.4.3 i es detalla a la següent taula:

Taula 3.2.1.1. Perfil bioquímic de la soca salvatge B-48

Prova Bioquímica	Resultat
Catalasa	+
Lecitinasa	+
Beta-hemòlisis	+
Creixement 55°C	-
Creixement Bacillus cereus Agar	+
Creixement 45°C	(Alcalinitza)
Producció Indol	-
Creixement 4°C	-
Utilització de Glicerol	-
Utilització de Eritritol	-
Utilització de D-Arabinosa	-
Utilització L-Arabinosa	-
Utilització de Ribosa	-
Utilització de D-Xilosa	-
Utilització de L-Xilosa	-
Utilització de Adonitol	-
Utilització de Beta-Metil-D-Xilòsid	-
Utilització de Galactosa	-
Utilització de Glucosa	Oxida i Fermenta
Utilització de Fructosa	Oxida i Fermenta
Utilització de Manosa	-
Utilització de Sorbosa	-
Utilització de Ramnosa	-
Utilització de Dulcitol	-
Utilització de Inositol	-
Utilització de Manitol	-
Utilització de Sorbitol	-
Utilització de Alfa-metil-D-Manòsid	-
Utilització de Alfa-metil-d-Glucòsid	-
Utilització Cel.lobiosa	-
Utilització de Maltosa	Oxida i Fermenta
Utilització de Lactosa	-
Utilització de Melobiosa	-
Utilització de Sacarosa	Oxida i Fermenta
Utilització de Trehalosa	Oxida i Fermenta
Utilització Inulina	-

Utilització de Melezitosa	-
Utilització de Rafinosa	
Utilització de Midó	Oxida i Fermenta
Utilització Xilitol	-
Utilització de Glicogen	Oxida i Fermenta
Utilització de Gentobiosa	-
Utilització de D-Turanosa	-
Utilització de D-Lixosa	-
Utilització de D-Tagatosa	-
Utilització de D-Fucosa	-
Utilització de L-Fucosa	-
Utilització de D-Arabitol	-
Utilització de L-Arabitol	-
Utilització de D-Gluconat	-
Utilització de 2-Cetogluconat	-
Utilització de 5-Cetogluconat	-
Utilització de N-acetil-Glucosamina	Oxida i Fermenta
Utilització de Amigdalina	-
Utilització de Arbutina	-
Utilització de Esculina	Oxida i Fermenta
Utilització de Salicina	-
Utilització de Temoina	-

El perfil bioquímic obtingut amb aquestes proves indica que la soca salvatge denominada com a B-48 correspon a un *Bacillus cereus* biotip I.

3.2.2 Identificació de la soca salvatge B-39.

El microorganisme s'identifica segons 2.4.3., resultant un bacil gramnegatiu no-esporejat que en ocasions pot presentar pleomorfisme i presenta un perfil bioquímic que es detalla a la següent taula:

Taula 3.2.2.1: Perfil bioquímic de la soca B-39

Prova Bioquímica	Resultat
Citocrom C oxidasa	+
Creixement en Agar McConckey	+(Lactosa-)
Creixement en Agar Cetrimida	+
Beta-Galactosidasa	+
Arginina dehidrolasa	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+
Utilització del Citrat	+
Producció de Àcid Sulfúric	-
Ureasa	-
Triptòfan deaminasa	-

Producció Indol	-
Producció Acetoïna	-
Gelatinasa	+
Utilització de Glucosa	+
Utilització de Manitol	-
Utilització de Inositol	-
Utilització de Sorbitol	-
Utilització de Ramnosa	-
Utilització de Sacarosa	-
Utilització de Melobiosa	-
Utilització de Amigdalina	-
Utilització de Arabinosa	-
Reducció Nitrats	+
Producció de Nitrogen	-
Beta-glucosidasa	+
Utilització de N-acetilglucosamina	-
Utilització de Gluconat	-
Utilització de Caprat	-
Utilització de Adipat	-
Utilització de Malat	-
Utilització de fenilacetat	-
Utilització de Amilosa	+

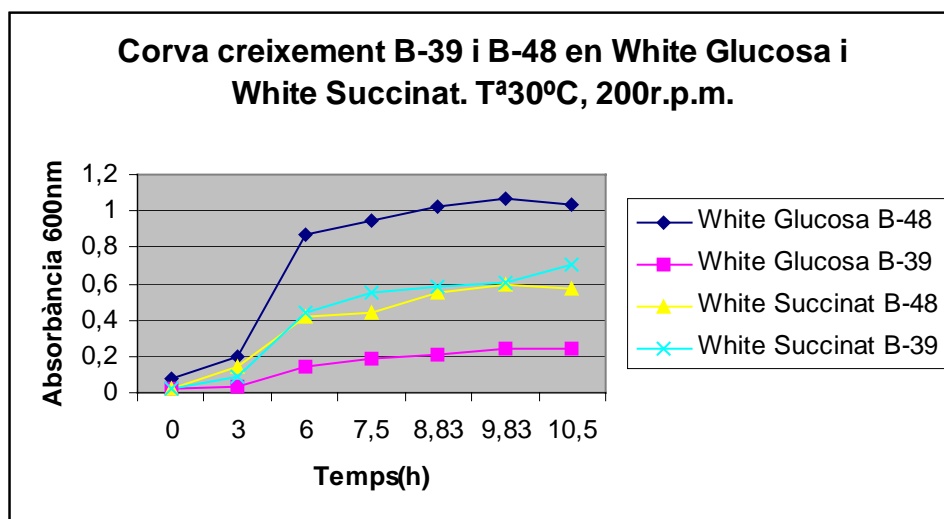
El perfil bioquímic obtingut de la soca salvatge denominada com a B-39, correspon al número 1730004 del sistema d'identificació API 20NE, que indica que ens trobem davant una soca com pot ser *Pseudomonas cepacia*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus* o *Xanthomonas maltophilia*. Posteriorment els resultats obtinguts amb el sistema de identificació API 20E, en el que la soca salvatge obté el número 5202005, confirmant que ens trobem davant una soca de *Pseudomonas cepacea*.

3.3 Estudis de creixement dels microorganismes en les condicions d'assaig.

3.3.1 Corves de creixement de B-39 i B-48 amb medi de cultiu white glucosa (WG) i white succinat (WS).

Per a determinar la idoneïtat dels medis de cultius mínims per a realitzar assaigs de biotransformació es va estudiar el creixement de les soques salvatges en els medis WG i WS. La mesura del creixement es va realitzar segons 2.4.2 i es van obtenir els resultats de la figura 3.3.1.1, en els que s'observa un òptim creixement per B-48 en glucosa i succinat i per B-39 en succinat.

Figura 3.3.1.1.

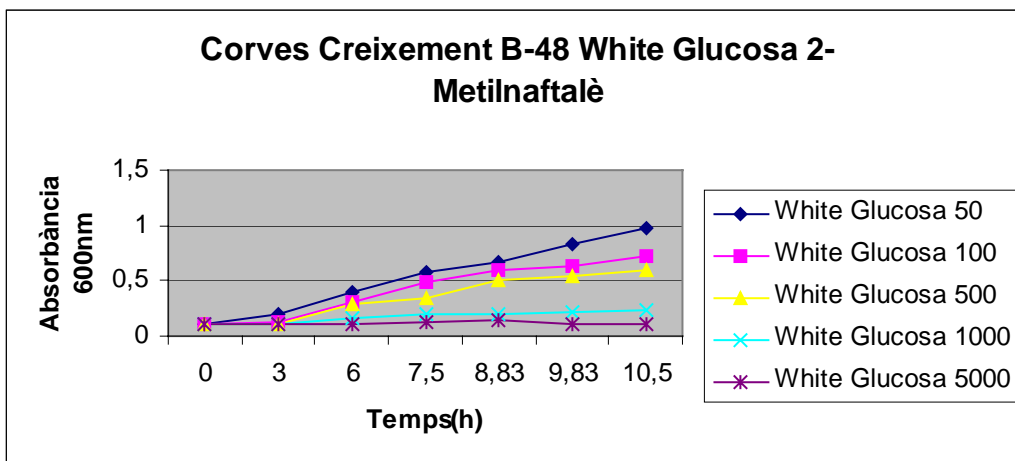


3.3.2. Corva de creixement de la soca B-48 en white glucosa i white succinat amb 2-MNF.

Segons el resultat anterior, on es pot veure que la soca B-48 produeix considerablement més biomassa que la soca B-39 en termes generals, i a més, la soca B-48 produïa més menadiona observant els estudis qualitius realitzats amb la tècnica HPLC, es va decidir treballar amb la soca B-48 pels estudis d'optimització del procediment d'obtenció de vitamina K3 mitjançant un mètode biotecnològic.

Per a determinar l'efecte del substrat (2-MNF) en la soca B-48 pel que fa al creixement, es va realitzar una corva de creixement segons 2.4.2, a concentracions de 50, 100, 500, 1000, 5000µg/ml de 2-MNF, obtenintse els resultats de la figura 3.3.2.1.

Figura 3.3.2.1. Corves de creixement de la soca B-48 en WG i 2-MNF.



En aquest assaig es va observar la toxicitat del 2-MNF, fet que limita a concentracions molt baixes el treball de la reacció.

3.3.3. Corbes de creixement de la soca B-48 en cultius bifàsics.

Amb l'objectiu d'evitar la toxicitat del substrate i augmentar la dosis d'aquest, es van realitzar corbes de creixement en ambients aigua/hexadecà. Es van escollir dos concentracions molt augmentades de 2-MNF respecte als assaigs anteriors, això es, 1 i 5 g/l de 2-MNF en diferents medis de cultiu, obtenintse el resultats de les figures 3.3.3.1, 3.3.3.2 i 3.3.3.3

Figura 3.3.3.1.

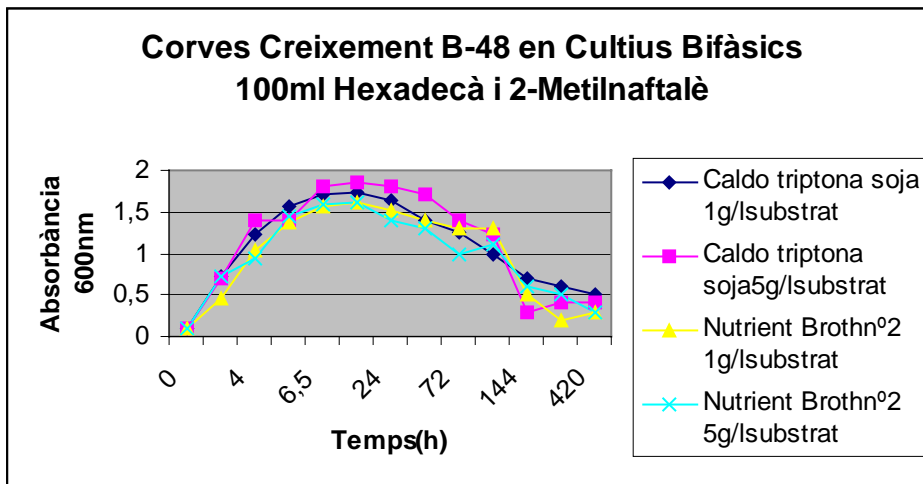


Figura 3.3.3.2.

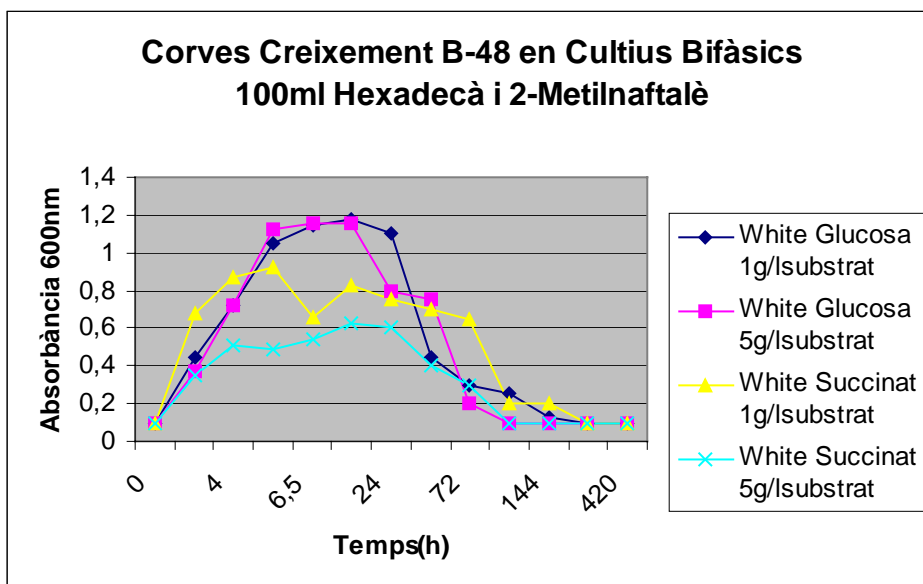
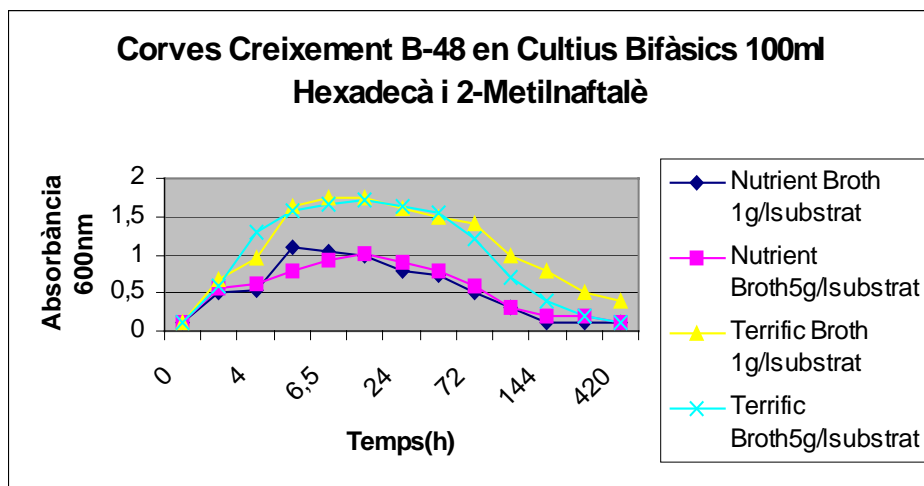


Figura 3.3.3.3.



En les figures s'observa que els sistemes bifàsics amb hexadecà solucionen el problema de la toxicitat, obtenint-se cultius amb elevadíssima densitat al comparar els resultats de la figura 3.3.2.1.

3.4. Producció de vitamina K3 amb Cèl.lules senceres de B-48 amb 2-MNF.

3.4.1. Producció de vitamina K3 per B-48 en diferents medis.

La soca amb major producció de menadiona en l'screening es va assajar amb medis mínims i amb els medis nutritius que comporten un major creixement de la soca. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.4.1.1.

Taula 3.4.1.1. Producció de vitamina K3 per B-48 a una concentració de 500µg/ml de 2-MNF en 14 dies a 30°C i 200r.p.m. L'assaig es va realitzar per duplicat en WG i WS.

Medi de Cultiu	Producció Menadiona (mg)	Producció Hidroximetilnaftalè (mg)	Percentatge Transformació Menadiona (%)
white glucosa 1	0,128	0,8356	0,021
white glucosa 2	0,078	0,1263	0,013
white succinat1	0,075	0,544	0,012
white succinat 2	0,103	0,214	0,017
Nutrient broth n°2 (NB2)	Traces	Traces	-
Nutrient broth (NB)	0	Traces	-
Terrific broth	0	Traces	-
caldo triptona soja	Traces	Traces	-

En aquests resultats s'observa que la major producció de menadiona es realitza en els medis white i que en succinat es produeix menys hidroximetilnaftalè, que es presenta com una ruta competitiva a la transformació desitjada.

3.4.2. Estudi del mecanisme de reacció

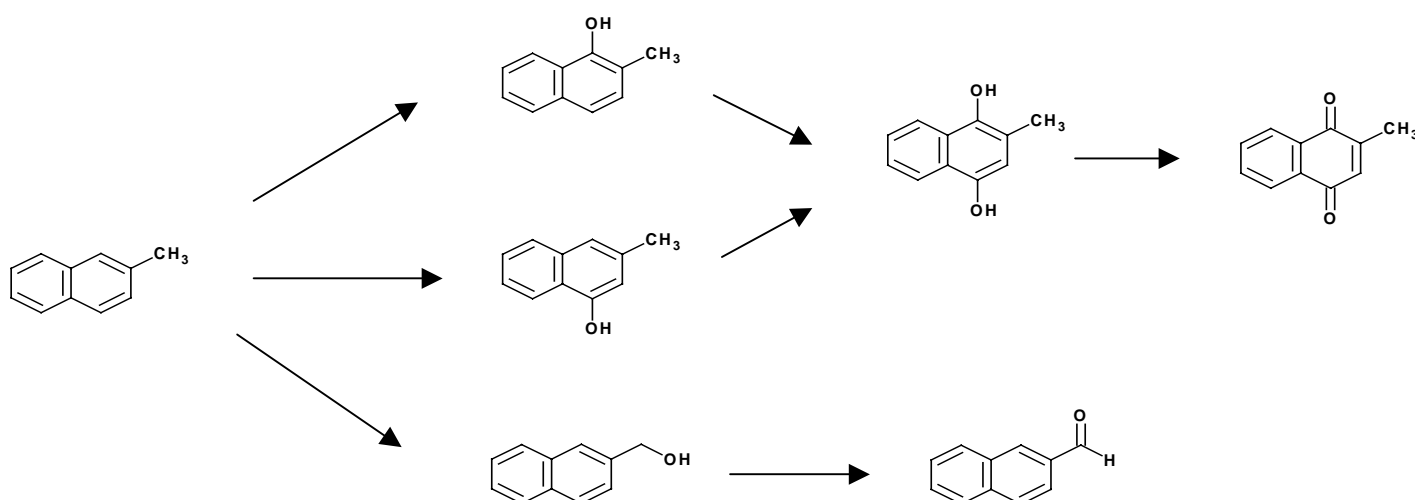
Amb l'objectiu de determinar el mecanisme de reacció de la síntesi de menadiona i la via competitiva del hidroximetilnaftalè es va fer una cinètica per veure l'evolució dels compostos al llarg del temps. Els resultats es veuen a la taula 3.4.2.1

Taula 3.4.2.1. Producció de vitamina K3 per la soca B-48 entre 10 i 20 dies a 30°C i 200 r.p.m.

