



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

*Inmovilización de transaminasas y amonio liasas y su  
aplicación en síntesis de compuestos aminados*

---

Memoria para optar al grado de doctor en **Biología** por  
la Universitat Autònoma de Barcelona

Presentada por

*Anthony Max Cárdenas Fernández*

*Bellaterra, Setiembre de 2012*

**Título:**

Inmovilización de transaminasas y amonio liasas y su aplicación en síntesis de compuestos aminados.

**dirigido por:**

Gregorio Álvaro Campos

Carmen López Díaz

Programa de Doctorado en Biotecnología

Departament d'Enginyeria Química

Escola d'Enginyeria

Universitat Autònoma de Barcelona

GREGORIO ÁLVARO CAMPOS, como profesor agregado del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona y CARMEN LÓPEZ DÍAZ como investigadora post-doctoral del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**CERTIFICAMOS:**

Que Anthony Max Cárdenas Fernández ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título **“Inmovilización de transaminasas y amonio liasas y su aplicación en síntesis de compuestos aminados”** presenta en esta memoria y que constituye su Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos en la Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona la mencionada Tesis, firmando el presente certificado en

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 13 de setiembre de 2012.

Dr. Gregorio Álvaro Campos

Dra. Carmen López Díaz



*Este trabajo de tesis se lo dedico a:*

*mis padres Filemón e Isabel,  
hermanos Paul, Rosa, Sandra y Piero  
sobrinos Richi, Matías, Adriano, Esteban y Luciano  
cuñados Fernando y Jenny  
Los quiero y extraño mucho.*

*Adam, por su compañía y paciencia  
que espero la tenga para siempre.*

## Agradecimientos

Después de casi 4 años de estancia en Barcelona, debo recordar y agradecer a todos aquellos que de una u otra forma estuvieron allí en las buenas y en las malas.

Indudablemente el mayor de los agradecimientos a Goyo y Carmen, por su asesoramiento, paciencia, enseñanzas, disponibilidad, amistad....por enseñarme algunas expresiones españolas, momentos de risas en las reuniones, etc. etc. No podrían haber sido mejores tutores.

Gracias a Gloria Caminal, pues fuiste el primer contacto para poder llegar acá. También quiero agradecer a Josep, quien me dio la oportunidad de participar en el proyecto Europeo y porque creo que eres un excelente ejemplo de profesionalismo.

A todos los miembros del grupo Aldolasas: Josep, Gloria C., Gloria G., Dolors y Carles; por el ánimo, consejos y por enseñarme que un grupo es más grupo cuando se trabaja entre amigos. A los que se fueron Inés, JuanMi, Cris, Alfred y Jordi; a los que se quedan Marcel·la, Dani, Martina, Gerad y Margot; a todos ellos, muchas gracias por los momentos compartidos.

Mil gracias a Milja Pesic y Rossmery, por todos los grandes momentos en el mejor laboratorio PROCESOS ENZIMÁTICOS, por las conversaciones (¡si nos oyeran!), por el tiempo frente al HPLC (sí, el achepelece), los días de limpieza y sobre todo por mantener un ambiente agradable de trabajo....uffff!!...me llevo los mejores recuerdos de ambas.

A todos aquellos que hicieron más agradable los días por el departamento y en especial a aquellos con quienes compartí despacho y mesa a la hora de la comida: Laura, Ernest, Marta, Carlos, Isaac, Andrea, Mariangel, Angélica, Zul, David, Toni, Oscar, Kristin, Arnaud, Pili, Lara...disculpen si me olvidé de alguien.

Agradezco a infinitamente a mis buenos amigos Adriana, Rodney, Mariana, Alhelí, Adriano y a todos aquellos con quienes compartí momentos inolvidables y que hicieron de Barcelona una ciudad mucho más agradable.

Agradezco a John Woodley y Pär Tufvesson por la oportunidad brindada para realizar la estancia en su grupo de investigación PROCESS de la Universidad Técnica de Dinamarca, igualmente agradecer a todos los miembros del grupo quienes me acogieron y me hicieron sentir como parte de su grupo.

Además, agradecer a Timo Korpela y Elvira Khalikova de la Universidad de Turku - Finlandia, quienes sin ningún interés también colaboraron con el desarrollo de una parte de la tesis.

Agradezco a la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo del Reino de España por el financiamiento de los estudios de doctorado.





# Índice

---

<b>Índice</b> .....	i
<b>Índice de tablas</b> .....	viii
<b>Índice de figuras</b> .....	x
<b>Abreviaturas</b> .....	xiii
<b>Resumen general</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	5
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	
<b>1.1. Biotransformación</b> .....	8
1.1.1. Células como biocatalizadores. ....	9
1.1.2. Enzimas como biocatalizadores.....	11
1.1.3. Procesos multienzimáticos. ....	14
<b>1.2. Biocatalizadores inmovilizados</b> .....	16
1.2.1. Transferencia de materia en enzimas inmovilizados. ....	17
1.2.2. Métodos de inmovilización.. ....	19
1.2.3. Inmovilización covalente en soportes de agarosa y derivados .....	23
1.2.3.1. Inmovilización de enzimas en soporte MANA-agarosa.....	23
1.2.3.2. Inmovilización de enzimas en soporte aspártico-agarosa.....	25
1.2.4. Inmovilización covalente en soporte Eupergit® .....	26
1.2.5. Inmovilización por atrapamiento en soporte LentiKats® .....	28
<b>1.3. Compuestos aminados de interés biotecnológico</b> .....	30
1.3.1. Aminoácidos.....	30
1.3.2. Aminas.....	34
<b>1.4. Enzimas transaminasas y amonio liasas</b> .....	36
1.4.1. Transaminasas.....	36
1.4.1.1. Mecanismo catalítico de transaminasas.....	38
1.4.1.2. L-aspartato transaminasa .....	40
1.4.1.3. ω-transaminasas.....	42
1.4.2. Aminoácido-amonio liasas .....	44
1.4.2.1. L-aspartato amonio liasa.....	45
<b>1.5. Referencias</b> .....	49

## Capítulo 2. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por L-aspartato transaminasa inmovilizado

<b>Resumen</b> .....	60
<b>2.1. Introducción</b> .....	61
<b>2.2. Objetivos</b> .....	66
<b>2.3. Metodología</b> .....	67
2.3.1. Enzima y reactivos químicos.....	67
2.3.2. Ensayos de estabilidad de AAT.....	67
2.3.3. Inmovilización de AAT por enlace covalente en Eupergit® C.....	67
2.3.4. Inmovilización de AAT por enlace covalente en MANA-agarosa.....	68
2.3.4.1. Preparación del soporte aldehído-agarosa.....	68
2.3.4.2. Preparación del soporte MANA-agarosa.....	68
2.3.4.3. Proceso de inmovilización de AAT en MANA-agarosa.....	69
2.3.5. Inmovilización de AAT por atrapamiento en LentiKats®.....	69
2.3.6. Seguimiento de los procesos de inmovilización.....	70
2.3.7. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado.....	71
2.3.8. Medida de la actividad enzimática de AAT.....	71
2.3.9. Determinación de los parámetros cinéticos.....	71
2.3.10. Medida de concentración de fenilpiruvato y L-fenilalanina.....	72
<b>2.4. Resultados y discusión</b> .....	73
2.4.1. Estabilidad de L-aspartato transaminasa.....	73
2.4.2. Determinación de los parámetros cinéticos de AAT.....	74
2.4.3. Inmovilización de AAT en Eupergit® C.....	76
2.4.4. Inmovilización de AAT en MANA-agarosa.....	79
2.4.5. Inmovilización de AAT en LentiKats®.....	82
2.4.6. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado.....	83
<b>2.5. Conclusiones</b> .....	89
<b>2.6. Referencias</b> .....	90

## Capítulo 3. Síntesis de L-aspartato catalizada por L-aspartato amonio liasa inmovilizado

<b>Resumen</b> .....	96
<b>3.1. Introducción</b> .....	97

<b>3.2. Objetivos</b> .....	100
<b>3.3. Metodología</b> .....	101
3.3.1. Enzima y reactivos químicos.....	101
3.3.2. Expresión de aspartasa (AspB).....	101
3.3.3. Purificación parcial de AspB.....	101
3.3.4. Ensayos de estabilidad de AspB.....	102
3.3.5. Inmovilización de AspB por enlace covalente en Eupergit® C.....	102
3.3.6. Inmovilización de AspB por enlace covalente en MANA-agarosa.....	103
3.3.7. Inmovilización de AspB por atrapamiento en LentiKats®.....	103
3.3.8. Seguimiento de los procesos de inmovilización.....	103
3.3.9. Síntesis de L-aspartato catalizada por AspB libre e inmovilizado.....	104
3.3.10. Reutilización de AspB inmovilizado.....	104
3.3.11. Medida de la actividad enzimática de AspB.....	104
3.3.12. Medida de concentración de L-aspartato.....	105
<b>3.4. Resultados y discusión</b> .....	106
3.4.1. Purificación de AspB.....	106
3.4.2. Estabilidad de AspB.....	107
3.4.3. Inmovilización de AspB.....	110
3.4.3.1. Inmovilización de AspB en Eupergit® C.....	110
3.4.3.2. Inmovilización de AspB en MANA-agarosa.....	112
3.4.3.3. Inmovilización de AspB en LentiKats®.....	113
3.4.4. Síntesis de L-aspartato.....	114
3.4.5. Reutilización de los biocatalizadores inmovilizados.....	118
<b>3.5. Conclusiones</b> .....	119
<b>3.6. Referencias</b> .....	120