Producte →	2-metil-1-naftol + 2-metil-4-naftol		Menadiona		Hidroxi- metilnaftalè		Àcid 2-metil- naftoic	
	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.
whiteglucosa 1g 2-metilnaftalè/l	0mg	0mg	0,12mg	0,13mg	0mg	0mg	0,25mg	0,3mg
whitesuccinat 1g 2-Metilnaftalè/l	0mg	0mg	0,025mg 0,11mg		0,03mg 0,05mg		0,1mg	0,8mg
white 1g 2-metilnaftalè/l	0,8mg	0,7mg	0,05mg	0,14mg	20mg	15mg	0mg	0mg

Amb aquesta cinètica es va observar que per a la síntesi de menadiona hi ha uns compostos intermediaris en la síntesi de la menadiona, com són el 2-metil-1-naftol, 2-metil-4-naftol i probablement el menadiol, i que l'hidroximetilnaftalè és un intermediari de la producció de l'àcid 2-metilnaftoic, producte final de la via competitiva a la producció de la menadiona.

Figura 3.4.2.1. Mecanisme de reacció per a la producció de menadiona i ruta competitiva.



3.4.1.3 Producció de menadiona per B-48 en restricció de font de nitrogen o carboni.

Amb l'objectiu de treballar amb cèl.lules no proliferants es van realitzar assaigs amb restricció de nitrogen (white glucosa o white succinat, sense nitrogen) o font d'energia i carboni (sals white), obtenint els resultats que es veuen a la taula 3.4.1.3.1.

Taula 3.4.1.3.1. Producció de vitamina K3 per la soca B-48 durant 14 dies, 30°C, 200 r.p.m. i 500µg/ml de 2MNF.

Medi de Cultiu	Producció Menadiona (mg)	Producció Hidroximetilnaftalè (mg)	Percentatge de Transformació (%)
white glucosa-N	Traces	0,734	-
white succinat-N	0,073	0,453	0,0122
sals white Crescut en NB2	0	0	0
sals white crescut en WG	0,140	0,714	0,028
sals white crescut WS	0,131	0,15	0,026

En aquestes condicions es va observar que en condicions de restricció de font d'energia i carboni, en sals white, hi ha més producció de menadiona i es confirma que en cèl.lules crescudes en succinat la producció de la via alternativa disminueix.

3.4.1.4 Producció de vitamina K3 per B-48 en sistemes bifàsics.

Amb l'objectiu d'augmentar la quantitat de substrat en la reacció, sense que fos insoluble en el medi de reacció ni tòxic pels bacteris, es van afegir solvents orgànics creant un ambient bifàsic, en el present estudi es va fer servir hexadeca, obtenintse els resultats de la taula 3.4.1.4.1.

Taula 3.6.1.4.1. Producció de vitamina K3 per la soca B-48 amb 100ml Hexadeca, 2MNF, 30°C, 200 r.p.m. i 14 dies.

Medi de Cultiu	Producció Menadiona	Producció Hidroximetilnaftalè	Producció cetones Alifàtiques
white glucosa 1g/l 2MNF	Traces	Traces	35mg
white glucosa 5g/l 2 MNF	Traces	Traces	36mg
white succinat 1g/l 2 MNF	Traces	Traces	20mg
white succinat 5g/l 2 MNF	Traces	Traces	25mg
nutrient broth n°2 1g/l 2 MNF	0	0	50mg
nutrient broth n°2 5g/l MNF	0	0	47mg

En les condicions assajades es veu que no es forma gairebé gens de cap producte relacionat amb el metabolisme del 2-metilnaftalè i que es produeix una oxidació en l'hexadecà, formant cetones alifàtiques de diferent llargada.

3.4.1.5 Cinètica de producció de menadiona per B-48 en restricció de carboni i nitrogen.

Amb l'objectiu d'optimitzar el temps de reacció i la concentració de substrat es va realitzar una cinètica a 2, 5, 10 i 15 dies a 50, 100 i 150mg/l de 2-MNF en restricció de carboni, cinètica a 1, 5, 10 i 15 dies a 50mg/l de 2-MNF en restricció de nitrogen en glucosa o succinat, obtenintse els resultats indicats a les taules 3.4.1.5.1, 3.4.1.5.2, 3.4.1.5.3, 3.4.1.5.4 .

Taula 3.4.1.5.1. Cinètica de reacció de la producció de menadiona per la soca B-48 en medi sals white crescut en WS, 30°C, 200r.p.m. i 14 dies.

Concentració 2-Metilnaftalè	Producció Menadiona 2dies	Producció Menadiona 5dies	Producció Menadiona 10dies	Producció Menadiona 15dies
50mg/l	0,25mg	0,75mg	1,35mg	1,05mg
100mg/l	0,15mg	0,27mg	0,25mg	0,18mg
150mg/l	0,10mg	0,19mg	0,18mg	0,11mg

Es pot observar a la taula que el percentatge màxim de transformació en menadiona va succeir als 10 dies, obtenintse el 2,7% de transformació.

Taula 3.4.1.5.2. Producció de hidroximetilnaftalè segons cinètica anterior.

Concentració 2-Metilnaftalè	Producció Hidroxi-metilnaftalè 2dies	Producció Hidroxi-metilnaftalè 5dies	Producció Hidroxi-metilnaftalè 10dies	Producció Hidroxi-metilnaftalè 15dies
50mg/l	1,53mg	6,29mg	20,57mg	23,29mg
100mg/l	0,94mg	4,35mg	8,23mg	10,24mg
150mg/l	0,41mg	2,99mg	5,3mg	6,92mg

Es pot observar a la taula que el percentatge màxim de transformació en hidroximetilnaftalè va succeir als 15 dies, obtenintse el 46,5% de transformació.

Amb aquesta cinètica s'observa una major producció de menadiona a 50mg/l de substrat i 10 dies, però en aquestes condicions també augmenta molt la producció de la ruta alternativa, essent majoritària respecte a la producció de menadiona.

Taula 3.4.1.5.3. Cinètica de reacció de la producció de menadiona per la soca B-48 en medi white succinat-N 50mg/l 2MNF crescut en WS, 30°C, 200r.p.m. i 14 dies.

Producte	Producció Menadiona 1dia	Producció Menadiona 5dies	Producció Menadiona 10dies	Producció Menadiona 15dies
Vitamina k3	0	Traces	Traces	1.58mg
Hidroximetilnaftalè	0	1mg	1.5mg	18.9mg
2-metil-1 o 4-naftol	0	0	0	0

Es pot observar a la taula que el percentatge màxim de transformació en menadiona va succeir als 15 dies, obtenintse el 3,16% de transformació.

Taula 3.4.1.5.4. Cinètica de reacció de la producció de menadiona per la soca B-48 en medi white glucosa-N 50mg/l 2MNF crescut en WS, 30°C, 200r.p.m. i 14 dies.

Producte	Producció Menadiona 1dia	Producció Menadiona 5dies	Producció Menadiona 10dies	Producció Menadiona 15dies
Vitamina k3	0	0.3mg	4mg	4.56mg
Hidroximetilnaftalè	20mg	42mg	43mg	44mg
2-metil-1 o 4-naftol	5mg	3mg	0	0

Es pot observar a la taula que el percentatge màxim de transformació en menadiona va succeir als 15 dies, obtenintse el 9,12% de transformació

3.4.1.6 Producció de menadiona en medis de cultiu amb inhibidors de l'oxidació en el grup metil.

Amb l'objectiu d'inhibir la producció del principal competidor de la síntesi de la menadiona, es van addicionar reactius inhibidors d'hidroxilació en grups metil, com són el dietilditiocarbamat sòdic trihidratat i l'etilxantogenat potàssic, obtenint els resultats que es detallen a continuació a les taules 3.4.1.6.1. i 3.4.1.6.2.

Taula 3.4.1.6.1. Producció de menadiona amb presència de dietilditiocarbamat sòdic trihidratat.

B-48 Crescut en white glucosa	Producció Menadiona	Percentatge Transformació
dietilditiocarbamatsòdic trihidratat 1mM	-	-
dietilditiocarbamat trihidratat 0,1mM	Traces	-
dietilditiocarbamat sòdic trihidratat 0,01mM	Traces	-
B-48 crescut en white succinat:		
dietilditiocarbamatsòdic trihidratat 1mM	-	-
dietilditiocarbamat trihidratat 0,1mM	-	-
dietilditiocarbamat sòdic trihidratat 0,01mM	-	-

Taula 3.6.1.6.2 Producció de menadiona amb presència de Etilxantogenat potàssic

B-48 Crescut en white glucosa	Producció Menadiona	Percentatge Transformació
etilxantogenat potàssic 1mM	-	-
etilxantogenat potàssic 0,1mM	Traces	-
etilxantogenat potàssic 0,01mM	Traces	-
B-48 crescut en white succinat:		
etilxantogenat potàssic 1mM	Traces	-
etilxantogenat potàssic 0,1mM	Traces	-
etilxantogenat potàssic 0,01mM	Traces	-

L'ús dels inhibidors demostra que la ruta de producció dels dos compostos s'inhibeix.

3.4.2 Producció de menadiona per *B.subtilis* en restricció de font de nitrogen o carboni

Amb l'objectiu de treballar amb cèl.lules no proliferants de *Bacillus subtilis* es van realitzar assaigs amb restricció de nitrogen (white glucosa o white succinat sense nitrogen) o font d'energia i carboni (sals white), obtenint els resultats que es veuen a la taula 3.4.21.

Taula 3.4.2.1: Producció de vitamina K3 per la soca *Bacillus subtilis* DSMZ 402 a un temps de 14 dies, temperatura de 30°C, agitació de 200 r.p.m. i 50µg/ml de 2MNF

Medi de Cultiu	Producció Menadiona	Producció Hidroximetilnaftalè	Percentatge de Transformació
white glucosa-N	7,136mg	1,1mg	14,3%
white succinat-N	Traces	Traces	-
sals white crescut en WG	Traces	Traces	-
sals white crescut WS	Traces	Traces	-

En la condició de cèl.lules crescudes en glucosa no proliferants degut a limitació de nitrogen s'observa una elevada producció de menadiona i a més una baixa productivitat de la ruta alternativa.

3.4.3 Producció de menadiona amb cèl.lules senceres amb 2-metil-1-naftol 25mg/l.

Es va estudiar també la reacció de síntesis amb un substrat diferent, el 2-metil-1-naftol, obtenintse els resultats de les taules 3.4.3.1 i 3.4.3.2

Taula 3.4.3.1. Producció amb B-48 i *Bacillus subtilis* DSMZ 402 en sals white.

Condicions	Producció Menadiona			Percentatge transformació		
	2dies	5dies	10dies	2dies	5dies	10dies
Blanc	5mg	23mg	25mg	20%	92%	100%
B-48	25mg	25mg	25mg	100%	100%	100%
<i>B.subtilis</i> DSMZ 402	25mg	25mg	25mg	100%	100%	100%

Taula 3.4.3.2. Producció amb B-48 i *Bacillus subtilis* DSMZ 402 en cultius bifàsics amb sals white i hexadecà.

Condicions	Producció Menadiona			Percentatge transformació		
	2dies	5dies	10dies	2dies	5dies	10dies
Blanc	2mg	3mg	4mg	8%	12%	16%
B-48	14mg	15mg	13mg	56%	60%	52%
<i>B.subtilis</i> DSMZ 402	3mg	5mg	6mg	12%	20%	24%

En els assaigs amb 2-metil-1-naftol s'observa que la mostra s'autooxida a partir del blanc i que les cèl.lules fan de catalitzador al reduir el temps de reacció, obtenintse uns resultats de 100% de transformació en els assaigs sense hexadecà, mentre que en els assaigs en condicions bifàsiques la reacció té un rendiment inferior. A més la síntesi és totalment selectiva, és a dir no es produeix cap producte competitiu amb la menadiona.

3.4.4 Assaigs enzimàtics

Amb l'objectiu de veure l'activitat productiva a partir de cèl.lules trencades de B-48, *B.subtilis* DSMZ 402 i *B.cereus* CECT 135 enfront el 2-metilnaftalè i el 2-metil-1-naftol, es van realitzar els assaigs segons 2.5.1.2 i 2.5.1.3 amb i sense hexadecà, obtenintse els resultats detallats a les taules 3.4.4.1., 3.4.4.2, 3.4.4.3., 3.4.4.4, 3.4.4.5.

Taula 3.4.4.1. Assaig de producció de vitamina K3 amb 2-MNF i cèl.lules trencades.

Microorganisme	Producció menadiona en 1 dia	Producció menadiona en 5 dies
B-48 crescut amb WS	Negatiu	Negatiu
B-48 crescut amb WG	Negatiu	Negatiu
<i>B. cereus</i> crescut amb WS	Negatiu	Negatiu
<i>B.cereus</i> crescut amb WG	Negatiu	Negatiu
<i>B.subtilis</i> crescut amb WS	Traces	Traces
<i>B.subtilis</i> crescut amb WG	Negatiu	Negatiu

Els assaigs amb 2-MNF mostren que no hi ha un procés òptim per a la producció de menadiona, ja que només en *B.subtilis* crescut amb WS sembla que hi pot haver un resultat presumptament positiu.

Taula 3.4.4.2. Assaig de producció de vitamina K3 amb 2-metil-1-naftol i cèl.lules trencades.

Microorganisme	Producció Menadiona 1 dia/ Percentatge Transformació	Producció Menadiona 5 dies/ Percentatge Transformació
B-48 crescut amb WS	3,3mg/13,2%	3,48mg/13,92%
B-48 crescut amb WG	Negatiu	Negatiu
<i>B. cereus</i> crescut amb WS	1,2mg/4,8%	3mg/12%
<i>B.cereus</i> crescut amb WG	1,7mg/6,8%	2mg/8%
<i>B.subtilis</i> crescut amb WS	3,8mg/15,2%	1,3mg/5,2%
<i>B.subtilis</i> crescut amb WG	2,2mg/8,8%	8mg/32%

Amb les cèl.lules trencades hi ha transformació, obtenintse el màxim amb la condició de *B. Subtilis* DSMZ 402 crescut amb WG a 5 dies de reacció.

Taula 3.4.4.3 Assaig de producció de vitamina K3 amb 2-MNF i 2-metil-1-naftol a 25µg/ml. Assaig control.

Blanc	Producció menadiona		Percentatge de transformació	
	1dia	5dies	1dia	5dies
2-metilnaftalè 25µg/ml hexadecà	0mg	0mg	0%	0%
2-metil-1-naftol 25µg/ml hexadecà	0,1mg	0,2mg	0,4%	0,8%

Taula 3.4.4.4 Assaig de producció de vitamina K3 amb 2-MNF i 2-metil-1-naftol a 25µg/ml amb cèl.lules trencades de B-48

B-48 crescut en WS	Producció menadiona		Percentatge de transformació	
	1dia	5dies	1dia	5dies
2-metilnaftalè 25µg/ml hexadecà	0mg	0mg	0%	0%
2-metil-1-naftol 25µg/ml hexadecà	1mg	2mg	4%	8%

Taula 3.4.4.5 Assaig de producció de vitamina K3 amb 2-MNF i 2-metil-1-naftol a 25µg/ml amb cèl.lules trencades de *B. subtilis* DSMZ 402

<i>B.subtilis</i> crescut en WG	Producció menadiona		Percentatge de transformació	
	1dia	5dies	1dia	5dies
2-metilnaftalè 25µg/ml hexadecà	0mg	0mg	0%	0%
2-metil-1-naftol 25µg/ml hexadecà	1mg	0,5mg	4%	2%

Amb les cèl.lules trencades hi ha transformació del 2-metil-1-naftol i no del 2-metilnaftalè, tot i així els rendiments en condicions bifàsiques amb hexadecà són molt inferiors als observats en fase aquosa, obtenintse un màxim de producció amb cèl.lules de B-48 crescudes en WS, trencades, i a un temps de reacció de 5 dies.

3.5 Construcció de soques de *E.coli* recombinants.

Les soques recombinants d'*Escherichia coli* es van aconseguir clonant els fragments de DNA corresponents als gens presumptament implicats en la producció de menadiona de *B. subtilis* DSMZ 402 en les soques d'*Escherichia coli* TOP 10 i BL 21 com s'expressa en el punt 2.5.4.

3.5.1 Amplificació per PCR dels gens diana i confirmació dels inserts.

Els gens QOX, CYD, QOX A, B, C, D i CYD A, B de *B. subtilis* DSMZ 402, es van amplificar per PCR segons 2.5.4.1. Es va confirmar que l'insert era el correcte per PCR colonial 2.5.4.3.2 i analitzant el tamany dels fragments amplificats mitjançant la tècnica d'electroforesis en gels d'agarosa segons 2.5.3.6.

A les figures 3.5.1.1, 3.5.1.2, 3.5.1.3, 3.5.1.4, 3.5.1.5, 3.5.1.6 es mostren les fotografies dels gels obtinguts:

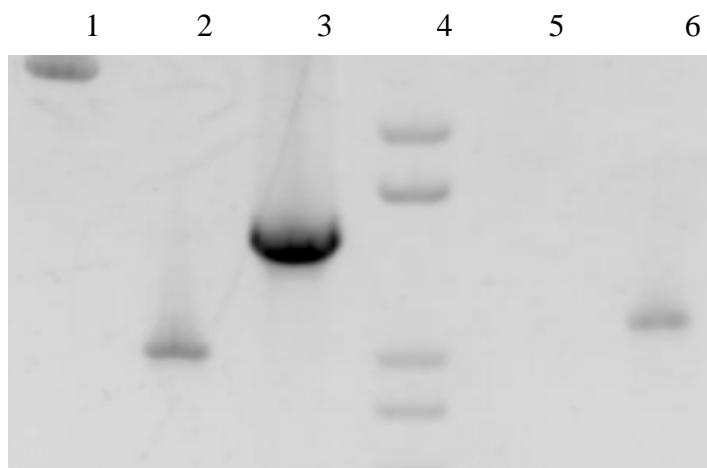


Figura 3.5.1.1: Electroforesis segons 2.5.3.6
Carrils 1-3: Productes de PCR corresponents a
Cyd(2.4kb), CydA(1kb), CydB(1.4kb)
Carril 4: Marcador 1 kb. Carril 5: Buit
Carril 6: Producte de PCR colonial del clon *E.coli*
Top10 CydA

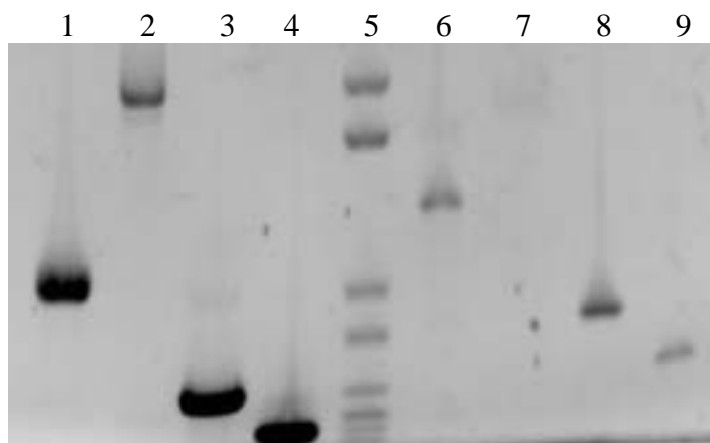


Figura 3.5.1.2: Electroforesis segons 2.5.3.6
 Carril 1-4: Productes de PCR corresponents a QoxA(1kb),B(2kb),C(550pb),D(350pb)
 Carril 5: Marcador 1kb Carril 7: Buit
 Carrils 6,8,9: PCR colonials dels clons *E.coli*



Figura 3.5.1.3: Electroforesis segons 2.5.3.6
 Carril1: Qox(4kb aprox.)
 Carril 2: Marcador 1kb

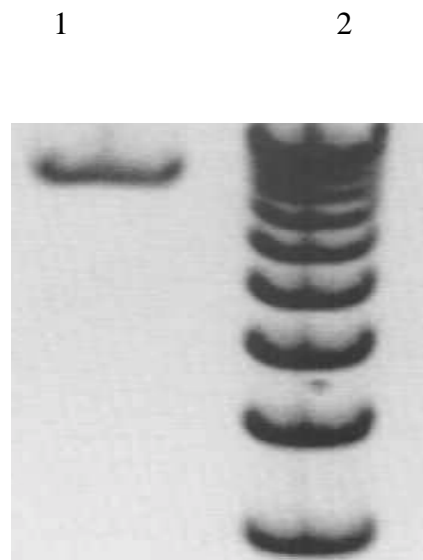


Figura 3.5.1.4: Electroforesis segons 2.5.3.6
 Carril 1: Miniprep digerida del clon Qox 16 (9.3kb aprox.)
 Carril 2: Marcador 1kb

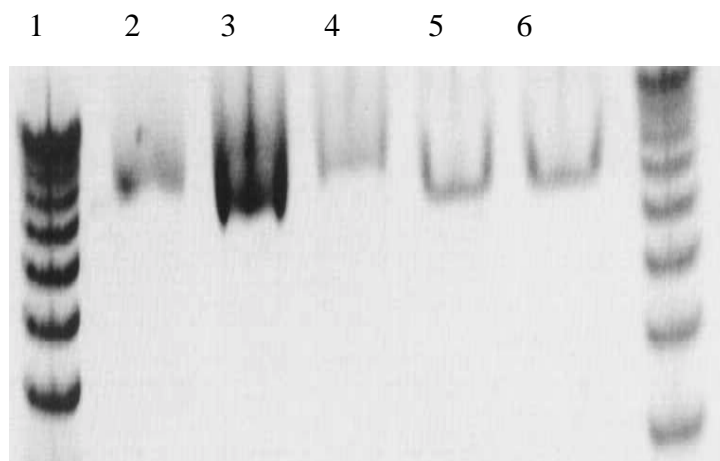
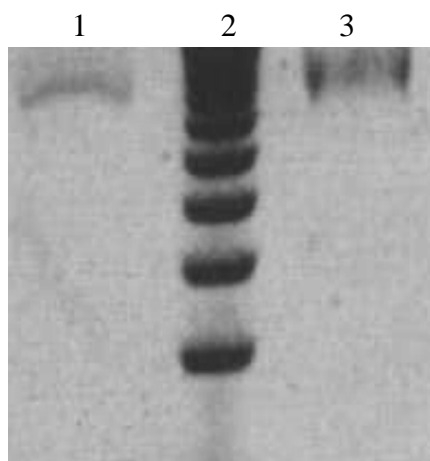


Figura 3.5.1.5: Electroforesis segons 2.5.3.6

Carril 1: Miniprep digerida del clon Qox B1 (8.3kb aprox.)

Carril 2 Marcador 1kb

Carril 3: Miniprep digerida del clon Cyd1 (8.3kb aprox.)

Figura 3.5.1.6: Electroforesis segons 2.5.3.6

Carril 1,7: Marcador 1kb

Carrils 5,6: Miniprep digerida del clon Cyd 4 i 5

(7.3kb aprox.)

3.5.2 Confirmació dels clons correctes per seqüenciació de DNA.

Els clons sospitosos de presentar els inserts correctes mitjançant PCR colonial 2.5.4.3.2. i anàlisi de restricció 2.5.4.3.2 , es van seqüenciar segons 2.5.4.3.2 obtenint els següents resultats:

3.5.2.1. Seqüència del gen QOX.

1GATGACGATG	ACAAGCTGGG	AATTGATCCC	TTCACCGAGA	AAAGATTTTG
AGGAAGTATG	CACTTCAGAT	TTATTACATC	AATAGGAAGG	ATGGTGATCT
TCTTGTTCAG	AGCATTAATA	CCGTTGCTTG	TATTAGCGCT	GTTAACTGTG
GTTTTTCGTCC	TTGGGGGATG	CAGCAATGCT	TCAGTACTAG	ATCCGAAAGG
ACCTGTAGCT	GAACAGCAAA	GTGATTTAAT	CCTGTTATCT	ATCGGATTTA
TGCTGTTTAT	CGTCGGGGTC	GTCTTTGTTC	TATTTACCAT	TATTTTAGTA
AAATACCGCG	ACCGTAAAGG	CAAAGATAAT	GGATCTTATA	ACCCAGAAAT
TCACGGTAAC	ACGTTTTTAG	AAGTAGTCTG	GACAGTGATC	CCAATTTTAA
TCGTCAATTGC	ACTTCTGTG	CCAACAGTAC	AGACGATATA	TTCGTTAGAA
AAAGCTCCTG	AAGCAACAAA	AGACAAAGAG	CCTCTTGTTG	TTTATGCTAC
TTCGGTAGAC	TGGAAATGGG	TATTTAGCTA	CCCTGAACAG	GATATTGAAA
CGGTCAACTA	CTTAAACATT	CCTGTGAC	GCCCGATCTT	GTTCAAATC
TCATCTGCAG	ATTCAATGGC	TTCGCTATGG	ATTCCTCAGC	TTGGAGGGCA
AAAATATGCG	ATGGCAGGAA	TGCTGATGGA	TCAATACTTA	CAGGCTGACA
AAGTGGGTAC	TTACGAAGGC	CGCAACGCGA	ACTTCACAGG	TGAACATTTT
GCAGACCAAG	AGTTTGATGT	GAATGCAGTC	ACAGAAAAAG	ACTTTAACAG
CTGGGTGAAA	AAGACTCAGA	ACGAGGCTCC	TAAGCTGACA	AAAGAGAAGT
ATGATGAATT	GATGCTTCCT	GAAAATGTGG	ACGAATTAAC	GTTCTCTTCT
ACTCACTTGA	AATACGTTGA	TCACGGACAA	GACGCTGAGT	ACGCGATGGA
GGCGCGCAA	CGCCTTGGCT	ATCAAGCCGT	TTCACCGCAT	TCTAAAACAG
ATCCGTTTGA	AAACGTAAAG	AAAAACGAAT	TTAAGAAGTC	TGATGATACA
GAAGAATGAT	ATTGATCAGG	AAAGGAGGAA	GCCTGCATGA	AATTCAAATG

GGACGAATTT	TTCGTA ACTG	GTGACCCATT	AATTCTGGGC	GCACAAGTTT
CCATTGCGCT	TTCAACCATT	GCCATTATTT	TTGTTCTGAC	TTACTTCAAA
AAGTGAAAT	GGCTGTGGTC	TGAATGGATA	ACTACTGTTG	ACCATAAAAA
ACTCGGAATC	ATGTATATTA	TATCTGCTGT	AATTATGTTA	TTCCGTGGCG
GTGTCGACGG	TCTGATGATG	CGTGCCCAGC	TAGCGCTTCC	GAATAACAGT
TTTTTAGACT	CAAACCACTA	TAATGAAATT	TTTACAACCTC	ACGGTACAAT
CATGATCATC	TTCATGGCGA	TGCCGTTCTT	AATCGGTCTT	ATCAACGTTG
TTGTGCCTCT	TCAAATCGGT	GCCC GCGACG	TTGCGTTCCC	TTACTTGAAC
AACCTGAGCT	TCTGGACGTT	CTTTGTAGGG	GCGATGCTTT	TCAATATTTT
TTTCGTTATC	GGAGGTTCTC	CGAACGCAGG	CTGGACGAGT	TATATGCCGC
TTGCAAGTAA	CGACATGAGC	CCTGGGCCGG	GTGAGAACTA	CTACCTCCTC
GGACTTCAGA	TTGCCGGTAT	CGGTACCCTG	ATGACAGGGA	TCAACTTTAT
GGTAAACAATC	TTAAAAATGA	GAACAAAAGG	CATGACATTA	ATGCGTATGC
CGATGTTTAC	ATGGACAACA	CTGATCACAA	TGGTTATTAT	CGTGTTTGCG
TTCCCTGTAC	TTACAGTAGC	ATTAGCACTT	TTATCATTTG	ATCGTTTGT
CGGCGCTCAC	TTTTTTCACAT	TGGAAGCAGG	CGGTATGCCG	ATGCTTTGGG
CTAACTTGTT	CTGGATTTGG	GGACATCCTG	AAGTATATAT	CGTTATTCTT
CCGGCGTTTG	GTATTTTCTC	AGAAATCATC	TCAAGCTTTG	CAAGAAAACA
ATTGTTTGGT	TACAAAGCGA	TGGTTGGTTC	TATTATCGCC	ATCTCTGTAT
TGAGTTTCTT	AGTTTGGACT	CACCACTTCT	TCACAATGGG	GAACAGTGCG
TCCGTTAACT	CATTCTTCTC	AATTACGACA	ATGGCAATCT	CAATCCCAAC
CGGGGTAAA	ATCTTTAACT	GGCTCTTTAC	AATGTATAAA	GGCCGAATCA
GCTTTACAAC	ACCTATGCTG	TGGGCGCTTG	CGTTCATTCC	TAACCTCGTT
ATCGGCGGGG	TTACAGGGGT	TATGCTTGCG	ATGGCAGCAG	CGGATTATCA
ATACCATAAT	ACGTACTTCC	TTGTATCTCA	CTTCCACTAT	GTGCTGATTG
CGGGTACTGT	ATTTGCTTGT	TTCGCCGGAT	TTATTTTCTG	GTATCCAAAA
ATGTTCGGCC	ACAAGCTGAA	CGAAAGAATC	GGAAAATGGT	TCTTCTGGAT
CTTTATGATC	GGTTCAATA	TTTGTTCCTT	CCCGCAATAT	TTCTTGGGGC
TTCAAGGCAT	GCCGCGCCGT	ATTTACACAT	ACGGACCGAA	TGACGGCTGG
ACAACATTGA	ACTTTATCTC	AACAGTCGGA	GCTTTCATGA	TGGGTGTAGG
ATTCTTAATC	CTTTGCTATA	ACATCTACTA	CAGCTTCCGT	TACTCTACTC
GTGAAATCAG	CGGAGATTCA	TGGGGTGTGG	GACGTACGCT	TGATTGGGCG
ACTTCTTCTG	CGATTCCGCC	GCATTACAAC	TTTGCGGTGC	TTCTGAAGT
CAAATCTCAA	GATGCATTCC	TGCATATGAA	AGAAGAAAAA	ACTGAATTAT
ACCCTGAAAG	CAAATTCAAG	AAAATCCATA	TGCCAAGCAA	CTCAGGCAGA
CCGTTCTTTA	TGTCTGTTGC	CTTCGGTCTC	GCAGGCTTTG	GACTTGTCTT
TGAATGGTAC	TGGATGGGCG	TAGTCGGATT	GATCGGAGTC	CTGCTCTGCA
TGGTTCTGCG	TTCATTCGAA	TACGACAACG	GCTACTACAT	TAGTGTTGAT
GAAATAAAAG	AGACGGAAAG	AAAGATTTC	GAATAAGGAG	GCGTGAGTTA
TGGAACATGC	AGAACACGGC	AATTCTAACG	CGCCTATGGA	ATATCAATCT
GAAACCGGCA	GACTTAATAT	TCTCGGGTTT	TGGATCTTTT	TAGGGGCAGA
AATTGTGTTG	TTCTCAACAC	TATTTGCAAC	CTTCTTCGTT	CTTAAAAACA
GAACAGCTGG	AGGTGTCTTG	CCAGACGAAC	TATTTGAAGT	CAATCTGGTA
ATGATTATGA	CGTTCTTGCT	GCTGATCAGC	AGCTTTACCT	GCGGGATCGC
TGTTTATGAA	ATGCGCCGCG	GAAGTTTAAA	AGGCGTAGTC	ATTTGGACAA
TTATCACTCT	TCTTCTCGGT	GCCGGCTTCG	TCGGATGCGA	GATCAACGAG
TTTGTTCACT	ATGTACATGA	AGGAGCGGCT	CTCAGTACAA	GTGCGTTCTG
GTCTGGATTC	TTTGTTTAC	TTGGAACCTCA	CGGAACTCAC	GTAACAATCG
GGATTTTCTG	GATCACAGGA	ATTCTGATTC	AGTTGAAGAA	ACGCGGCTTA
ACTCCGCAA	CTTCATCTAA	AATCTTTATC	TCAAGCTTGT	ACTGGCACTT
CTTAGATGTT	GTATGGATTT	TCATCTTTAC	AGGTGTCTAT	CTCATGGGAT

TGGGGGGTCT	GTAAAATGGC	AAACAAATCT	GCTGAACACA	GTCACTTTCC
ATGGAAACAC	ATTGTAGGTT	TTATCCTGTC	TATCGTTTTG	ACCTGCTGG
CTCTATGGGT	TGCAGTGTAT	ACTGACCTGA	GCTCATCAGC	AAAACTTTGG
ATTATCTTCG	GCTTCGCCTT	CATTCAGGCG	GCGCTGCAGC	TTCTCATGTT
CATGCATATG	ACAGAGAGCG	AAAACGGCAC	GATCCAAGTC	GGAAACACGC
TGTTTCGGATT	CTTTGGCGCG	ATCGTTATCG	TACTTGGATC	CATCTGGATT
TTTCGCGGCTC	ACTATCACCA	TGGTGACCAT	ATGGACGGAA	ATCCTCCTGG
AGGCGCTGAA	CACTCAGAGC	ATTCAGGCCA	TAACGAATTA	TACAAGGGCG
AGCTCAAGCT	TGAAGGTAAG	CCTATCCCTA	ACCCTCTCCT	CGGTCTCGAT
TCTACGCGTA	CCGGTCATCA	TCACCATCAC	CATTGAGTTT	GATCCGGCTG
CTAACAAAGC	CCGAAAGGAA	GCTGAG 4177		

3.5.2.2 Seqüència del gen CYD.

1CAGACATAAT AGCTCCAGAT CTGGCTGCCG ATGACGAACG GCAATAGCG
TAATGCTGCA ATTGACATGA CTTTAAGCGA ATAATCTCCA GAAGAAGCGT
TAGCTACTGT TAAATCGTAT GCGCTATGAA GCGAGCTGAC CATTACACGA
GGGAATAGGG AAATAAAGAT CATTCCCACG GTCAGCGCCA GACCAGCGCC
TGTCATCCCA AATGTCCAGC CGTCTTTTTT CTTACGAATA AATACAGCCG
CGAGCATAAA GCAGATGACA ATCAAAACAG CGAGCGGAAT GGTAATCTCG
CCGCGGCGTG TAAACATGTC TGTCTGATAC GCAGAAAGGG CCGCGAAGGC
AGAACCCTGCT ACAAAAACAA CACCCATTAT CTTTTGCGCC ATTTTCCGGG
CGCGGTTTTG CAAATCACCA ATCGTACGCA GCGTGATAAA CATTAATCCA
TGCTGGAAGC AAAGAAGCGT TACCGTCACA CCGCCAAGTA TAGAATATAC
ATTGATATAA TCAGATACAT GTGCGTGAAT GTTCATGTCTG GCATCAATCG
GCATCCCGCG GAATAATGTC GTGAACAGCA CACCAAGCAC AAACGGAGGA
ATTAGACTGC CGAAAAAAC GACCCAGTCC CAAACCTTTA CCCATTTTAA
ATGATCCACC TTGCGCGGGA ACTCAAACGC GACCCCGCGG CCCATTAACG
CAAGCAGCAC TATGACAAAC GGAATGTAAT AACCGCTCAG CATCGTTGCA
TACCAGTTTG GGAATGCCGC GAAAATGGCG CCTGCGCCAG TCAAAGCCA
CACTTCATTC GCGTCCCAGA ACGGCCCGAT CGTGTTGATC AGCACTCTGC
GTTCTAATTC ATTATGGCCA AGAAAACGGG TCGCCATGCC GACCCCGAAA
TCAAAGCCTT CCAAAAAGAA GAATCCTACA AACAATACAG CAACGAGTAT
AAACCAAAGA TCATGAAGAG ATGCCATGGT ATACCTCCTG ACTAAATGGA
TCTGTTGATA CAGGCACATC ATGATGATTA TCATGCTCCG CACCTTTTTT
AATCTCACGG ATAAACAAGA AGACAAGCAG GCACCAAGA ATCATGTACA
TCACACCGAA TGCGATGATT GAGAATAACA AGGAACCCGC TGTTACGTTA
GGCGACACAG ATTGAGCGGT TGTCAATTAAC CCCATAACCG TCCAAGGTTG
ACGTCCGATT TCTGTCATAA TCCAGCCCGC GGAGTTTGCA AGAAACGGAA
GGAAATCAAC GCGATCATGA TGCGCAAATA CCATTTGCTG TTTTCAAGCT
TTTTACGGCG GTTTAACCAA AGGCCGCCTA ACGCAGCAAG AATCATGACA
ACACCTGCTC CTACCATGAT GCGGAAGCTC CAGAATGTCTG TTTTCACTGG
CGGAATGTAG TCGCCTTTTC CGTATATTTT TTCGTACTCA GCCTGAAGGG
TTTTTCATCCC TTTGACACTT CCGCTGAATT TCTGATAAGC CAAGTAGCTC
AAGGCATAAG GAACTTTGAT TTCATTTGAG CTTTTTTTCAT TTTTTGTATC
GATCGTCGCA AAAGCGGTCC AAGCAGCAGG GTCACCGCTG TCTTCCCATA
GGCCTTCACT GGCAGCCATT TTCATCGGCT GTGATTCCAT CAAGTGCTCA
GCCTGCATGT GTCCGCTAAG GCCGACGCCA AGACCGGCAC AAAGACCGAC
GATCATTGCG AGTTTAAAG ATTGCTTAAA GAACGGCACT TCTTTTTTCT
TCAGCAGTTT AAAAGCACTC ACTCCGGCAA TAAAGAAAGC TCCAGTGGCA
AGCGCACCGA AAATAACGTG CGGGAATTCA ACCCAAAGCT GAGGGTTTTGT