## **Capítulo 4. Síntesis multienzimática de L-fenilalanina catalizada por aspartasa (AspB) y transaminasa (AT)**

<b>Resumen</b> .....	124
<b>4.1. Introducción</b> .....	125
<b>4.2. Objetivos</b> .....	128
<b>4.3. Metodología</b> .....	129
4.3.1. Enzimas y reactivos químicos.....	129

4.3.2. Expresión y purificación de AspB.....	129
4.3.3. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AT.....	129
4.3.4. Optimización de las condiciones de reacción multienzimática.....	130
4.3.4.1. Determinación de la proporción de Asp y FP .....	130
4.3.4.2. Determinación de la concentración de enzimas .....	130
4.3.5. Medida de la actividad enzimática de AspB y AT .....	130
4.3.6. Medida de la concentración de sustratos y productos .....	130
<b>4.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>131</b>
4.4.1. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por transaminasa (AT) .....	131
4.4.2. Optimización del proceso multienzimático .....	133
4.4.2.1. Determinación de la proporción de FP y Asp .....	133
4.4.2.2. Determinación de la concentración de enzimas .....	134
<b>4.5. Conclusiones .....</b>	<b>137</b>
<b>4.6. Referencias.....</b>	<b>138</b>

## **Capítulo 5. Síntesis de aminas aromáticas catalizada por $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) inmovilizado**

<b>Resumen .....</b>	<b>140</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>141</b>
<b>5.2. Objetivos .....</b>	<b>144</b>
<b>5.3. Metodología.....</b>	<b>145</b>
5.3.1. Enzima y reactivos químicos .....	145
5.3.2. Expresión de $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) .....	145
5.3.3. Permeabilización de células con actividad $\omega$ -TA.....	145
5.3.4. Inmovilización de células $\omega$ -TA en LentiKats <sup>®</sup> .....	145
5.3.5. Purificación parcial de $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) .....	146
5.3.6. Ensayos de estabilidad del enzima $\omega$ -TA .....	146
5.3.7. Inmovilización por enlace covalente de $\omega$ -TA en soportes derivados de agarosa .....	147
5.3.7.1. Inmovilización de $\omega$ -TA en MANA-agarosa .....	147
5.3.7.2. Preparación del soporte aspártico-agarosa .....	147
5.3.7.3. Aminación de la superficie de $\omega$ -TA.....	148
5.3.7.4. Inmovilización de $\omega$ -TA y $\omega$ -TA-NH <sub>2</sub> en soporte aspártico-agarosa.....	148

5.3.8. Inmovilización por enlace covalente de $\omega$ -TA en Eupergit <sup>®</sup> CM .....	148
5.3.9. Inmovilización por atrapamiento de $\omega$ -TA en LentiKats <sup>®</sup> .....	149
5.3.10. Seguimiento de los procesos de inmovilización.....	149
5.3.11. Síntesis de aminas aromáticas con biocatalizadores con actividad $\omega$ -TA.....	149
5.3.12. Reutilización de biocatalizadores inmovilizados con actividad $\omega$ -TA.....	151
5.3.13. Medida de la actividad enzimática de $\omega$ -TA .....	151
5.3.14. Medida de la concentración de las aminas aromáticas .....	151
<b>5.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>153</b>
5.4.1. Síntesis de aminas aromáticas catalizada por células con actividad $\omega$ -TA .....	153
5.4.1.1. Permeabilización de células $\omega$ -TA .....	153
5.4.1.2. Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por células $\omega$ -TA .....	154
5.4.1.3. Inmovilización de células $\omega$ -TA en LentiKats <sup>®</sup> y síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) .....	157
5.4.2. Síntesis de aminas aromáticas catalizada por el enzima $\omega$ -TA .....	159
5.4.2.1. Purificación parcial de $\omega$ -TA.....	159
5.4.2.2. Estabilidad de $\omega$ -TA .....	159
5.4.2.3. Inmovilización de $\omega$ -TA en soportes de derivados de agarosa .....	161
5.4.2.4. Inmovilización de $\omega$ -TA en Eupergit <sup>®</sup> CM .....	163
5.4.2.5. Inmovilización de $\omega$ -TA en LentiKats <sup>®</sup> .....	164
5.4.2.6. Síntesis de AFB catalizada por $\omega$ -TA libre e inmovilizado .....	164
5.4.3. Reutilización de células y enzima inmovilizados con actividad $\omega$ -TA .....	165
5.4.4. Determinación de la producción catalítica .....	167
<b>5.5. Conclusiones .....</b>	<b>169</b>
<b>5.6. Referencias .....</b>	<b>170</b>

## **Capítulo 6. Inmovilización de aspartasa mutado (AspB-C6)**

<b>Resumen .....</b>	<b>176</b>
<b>6.1. Introducción.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2. Objetivos .....</b>	<b>178</b>
<b>6.3. Metodología.....</b>	<b>179</b>
6.3.1. Enzima y reactivos químicos .....	179

6.3.2. Expresión de aspartasa mutado (AspB-C6).....	179
6.3.3. Purificación parcial de aspartasa mutado (AspB-C6).....	179
6.3.4. Inmovilización de AspB-C6 en Eupergit® C.....	180
6.3.5. Inmovilización de AspB-C6 en MANA-agarosa .....	180
6.3.6. Seguimiento de los procesos de inmovilización.....	180
6.3.7. Medida de la actividad enzimática de AspB-C6 .....	181
6.3.7.1. Síntesis de $\beta$ -aminobutirato .....	181
6.3.7.2. Derivatización de $\beta$ -aminobutirato.....	182
6.3.7.3. Cálculo de la actividad enzimática de AspB-C6.....	182
6.3.8. Análisis de $\alpha$ -aminobutirato .....	183
<b>6.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>184</b>
6.4.1. Determinación de la especificidad de AspB-C6.....	184
6.4.2. Purificación parcial de AspB-C6.....	186
6.4.3. Inmovilización de AspB-C6 .....	187
<b>6.5. Conclusiones .....</b>	<b>189</b>
<b>6.6. Referencias.....</b>	<b>190</b>
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>191</b>
<b>Anexos</b>	
<b>Anexo 1.</b> Cromatogramas y curva patrón de L-fenilalanina y fenilpiruvato .....	196
<b>Anexo 2.</b> Curva patrón de proteínas con albúmina sérica bovina (BSA) .....	198
<b>Anexo 3.</b> Cromatograma y curva patrón de L-aspartato derivatizado .....	199
<b>Anexo 4.</b> Cromatograma y curva patrón de AFB y FB .....	201
<b>Anexo 5.</b> Cromatograma y curva patrón de $\beta$ -aminobutirato .....	203

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Mercado mundial de enzimas .....	11
<b>Tabla 1.2.</b> Fuente de enzimas utilizados en diferentes industrias .....	12
<b>Tabla 1.3.</b> Reacciones multienzimáticas <i>ex-vivo</i> “one-pot” .....	15
<b>Tabla 1.4.</b> Ventajas y desventajas del uso de biocatalizadores inmovilizados .....	16
<b>Tabla 1.5.</b> Características generales de los soportes .....	22
<b>Tabla 1.6.</b> Inmovilización de biocatalizadores por atrapamiento en LentiKats® .....	29
<b>Tabla 1.7.</b> Producción de compuestos biotecnológicos por biotransformación .....	31
<b>Tabla 1.8.</b> Métodos de síntesis de $\alpha$ -aminoácidos.....	32
<b>Tabla 1.9.</b> Enzimas utilizados en la síntesis de aminoácidos .....	33
<b>Tabla 1.10.</b> Características generales de los enzimas.....	37
<b>Tabla 1.11.</b> Agrupación de transaminasas .....	38
<b>Tabla 1.12.</b> Enzimas aminoácido-amonio liasas .....	44
<b>Tabla 1.13.</b> Características generales de AspA y AspB .....	46
<b>Tabla 2.1.</b> Estabilidad de L-aspartato transaminasa (AAT) en presencia de los agentes bloqueadores de grupos epóxidos .....	74
<b>Tabla 2.2.</b> Inmovilización de AAT en Eupergit® C .....	77
<b>Tabla 2.3.</b> Efecto protector de los agentes estabilizantes en la actividad de AAT .....	78
<b>Tabla 2.4.</b> Inmovilización de AAT en MANA-agarosa .....	81
<b>Tabla 2.5.</b> Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado .....	86
<b>Tabla 3.1.</b> Purificación parcial de AspB.....	106
<b>Tabla 3.2.</b> Estabilidad de aspartasa (AspB) en presencia de los agentes bloqueadores de grupos epóxido .....	109
<b>Tabla 3.3.</b> Inmovilización de AspB en Eupergit® C .....	110
<b>Tabla 3.4.</b> Inmovilización de AspB por enlace covalente en soporte Eupergit® C y MANA- agarosa y por atrapamiento en LentiKats® .....	114
<b>Tabla 3.5.</b> Parámetros de la reacción de síntesis de L-aspartato (Asp) catalizada por AspB libre e inmovilizados .....	116
<b>Tabla 4.1.</b> Comparación de AAT y AT en la síntesis de L-fenilalanina .....	132
<b>Tabla 4.2.</b> Síntesis enzimática de Phe catalizada por AT a distintas concentraciones de L- aspartato .....	134
<b>Tabla 4.3.</b> Relación óptima de las concentraciones de los enzimas AspB y AT.....	135