AATCAACGCG CCAAATCAT TCATTTCCGC GCGGCCGTTT TTGATCGTAA
 AGCCGACCGG CTCCTGCATA AAGGAGTTTG CTGTTAAAAT CCAGAAAGAT
 GACATGATCG TTCCGAATGA TACGAGCCAT ATGCAGAGCG CGTGAATTTT
 CTTCCGGCAGG CGGTCCCAGC CAAAATCCA TAATCCGATA AAAATAGATT
 CCATGAAAAA CGCCAATAAT GCTTCAATCG CAAGCGGAGC GCCAAATACA
 TCTCCGACAA AACGGGAGTA ATCTGACCAG TTCAGTCCAA ACTGGAATTC
 TTGCAAAATC CCCGTTACAA CACCGACTGC GAAATTTATT AAGAATAAGT
 GTCCCCAAAA CTTTGCCATT TTGAGATACA GCTCATTTTT CTTTACAAGA
 TAAAGAGTCT CCATCAACGC AACCATAAAC ACAAGCCCGA TAGACATCGG
 CACAAACAAG AAGTGAAACA ACGTTGTTGA TGCAAATTGT ATGCGGGCTA
 ATACCAATTC ACTCATGCTT TCTCCTCCA2849

3.5.2.3 Seqüència del gen QOXA.

1CCGGTGATGA CGATGACAAG CTGGGAATTG ATCCCTTCAC CGAGAAAAGA
 TTTTGAGGAT GTATGCACTT CAGATTTATT ACATCAATAG GAAGGATGGT
 ATCTTCTTG TTCAGAGCAT TAAAACCGTT GCTTGTATTA GCGCTGTTAA
 CTGTGGTTTT CGTCCTTGGG GGATGCAGCA ATGCTTCAGT ACTAGATCCG
 AAAGGACCTG TAGCTGAACA GCAAAGTGAT TTAATCCTGT TATCTATCGG
 ATTTATGCTG TTTATCGTCG GGGTCGTCTT TGTTCTATTT ACCATTATTT
 TAGTAAAATA CCGCGACCGT AAAGGCAAAG ATAATGGATC TTATAACCCA
 GAAATTCACG GTAACACGTT TTTAGAAGTA GTCTGGACAG TGATCCCAAT
 TTTAATCGTC ATTGCACTTT CTGTGCCAAC AGTACAGACG ATATATTCGT
 TAGAAAAAGC TCCTGAAGCA ACAAAGACA AAGAGCCTCT TGTTGTTTAT
 GCTACTTCGG TAGACTGGAA ATGGGTATTT AGCTACCCTG AACAGGATAT
 TGAAACGGTC AACTACTTAA ACATTCCTGT CGACCGCCCG ATCTTGTTCA
 AAATCTCATC TGCAGATTCA ATGGCTTCGC TATGGATTCC TCAGCTTGGA
 GGGCAAAAAT ATGCGATGGC AGGAATGCTG ATGGATCAAT ACTTACAGGC
 TGACAAAGTG GGTACTTACG AAGGCCGCAA CGCGAACTTC ACAGGTGAAC
 ATTTTGCGAGA CCAAGAGTTT GATGTGAATG CAGTCACAGA AAAAGACTTT
 AACAGCTGGG TGAAAAAGAC TCANANAGAG GCTCCTAAGC TNACAAAAGA
 GAAGTATGAT CCATTGATGC TTCGTGAAAA TGTGGGGAAT TAGCGTTCTC
 TTCTACTCAC TTGAAATGCG TTGATCACGG ACAAGACGCT GAGTACGCGA
 TGGAGGCGCG CAAACGCCTT GGCTATCAAG CCGTTTCTCC GCATTCTAAA
 ACAGATCCGT TTGAAAACGT AAAGAAAAAA GAATTTAAGA AGTCTGATGA
 TACAGAAGAA TGATATTGCT CAGGAAAGGA GGAAGCCTGC AAGGGCGAGC
 TCAAGCTTGA AGGTAAGCCG TATCCCTAAC CCTGTCTCG GTCTCGATTTC
 TACGCGTACC GGTATCATC ACCATCACCA TTGAGTTTGA TCCGGCTGCT
 AACAAAGCCC GAAAGGAA1221

3.5.2.4 Seqüència del gen QOX B.

1CCGGTGATGA CGATGACAAG CTGGGAATTG ATCCCTTCAC CGAGAAAAGA
 TTTTGAGGAT GTATGCACTT CAGATTTATT ACATCAATAG GAAGGATGGT
 GATCTTCTTG TTCAGAGCAT TAAAACCGTT GCTTGTATTA GCGCTGTTAA
 CTGTGGTTTT GCTCCTTGGG GGATGCAGCA ATGCTTCAGT ACTAGATCCG
 AAAGGACCTG TAGCTGAACA GCAAAGTGAT TTAATCCTGT TATCTATCGG
 ATTTATCGTG TTTATCGTCG GGGTCGTCTT TGTTCTATTT ACCATTATTT
 TAGTAAAATA CCGCGACCGT AAAGCGAAAG ATAATGGATC TTATAACCCA
 GAAATTCACG GTAACACGTT TTTAGAAGTA GTCTGGACAG TGATCCCAAT
 TTTAATCGTC ATTGCACTTT CTGTGCCAAC AGTACAGACG ATATATTCGT

TAGAAAAAGC	TCGTGAAGCA	ACAAAAGACA	AAGAGCCTCT	TGTTGTTTAT
GCTACTTCGG	TAGACTGGAA	ATGGGTATTT	AGCTACCCTG	AACAGGATAT
TGAAACGGTC	AACTACTTAA	ACATTCCTGT	CGACCGCCCG	ATCTTGTTCA
AAATCTCATC	TGCAGATTCA	ATGGCTTCGC	TATGGATTCC	TCAGCTTGGA
GGGCAAAAAT	ATGCGATGGC	AGGAATGCTG	ATGGATCAAT	ACTTACAGGC
TGACAAAGTG	GGTACTTACG	AAGGCCGCAA	CGCGAACTTC	ACAGGTGAAC
ATTTTGCAGA	CCAAGAGTTT	GATGTGAATG	CAGTCACAGA	AAAAGACTTT
AACAGCTGGG	TGAAAAAGAC	TCANANAGAG	CGTCCTAAGC	TNACAAAAGA
GAAGTATGAT	CCATTGATGC	TTCGTGAAAA	TGTGGGGAAT	TAGCGTTCTC
TTCTACTCAC	TTGAAATGCG	TTGATCACGG	ACAAGACGCT	GAGTACCGGA
TGGAGGCGGC	CAAACGCCTT	GGCTATCAAG	CCGTTTCTCC	GCATTCTAAA
ACAGATCCGT	TTGAAAACGT	AAAGAAAAAA	GAATTTAAGA	AGTCTGATGA
TACAGAAGAA	TGATATTGCT	CAGGAAAGGA	GGAAGCCTGC	AAGGGCGAGC
TCAAGCTTGA	AGGTAAGCCG	TATCCCTAAC	CCTGTCTCTG	GTCTCGATTG
TACGCGTACC	GGTCATCATC	ACCATCACCA	TTGAGTTTGA	TCCGGCTGCT
AACAAAGCCC	GAAAGGAA1218			

3.5.2.5. Seqüència del gen QOX C.

1CCGGTGATGA	CGATGACAAG	CTGGGAATTG	ATCCCTTCAC	CCCGAATTAG
GAGGCGTGAG	TTATGGAACA	TGCAGAACAC	GGCAATTCTA	ACGCGCCTAT
GGAAATATCAA	TCTGAAACCG	GCAGACTTAA	TATTCTCGGG	TTTTGGATCT
TTTTAGGGGC	AGAAATTGTG	TTGTTCTCAA	CACTATTTGC	AACCTTCTTC
GTTCTTAAAA	ACAGAACAGC	TGGAGGTGTC	TTGCCAGACG	AACTATTTGA
AGTCAATCTG	GTAATGATTA	TGACGTTCTT	GCTGCTGATC	AGCAGCTTTA
CCTGCGGGAT	CGCTGTTTCA	GAAATGCGCC	GCGGAAGTTT	AAAAGGCGTA
GTCATTTGGA	CAATTATCAC	TCTTCTTCTC	GGTGCCGGCT	TCGTCCGATG
CGAGATCAAC	GAGTTTGTTC	ACTATGTACA	TGAAGGAGCG	GCTCTCAGTA
CAAGTGCGTT	CTGGTCTGGA	TTCTTTGTTT	TACTTGGAAC	TCACGGAAC
CACGTAACAA	TCGGGATTTT	CTGGATCACA	GGAATTCTGA	TTCAGTTGAA
GAAACGCGGC	TTAACTCCGC	AAACTTCATC	TAAAATCTTT	ATCTCAAGCT
TGTACTGGCA	CTTCTTAGAT	GTTGTATGGA	TTTTCATCTT	TACAGGTGTC
TATCTCATGG	GATTGGGGGG	TCTGTTAAAA	GGCAAACAAA	TCAAGGGCGA
GCTCAAGCTT	GAAGGTAAGC	CTATCCCTAA	CCCTCTCCTC	GGTCTCGATT
CTACGCGTAC	CGGTCATCAT	CACCATCACC	ATTGAGTTTG	ATCCGGCTGC
TAACAAAGCC	CGAAAGGAAG	CTGAGTTGGC	T832	

3.5.2.6 Seqüència del gen QOX D.

1TGGATCCGGT	GATGACGATG	ACAAGCTGGG	AATTGATCCC	TTCACCTGGG
ATTGGGGGGT	CTGTAAAATG	GCAAACAAAT	CTGCTGAACA	CAGTCACTTT
CCATGGAAC	ACATTGTAGG	TTTTATCCTG	TCTATCGTTT	TGACCCTGCT
GGCTCTATGG	GTTGCAGTGT	ATACTGACCT	GAGCTCATCA	GCAAACTTT
GGATTATCTT	CGGCTTCGCC	TTCATTTCAGG	CGGCGCTGCA	GCTTCTCATG
TTCATGCATA	TGACAGAGAG	CGAAAACGGC	ACGATCCAAG	TCGGAAACAC
GCTGTTCCGA	TTCTTTGGCG	CGATCGTTAT	CGTACTTGGA	TCCATCTGGA
TTTTTCGCGC	TCACTATCAC	CATGGTGACC	ATATGGACGG	AAATCCTCCT

GGAGGCGCTG AACACTCAGA GCATTCAGGC CATAACGAAT TATACAAGGG
 CGAGCTCAAG CTTGAAGGTA AGCCTATCCC TAACCCTCTC CTCGGTCTCG
 ATTCTACGCG TACCGGTCAT CATCACCATC ACCATTGAGT TTGATCCGGC
 TGCTAACAAA GCCCGAAAGG AAGCTGAGTT GGCT585

3.5.2.7. Seqüència del gen CYD A.

1TCCGGTGATG ACGATGACAA GCTGGGAATT GATCCCTTCA CCGAAATGGC
 TGACGCGCTT CCGGAAGACA TAATAGCTCC AGATCTGGCT GCCGATGACG
 AACGGCAATA GCGTTAATGC TGCAATTGAC ATGACTTTAA GCGAATAATC
 TCCAGAAGAA GCGTTAGCTA CTGTTAAATC GTATGCGCTA TGAAGCGAGC
 TGACCATTAC ACGAGGGAAT AGGGAAATAA AGATCATTCC CACGGTCAGC
 GCCAGACCAG CGCCTGTCTAT CCCAAATGTC CAGCCGTCTT TTTTCTTACG
 AATAAATACA GCCGCGAGCA TAAAGCAGAT GACAATCAAA ACAGCGAGCG
 GAATGGTAAT CTCGCCGCGG CGTGTAACA TGTCTGTCTG ATACGCAGAA
 AGGGCCGCGA AGGCAAGAAC CGCTACAAA ACAACACCCA TTATCTTTTG
 CGCCATTTTC CGGGCGCGGT TTTGCAAATC ACCAATCGTA CGCAGCGTGA
 TAAACATTAA TCCATGCTGG AAGCAAAGAA GCGTTACCGT CACACCGCCA
 AGTATAGAAT ATACATTGAT ATAATCAGAT ACATGTGCGT GAATGTTCAT
 GTCGGCATCA ATCGGCATCC CGCGGAATAA TGTCGTGAAC AGCACACCAA
 GCACAAACGG AGGAATTAGA CTGCCGAAAA AAACGACCCA GTCCCAAACC
 TTTACCCATT TTAAATGATC CACCTTGCCG CGGAACTCAA ACGCGACCCC
 GCGGCCATT AACGCAAGCA GCACTATGAC AAACGGAATG TAATAACCGC
 TCAGCATCGT TGCATACCAG TTTGGGAATG CCGCGAAAAT GGCGCCTGCG
 CCAGTCAAAA GCCACACTTC ATTCGCGTCC CAGAACGGCC CGATCGTGTT
 GATCAGCACT CTGCGTTCTA ATTCATTATG GCCAAGGAAA CGGGTCGCCA
 TGCCGACCCC GAAATCAAAG CCTTCCAAAA AGAAGAATCC TACAAACAAT
 ACAGCAACGA GTATAAACCA AAGATCATGA AGAGATGCCA TGGTATACCT
 CCTGACTTAA TGGATCTGTT GAAGGGCGAG CTCAAGCTTG AAGGTAAGCC
 TATCCCTAAC CCTCTCCTCG GTCTCGATTC TACGCGTACC GGTTCATCATC
 ACCATCACCA TTGAGTTTGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC
 TGAGTTG1208

Les 7 seqüències presentades es van determinar com a correctes mitjançant una comparació de seqüències, entre el resultat obtingut i les seqüències dipositades en el Genbank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/) corresponents als gens que es desitjaven clonar. La comparació es va realitzar mitjançant el programa d'alineament de seqüències de DNA Clustal. L'única excepció va ser l'insert corresponent al gen CYDB el qual no va ser suficientment homòleg respecte de la seqüència publicada, fet que va avortar el treball amb aquest clon.

3.5.3 Expressió de proteïnes recombinants en *E.coli* BL21.

L'expressió dels diferents gens es va realitzar segons 2.5.5. Només va ser òptima per a la proteïna QOX. El nivell d'expressió de la resta de proteïnes estudiades, corresponents als gens QOX A, B, C, D, CYD, CYD A i B, no va ser suficientment elevada, així que els esforços es van centrar en l'expressió del gen QOX i purificació de la proteïna

corresponent. A la figura 3.5.3.1 es mostra la sobreexpressió (2.5.5) d'aquesta en una electroforesis realitzada segons 2.5.7.3.1.

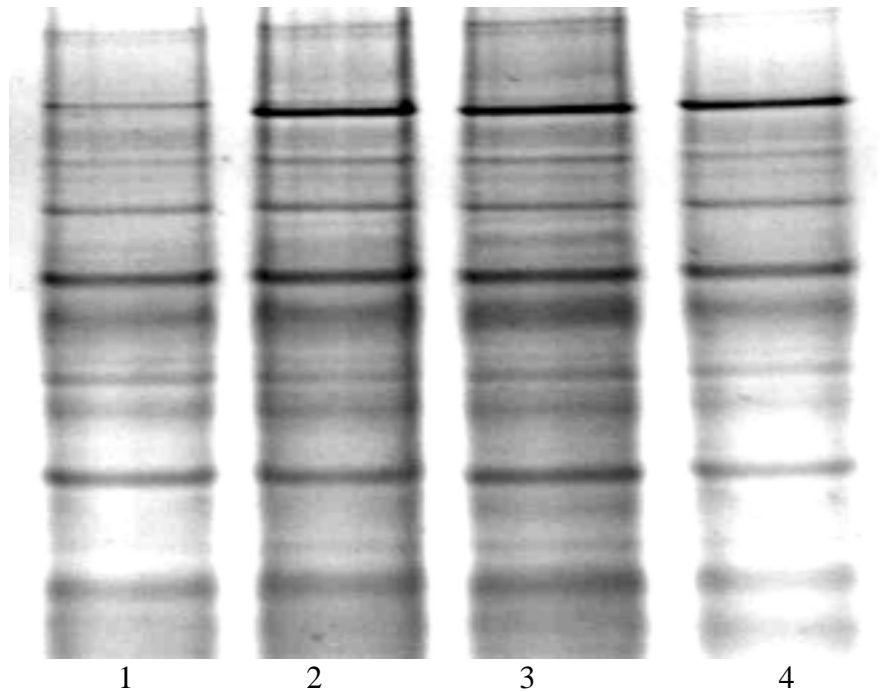


Figura 3.5.3.1 Electroforesis segons 2.5.3.7.1 de la sobreexpressió de Qox
Carril1: Cultiu no induït
Carril2: Cultiu induït amb 100µg/ml IPTG
Carril3: Cultiu induït amb 150µg/ml IPTG
Carril4: Cultiu induït amb 200µg/ml IPTG

En l'assaig de sobreexpressió s'observa una clara diferència en quantitat de proteïna entre el cultiu no induït i les induccions entre 100 i 200µg/ml de IPTG.

3.5.4. Purificació de la proteïna citocrom aa3-600quinoloxidasa per cromatografia d'afinitat.

La purificació de la proteïna citocrom aa3-600quinoloxidasa es va realitzar segons 2.5.7. i es va observar el resultat pelectroforesis segons 2.5.3.7.1.(Figura 3.5.4.1). S'observa una bona purificació al comparar la fracció total soluble (carril 1) amb la resta de carrils (2-5), corresponents a un rentat de la columna de purificació (carril 2) i les tres el.lucions (carrils 3, 4, 5). .

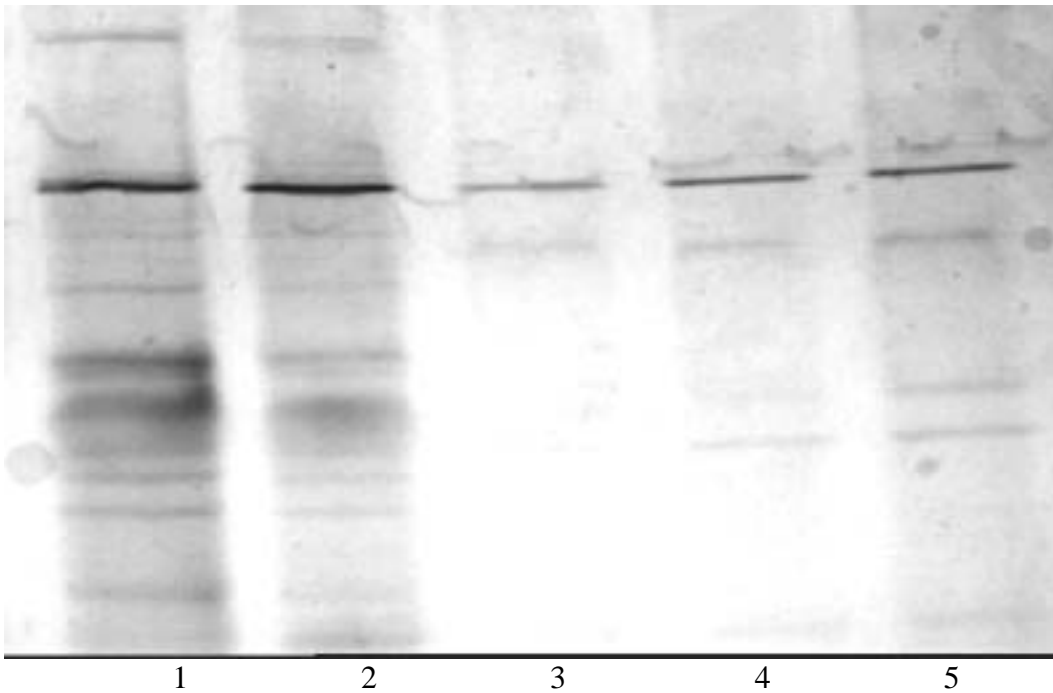


Figura 3.5.4.1 Electroforesis segons 2.5.3.7.1 de la Purificació per Cromatografia d'Afinitat
Carril1:Cèl.lules sobreexpressades
Carril2:Rentat de la columna
Carril3:Primera fracció el.lució
Carril4:Segona fracció el.lució
Carril5:Tercera fracció el.lució

3.5.5 Identificació de la proteïna recombinant per Westernblott.

La detecció de la proteïna recombinant es va realitzar segons 2.5.6. A la figura 3.5.5.1 es visualitza el resultat, en què es veu clarament la detecció de la proteïna estudiada en els carrils 6 i 7 (d'aproximadament 160kDa), així com el control en el carril 1 (d'aproximadament 135kDa).



Figura 3.5.5.1. Detecció de la proteïna recombinant Qox per Western
Carril: Proteïna fusió lacz de 135kDa aprox
Carrils 2-5: Rentats de la purificació
Carrils 6-7: Proteïna de fusió Qox de 160Kda aprox

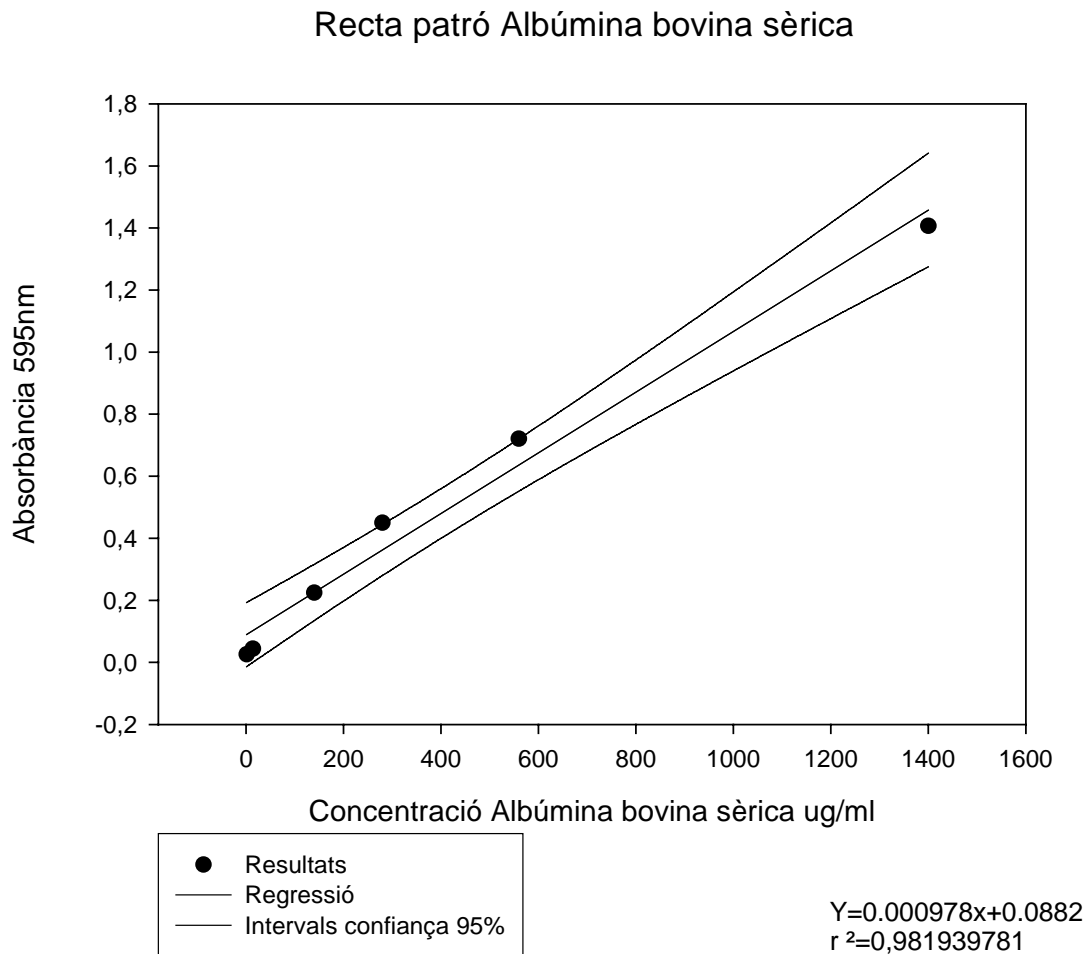
3.5.6 Quantificació Proteïna citocrom aa3-600quinoloxidasa purificada.

La quantificació es va fer pel mètode 2.5.3.8. Els resultats de la recta patró obtinguda són acceptables des del punt de vista estadístic, obtenintse un resultat de regressió de més del 98%. El rendiment obtingut de proteïna purificada va ser de 20,3 miligrams per litre de cultiu. A la taula 3.5.6.1 i figura 3.5.6.2 es veuen els resultats obtinguts.

Taula 3.5.6.1.

Concentració Patró Albúmina bovina sèrica($\mu\text{g/ml}$)	Absorbància 595nm
1.4	0.026
14	0.044
140	0.225
280	0.450
560	0.721
1400	1.407
Mostra	0.212

Figura 3.5.6.2. Recta patró d'Albúmina bovina sèrica.



Càlcul de concentració de citocrom aa3-600quinoloxidasa:

Fórmula acceptada: **absorbància= 0,000978 concentració de proteïna + 0,882**

Càlcul de quantitat de proteïna obtinguda: **0,212=0.000978x+0,882 x=127µg/ml**

Càlcul de quantitat de proteïna obtinguda en un cultiu de 50 ml: **127µg/ml x 8ml de diluïent=1.016mg.**

Càlcul per a 1 litre de cultiu: **1.016mg x 20=20.3mg proteïna per litre de cultiu.**

3.5.7 Producció de menadiona amb *E.coli* recombinant.

3.5.7.1. Producció amb 2-metil-1-naftol com a substrate.

La producció de menadiona desde 2-metil-1-naftol amb cèl.lules senceres i trencades d' *E.coli* recombinant sobreexpressada segons 2.5.5, amb i sense hexadecà es veuen a la taula 3.5.7.1.1, obtenintse els millors resultats amb cèl.lules senceres sense hexadecà, encara que en les mateixes condicions amb hexadecà el resultat va ser similar.

Taula 3.5.7.1.1.

Soca	Cèl.lules	hexadecà	2-metil-1-naftol (concentració inicial)	Producció 2dies	Producció 5dies	Producció 10dies
<i>E.coli</i> recombinant	Senceres	No	25mg/l	16,5 mg	25 mg	25 mg
	Trencades	No	25mg/l	6 mg	25 mg	25 mg
	Senceres	Sí	25mg/l	15,8 mg	25 mg	25 mg
	Trencades	Sí	25mg/l	8 mg	25 mg	25 mg

3.5.7.2 Producció amb 2-metilnaftalè com a substrate

La producció de menadiona des de 2-metilnaftalè amb cèl.lules senceres i trencades d' *E.coli* recombinant sobreexpressada segons 2.5.5, amb i sense hexadecà es veuen a la taula 3.5.7.2.1. No es va poder obtenir menadiona en cap de les condicions assajades.

Taula 3.5.7.2.1.

Soca	Cèl.lules	hexadecà	2-metilnaftalè (concentració inicial)	Producció 2dies	Producció 5dies	Producció 10dies
<i>E.coli</i> recombinant	Senceres	No	25mg/l	-	-	-
	Trencades	No	25mg/l	-	-	-
	Senceres	Sí	25mg/l	-	-	-
	Trencades	Sí	25mg/l	-	-	-

4. DISCUSSIÓ

4.1. Ús, producció i necessitats de vitamina K3.

4.1.1. Ús de vitamines desde el punt de vista terapèutic i profilàctic

Les vitamines són compostos químics essencials per al bon funcionament del nostre organisme ja que intervenen en nombrosos processos metabòlics com a cofactors de gran varietat d'enzims. Aquestes estructures biològicament actives no es poden biosintetitzar al nostre cos, per tant és necessari ingerirles per la dieta, de manera que en casos de dieta desequilibrada, ingesta de compostos antagonistes de les vitamines, o bé situacions diverses que provoquin una disminució en el nivell normal de concentració de vitamines, es pot arribar a estats de carència que poden portar a estats de deficiència i nombroses malalties, com la ceguesa, problemes circulatoris, demència, depressió, trastorns alimentaris, problemes dermatològics i capil.lars, fatiga, susceptibilitat a agents infecciosos, anèmia, malabsorció de greixos, osteoporosis i problemes de coagulació sanguínia entre d'altres (5).

En situacions de carència que portin a un estat de deficiència cal una aportació extra de vitamines mitjançant complexos vitamínics, com a medicaments o productes dietètics, per a solucionar els problemes existents i restablir les condicions normals, tot i que també cal esmentar el possible ús profilàctic de complexos vitamínics per a prevenir estats de carència en individus susceptibles o individus que pateixen molt desgast i necessiten un aport extra de vitamines.

La vitamina estudiada en el present treball ha estat la vitamina K, en concret la K3 o també anomenada menadiona.

Les deficiències en els nivells de vitamina K tant en humans com en animals es poden produir degut a una baixa ingesta d'aquesta, disminuintse els nivells de vitamina K1. També es poden deure a problemes amb la microbiota intestinal que és responsable de la cèssió de vitamina K2, o bé es pot deure a la ingestió de compostos antagonistes com poden ser compostos cumarínics o similars. Aquestes situacions poden provocar problemes a dos grans nivells, a nivell ossi i de coagulació. L'efecte de la carència de vitamina K té un efecte en l'os que té a veure amb la mobilització del calci de l'os, produintse una debilitació d'aquest i per tant un risc d'osteoporosis (9). L'efecte de la deficiència a nivell de coagulació té a veure amb la inhibició de la cascada de reaccions que comporten la formació de coàguls, i per tant provocar problemes de sangrat excessiu (9).

Així doncs en aquests casos caldrà suplir la deficiència amb productes que aportin la vitamina, tot i que cal esmentar que també és recomanable l'ús de complexos vitamínics amb un objectiu profilàctic per a prevenir els problemes esmentats anteriorment.

En el cas dels animals de granja, la vitamina K també s'administra en forma de vitamina K3, però en aquest cas es sol administrar dins dels pinsos de forma regular per a evitar possibles problemes de coagulació, en forma de complexos multivitamínics que permeten evitar deficiències de qualsevol tipus (42).

4.1.2. La vitamina K3 en la indústria químico-farmacèutica

La vitamina K és un compost present en nombrosos productes per a ús humà, principalment en la forma de vitamina K3, tot i que hi ha diversos productes que tenen com a principi actiu la vitamina K1, K2 o K4. També forma part de nombrosos additius per a pinsos alimentaris. La producció mundial de vitamina K3 es troba al voltant de 3-4 tones per any, que a un preu de venda superior als 1.500 dòlars/kg, genera un mercat d'entre 4,5 i 6 milions de dòlars anuals.

Tot i que el valor afegit de la menadiona no és estratosfèric al compararse amb nombrosos principis actius, cal destacar-ne la quantitat produïda i per tant el volum econòmic que es genera és prou important com per tenir en compte que qualsevol millora en el procés de síntesis i purificació del producte pot comportar un benefici molt important, tant a nivell econòmic com a nivell mediambiental, ja que ens trobem davant un procediment altament contaminant.

El preu de la menadiona sintetitzada per un procés químic està compost per diversos factors, com són els reactius, els dissolvents, el cost energètic de la reacció, l'extracció i purificació del producte, el manteniment de les condicions de seguretat i la gestió de residus, de manera que si s'aconsegueix reduir el cost d'algun d'aquests factors el marge de millora econòmica pot ser important.

Des del punt de vista mediambiental, el procés productiu actual és poc respectuós amb el medi, de manera que la utilització dels agents cromats responsables de l'oxidació i la utilització del solvent de la reacció com és l'àcid sulfúric, provoca la formació de residus de crom trivalent en quantitats estequiomètriques, en grans volums d'aigües àcides altament contaminants. La solució d'aquests dos problemes permetria obtenir un procediment respectuós amb el medi ambient alhora que permetria minimitzar els costos de gestió de residus i per tant obtenir un major benefici en la producció.

Tot i així, mentre la legislació no penalitzi d'una forma més severa les empreses que realitzin processos tant contaminants com aquest, serà un cost no massa elevat dins dels

costs del producte final. En el cas que les penalitzacions fossin majors, i aquestes fossin a nivell global a tot el món, altres procediments alternatius que no es poden industrialitzar per problemes econòmics potser tindrien una major possibilitat d'implantació industrial.

Així doncs, només un procediment alternatiu que sigui respectuós amb el medi ambient, però que tingui una productivitat almenys similar al procés clàssic, factor limitant en els processos biotecnològics que es desitgen implantar, obriran la porta a la possibilitat de deixar de banda el procés actualment emprat.

4.1.3. Problemes de les rutes de producció química tradicionals i alternatives

La producció química actual de la vitamina K3 a nivell industrial es realitza segons un procés base descrit fa més de 50 anys, sobre el qual s'han realitzat petites variacions per a la seva adequació als sistemes moderns de producció, amb l'objectiu de millorar lleugerament els rendiments de la reacció, els processos de recuperació del producte desitjat, la seguretat del procediment i la minimització de residus produïts en aquest procediment (8). Tot i així, és evident que la reacció que utilitza un agent oxidant com el dicromat sòdic en un solvent com és l'àcid sulfúric, presenta una llarga llista de problemes a nivell ambiental, de seguretat i inclús de la química de la reacció en sí mateixa. Des d'un punt de vista modern aquesta reacció, així com el seu procés de recuperació de producte, és un procés caracteritzat com a brut i dolent, però que degut a que no han existit alternatives químiques viables que solucionessin tots els problemes observats en aquesta reacció, el mètode del dicromat sòdic en àcid sulfúric continua essent l'escollit per a la preparació de la menadiona.

Un nou procés que permetés una alternativa a aquest procediment hauria d'intentar solucionar els diferents problemes existents en la síntesi actual d'una forma clara. El primer factor determinant és la consecució d'un mètode que sigui 100% selectiu per al que fa a la no producció d'isòmers de la menadiona, realitzant una oxidació selectiva en les posicions 1 i 4 de l'anell del 2-metilnaftalè. El segon factor és aconseguir un percentatge de transformació comparable o superior al procés establert per a poder ésser competitiu amb aquest. El tercer factor important és la substitució del solvent de reacció per un altre que sigui més benigne per al medi ambient i menys perillós que l'àcid sulfúric, com podria ser l'aigua. El quart factor seria obtenir una reacció catalítica i no estequiomètrica per a minimitzar la producció de residus i poder reutilitzar el component químic o biològic que catalitza la reacció. El cinquè factor seria eliminar els agents oxidants derivats del crom per components més respectuosos amb el medi

ambient. El sisè factor seria realitzar la reacció en unes condicions suaus, eliminar compostos perillosos pels treballadors com és la piridina (8), amb l'objectiu de minimitzar la perillositat de la reacció.

La conjunció d'aquests factors, junt amb consideracions com obtenir una reacció en un temps reduït i una gran productivitat sense ocupar grans extensions de reactors, podria portar a una reacció que substituís el mètode actual.

Els processos químics alternatius han aportat diferents millores al procediment clàssic, substituint-se els solvents de les reaccions com pot ser l'àcid acètic (12), la substitució dels agents cromats per a l'oxidació per altres compostos més benignes com pot ser l'aigua oxigenada (12), la utilització de catalitzadors com el metiltioxoreni per evitar reaccions estequiomètriques (2), inclús s'han aconseguit eliminar compostos perillosos per a l'home i treballar en condicions suaus que permeten reduir costos i baixar el risc d'accidents, però tots els processos químics alternatius han topat amb el factor de la selectivitat, produint-se 6-metil-1,4-naftoquinona, isòmer de la menadiona en tots els casos, aconseguint baixes productivitats o problemes de costos de reactius i d'escalat que han fet avortar tota mena de processos químics alternatius (1).

Un cop vistes les limitacions del procediment actual i que els processos alternatius no s'han pogut desenvolupar per diferents problemes, l'única opció possible sembla ser la de la biotecnologia que inherentment comporta la millora de gran part dels factors que es necessiten millorar en aquesta reacció.

Concretament s'ha descrit un procés biotecnològic de síntesis de menadiona que utilitza el microorganisme *Rhodococcus*, procés que no s'ha pogut industrialitzar i que es descriu en el punt 4.2. de la discussió.

En el nostre treball s'han descrit nous processos alternatius de síntesis de menadiona en els que intervenen microorganismes com *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* biotip I, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodococcus sp.* i *Pseudomonas cepacea*, que permeten la síntesi de menadiona utilitzant tant el substrat 2-metilnaftalè com el 2-metil-1-naftol en unes condicions definides i que es detallen posteriorment.

4.2. La producció biotecnològica de la vitamina K3.

4.2.1. Necessitat de pensar en rutes alternatives biotecnològiques.

Els processos químics de síntesis de menadiona són processos molt evolucionats pel que fa a rendiment, ja que fa anys que s'està treballant amb aquests procediments, però aquests no tenen massa marge de millora mentre s'utilitzin industrialment reaccions estequiomètriques. La millora ha de venir des del punt de vista de la catàlisi, tant catàlisi química, amb el desenvolupament de nous catalitzadors i la millora dels procediments que ja existeixen, com la biocatalisi.