<b>Tabla 5.1.</b> Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por células $\omega$ -TA libres no permeabilizadas y permeabilizadas.....	156
<b>Tabla 5.2.</b> Inmovilización por atrapamiento en soporte LentiKats <sup>®</sup> de células $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas .....	158
<b>Tabla 5.3.</b> Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizadas por células $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas inmovilizadas por atrapamiento en LentiKats <sup>®</sup> .....	158
<b>Tabla 5.4.</b> Purificación parcial de $\omega$ -TA .....	159
<b>Tabla 5.5.</b> Estabilidad de $\omega$ -TA en presencia de CDI y EDA .....	161
<b>Tabla 5.6.</b> Inmovilización de $\omega$ -TA (no modificado) y $\omega$ -TA-NH <sub>2</sub> (modificado por aminación) en soporte aspártico-agarosa (Asp-agarosa).....	163
<b>Tabla 5.7.</b> Inmovilización de $\omega$ -TA en Eupergit <sup>®</sup> CM y LentiKats <sup>®</sup> .....	164
<b>Tabla 5.8.</b> Síntesis AFB catalizada por $\omega$ -TA libre e inmovilizado.....	165
<b>Tabla 5.9.</b> Producción catalítica para la reacción de síntesis de 3-amino-1-fenilbutano catalizada por células $\omega$ -TA libres e inmovilizadas y el enzima $\omega$ -TA inmovilizado .....	168
<b>Tabla 6.1.</b> Purificación parcial de AspB-C6.....	186
<b>Tabla 6.2.</b> Inmovilización de AspB-C6 por formación de enlaces covalentes en soporte Eupergit <sup>®</sup> C y MANA-agarosa.....	187

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Estructura de la pared celular de bacterias <i>gram</i> -negativas.....	10
<b>Figura 1.2.</b> Obtención de enzimas intracelulares y extracelulares .....	13
<b>Figura 1.3.</b> Reacciones multienzimáticas.....	14
<b>Figura 1.4.</b> Eficacia ( $\eta$ ) de un biocatalizador inmovilizado en función del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) a diferentes valores de $\beta$ .....	19
<b>Figura 1.5.</b> Métodos de inmovilización de biocatalizadores.....	20
<b>Figura 1.6.</b> Consideraciones para la selección del método de inmovilización de biocatalizadores.....	21
<b>Figura 1.7.</b> Funcionalización del soporte de agarosa .....	24
<b>Figura 1.8.</b> Inmovilización de enzimas en soporte MANA-agarosa.....	25
<b>Figura 1.9.</b> Mecanismo de activación de grupos carboxilos por carbodiimidas y formación de enlaces covalentes con grupos amino.....	26
<b>Figura 1.10.</b> Inmovilización de enzimas en soporte Eupergit® .....	27
<b>Figura 1.11.</b> Inmovilización por atrapamiento en soporte LentiKats® .....	28
<b>Figura 1.12.</b> Clasificación de aminoácidos según la posición del grupo amino primario .....	30
<b>Figura 1.13.</b> Clasificación de $\beta$ -aminoácidos.....	34
<b>Figura 1.14.</b> Tipos de aminas de interés industrial.....	34
<b>Figura 1.15.</b> Reacción catalizada por transaminasas.....	36
<b>Figura 1.16.</b> Unión del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) en el centro activo de transaminasas formando una aldimina interna .....	39
<b>Figura 1.17.</b> Mecanismo catalítico de la reacción de transaminación.....	40
<b>Figura 1.18.</b> Reacciones catalizadas por L-aspartato transaminasa .....	41
<b>Figura 1.19.</b> Reacción catalizada por $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TA).....	42
<b>Figura 1.20.</b> Reacción catalizada por $\omega$ -TA en la síntesis de aminas quirales.....	43
<b>Figura 1.21.</b> Reacción catalizada por aminoácido amonio liasas.....	44
<b>Figura 1.22.</b> Reacción catalizada por L-aspartato amonio liasa o aspartasa.....	45
<b>Figura 1.23.</b> Centro activo de AspB en presencia del sustrato L-aspartato .....	47
<b>Figura 1.24.</b> Mecanismo de desaminación de L-aspartato catalizada por aspartasa.....	47
<b>Figura 2.1.</b> a) L-fenilalanina y b) Aspartamo.....	61
<b>Figura 2.2.</b> Vía metabólica bacteriana para la síntesis de L-fenilalanina.....	62
<b>Figura 2.3.</b> Síntesis de L-fenilalanina por biotransformación.....	63

<b>Figura 2.4.</b> Estabilidad de AAT a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica .....	73
<b>Figura 2.5.</b> Estabilidad de AAT a diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI).....	75
<b>Figura 2.6.</b> Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos $K_m$ y $r_{max}$ de AAT .....	75
<b>Figura 2.7.</b> Inmovilización de AAT en Eupergit® C en presencia de oxaloacetato .....	79
<b>Figura 2.8.</b> Inmovilización de AAT en MANA-agarosa.....	82
<b>Figura 2.9.</b> Reacción de síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT .....	84
<b>Figura 2.10.</b> Cinética de conversión de fenilpiruvato a L-fenilalanina catalizada por AAT inmovilizado en Eupergit® C.....	87
<b>Figura 2.11.</b> Perfiles de estabilidad enzimática de AAT durante la reacción de síntesis de L-fenilalanina .....	88
<b>Figura 3.1.</b> a) L-aspartato y b) Aspartamo .....	97
<b>Figura 3.2.</b> Síntesis enzimática de L-aspartato.....	98
<b>Figura 3.3.</b> Derivatización de L-aspartato con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB).....	105
<b>Figura 3.4.</b> Análisis SDS-PAGE de la purificación parcial de AspB .....	107
<b>Figura 3.5.</b> Estabilidad de AspB a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica .....	108
<b>Figura 3.6.</b> Estabilidad de AspB a diferentes concentraciones de CDI .....	109
<b>Figura 3.7.</b> Inmovilización de AspB en Eupergit® C.....	111
<b>Figura 3.8.</b> Inmovilización de AspB en MANA-agarosa.....	113
<b>Figura 3.9.</b> Reacción de síntesis de L-aspartato catalizada por AspB .....	114
<b>Figura 3.10.</b> Perfil de producción de L-aspartato en la reacción catalizada por AspB inmovilizado en Eupergit® C.....	115
<b>Figura 3.11.</b> Reutilización de AspB inmovilizado .....	118
<b>Figura 4.1.</b> Reacción multienzimática para la síntesis de L-fenilalanina catalizada por AspB (aspartasa) y AT (transaminasa).....	126
<b>Figura 4.2.</b> Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AT y AAT.....	132
<b>Figura 4.3.</b> Síntesis multienzimática de Phe catalizada por AspB y AT.....	136
<b>Figura 5.1.</b> Fármaco dilevalol .....	141
<b>Figura 5.2.</b> Síntesis de aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por $\omega$ -TA.....	150
<b>Figura 5.3.</b> Permeabilización de células $\omega$ -TA con CTAB y etanol .....	153
<b>Figura 5.4.</b> Rendimientos de reacción en la síntesis de aminas aromáticas .....	154
<b>Figura 5.5.</b> Estabilidad $\omega$ -TA a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica .....	160

<b>Figura 5.6.</b> Reutilización de biocatalizadores con actividad $\omega$ -TA en la síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB).....	167
<b>Figura 6.1.</b> Reacción catalizada por aspartasa mutado (AspB-C6).....	181
<b>Figura 6.2.</b> Derivatización de $\beta$ -aminobutirato con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno.....	182
<b>Figura 6.3.</b> Reacciones catalizadas por AspB y AspB-C6.....	184
<b>Figura 6.4.</b> Especificidad de AspB-C6.....	185

## Abreviaturas

AAT = L-aspartato transaminasa.

AF = acetofenona.

AFB = 3-amino-1-fenilbutano.

AL = aminoácido-amonio liasa.

Ala = L-alanina.

Asp = L-aspartato.

Asp-agarosa = soporte aspártico agarosa.

AspA = L-aspartato amonio liasa o aspartasa de *Escherichia coli*.

AspB = L-aspartato amonio liasa o aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1.

AspB-C6 = aspartasa mutado (a partir de AspB).

ATs = aminotransferasas o transaminasas.

AT = transaminasa de origen bacteriano.

BSA = albúmina sérica bovina.

CDI = N<sup>3</sup>-(3-dimetilaminopropil)-N<sup>1</sup>-etil carbodiimida.

CTAB = bromuro de cetrimonio.

DCW = peso seco de células.

DNFB = 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno.

FB = 4-fenil-2-butanona.

FEA = 1-feniletilamina.

FP = fenilpiruvato.

IPA = isopropilamina.

$K_c$  = constante de equilibrio.

$K_m$  = constante de Michaelis-Menten.

MA = metilamina.

MANA = monoaminometil-N-aminoetil.

OA = oxaloacetato.

Phe = L-fenilalanina.

$pI$  = punto isoeléctrico.

$pK_a$  = constante de disociación.

PLP = piridoxal-5'-fosfato.

PMP = piridoxamina-5'-fosfato.

PVA = alcohol polivinílico.

## *Índice*

---

$r_{max}$  = velocidad máxima de reacción.

$r_o$  = velocidad inicial de reacción.

2-ME = 2-mercaptoetanol.

$\alpha$ -KG =  $\alpha$ -cetoglutarato.

$\alpha$ -abut =  $\alpha$ -aminobutirato.

$\beta$ -abut =  $\beta$ -aminobutirato.

$\eta$  = factor de eficacia.

$\Phi$  = módulo de Thiele.

$\omega$ -TA = omega-transaminasa.

# Resumen general

---

Los compuestos aminados son de gran interés industrial y tienen una gran demanda sobre todo en la industria alimentaria, farmacéutica y agroquímica. La síntesis de estos compuestos se realiza por métodos químicos, por fermentación (especialmente en el caso de los aminoácidos) o por biotransformación.

La síntesis de compuestos aminados por biotransformación mediante células y/o enzimas ha ganado terreno frente a los métodos químicos convencionales debido a la gran eficacia catalítica de los biocatalizadores, a su alta especificidad y selectividad, a su capacidad para operar en condiciones moderadas (pH, temperatura, etc.) y al menor impacto medioambiental.

El presente trabajo de tesis doctoral es un aporte al desarrollo de procesos biocatalíticos para la síntesis de compuestos aminados de interés industrial como son los aminoácidos L-fenilalanina, L-aspartato y  $\beta$ -aminobutirato; y las aminas aromáticas 1-feniletilamina y 3-amino-1-fenilbutano.

Para la síntesis del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina (Phe) se establecieron dos métodos enzimáticos. En el primero, se sintetizó Phe a partir de fenilpiruvato y L-aspartato empleando como biocatalizador L-aspartato transaminasa (AAT) de corazón porcino inmovilizado. Se optimizaron los métodos de inmovilización de AAT por enlace covalente en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa y por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>; y tanto el enzima soluble como los biocatalizadores inmovilizados resultantes se emplearon en la síntesis de Phe. La inmovilización en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup> permitió mejorar la estabilidad del enzima AAT, así como alcanzar rendimientos de reacción de síntesis de Phe superiores al 70% (**capítulo 2**). Además se estableció un método de síntesis multienzimática “one-pot” de Phe empleando como sustratos fenilpiruvato y fumarato, para lo que se acoplaron las reacciones catalizadas por los enzimas aspartasa (AspB) y transaminasa (AT). Se determinó la compatibilidad de los enzimas en las condiciones de reacción (pH 7,5 y 37°C) y se establecieron las concentraciones óptimas de los sustratos (0,15 M de fumarato, 0,3 M de NH<sub>4</sub>Cl y 0,1 M de fenilpiruvato) y de los enzimas (0,3 U de AspB/mL y 2 U de AT/mL). En estas condiciones, el rendimiento global de reacción fue de 80% (**capítulo 4**).

Para la síntesis de L-aspartato (Asp) se utilizó el enzima L-aspartato amonio liasa o aspartasa (AspB) de *Bacillus* sp. YM55-1 parcialmente purificado. El enzima se inmovilizó en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup>. Los biocatalizadores inmovilizados permitieron la síntesis de altas concentraciones de Asp ( $\geq 60$  g/L). Además, el enzima



inmovilizado se reutilizó eficientemente en la síntesis del aminoácido, manteniendo alrededor del 90% de su actividad inicial al cabo de 5 ciclos de reacción en todos los casos (*capítulo 3*).

La síntesis de las aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) se llevó a cabo utilizando biocatalizadores (células y/o enzima parcialmente purificado) con actividad  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA). Se estableció un método de permeabilización de las membranas de células  $\omega$ -TA utilizando bromuro de cetrimonio (CTAB). Las células  $\omega$ -TA se inmovilizaron por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup> con un 100% de retención de su actividad catalítica. El enzima  $\omega$ -TA se inmovilizó en varios soportes, obteniéndose los mejores resultados en Eupergit<sup>®</sup> CM y LentiKats<sup>®</sup>. La inmovilización en LentiKats<sup>®</sup>, tanto de células (no permeabilizadas y permeabilizadas) como del enzima, permitió la reutilización de los catalizadores hasta en 5 y 10 ciclos de síntesis de AFB, manteniendo alrededor del 80 y 70% de la actividad inicial, respectivamente (*capítulo 5*).

Por último, se comprobó que el enzima aspartasa mutado (AspB-C6) a partir de AspB, cataliza la reacción de aminación regioselectiva del ácido crotonico para producir  $\beta$ -aminobutirato. Este enzima se inmovilizó en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa según los métodos de inmovilización establecidos para el enzima AspB en los mismos soportes. Se obtuvieron rendimientos de inmovilización similares pero las actividades retenidas fueron significativamente inferiores para AspB-C6 que para AspB (*capítulo 6*).

El presente trabajo de tesis se enmarca dentro del proyecto europeo “*Implementation of an enzyme engineering technology platform for the provision of tailor-made enzymes for biocatalytic synthesis*” (ERA-IB Eng Biocat), que se desarrolló durante el periodo comprendido entre marzo de 2009 y marzo de 2012.

Parte de este trabajo se realizó en colaboración con diferentes instituciones europeas:

Los enzimas recombinantes aspartasa (AspB),  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) y aspartasa mutado (AspB-C6) fueron clonados en *E. coli* BL21(D3) por la compañía c-LEcta (Leipzig, Alemania) quien suministró las cepas y plásmidos.

El enzima transaminasa empleado en la síntesis multienzimática de L-fenilalanina fue proporcionado por el profesor Timo Korpela y la Dra. Elvira Khalikova del Laboratorio “Joint Biotechnology” de la Universidad de Turku, Finlandia.

## *Resumen general*

---

Asimismo, parte de la experimentación relacionada con la síntesis de aminas aromáticas mediante células  $\omega$ -TA inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup> se realizó en las instalaciones del grupo de investigación PROCESS del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica de la Universidad Técnica de Dinamarca, a cargo del profesor John Woodley y bajo la supervisión del Dr. Pär Tufvesson.

# Objetivos

---

## *Objetivos*

---

El objetivo global del presente trabajo de tesis es establecer procesos biocatalíticos para la síntesis de los aminoácidos L-fenilalanina, L-aspartato y  $\beta$ -aminobutirato, y de las aminas aromáticas 1-feniletilamina y 3-amino-1-fenilbutano, usando biocatalizadores con actividad transaminasa y amonio liasa inmovilizados por técnicas de formación de enlaces covalentes (en el caso de enzimas) y por atrapamiento (tanto de enzimas como de células).

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

-Establecer dos métodos enzimáticos para la síntesis del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina (Phe); el primero, usando como biocatalizador L-aspartato transaminasa (AAT) de corazón porcino inmovilizado; el segundo, mediante un método de síntesis multienzimática catalizada por L-aspartato amonio liasa (aspartasa, AspB) y transaminasa (AT).

-Establecer un método enzimático para la síntesis de altas concentraciones del aminoácido L-aspartato usando como biocatalizador L-aspartato amonio liasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) inmovilizado.

-Establecer un método de síntesis de las aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB), usando como biocatalizadores células con actividad  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) inmovilizadas y el enzima  $\omega$ -TA inmovilizado.

-Inmovilizar el enzima aspartasa mutado (AspB-C6, a partir de AspB) por extrapolación de los métodos de inmovilización establecidos para AspB y sintetizar  $\beta$ -aminobutirato utilizando AspB-C6.