Actualment sembla no existir cap procediment químic alternatiu que pugui competir amb el procediment ja establert, de manera que un camp interessant a explorar és el de la biotecnologia. La Biotecnologia sembla donar esperances per solucionar els problemes existents en els processos tradicionals, ja que al ser un camp menys explorat hi ha un gran marge de treball per a optimitzar els procediments. Tot i així la biotecnologia aplicada a aquesta reacció, com totes les reaccions biotecnològiques que competeixen amb processos químics ben establerts i desenvolupats amb els anys, té les de perdre, ja que probablement els resultats de rendiment no podran ser comparables degut al baix rendiment esperable de les reaccions biotecnològiques a l'inici de l'estudi de la reacció.

Un altre punt limitant per al que fa a la Biotecnologia per a la seva aplicació en aquesta reacció és que es tracta d'una oxidació, per tant els enzims involucrats en aquestes reaccions han de ser monoxigenases o dioxigenases, enzims que de forma aïllada necessiten cofactors com el NADH, d'elevat cost econòmic, per al seu funcionament, factor que fa intuir que la reacció s'haurà de realitzar amb cèl·lules senceres i no amb fraccions purificades d'aquestes que continguin el biocatalitzador, tot i que existeixen mètodes de reciclatge de NADH, fet que limita les opcions d'enginyeria per a realitzar un procés industrial. També hi ha un altre factor important que qüestiona l'ús d'enzims d'oxidoreducció per a reaccions biotecnològiques, i és la seva possible no selectivitat davant certs substractes o davant el mateix substracte en diferents condicions ambientals.

De totes maneres hi ha avantatges clares en el camp de la Biotecnologia que permeten apostar d'una forma decidida pel seu desenvolupament, com són la selectivitat d'acció dels enzims, les condicions suaus de reacció, la substitució de solvents orgànics per aigua com a dissolvent en les reaccions, la disminució de la perillositat en el treball, la

menor contaminació ambiental i la realització de reaccions catalítiques i no estequiomètriques.

Tots aquests factors poden ajudar de forma clau en la millora de la reacció d'oxidació del 2-metilnaftalè a menadiona, ja que podrien solventar els problemes esmentats.

4.2.2. Descripció de rutes alternatives Biotecnològiques

En un estudi realitzat durant la passada dècada (45) es va descriure un mètode alternatiu a la síntesi tradicional que comporta l'ús del microorganisme *Rhodococcus*, que sembla solucionar la major part del problema de la síntesi tradicional. Aquest procediment soluciona els problemes de selectivitat, respecte a l'isòmer de la menadiona, actua com a catalitzador de la reacció, la reacció es realitza en aigua, s'eliminen compostos tòxics i perillosos i es realitza la reacció en condicions suaus. Aquest procés però té unes certes limitacions de productivitat, el creixement del microorganisme és lent i es realitza una reacció competitiva acumulant-se àcid 2-metilnaftoic en grans quantitats, que s'intenta minimitzar amb compostos cars que augmenten el cost de la reacció, alhora que inhibeixen també la síntesi de la menadiona, factors que no han permès la industrialització d'aquest procediment.

Aquest procediment descrit sembla ser similar al procés realitzat amb els microorganismes descrits en aquest treball al realitzar l'oxidació amb el 2-metilnaftalè, tenint en compte la selectivitat sobre la no producció de 6-metil-1,4-naftoquinona, la realització de reaccions en aigua i condicions suaus, així com la mínima perillositat i toxicitat dels productes utilitzats per a l'home i el medi ambient.

Tot i així cal destacar les diferències existents entre els dos procediments, ja que els microorganismes *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip, microorganismes amb els que s'han obtingut millors resultats en el present treball, tenen un creixement molt més ràpid, d'unes 8 hores, al compararse amb *Rhodococcus*, d'aproximadament 5 dies fet que facilita molt més l'ús a nivell industrial (45).

Una altra avantatge és que els microorganismes *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip són molt més coneguts a nivell metabòlic i mol.lecular, fet que permet un major marge de millora per al que fa a disseny de medis de cultiu, estudis mol.leculars i enzimàtics.

El procediment de preparació de menadiona amb *Bacillus subtilis* permet la quasi eliminació de la ruta alternativa d'oxidació en el metil, factor que en la reacció amb *Rhodococcus* s'ha de controlar amb additius inhibidors d'aquesta reacció competitiva que limiten també la producció de menadiona (45).

També cal destacar que amb *Rhodococcus* no s'ha estudiat l'activitat enfront el 2-metil-1-naftol, substrate amb el qual s'obtenen els millors resultats amb les soques *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip I.

Cal destacar, però, que la productivitat del procediment amb *Rhodococcus* és major que amb les soques *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip I, probablement ja que l'estudi amb *Rhodococcus* va arribar a un grau de desenvolupament més elevat, utilitzant-se bioreactors que permeten obtenir densitats de cultiu molt més elevades, aireació forçada i el control de diversos paràmetres que de ben segur permetran augmentar el rendiment de la reacció realitzada amb els microorganismes *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* biotip I en un futur pròxim.

4.2.3. Fonament enzimàtic de la producció de menadiona.

Al tractarse d'una reacció d'oxidació els enzims involucrats en una oxidació del 2-metilnaftalè a menadiona han de ser obligatòriament del tipus oxido-reductases, i concretament monooxigenases o dioxigenases, que permetin introduir oxigen en les posicions 1 i 4 de la mol.lècula inicial de 2MNF fins a l'obtenció de grups cetona en les posicions esmentades.

Des d'un inici l'estudi es va centrar en el metabolisme del gènere *Bacillus*, i principalment en *Bacillus subtilis*, ja que és l'espècie més coneguda del gènere tant a nivell fenotípic com genotípic. El sistema respiratori de *Bacillus subtilis* (descriu en la figura 1.2.6.2.1) consta de 4 oxidases terminals diferents, predominant l'expressió i activitat de la citocrom aa₃ quinol oxidasa, corresponent al gen QOX en la major part de les fases de creixement, principalment en la fase exponencial i no tant en l'estacionària. Aquest enzim utilitza menaquinol (vitamina K₂ dihidroxilada) com un intermediari de transport d'electrons, de manera que quan aquest intermediari és oxidat passa a menaquinona. Una altra oxidasa terminal de la cadena de transport d'electrons és la citocrom bd quinol oxidasa, corresponent al gen CYD que també utilitza el menaquinol com a intermediari de transport d'electrons, tot i que el nivell d'expressió i activitat en el creixement de *Bacillus subtilis* no és tan elevat com el de la citocrom aa₃ quinol oxidasa (QOX).

En estudis d'activitat enzimàtica s'ha descrit que la citocrom aa₃ quinol oxidasa té elevada activitat enfront de diferents estructures químiques que contenen quinols, i de forma interessant s'havia estudiat l'activitat respiratòria d'aquesta proteïna enfront el menadiol (vitamina K₃ dihidroxilada o vitamina K₄), que és un intermediari de la síntesi de la menadiona, de manera que aquest enzim semblava tenir les característiques

adequades per a intervenir en la producció de menadiona partint d'un substrat com és el 2-metilnaftalè, mentre que la possible activitat de la citocrom bd quinol oxidasa es presentava com una incògnita degut a que és un enzim menys estudiat fins a l'actualitat (49).

4.2.4. Descripció dels microorganismes que presenten sistemes enzimàtics similars.

Les menaquinones són mol.lècules que intervenen com a intermediaris d'oxido-reducció en la cadena de transport d'electrons de nombrosos microorganismes, englobant grups i famílies de microorganismes tant diversos com poden ser una enterobactèria com un bacil grampositiu (14). Tot i així el grup de microorganismes en què aquesta mol.lècula té un paper més important és el dels bacils grampositius, i entre ells el microorganisme més ben conegut és el *Bacillus subtilis* 168 (15). Ens hem centrat en aquest microorganisme i concretament en els enzims que tenen activitat oxidativa enfront el menaquinol, la mol.lècula reduïda de la menaquinona. La menaquinol oxidasa, o citocrom aa3600 quinol oxidasa, és la proteïna que té una major activitat enfront el menaquinol, per tant aquest va ser l'enzim escollit per al desenvolupament del projecte. Es va realitzar una cerca dels diferents microorganismes que presenten enzims similars a aquest, segons el grau d'homologia del gen, i es va obtenir que microorganismes com *Rhodococcus*, *Mesorhizobium loti* i *Paracoccus denitrificans* tenien proteïnes molt similars tot i que no s'havien fet estudis d'activitat d'aquestes proteïnes enfront substractes interessants per a la síntesi de menadiona (52). Curiosament, però, apareix *Rhodococcus*, microorganisme que s'havia descrit anteriorment com un productor de menadiona a partir del 2-MNF.

Així doncs els microorganismes designats per al treball amb soques de col.lecció varen ser *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus*, *Mesorhizobium loti* i *Paracoccus denitrificans*.

En els assaigs de screening de l'activitat enfront del 2-MNF, aquests microorganismes es varen mostrar com a productors de menadiona en tots els casos excepte per a *Mesorhizobium loti*, fet que el va descartar per a seguir treballant amb ell en l'estudi. Cal destacar doncs que tres de les quatre espècies escollides es varen mostrar com a productores de menadiona, punt 3.1.2.3.3 , fet que ajuda a pensar en l'activitat de la menaquinol oxidasa en aquesta reacció.

El total dels 100 d'aïllats microbians de l'ambient i del producte de partida, corresponents als gèneres *Bacillus* i *Pseudomonas*, varen ser estudiats mitjançant screenings descrits en el punt 2.5.1.1., fent servir 2-MNF com a producte de partida, mostrant uns resultats satisfactoris al poderse obtenir dues soques salvatges com a

productores de menadiona, que corresponen a les soques B-39 i B-48. Sorprenentment, aquestes dues soques es van aïllar del substrat de partida de la reacció, el 2-MNF, mentre que dels microorganismes aïllats de l'aire i el sòl no es va obtenir cap resultat positiu.

Encara que el screening es va fonamentar en proves analítiques qualitatives, 2.5.3, es va poder observar que la soca que produïa major quantitat de menadiona, tant per les soques salvatges (B-39 i B-48), com per les de col·lecció estudiades, en les condicions assajades era la corresponent a la denominació B-48. Per tant, el desenvolupament de l'estudi es va centrar en aquesta soca, principalment.

Un factor determinant per a poder valorar l'aplicabilitat de la reacció biotecnològica de síntesis de menadiona, és la determinació de la selectivitat de la reacció, ja que és necessari obtenir un procés 100% selectiu en l'oxidació en posicions 1 i 4 de l'anell de naftalè, ja que si es forma l'isòmer de la menadiona, la 6-metil-1,4-naftoquinona, no s'obté l'avantatge necessari respecte als mètodes químics clàssics i alternatius, que produeixen els dos isòmers com s'ha explicat anteriorment.

Aquesta selectivitat del 100% es va demostrar mitjançant un estudi acurat que incloïa la síntesi del patró 6-metil-1,4-naftoquinona, aconseguint unes condicions analítiques que permetessin diferenciar els dos compostos. Els dos productes no són diferenciables per espectrometria de masses ja que en el trencament de la mol·lècula s'obtenen els mateixos ions. Utilitzant un escombrat per espectrofotometria a l'ultraviolat no són diferenciables d'una manera concluent i tampoc per espectrofotometria d'infraroig, així doncs el mètode escollit per a la diferenciació dels isòmers va ser el de la separació d'una barreja dels dos productes per HPLC i diferenciació/identificació dels dos isòmers mitjançant el temps de retenció. Finalment es va poder determinar que la mostra de B-48 contenia menadiona al 100% ja que al dopar la mostra amb patró de menadiona, l'alçada del pic sospitós de menadiona va augmentar d'intensitat de senyal, mentre que al dopar la mostra amb la 6-metil-1,4-naftoquinona s'aconseguien separar els pics cromatogràficament i identificarlos pel diferent temps de retenció, és a dir, es va aconseguir un mètode analític que va permetre diferenciar les dues estructures.

Un cop s'havia fet la constatació que s'havien aconseguit soques productores de menadiona, i que aquestes feien el producte desitjat amb un 100% de selectivitat respecte l'isòmer contaminant descrit en la producció química, era important identificar els microorganismes salvatges per a poder saber quin grau de coneixement existia sobre aquests microorganismes. Per a la identificació es van utilitzar unes tècniques

bioquímiques que van permetre identificar la soca salvatge B-48 com una soca corresponent a la varietat *Bacillus cereus* biotip I, mentre que la soca salvatge B-39 es va identificar com una soca corresponent a *Pseudomonas cepacea*.

Els treballs de producció de menadiona es varen centrar en la soca de *Bacillus cereus* B-48, ja que la soca B-39 tenia un baix nivell de producció i a més l'informació sobre el seu genoma no era la adient com per abordar un treball mol.lecular fiable, per tant es va deixar de banda en aquest moment.

El treball bibliogràfic realitzat, ens va permetre veure que en la cadena respiratòria de *Bacillus cereus* existia també una quinol oxidasa, tot i que el grau d'homologia genètica respecte la menaquinol oxidasa de *B.subtilis* era al voltant del 60% (53).

4.2.5. Elecció de les soques de treball i condicions experimentals.

Els assaigs de screening d'activitat van permetre descartar els microorganismes no productors de menadiona, i centrarnos en la soca més productiva de menadiona, B-48, deixant en un segon pla el treball amb les soques *Rhodococcus*, *Paracoccus denitrificans*, *Bacillus subtilis* i B-39.

La naturalesa del substrate que s'utilitza en aquesta reacció comporta diferents problemes, com són la seva baixíssima solubilitat en aigua, així com l'elevadíssima toxicitat sobre les cèl.lules, factors que condicionen profundament la reacció biotecnològica de síntesis de menadiona.

Prèviament a la realització del screening s'havien realitzat uns assaigs de solubilitat del 2-MNF en DMSO i de toxicitat d'ambdós enfront soques de col.lecció. Els resultats obtinguts van permetre determinar que les condicions òptimes de treball han de ser inferiors a 100mg/l de 2-MNF i al 1% de DMSO.

En les corbes de creixement realitzades amb B-48 es va determinar que el millor medi mínim pel seu creixement, pel que fa a obtenció de biomassa era el White Glucosa (WG). En aquest medi es va mesurar l'activitat inhibidora del substrate (2-MNF), veientse una clara activitat antimicrobiana d'aquest a totes les concentracions assajades, de 50 a 5.000mg/l de 2-MNF, fet preocupant ja que treballar a dosis inferiors a les determinades en aquest assaigs implicarien una baixíssima productivitat. Tenint en compte aquest factors, es van realitzar assaigs a 500mg/l de 2-MNF en els medis mínims WG, white succinat (WS) i diferents medis nutritius, en els que es va observar que en els medis nutritius la producció era a nivell de traces, mentre que per WG i WS la productivitat de menadiona era de 0,13mg/l i de 0,10 mg/l respectivament, resultats que indicaven un percentatge de transformaió del voltant del 0.02%.

Cal destacar que es va detectar un producte corresponent a una ruta alternativa no descrita en els processos químics coneguts, que conduïa a la formació d'hidroximetilnaftalè, amb una productivitat de 0,1mg/l en WS i 0,8mg/l en WG. Aquest fet ens va fer pensar que la ruta alternativa podia limitar enormement la síntesi de menadiona, així que es va realitzar un estudi cinètic, a diferents temps i en medis mínims diferents, és a dir WG, WS o white amb 2-MNF, que ens va permetre observar els diferents successos que es donaven en la reacció, i ens va permetre determinar el mecanisme de reacció de la síntesi de la menadiona així com de la ruta alternativa.

Els resultats obtinguts indiquen l'acumulació del 2-metil-1-naftol i del 2-metil-4-naftol, que posteriorment es suposa que passen a menadiol, tot i que no hi ha evidència analítica del fet, com a productes intermediaris de la síntesi de la menadiona, productes que ràpidament són oxidats a la vitamina K3. D'altra banda s'observa l'acumulació de l'hidroximetilnaftalè com a intermediari que posteriorment és transformat a àcid 2-metil-1-naftoic, uns resultats que indiquen que l'oxidació del substrate es realitza en tres punts, els dos desitjats en la posició 1 i 4 de l'anell de naftalè, i la no desitjada en el grup metil.

Un cop vistes les limitacions del sistema, es van realitzar assaigs a 500mg/l de 2-MNF en condicions de cèl.lules no proliferants, és a dir, en condicions de limitació de font de carboni o nitrogen, condició que obliga a realitzar un precultiu anterior del qual s'obtiniran les cèl.lules per a l'assaig. Els resultats obtinguts indiquen que a la concentració de substrat assajada la limitació de nitrogen no estimula la producció de menadiona i es manté la productivitat de l'hidroximetilnaftalè. En els assaigs de limitació de font de carboni s'obté una lleugera millora de rendiment obtenintse aproximadament 0,14mg/l de menadiona, tant en cèl.lules crescudes en succinat com en glucosa, però en les crescudes en succinat es produeix aproximadament una quarta part d'hidroximetilnaftalè, fet remarcable per a la selectivitat de la reacció.

En aquest punt de l'estudi, es va pensar en una possible inhibició per substrate que provoqués una baixa productivitat, així doncs es va realitzar un estudi cinètic a concentracions molt inferiors de substrate, a 50,100 i 150 mg/l de 2-MNF, en el medi que limitava la producció de la via alternativa, és a dir el medi amb limitació de carboni amb cèl.lules crescudes en succinat. Els resultats obtinguts a 50mg/l indiquen un augment de la productivitat de menadiona en un ordre de magnitud logarítmica al baixarse un ordre de magnitud la concentració de substrate, demostrantse clarament que en la reacció hi ha un clar efecte d'inhibició per substrate.

Aquest fet es corrobora en els assaigs realitzats a 100 i 150mg/l, en els que la productivitat baixa d'una forma clara. La productivitat a 10 dies en aquestes condicions és de 1,35mg/l i el percentatge de transformació és del 2.7%.

Tot i obtenir-se aquesta millora cal destacar que la reacció alternativa també es trobava sota un efecte d'inhibició per substrate, ja que a la cinètica de 50mg/l s'obtenen fins a 23,29 mg/l d'hidroximetilnaftalè, amb un 46% de transformació, augmentant-se en dos ordres de magnitud la productivitat de la ruta alternativa al baixar un ordre de magnitud la concentració de substrate.