# CAPÍTULO 1

---

## *Introducción general*

## **1.1. Biotransformación**

El término biotransformación, biocatálisis o bioconversión hace referencia a las reacciones químicas que tienen lugar mediante la acción de catalizadores de origen biológico o biocatalizadores. Los biocatalizadores pueden ser células (bacterias, hongos, etc.), enzimas y/o sistemas enzimáticos.

Los biocatalizadores presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos usados en la industria:

*i)* Debido a su origen biológico, los biocatalizadores actúan en medios acuosos y condiciones suaves de temperatura (20 - 40°C), de pH (5 - 7) y de presión (atmosférica), con excepción de los biocatalizadores de origen extremófilo (termófilos, psicrófilos, halófilos, barófilos, etc), que pueden actuar en condición más extremas según sus características particulares [1].

*ii)* Presentan gran actividad catalítica y por lo general tienen gran especificidad por el sustrato y elevada selectividad respecto a la reacción que catalizan; como consecuencia se reduce la formación de subproductos por reacciones colaterales [2].

*iii)* Son biodegradables, por lo que disminuyen el impacto medioambiental de los procesos que catalizan.

Todas estas ventajas contribuyen al ahorro del consumo de agua, energía y materias primas y a la reducción de los costes de operación y de tratamiento de residuos, lo que permite incrementar el rendimiento de los procesos y reducir considerablemente los costes finales asociados a la síntesis del producto de interés [3].

La aplicación de células y/o enzimas juega un rol importante principalmente en la industria química, agroquímica, farmacéutica (síntesis de fármacos o intermediarios), alimentaria y textil, así como en el tratamiento de residuos (domésticos y/o industriales) [4]. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones generales para poder justificar el uso de biocatalizadores como la mejor alternativa [5]:

*i)* El proceso debe ser económicamente viable; por ejemplo, en la industria farmacéutica se recomienda que la concentración final del producto esté en el rango de 50 – 100 g/L y que la relación entre el peso de producto y el peso de biocatalizador debe ser al menos 1000 si se emplean enzimas y de 15 para células.

ii) En el caso de que se requieran productos con una función biológica determinada (fármacos, alimentos, etc.) y con una estereoquímica definida, éstos deben tener un exceso enantiomérico como mínimo del 98%.

### 1.1.1. Células como biocatalizadores

Muchos microorganismos (bacterias, hongos o levaduras) han sido utilizados desde la antigüedad en la elaboración de vino, cerveza, pan, etc. Actualmente, el uso de microorganismos a nivel industrial se lleva a cabo con mucho éxito en la producción de compuestos tales como antibióticos, alcoholes, esteroides, aminoácidos, etc [6].

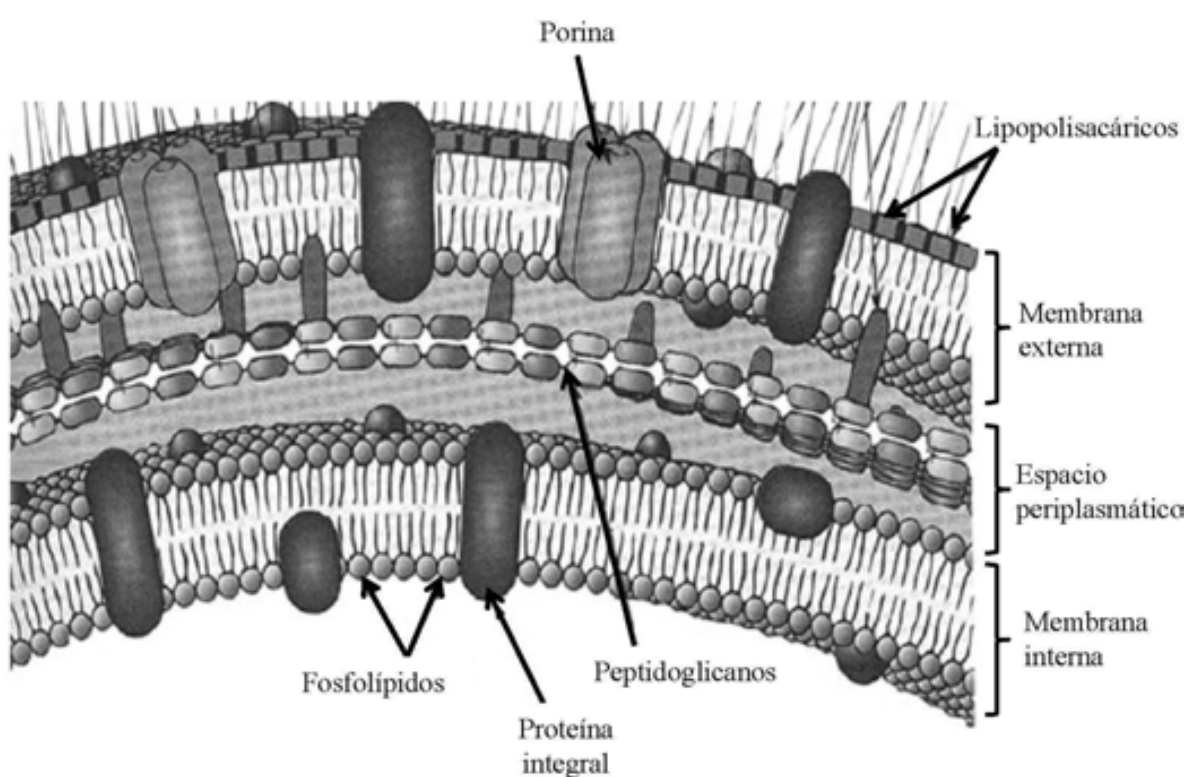
La aplicación de células como biocatalizadores constituye una excelente alternativa frente al empleo de enzimas, especialmente desde el punto de vista económico. El coste total del proceso suele ser menor que el de los procesos catalizados por enzimas, pues se evitan los pasos de purificación de éstos, que suelen ser tediosos y a menudo implican un alto coste [5, 7]. Por otra parte, la maquinaria enzimática/metabólica de la célula permite llevar a cabo reacciones de síntesis en cascada o favorecer la eliminación de sub-productos de reacción. Además, la aplicación de células facilita la regeneración *in-situ* de cofactores (ej. NADH, NADPH, etc.) evitándose el uso de reacciones enzimáticas acopladas que son necesarias cuando se utilizan enzimas dependientes de cofactor como deshidrogenasas (dependientes de NADH). Por último, las células se pueden separar al final del proceso (por centrifugación o filtración) lo que permite su reutilización y facilita la recuperación del producto final [8].

Sin embargo, el uso de células puede implicar un incremento de reacciones colaterales y formación de productos no deseados. Además, las células son sensibles a la presencia de altas concentraciones de sustratos o productos y a la presencia de disolventes orgánicos, por lo que su uso se limita a medios acuosos [5, 8].

Otro inconveniente del uso de células como biocatalizadores es la baja velocidad a la que catalizan las reacciones, que usualmente es de 1 ó 2 órdenes de magnitud menor que la velocidad de las reacciones catalizadas por los enzimas aislados. Ésto está asociado directamente a la estructura de las membranas celulares que actúan como una barrera semipermeable, dificultando la difusión de los sustratos del medio hacia el interior de la célula y de los productos hacia el exterior [9].

En general, las bacterias están constituidas de dos membranas denominadas interna y externa (Figura 1.1). En el caso de las bacterias *gram-negativas* como *Escherichia coli*, la membrana

interna consiste en una bicapa fosfolipídica de carácter netamente hidrofóbico. Las moléculas hidrofóbicas pueden atravesarla sin mucha dificultad, mientras que las moléculas hidrofílicas (como por ejemplo algunos aminoácidos o azúcares) lo hacen a través de proteínas integrales de membrana que actúan como transportadores específicos. Por otro lado, la membrana externa está constituida por lipopolisacáridos (LPS) y es de carácter anfifílico, de modo que dificulta el paso tanto de moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas. Esto afecta especialmente a aquellas moléculas que no son esenciales para la célula, puesto que los compuestos esenciales (azúcares, aminoácidos, iones, etc.) entran por difusión facilitada a través de canales específicos o porinas [10, 11].



**Figura 1.1.** Estructura de la pared celular de bacterias gram-negativas (ej. *Escherichia coli*).

El tratamiento de células con agentes permeabilizantes de las membranas constituye una solución al problema de la lenta o pobre difusión de los sustratos a través de las membranas, con lo cual se logra incrementar la velocidad de reacción. De manera general, los agentes permeabilizantes actúan sobre la estructura de las membranas causando un cambio



conformacional de las mismas, haciéndolas más fluidas y menos resistentes al paso de moléculas (ej. sustratos usados en las reacciones de síntesis) [9].

La permeabilización de células se puede realizar usando agentes de diferentes características, tales como: disolventes orgánicos (ej. etanol y alcohol isopropílico), detergentes o surfactantes (ej. Tritón X-100 y bromuro de cetrimonio - CTAB) o altas concentraciones de sales (ej. NaCl). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito un protocolo único para la permeabilización de células. El método seleccionado dependerá principalmente del tipo de células y del proceso en el cual se utilizarán las células permeabilizadas; y se definirá mediante parámetros tales como: el tipo de agente permeabilizante, la relación entre las concentraciones de células y del agente permeabilizante, tiempo de contacto, temperatura, etc [9, 12-14].

### 1.1.2. Enzimas como biocatalizadores

Actualmente, alrededor de 500 productos comercializados son producidos utilizando enzimas, cuyo campo de aplicación estaría distribuido según la Tabla 1.1 [15]. El mercado mundial de enzimas alcanzó 3700 millones de dólares en 2006 y se incrementó hasta 5100 millones en 2009, lo cual demuestra el creciente interés por este tipo de productos y procesos [16].

**Tabla 1.1.** Mercado mundial de enzimas [15].

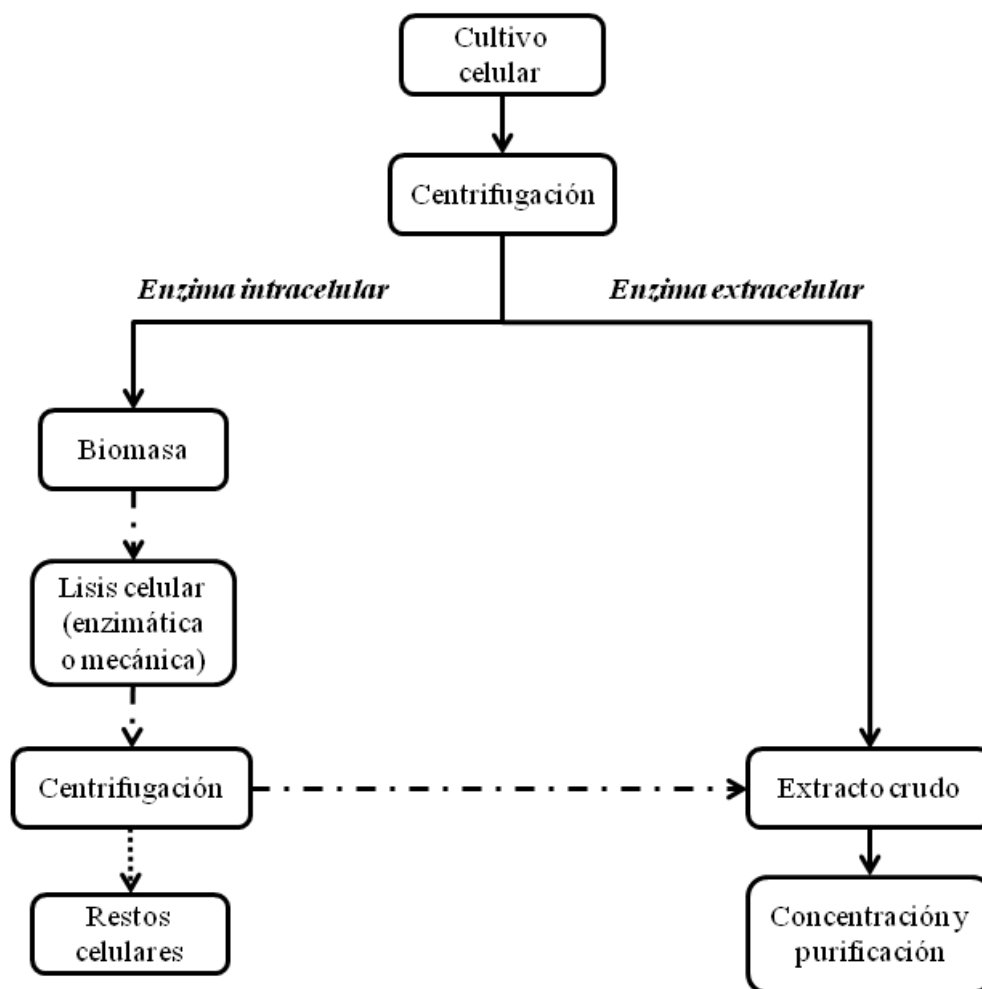
<b>Industria</b>	<b>Mercado (%)</b>
Alimentación	45
Detergentes	34
Textil	11
Cuero	3
Farmacéutica, papel, otros	7

Los enzimas usados en los diferentes campos ya mencionados son básicamente de origen bacteriano y fúngico. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Fuente de enzimas utilizados en diferentes industrias [16].

<b>Enzima</b>	<b>Fuente</b>	<b>Microorganismo (género)</b>	<b>Aplicación industrial</b>
$\alpha$ -amilasa	Bacteria	<i>Bacillus</i>	Panadería
Asparginasa	Bacteria	<i>Escherichia</i>	Farmacéutica
Celulasa	Bacteria	<i>Clostridium</i>	Tratamiento de residuos
Proteasa	Bacteria	<i>Bacillus</i>	Detergente
Lipasa	Hongo	<i>Candida</i>	Alimentación, detergente
Xilanasas	Hongo	<i>Aspergillus</i>	Papel
Rennina	Hongo	<i>Mucor</i>	Alimentación (quesos)

Los enzimas se pueden clasificar en función de su lugar de acción en extracelulares o intracelulares. Los enzimas extracelulares son excretados al medio de cultivo, y para su recuperación y purificación se aplican diferentes técnicas tales como: centrifugación, filtración, ultrafiltración, precipitación (mediante disolventes o agentes precipitantes), cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, etc. Para la recuperación de enzimas intracelulares, es necesario añadir un paso previo de lisis celular (por métodos enzimáticos o mecánicos) para liberar al enzima al medio; a partir de ahí se continúa con los mismos procedimientos aplicados para los enzimas extracelulares (Figura 1.2). El grado de pureza que debe alcanzar el enzima dependerá de su futura aplicación; así, la pureza deberá ser alta en el caso de una aplicación terapéutica, pero no es necesario un alto grado de pureza en el caso de enzimas que serán utilizados en el tratamiento de residuos [17].



**Figura 1.2.** Obtención de enzimas intracelulares y extracelulares.

Actualmente, gracias al rápido desarrollo de la ingeniería de proteínas y de la bioinformática, es posible mejorar las características propias de los enzimas. Por ejemplo, es posible incrementar su estabilidad en condiciones adversas (pH, temperatura, etc.), mejorar o incrementar la especificidad por su sustrato, eliminar los efectos de inhibición por sustrato y/o producto, etc [18, 19]. Asimismo, los avances en biología molecular y en la tecnología de ADN recombinante han permitido el aislamiento del gen o genes que codifican el enzima de interés, que posteriormente puede ser clonado en otra célula huésped (ej. *Escherichia coli* para proteínas no glicosiladas). De este modo se logra que el enzima sea expresado en cantidades mucho mayores (sobreexpresión) que cuando se produce naturalmente. Así se consigue incrementar los niveles de producción y disminuir los costes del proceso y el precio final del producto [20, 21].

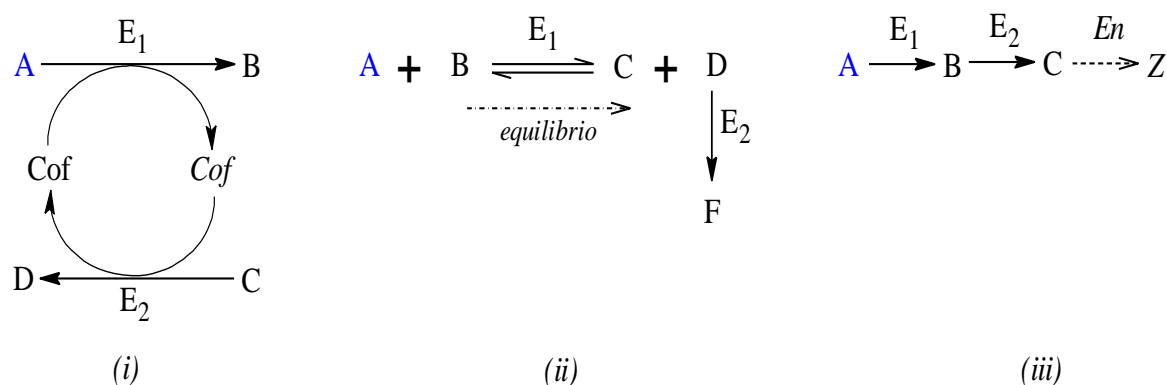
### 1.1.3. Procesos multienzimáticos

Los procesos multienzimáticos o de reacciones acopladas son aquellos procesos que se llevan a cabo utilizando dos o más biocatalizadores (enzimas y/o células) para la obtención de un producto de interés. Los procesos multienzimáticos se utilizan con diferentes objetivos (Figura 1.3) [22, 23]:

*i)* Regeneración de cofactores (ej. NADH). En este tipo de procesos, el primer biocatalizador dependiente de cofactor cataliza la reacción de interés mientras que el segundo se aplica para llevar a cabo la regeneración del cofactor.