Tot i observar-se uns resultats no massa esperançadors en els assaigs de cèl.lules no proliferants degut a limitació de nitrogen, es van realitzar assaigs en aquestes condicions de no proliferació però baixant també la concentració de substrate a 50mg/l, observant-se una clara millora en els rendiments de la reacció. En el cas dels assaigs en WS sense nitrogen el millor resultat es troba als 15 dies, obtenint-se 1,58mg/l de menadiona, amb un percentatge de transformació del 3,16%, i una productivitat d'hidroximetilnaftalè de 18,9 mg/l. En els assaigs en WG sense nitrogen el millor resultat es troba als 15 dies, obtenint-se 4,56 mg/l de menadiona, amb un percentatge de transformació del 9,12%, i una productivitat d'hidroximetilnaftalè de 44 mg/l, que correspon a un 88% de transformació.

Es pot dir doncs, que aquestes condicions de limitació de nutrients han permès augmentar clarament la productivitat, passant de 0,14mg/l en els assaigs precedents, a 1,35mg/l en limitació de carboni, 1,58mg/l en limitació de nitrogen en succinat i 4,56 mg/l en limitació de nitrogen en glucosa. Cal destacar, però que l'augment en la productivitat de menadiona va lligada a un augment en la síntesi de la via alternativa en gran mesura, arribant a exhaurir-se el substrat de partida en el cas de la limitació de nitrogen en glucosa.

L'aparició de l'hidroximetilnaftalè com a competidor en la producció de menadiona per la soca B-48 ens va portar a la utilització de substàncies inhibidores d'oxidació en grups metil, com són el dietilditiocarbamatsòdic trihidratat i l'etilxantogenat de potassi(8). Aquests assaigs es van realitzar tant en cèl.lules crescudes en succinat com en glucosa, i els resultats obtinguts mostren que sí hi ha una inhibició de l'oxidació en el metil, però també en la síntesi de menadiona i de forma més forta, ja que al minimitzar la concentració dels inhibidors la productivitat de l'hidroximetilnaftalè augmenta ràpidament i la de menadiona no, tal i com es pot observar en el punt 3.4.1.6 . Aquests

resultats van fer descartar la utilització d'aquests productes inhibidors d'oxidació en els grups metil.

Paral·lelament, varem intentar solucionar el problema de la toxicitat del 2-MNF, intentant minimitzar-la amb la preparació de medis bifàsics que consisteixen en medi de cultiu aquós: hexadecà, proporció 10:1. L'addició d'aquest solvent orgànic d'elevat pes molecular permet dissoldre el substracte, no l·lisar les cèl·lules i mantenir un equilibri de solubilitat amb l'aigua del 2-MNF que li permet créixer d'una forma òptima a concentracions elevadíssimes de substracte com són 5g/l, aconseguintse gairebé el doble de biomassa en sistemes amb 100 vegades major concentració de 2-MNF. Així doncs semblava ser que el problema de la toxicitat s'havia solucionat.

Es van realitzar doncs assaigs en aquestes condicions utilitzant diferents medis de cultiu, obtenintse síntesis de menadiona en els cultius amb medis mínims WG, WS, però no en medis nutritius. En els medis mínims s'observava la producció de vitamina K3 a nivells de traces però també d'hidroximetilnaftalè als mateixos nivells, fet que desestimava l'ús d'aquests sistemes bifàsics en endavant. Sorprenentment, a més, es va poder determinar la formació de cetones alifàtiques a unes quantitats variables de 20 a 50mg, corresponents a oxidacions no selectives del solvent orgànic hexadecà, que era oxidat i trencat per diferents enzims de la soca B-48.

En aquest punt les expectatives generades en un inici per la soca B-48 no es van veure acompanyades pels resultats, així doncs es va encarar el treball amb un altre dels microorganismes productors de menadiona, el *Bacillus subtilis*, el qual es va assajar enfront del 2-MNF tenint en compte els resultats obtinguts fins al moment amb B-48, de manera que es van realitzar assaigs amb cèl·lules no proliferants amb limitació de nitrogen o carboni a 50mg/l de 2-MNF. Els resultats obtinguts en les condicions de limitació de font de carboni, així com en la limitació de nitrogen en succinat indiquen la formació de menadiona, però també d'hidroximetilnaftalè encara que a nivell de traces ambdós. La productivitat obtinguda en la condició de limitació de nitrogen en glucosa és de 7,136mg/l de menadiona, aconseguintse un augment major respecte a la millor condició obtinguda per B-48, mentre que s'obté 1,1mg/l d'hidroximetilnaftalè, fet que redueix en més de 20 vegades la productivitat de la ruta alternativa, fet que condicionava la millora de la reacció feta amb la soca B-48. Així doncs aquesta opció sembla ser la més adequada per a la síntesi biotecnològica de la menadiona partint del 2-MNF.

Un cop vistes les limitacions de la reacció biotecnològica utilitzant el 2MNF com a substrat, es va estudiar la utilització de substrats alternatius com és el 2-metil-1-naftol, producte comercialment disponible que probablement solucionaria el que sembla ser el pas limitant de la reacció, l'oxidació en la posició 1 de l'anell del naftalè, i a més evita l'hidroxilació del grup metil del 2-MNF.

Es van realitzar assaigs amb aquest nou substrate, els dos microorganismes amb els que s'obtenien els millors resultats, és a dir, la soca B-48 i la soca de referència de *Bacillus subtilis* en condicions de limitació de carboni a una concentració de 25mg/l de substrate.

Els resultats obtinguts indiquen que la pròpia mostra s'autooxida en les condicions assajades, i que els dos microorganismes assajats acceleren la reacció d'una forma considerable, produint-se un 100% de transformació ja als 2 dies de reacció, resultat que probablement es pot aconseguir en uns temps molt inferiors i inclús amb majors dosis de substrate.

Els assaigs realitzats en les mateixes condicions però en cultius bifàsics mostren uns rendiments inferiors, obtenint-se uns resultats entre el 50% i 60% per a B-48 i del 10% al 25% per a *Bacillus subtilis*. Un fet destacable és que els blancs d'oxidació indiquen una major estabilitat del substrate en l'hexadecà, és a dir que s'autooxida menys, als 10 dies un 16%, mentre que en medi aquós és del 100%. Aquest és un factor probablement degut a la menor difusió de l'oxigen dins el solvent orgànic utilitzat per al cultiu bifàsic, l'hexadecà.

Degut als problemes de solubilitat dels substrates utilitzats fins ara, el 2-MNF i el 2-metil-1-naftol, era molt interessant saber si la limitació de la producció de menadiona podia ser deguda a problemes de disponibilitat de substrate per als enzims, de manera que es van realitzar assaigs enzimàtics en condicions tamponades amb addició del cofactor NADH. Per a fer aquests assaigs es van utilitzar cèl.lules trencades de B-48 i cèl.lules trencades de soques de referència de *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* enfront dels substrates esmentats.

Els resultats van mostrar una baixa activitat de la soca de referència de *Bacillus cereus* per al 2-metil-1-naftol, produint un màxim de 3 mg/l de menadiona, a més d'un resultat negatiu per a la producció de menadiona partint del 2-MNF.

Els resultats per a B-48 també indiquen una baixa activitat per al 2-metil-1-naftol, produint un màxim de 3,48mg/l de menadiona i també un resultat negatiu per al 2-MNF. Els millors resultats van ser els aconseguits per la soca de referència *Bacillus subtilis*,

que va produir fins a 8mg de menadiona utilitzant el 2-metil-1-naftol, a més de ser l'única soca en obtenir un resultat positiu en la formació de menadiona desde 2-MNF, encara que a nivell de traces.

Cal destacar que tenint en compte que els nivells d'autooxidació dels blancs de 2-metil-1-naftol en medi aquós són força elevats es podria dir que l'activitat observada no és destacable si es comparen els resultats amb els obtinguts en medi aquós amb cèl.lules senceres.

Els mateixos assaigs, descartant la soca *Bacillus cereus* degut als mals resultats obtinguts en condicions aquoses, es van realitzar en condicions bifàsiques i es va confirmar l'efecte inhibidor de l'hexadecà en la reacció, obtenintse una productivitat de menadiona de 2mg/l per B-48 i 1mg/l per *Bacillus subtilis* partint del substracte 2-metil-1-naftol, i un resultat negatiu en els assaigs amb 2-MNF. Cal destacar també que els blancs realitzats indiquen que el 2-metil-1-naftol és molt més estable en hexadecà que en aigua ja que en els blancs la autooxidació de la mostra és nula.

Així doncs podem dir clarament que els assaigs enzimàtics no permeten una millora en el rendiment de les reaccions i per tant cal descartarlos com a alternativa als assaigs amb cèl.lules senceres de B-48 i *Bacillus subtilis*.

Per tant, podem concloure que la millor opció obtinguda fins al moment, seria segons els resultats obtinguts, l'oxidació del 2-metil-1-naftol en un medi tamponat mitjançant cèl.lules senceres de la soca B-48 o bé de *Bacillus subtilis*. Aquest procediment té una selectivitat del 100%, que s'aconsegueix a les 48 hores de reacció, evitantse la formació de cap compost competitiu i evitant la ruta alternativa d'oxidació present en els assaigs amb 2-metilnaftalè. Per altra part, aquestes condicions es podrien millorar moltíssim variant certes condicions fisico-químiques, com ara introduir aireació forçada en el matrau de reacció, cultius d'elevada densitat cel.lular i una llarga sèrie d'opcions biotecnològiques. D'altra banda existeix un problema determinant per a l'aplicabilitat d'aquest procediment, i aquest és el preu del producte de partida, que té un cost superior al de la menadiona, preu principalment degut a les condicions d'emmagatzament del producte en atmosfera de nitrogen. Aquest problema fa desestimar aquest procediment fins que el substracte es pugui aconseguir a un preu raonable, o bé fins que la tecnologia permeti combinar un procediment químic de síntesis de 2-metil-1-naftol d'una forma selectiva i eficaç, i que es pugui combinar posteriorment amb aquest procés biotecnològic, això seria doncs un procés quimioenzimàtic.

Tot esperant aquestes millores tecnològiques, en les quals s'hi està treballant, les alternatives actuals sobre la síntesi biotecnològica de menadiona s'han de centrar en l'ús del 2-MNF com a substrate de reacció, treballant amb les dues soques obtingudes que produeixen menadiona en les millors condicions, és a dir la soca salvatge B-48 i la soca de col.lecció *Bacillus subtilis* DSMZ 402, que tenen una productivitat màxima de 4,56 mg/l i 7,136mg/l de menadiona respectivament en les millors de les condicions possibles assajades.

4.3. Estudis mol.leculars de la producció de menadiona

4.3.1. Descripció d'enzims involucrats en la síntesi de la menadiona

La síntesi química de menadiona utilitzant el 2-MNF com a substrat, requereix la utilització de reactius altament oxidants, com són l'òxid de crom, dicromat o aigua oxigenada (8,12). Amb l'objectiu de donar alternatives als processos de síntesi química que incorporen aquests reactius, que s'han descrit com altament contaminants en el cas de derivats del crom, o bé com no industrialitzables en el cas de l'aigua oxigenada, s'ha treballat en l'estudi de noves rutes de síntesi mitjançant biocatàlisi enzimàtica.

Al tractarse d'una reacció d'òxid-reducció, els enzims involucrats en l'oxidació del 2-metilnaftalè a menadiona han de ser obligatòriament del tipus òxid-reductases, i concretament monooxigenases o dioxigenases, que permetin introduir oxigen en les posicions 1 i 4 de la mol.lècula inicial de naftalè fins a l'obtenció de grups cetona en les posicions esmentades, tal i com s'ha descrit i discutit anteriorment en l'apartat 4.2.3.

Els dos enzims que fins ara es coneixen com a implicats en l'oxidació d'estructures fins a l'obtenció de naftoquinones són els corresponents a l'operó QOX i l'operó CYD.

La citocrom aa3600quinol oxidasa (QOX), està composta per quatre subunitats que corresponen als gens QOX A(1000pb), B(2000pb), C(500pb) i D(300pb), gens que es troben de forma consecutiva en el genoma de *Bacillus subtilis*, conformant un gen de 3800pb. La citocrom bd quinol oxidasa està composta per dues subunitats que corresponen als gens CYD A (1000pb) i CYD B (1400pb), trobantse un a continuació de l'altre i formant un gen de 2400pb.

4.3.2. Resultats del clonatge en E.coli

En aquest estudi es va realitzar el clonatge dels dos operons complets descrits en l'apartat anterior, així com els gens corresponents a les diferents subunitats, amb l'objectiu de determinar quin fragment gènic és el responsable de la síntesi de menadiona, així com l'obtenció d'enzim purificat en el sistema d'expressió pET102TOPO/*E.coli* BL21, utilitzant com a DNA inicial el genoma de *Bacillus subtilis* DSMZ 402.

El clonatge dels gens QOX A, B, C i D es va realitzar mitjançant una correcta amplificació, com s'observa en la figura 3.5.1.2, obtenintse una gran quantitat de producte de PCR en tots els casos excepte en el gen QOX B en què la quantitat és més limitada. Un cop realitzades la lligació en el pET 102D TOPO i transformació en soques *E.coli* TOP 10, els inserts es van poder caracteritzar per PCR colonial per als gens QOX A, C i D, com es pot apreciar en la figura 3.5.1.2, en els que es poden observar

fragments lleugerament més llargs que els productes de PCR degut a que els primers de seqüenciació també engloben una part del vector de clonació. El gen QOX B no es va poder confirmar per PCR colonial, probablement degut a que aquest gen és més gran i a vegades l'èxit de les PCR colonials és més limitat. La inserció del gen QOX B en el plàsmid es va confirmar per restricció amb l'enzim HindIII que va permetre visualitzar el tamany esperat del vector amb l'insert, d'aproximadament 8,3 kb, com es pot veure en la figura 3.5.1.5.

El clonatge del gen complet QOX va ser molt més problemàtic que els anteriors en tots els seus passos degut a la gran llargada del fragment gènic. Tot i així, després de nombroses modificacions en els protocols d'amplificació es va poder obtenir una òptima amplificació, com es pot veure a la figura 3.5.1.3, en el que s'observa un fragment d'aproximadament 4kb. Un cop feta la lligació en el vector pET102D(TO)PO i la transformació en *E.coli* TOP10, es va optar per evitar la confirmació per PCR colonial degut a la grandària del gen, i aquesta es va realitzar per restricció amb HindII, obtenint-se un resultat correcte. En la seqüència del gen QOX apareix una diana per HindIII, fet que comportava l'aparició d'un fragment d'uns 800pb i un altre d'unes 9,3kb. En la figura 3.5.1.4 s'observa la presència d'una banda d'unes 10kb, fet que indica una inserció en el vector de clonatge però no s'observava cap banda d'uns 800pb, tot i així es va optar per continuar treballant amb aquesta mostra ja que semblava que l'insert era d'un tamany adequat.

El clonatge dels gens CYD A, CYD B i CYD es va realitzar mitjançant una correcta amplificació, sobretot per a CYD B, com s'observa en la figura 3.5.1.1, en què s'observen les bandes de DNA del tamany adequat. Un cop realitzades la lligació al vector pET102D(TO)PO i la transformació a la soca *E.coli* TOP10, la confirmació dels inserts es va realitzar per PCR colonial en el cas del gen CYD A, com es pot apreciar en la figura 3.5.1.1, en els que es pot observar el fragment lleugerament més llarg que el producte de PCR degut a que els primers de seqüenciació també engloben una part del vector de clonació.

Per als dos altres gens la confirmació per PCR colonial no va donar un resultat adient, possiblement degut al tamany d'aquests, i per tant es va realitzar per restricció amb HindIII.

El gen CYD té una diana de restricció per a HindIII, formant-se un fragment de 8,3kb i un de 400pb. Aquest resultat teòric es va confirmar al veure's la banda

d'aproximadament 8,5kb en la figura 3.5.1.5, tot i que no es va poder observar la banda d'uns 400pb, tot i així es va continuar treballant amb aquesta mostra.

El gen CYD B també té la mateixa diana de restricció que CYD, de manera que al fer la restricció s'originen dos fragments, un de 7,3kb i l'altre de 400pb, fet que es sembla corroborar en la figura 3.5.1.6 en què s'observen bandes de 7,3kb aproximadament encara que no per a 400pb.

Tots els clons que varen presentar signes de tenir els inserts correctes es van seqüenciar amb els primers de seqüenciació TrxFus forward i T7reverse, per una banda es van seqüenciar els productes de PCR colonials obtinguts en la confirmació, i de la resta es van realitzar cultius a major escala per aïllar suficient quantitat de plàsmid per a la seva seqüenciació. Els resultats obtinguts (figures 3.5.2: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) es van analitzar realitzant un alineament amb les seqüències publicades a la base de dades del *National Center of Biotechnology International* corresponents al genoma de *Bacillus subtilis* 168, i es va mostrar que les construccions realitzades amb els gens QOX, QOX A, B, C, D, CYD i CYD A, eren correctes, obtenint-se la seqüència del gen complet, amb l'orientació adequada i amb una homologia del 100% en tots els casos, mentre que per al clonatge de CYD B els resultats van mostrar la inserció d'un fragment d'uns 600pb que no corresponia al gen desitjat, fet que ens va obligar a deixar de treballar amb aquesta soca en endavant.

Per tant, podem catalogar d'èxit el treball de construcció de soques recombinants excepte per al gen CYD B.

4.3.3. Estudi d'expressió fenotípica.

Un cop confirmada la idoneïtat de les construccions gèniques realitzades per biologia molecular en el vector de clonatge, calia superar un altre punt limitant, el d'aconseguir un elevat nivell d'expressió fenotípica en el sistema d'expressió pET102D(TO)PO en soques de *E.coli* BL21.

En aquest punt es van presentar nombrosos problemes, ja que el nivell d'expressió de les diferents proteïnes de fusió, corresponents als 7 gens clonats en el vector d'expressió, va ser molt baix o nul en les diferents condicions d'inducció assajades.

Es van realitzar assaigs d'inducció amb IPTG a 25, 50, 100, 150 i 200mg/l de cultiu, addicionant l'inductor a diferents fases de creixement i a diferents temps d'inducció que variaven de 2 hores a 24 hores, tot i així no es van obtenir resultats idonis per a la majoria de les proteïnes. Les construccions amb els gens QOX C i D mostraven una certa productivitat de proteïna, però la seva quantitat i reproductibilitat no eren les

esperades, a més cal tenir en compte que aquests resultats positius corresponien als gens més petits (500pb i 300pb respectivament). L'única construcció que mostrava uns correctes nivells d'expressió va ser la corresponent al gen QOX, curiosament la que conté el gen més gran (3800pb), i amb la que més interès es tenia per obtenir ja que se sabia que aquesta proteïna completa actuava sobre el menadiol, com anteriorment s'ha esmentat (16).