*ii)* Desplazamiento del equilibrio de reacción hacia la formación de productos. Por ejemplo, para el caso de reacciones con la formación de un producto de interés y un subproducto con una constante de equilibrio ( $K_c$ ) muy pequeña, una segunda reacción acoplada que emplee el subproducto como sustrato favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del producto de interés.

*iii)* Simplicidad del proceso evitando los pasos de recuperación y/o purificación de compuestos intermediarios. Para este tipo de bioprocesos, el producto de la primera reacción sirve de sustrato de la segunda reacción.



**Figura 1.3.** Reacciones multienzimáticas. *(i)* Regeneración de cofactor (Cof y Cof es el cofactor en sus dos diferentes estados); *(ii)* desplazamiento del equilibrio de reacción y *(iii)* reacción multienzimática secuencial.

Los procesos multienzimáticos pueden ser clasificados como procesos *in-vivo* y *ex-vivo*. Los procesos multienzimáticos *in-vivo* son aquellos procesos que tienen lugar dentro de las células utilizando la maquinaria enzimática celular; en tanto que los procesos multienzimáticos *ex-vivo* se llevan a cabo utilizando diferentes enzimas aislados [24]. La principal ventaja de los procesos multienzimáticos *ex-vivo*, a diferencia de los procesos *in-vivo*, es que la reacción puede ser controlada y optimizada más fácilmente mediante la adición de cosolventes o bien mediante la variación de concentraciones de los sustratos y/o de los enzimas, temperatura o pH [24, 25].

El proceso en que la reacción de síntesis está catalizada por dos o más enzimas en un mismo reactor se denomina proceso multienzimático “one-pot” o de reacciones multienzimáticas simultáneas. En este caso, los enzimas utilizados deben ser compatibles con el medio de reacción, es decir, deben mantener su actividad catalítica y ser estables en las mismas condiciones de pH, temperatura, etc [24]. A diferencia de los procesos llevados a cabo con un único enzima, se han descrito pocos procesos en los que estén implicados dos o más enzimas [26, 27]. Algunos ejemplos de reacciones multienzimáticas *ex-vivo* “one-pot” se citan en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Reacciones multienzimáticas *ex-vivo* “one-pot”.

Sustratos	Producto final	Nº de etapas	Enzimas	Ref.
$\alpha$ -cetoácido + aminoácido	L-aminoácidos	2	1. Transaminasa 2. Deshidrogenasa	[28]
Almidón + agua	D-fructuosa	2	1. Glucoamilasa 2. Glucosa isomerasa	[29]
Glicerol + PP <sub>i</sub>	5-desoxi-5-etil-D-xilulosa	4	1. Fitasa 2. Oxidasa 3. Catalasa 4. Aldolasa	[30]
UMP + Acetil Pi + galactosa + Glucosa-1-P + ATP	Uridina-5'-difosfogalactosa	8	1. Galactoquinasa 2. Transferasa 3. Pirofosforilasa 4. UMP quinasa 5. Acetato quinasa	[31]

## **1.2. Biocatalizadores inmovilizados**

La inmovilización de biocatalizadores (enzimas o células) es el proceso por el cual se restringen completa o parcialmente los grados de libertad de movimiento del biocatalizador por unión a un soporte físico. En el caso de inmovilización de enzimas, éstos pasan de su forma soluble a una forma insoluble. La condición principal para que un proceso de inmovilización sea factible es que el biocatalizador mantenga su actividad catalítica total o parcialmente; en el caso de células y según sea necesario, que mantengan su viabilidad. Las principales ventajas y desventajas del uso de biocatalizadores inmovilizados se citan en la Tabla 1.4 [32].

**Tabla 1.4.** Ventajas y desventajas del uso de biocatalizadores inmovilizados.

---

<i>Ventajas</i>
- Posibilidad de reutilización continua del biocatalizador y disminución de los costes del proceso.
- Incremento de la estabilidad del biocatalizador.
- Incremento de la concentración del biocatalizador y aumento de la productividad.
- Facilidad de adaptación a diferentes configuraciones de biorreactor.
- Facilidad de separación del producto.

---

<i>Desventajas</i>
- Pérdida de actividad (viabilidad) del biocatalizador durante el proceso de inmovilización.
- Elevado precio del biocatalizador inmovilizado en comparación con su forma nativa.

---

La actividad catalítica de los enzimas depende estrictamente de su estructura terciaria y/o cuaternaria. Cuando el enzima se encuentra bajo condiciones adversas como valores extremos de pH, alta temperatura, presencia de cosolventes, etc, se pueden producir cambios conformacionales (modificación de la estructura molecular) del enzima por disociación de las subunidades, ruptura enlaces débiles, etc. De esta manera, la estructura del enzima se hace menos compacta y por lo tanto el enzima es mucho más susceptible a sufrir otras

modificaciones (agregación intermolecular, ruptura de puentes disulfuro, modificaciones químicas, etc.) y más propenso a su degradación por proteasas. Estas modificaciones conducen a la inactivación irreversible del enzima [33].

La inmovilización de enzimas es un método ampliamente utilizado que permite incrementar la rigidez del enzima y disminuir los cambios conformacionales del mismo, haciéndolos más estables y menos propensos a la inactivación. Sin embargo, la inmovilización puede producir una disminución de la eficacia catalítica por efecto de la difusión de sustratos y productos, además de una variación del microentorno, especialmente si el soporte utilizado está cargado eléctricamente, lo que implicaría cambios del pH óptimo de actividad enzimática [33, 34].

### 1.2.1 Transferencia de materia en enzimas inmovilizados

La inmovilización enzimática suele afectar a la difusión de los sustratos desde el medio de la reacción hacia el centro activo del enzima, así como a la difusión de los productos desde el centro activo hacia el medio. Las resistencias resultantes del confinamiento del enzima en un soporte pueden ser externas y/o internas, y pueden afectar negativamente a la velocidad de la reacción.

Las limitaciones difusionales externas son debidas a la presencia de una capa líquida estacionaria (capa de Nernst) que rodea al soporte sólido y que el sustrato debe atravesar para llegar a la superficie del soporte. Las limitaciones difusionales externas se eliminan fácilmente cuando la reacción se realiza a una velocidad de agitación suficientemente alta como para hacer despreciable el grosor de la capa de Nernst.

La difusión interna, para el caso en que el biocatalizador esté inmovilizado en el interior de partículas porosas, se refiere al transporte del sustrato a través de los poros del soporte hasta llegar al centro activo del enzima. Se habla de limitaciones difusionales internas cuando la velocidad de difusión es más lenta que la velocidad de reacción y, por tanto, la difusión limita la velocidad global observada [32, 35].

El grado del efecto de las limitaciones difusionales internas sobre la velocidad de reacción de un enzima se expresa mediante el factor de eficacia ( $\eta$ ):

$$\eta = \frac{\text{Velocidad de reacción observada}}{\text{Velocidad de reacción para el enzima libre}}$$

El factor de eficacia para un enzima con una cinética de reacción de Michaelis-Menten inmovilizado en un soporte de forma esférica se puede expresar gráficamente en función del Módulo de Thiele ( $\Phi$ ) y de  $\beta$ , los cuales se definen como se indica en las siguientes fórmulas [35]:

$$\eta = f(\Phi, \beta) \quad \Phi = \frac{r}{3} \cdot \sqrt{\frac{r_{max}}{D_s \cdot K_m}} \quad \beta = \frac{C_s}{K_m}$$

Donde:

$r$  = radio de la partícula del soporte esférico,

$r_{max}$  = velocidad máxima de reacción,

$D_s$  = coeficiente de difusividad del sustrato,

$K_m$  = constante de Michaelis-Menten,

$C_s$  = concentración del sustrato en el medio de reacción.

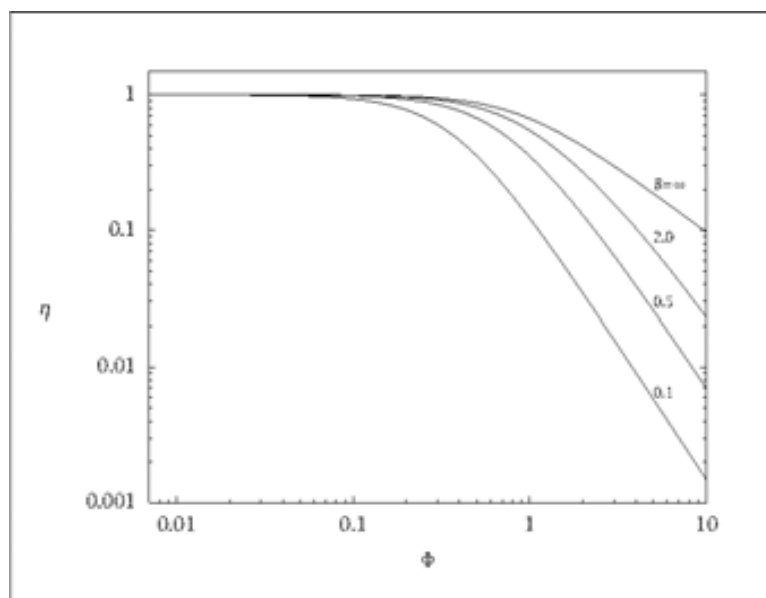
Por lo tanto, el cálculo del valor del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) para una determinada partícula de soporte y un enzima que cataliza una determinada reacción permite evaluar la existencia de limitaciones difusionales internas (Figura 1.4).