La sobreexpressió de la citocrom aa3 600 quinol oxidasa va ser correcta en el rang d'inductor IPTG 50-200 mg/l, essent òptima entre 100 i 200mg/l, com es pot veure a la figura 3.5.3.1, però sobretot en la figura 3.5.4.1, i durant temps d'inducció d'entre 4 hores i 12 hores, trobantse principalment de forma soluble, factor que en facilita la seva purificació, ja que si no fós soluble no es podria purificar en condicions suaus que permetessin mantenir l'estructura i activitat de la proteïna de fusió.

L'estratègia de purificació de la proteïna de fusió va ésser molt fàcil degut a que aquesta es trobava principalment en la fracció soluble al trencar les cèl.lules, de manera que aquesta fracció es va purificar per cromatografia d'afinitat amb una reïna de níquel que captura les proteïnes etiquetades amb histidines principalment, obtenintse un bon grau de puresa en les el.lucions obtingudes com es pot veure en la figura 3.5.4.1.

L'èxit de la purificació per afinitat de les histidines al níquel va donar sospites que la proteïna de fusió era correcta, ja que indicava que l'etiqueta d'histidines en l'extrem C-terminal es trobava en perfectes condicions i el marc de leucitra era correcte, tot i així calia demostrar que la proteïna que s'observava com a sobreexpressada en els gels d'electroforesis i la proteïna purificada corresponia a la proteïna de fusió. Amb aquest objectiu es va realitzar la detecció mitjançant la tècnica del Westernblott utilitzant un anticòs anti-etiqueta d'histidines que va permetre corroborar que la proteïna expressada i purificada corresponia a la proteïna de fusió, com es pot veure a la figura 3.5.5.1 i que tenia un tamany aproximat de 160kDa que concorda amb el tamany teòric estimat. Per tant, el producte proteic obtingut és el que resulta del gen QOX.

Amb l'objectiu de quantificar la proteïna purificada per poder veure l'èxit de la sobreexpressió i purificació de la proteïna de fusió es va realitzar una quantificació pel mètode 2.5.3.8 que ens permet dir que a partir d'un litre de brou amb cèl.lules sobreexpressades s'obtenen 20,3mg de proteïna purificada, quantitat força elevada tenint en compte els problemes observats en l'expressió fenotípica de les proteïnes de fusió.

El factor important, però, de tot el procediment de clonatge, expressió i purificació de la proteïna recombinant, és l'observació de l'activitat d'aquesta proteïna envers els possibles substrates per a la síntesi de la menadiona.

Els assaigs realitzats utilitzant el 2-metil-1-naftol com a substrat per a la síntesi de menadiona, van mostrar que les soques recombinants són actives pel que fa a aquest substrat tant utilitzant cèl.lules senceres com cèl.lules parcialment purificades, essent el millor mètode el corresponent a cèl.lules senceres sobreexpressades en sistemes aquosos, amb els que s'obté més d'un 50% de transformació en dos dies i un 100% als 5 dies, mentre que els assaigs amb cèl.lules trencades tenen una activitat inferior.

Cal destacar que es van realitzar blancs sense cèl.lules i amb cèl.lules de *E.coli* no recombinants BL21, per mesurar l'activitat autooxidativa del sistema tant en medis aquosos com bifàsics, mostrant-se que en medis aquosos l'activitat autooxidativa varia entre 1 i 5mg de producció de menadiona, mentre que en els sistemes bifàsics el 2-metil-1-naftol és més estable, formant-se 0,2mg com a màxim, probablement degut a la menor difusió d'oxigen en el dissolvent. Tenint en compte que els valors d'autooxidació són molt inferiors als valors d'oxidació dels assaigs, podem determinar que la responsable d'aquesta oxidació és la proteïna de fusió, i així assegurar que la proteïna responsable de la síntesi de menadiona des del 2-metil-naftol és l'obtinguda en aquest estudi.

Els assaigs realitzats amb cèl.lules sobreexpressades no varen mostrar activitat enfront del 2-MNF tant en assaigs en medi aquós com en medis bifàsics. Una explicació possible seria que la soca clonada només té el fragment QOX, el qual seria insuficient per produir la reacció d'oxidació sencera des del 2-MNF fins la menadiona. Aquest fet condiciona l'ús de la soca recombinant en la síntesi de la menadiona, ja que la síntesi a partir del 2-metil-1-naftol no és viable degut a l'alt preu d'aquest substrate, i queda pendent d'una eventual baixada de preu o bé d'un desenvolupament químic-enzimàtic que permeti obtenir aquest substrate partint del 2-MNF d'una forma selectiva i econòmica i que es pugui subministrar seguidament al biocatalitzador per evitar processos d'emmagatzemat del 2-metil-1-naftol que són els que presumiblement condicionen el preu del producte.

4.4. Discussió final.

Amb el present estudi hem demostrat que és possible l'obtenció de diferents processos productius de menadiona mitjançant la biotecnologia i que són processos molt més nets i selectius que els emprats per síntesis química tradicional.

Per altra part, hem aconseguit clonar, expressar i purificar la proteïna responsable de la producció de menadiona i possiblement altres naftoquinones semblants a partir de la bactèria *Bacillus subtilis* DSMZ 402. Ara bé, l'estudi es continuarà intentant que el procés sigui industrialment viable introduint certes variacions segons el model procariota del que es tracti, com ara, per la soca B-48 s'introduiran certs canvis en la temperatura de reacció, cerca d'inhibidors selectius de l'hidroximetilnaftalè, addició de dissolvents de reacció alternatius per obtenir cultius bifàsics diferents a l'hexadecà i treballs en bioreactors que donin altes densitats de població microbiana.

Per a *Bacillus subtilis* DSMZ 402 les estratègies serien molt similars, però el problema amb l'hidroximetilnaftalè no cal solucionar-ho ja que la seva formació és mínima, per tant els esforços es centren en augmentar el rendiment de l'obtenció de menadiona.

Per altra part, s'ha de començar a estudiar un procés químic-enzimàtic, en el qual el 2-metil-1-naftol sigui un producte intermediari que sense haver d'aïllar-ho sigui oxidat per un sistema enzimàtic descrit en aquest treball.

5. CONCLUSIONS

5.1 S'han aïllat dues soques salvatges provinents del 2-MNF, caracteritzades com *Bacillus cereus* biotip I i *Pseudomonas cepacea*, amb la capacitat de produir vitamina K3

5.2 Les soques de col·lecció *Paracoccus denitrificans*, *Bacillus subtilis* i *Rhodococcus sp.*, s'han pogut caracteritzar com a soques productores de vitamina K3

5.3 Les cinc soques productores de vitamina K3 realitzen un procediment 100% selectiu per al que fa a la producció d'aquesta, eliminantse la producció de la 6-metil-1,4-naftoquinona, producte isòmer de la vitamina K3.

5.4 S'ha desenvolupat un mètode analític per HPLC i per GC-MS que permet preparar les mostres de la reacció biotecnològica, analitzarles i determinar la formació de menadiona descartant la producció d'isòmers.

5.5 S'ha determinat el mecanisme de la reacció biotecnològica de la síntesi de vitamina K3 així com de la ruta alternativa que porta a la producció de l'àcid 2-metilnaftoic.

5.6 S'han desenvolupat diferents mètodes de producció de vitamina K3 partint del 2-MNF com a substrat, que inclouen cultius actius i condicions de limitació de nitrogen o font de carboni

5.7 La millor condició de producció per a la soca salvatge *Bacillus cereus* biotip I B-48 és realitzant assaigs en condicions de limitació de nitrogen en glucosa a 50mg/l de 2-MNF, en la qual s'obté una productivitat de 4,56mg/l de vitamina K3

5.8 La millor condició de producció per a la soca de referència *Bacillus subtilis* és realitzant assaigs en condicions de limitació de nitrogen en glucosa a 50mg/l de 2-MNF, en la qual s'obté una productivitat de 7,13mg/l de vitamina K3

5.9 Els assaigs de síntesis de vitamina K3 utilitzant el 2-metil-1-naftol com a substrat, han mostrat uns resultats excel·lents per a les soques de referència *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i la soca salvatge *Bacillus cereus* biotip I B-48. Els assaigs de síntesis de vitamina K3 utilitzant el 2-metil-1-naftol com a substrat, produint-se 25mg/l de menadiona amb un 100% de transformació en tots els casos, d'una forma 100% selectiva i evitant la ruta alternativa de formació de àcid 2-metil-1-naftoic

5.10 Els assaigs enzimàtics tenen una nula productivitat, o baixíssima en el cas de *Bacillus subtilis*, de vitamina K3 utilitzant el 2-MNF com a substrate

5.11 Els assaigs enzimàtics de síntesis de vitamina K3 utilitzant el 2-metil-1-naftol com a substrat han mostrat resultats positius per a les soques de referència *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i la soca salvatge *Bacillus cereus* biotip I B-48, formant-se entre 2 i 8 mg/l.

5.12 Els assaigs enzimàtics obtenen uns pitjors resultats que els assaig amb cèl·lules senceres, tant utilitzant el 2-MNF com el 2-metilnaftol com a substrat, fet que no n'aconsellen el seu ús per a la reacció biotecnològica de síntesis de la vitamina K3.

5.13 S'ha realitzat amb èxit la construcció del vector plasmídic amb el gen *qox* de *Bacillus subtilis*, el qual s'ha sobreexpressat en la soca *E.coli* BL21 en uns nivells òptims que han permès la purificació i estudiar l'activitat de la proteïna de fusió corresponent a la construcció realitzada.

5.14 S'ha pogut determinar la proteïna responsable de la reacció biotecnològica de síntesis de la menadiona al determinar que el gen *qox* de *Bacillus subtilis*, clonat i sobreexpressat en *E.coli* BL21, produïen una proteïna de fusió que li permetia adquirir la capacitat d'accelerar la reacció d'oxidació del 2-metil-1-naftol per a la síntesi de vitamina K3 en condicions definides, al compararne l'activitat amb assaigs amb cèl·lules de *E.coli* BL21 sense aquest gen.

5.15 Els resultats obtinguts fins aquest punt no permeten obtenir una reacció que permeti substituir el procés químic establert en l'actualitat de síntesi de la menadiona degut a la baixa productivitat quan s'utilitza 2-MNF com a substrat, o bé per l'elevat

cost del substrate de partida al utilitzar el 2-metil-1-naftol. Aquest estudi, però, ha permès mostrar noves alternatives que, tot i no poder competir amb el procés clàssic, es continuen millorant amb l'objectiu de solucionar els problemes que en l'actualitat comporten, i així millorar la productivitat des del 2-metilnaftalè mitjançant un procés 100% biològic, o bé un procés químic per obtenir el 2-metil-1-naftol de forma econòmica el qual serà transformat amb gran eficàcia a vitamina K3 amb els microorganismes aïllats en aquest estudi.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Agency of industrial Sciences and Technology. Electropreparation of menadione. 1982. Patent JP 81-76101.
2. Anunziata, O. Synthesis of menadione over selective oxidation zeolites. Journal of molecular Catalysis. 1999. 149:255-261
3. Araki ,S. Highly efficient production of vitamin k by microorganism. 1997. Patent JP10-295393.
4. Biomerieux. Manual api50chb. 2002.
5. Biomerieux. Manual api20e. 2002.
6. Biomerieux. Manual api20ne. 2002.
7. BIO-RAD Laboratories. Manual Bio-rad protein assay. 1994.
8. Ding, L. Synthesis of Vitamin k4. Jingxi Huagong (Chinese Idiom). 1997. 14: 11-13.
9. Hernandez Rodriguez, M. Tratado de Nutrición. Editorial Diaz de Santos 1999. Capítulo 11: 195-201.
10. Hirose, N. Preparation of menadione by oxidation of 2-methyl-1-naphtol with oxygen using a cupric-lithium chloride catalyst. 1989. Patent JP 87-246363.
11. Hishash, M. Vitamin highly productive strain and production of vitamin k. 1998. Patent 10-295393.
12. Huba, F. Batch and continuous process for preparing menadione. 1973. US patent 3,751,437.
13. Ilsi,J. Nutrition. American society for nutrition . 2002. Chapter 2 :146 154.
14. Invitrogen life technologies. Manual pET Directional TOPO expression kits. 2002. Version E, 25-0400.
15. Invitrogen life technologies. Manual Probond purification system. 2002. Version I, 020402,25-0006.
16. Invitrogen life technologies. Manual Simplybluesafestain. 2002. Version E, 050902,IM-6050.

17. Invitrogen life technologies. Manual X-cell II blot module. 2002. Version F, 010430, IM-9051.
18. Invitrogen life technologies. Manual Westernbreeze. 2002. Version E, 020502,IM-1004.
19. Invitrogen life technologies. Manual Antihiscterm. 2002. Version F, 081301, 28-0139.
20. Invitrogen life technologies. Manual S.N.A.P. Gel purification kit. 2002.Version C, 082701, 27-0351.
21. Invitrogen life technologies. Manual S.N.A.P.Miniprep kit. 2002. Version F.
22. Invitrogen life technologies. Manual S.N.A.P.Midiprep kit. 2002. Version F.
23. Invitrogen life technologies. Manual Easydna kit. 2002. Version E, 080201, 25-0056.
24. Invitrogen life technologies. Manual Pfx DNA polymerase. 2002.
25. Invitrogen life technologies.Manual Platinum PCR Supermix. 2002.
26. Ji, Y. Synthesis of vitamin K. Yingyong Huaxue. 1998. 15: 98-100.
27. Joo, Y. Preparation of 2-methyl-1,4-naphtoquinone from 2-methyl-1,4-benzoquinone and 1,3-butadiene. 1998.US Patent 96-758921.
28. Kowalski, J. Methods for synthesis of vitamin k3. Wiadomosci Chemiczne (Polish idiom).1999. 53: 401-413.
29. Lauraeus, M. The terminal Quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. Journal of Biological Chemistry. 1993 268: 11470-11473.
30. Lemma, E. Menaquinone is an obligatory component of the chain catalysing succinate respiration in *Bacillus subtilis*. Archives of Microbiology. 1990. 155:62-67.
31. Lemma, E. The menaquinol oxidase of *Bacillus subtilis* W23. Archives of Microbiology. 1993. 159:574-578.
32. Lemma, E. Properties of the menaquinol oxidase (Qox) and of Qox deletion mutants of *Bacillus subtilis*. Archives of microbiology. 1995. 163: 432-438.
33. Li, Y. Improved process for the synthesis of menadiol sodium diphosphate. Zhongguo Yiyao Gongye Azahi. 2000. 31: 529-530.
34. Matsumoto, Y. Preparation of 2-methyl-1,4-naphtoquinone. 1996. European patent EP 95-115063.

35. Matveev, K. Process for preparing menadione. 1996. Russian Patent RU 50-46866.
36. Matveev, K. New catalytic methods for the synthesis of vitamins k. Reaction kinetics and Catalysis letters. 1996.57: 375-381.
37. Merck research laboratories. Merck Index. 1997.
38. Murthy, k. A novel and environmentally benign selective route for vitamin k3 synthesis. Applied catalysis. 2002. 228: 161-165.
39. Nakaoji, S. Preparation of menadione with recycling dichromic acid and sulphuric acid. 1995. Patent JP 92-72044.
40. Panreac. Manual medios de cultivo. 1999.
41. Rosenfeld L. Vitamine-Vitamin.The early years of discovery. Clinical Chemistry. 1997. 43: 680-685.
42. Russel McDowell, L. Vitamins in animal and human nutrition(2000), Iowa state University Press,Capitol 5 (227-263).
43. Shige, T. Production of menadione with microorganism. 1994. Proposta de patent JP 6022775.
44. Suzuki, T. Process for preparing Vitamin k3 and k4 in supercritical methanol. 2002. Patent JP 2001-255804.
45. Taniyoshi,S. Production of Menadione with microorganism. 1994. Sol.licitud de Patent JP6022775.
46. Torres, E. Synthesis and properties of 6-(Hydroxymethyl)-9,9,10,10-tetracyanonaphtoquinodimethane. Journal of Organic chemistry. 1991. 56: 3737-3739.
47. Vandamme, E.J. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Elsevier Applied Science. 1989. Capitol 1 (1-11).
48. Whitby, P.W. Identification of members of *B.cepacia* complex by species specific PCR. Journal of clinical microbiology. 2000. 38:2962-2965.
49. Windstedt,W. Terminal oxidases in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 2000. 182:6557-6564

PÀGINES WEB CITADES

50. www.cofb.netweb.com. Col.legi de Farmacèutics de Barcelona .
51. www.biopsicologia.net Vitaminas hidrosolubles i liposolubles
52. www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed. National Center of Biotechnology International
53. www.ebi.ac.uk/clustalw/

7. AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria expressar tot el meu agraïment al director d'aquesta tesi, el doctor Rafael Montilla, per la seva gran ajuda a l'hora de dirigir aquest treball així com per la seva claredat en el plantejament dels diferents problemes que han aparegut al llarg de la tesi.

En segon lloc vull agrair als meus companys de IUCT, especialment als del departament de microbiologia, Javi, Ángel, Fran, Pilar, Anna, Elena i Jose Antonio, així com els diferents membres dels departaments de medi ambient, anàlisi i control i indústria química farmacèutica, Josep, Nati, Lúdia, Marc, Carles, Marta, Carme, Jaume, Francesc, Meri, Christiane, Alejandra, Maria, Anna, Paqui, David, Esther i a la resta del personal de IUCT, per la seva ajuda en camps com són la síntesis química i anàlisis químic. També vull agrair al Salva la seva ajuda en temes de Biologia mol.lecular, així com als membres del seu laboratori, al permetre'm treballar en el seu grup i poder tirar endavant en nombrosos punts crítics.

A nivell de suport econòmic i logístic vull destacar el paper de l'empresa on he realitzat aquest treball, IUCT, així com el seu principal membre, que és l'Escola Sant Gervasi, sense els quals ni tan sols se m'hauria passat pel cap poder realitzar aquest estudi, que també cal dir s'ha pogut dur a terme gràcies a les subvencions de la Generalitat de Catalunya a través de l'Àrea de Qualitat ambiental del Departament de Medi Ambient, que va concedir al projecte anomenat *Producció Biotecnològica de la Menadiona, una alternativa de la Química Verda* la subvenció corresponent als anys 2002, 2003 i 2004. També cal agrair de forma determinant al Ministeri de Ciència i Tecnologia que ha col.laborat al projecte presentat com *Producción Biotecnológica de la Menadiona. Una alternativa de la Química Verde* subvencionantlo sota els expedients FIT-010000-2001-45, 2002-74 i 2003-68.

Finalment a la família i als amics que han fet possible que en moments dolents pogués tirar endavant amb aquest llarg projecte. Així doncs gràcies a tothom que m'ha permès realitzar aquest treball durant els últims anys.

Gràcies