Para valores de  $\Phi$  muy grandes (valores pequeños de  $\eta$ ) la velocidad del proceso estaría controlada por la velocidad de difusión; por lo contrario, para valores pequeños de  $\Phi$  (valores cercanos a la unidad para  $\eta$ ) la velocidad del proceso estaría controlada por la velocidad de la reacción enzimática. Asimismo, para un mismo valor de  $\Phi$ , a medida que se incrementa la concentración de sustrato en el medio de reacción (valores altos de  $\beta$ ) el efecto de las limitaciones difusionales se hace más pequeño y por lo tanto el factor de eficacia también se incrementa (Figura 1.4) [35].

A partir de estas ecuaciones se observa que para minimizar el efecto de la difusión interna cuando ésta controla la velocidad de reacción se pueden seguir algunas estrategias, como disminuir el tamaño de partícula del biocatalizador inmovilizado o incrementar la



concentración del sustrato en el medio de reacción. En ambos casos se consigue aumentar el factor de eficacia y, por tanto, la velocidad del proceso [36].



**Figura 1.4.** Eficacia ( $\eta$ ) de un biocatalizador inmobilizado en función del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) a diferentes valores de  $\beta$ .

### 1.2.2. Métodos de inmovilización

Los métodos de inmovilización de biocatalizadores se pueden dividir en dos grandes grupos en función del modo en que tiene lugar la retención del enzima: métodos físicos y métodos químicos (Figura 1.5) [32].

La inmovilización por *atrapamiento* consiste en la retención física del biocatalizador en el interior de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros tales como poliacrilamida, alginatos, carragenatos, etc. En el caso de inmovilización por *encapsulación* el biocatalizador está rodeado de una membrana semipermeable que permite el paso de sustratos y productos pero no del biocatalizador. Ambos métodos de inmovilización suelen ser comúnmente aplicados para la inmovilización de células, pero apenas para enzimas, debido a que el tamaño de los poros de estos tipos de soporte suele ser mucho más grande que el de los enzimas, de modo que estos podrían difundir fuera del soporte.

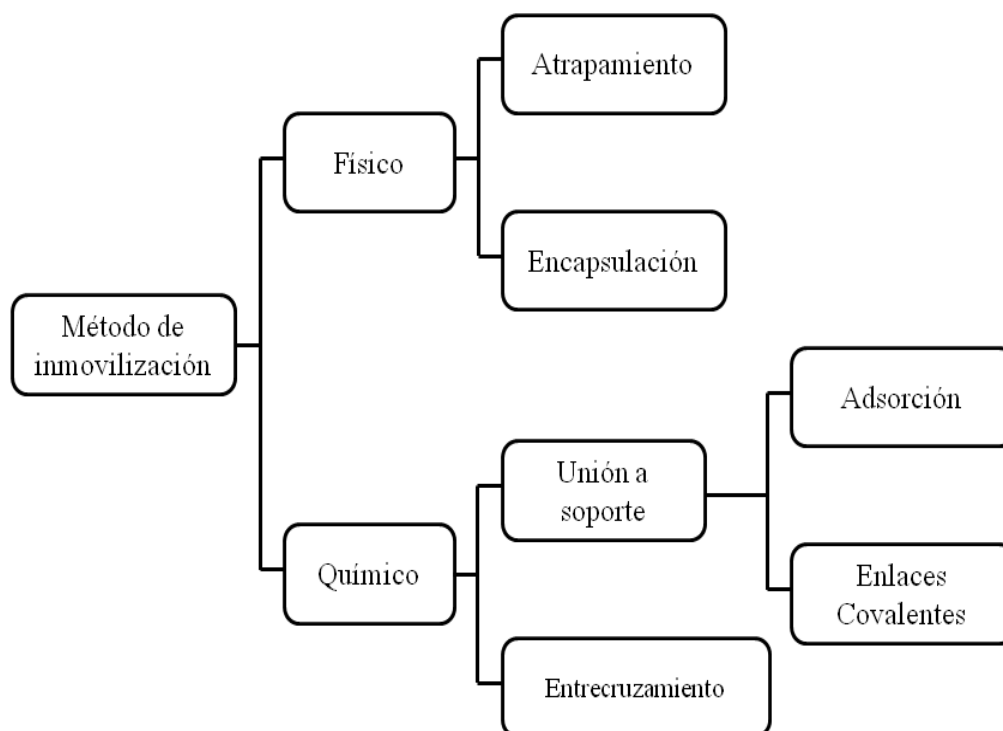
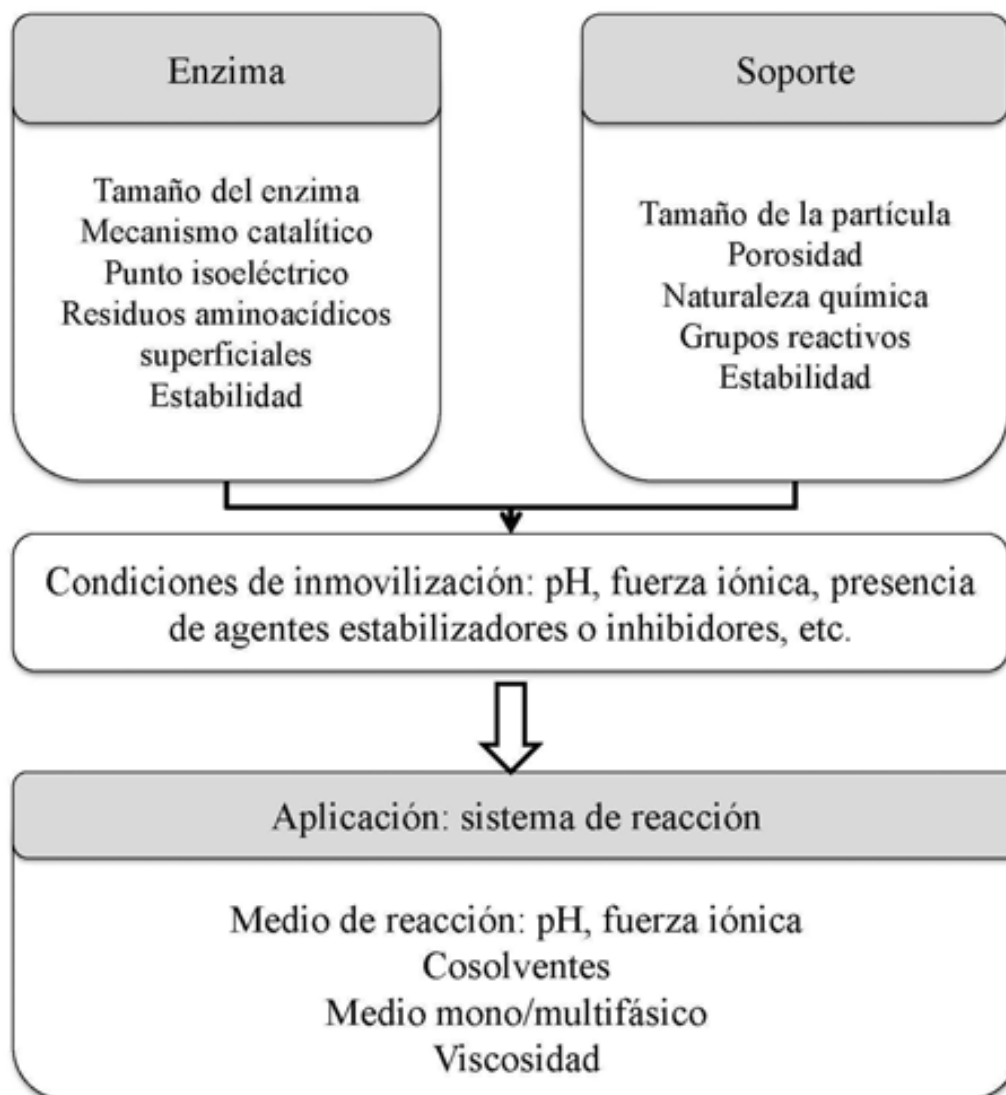


Figura 1.5. Métodos de inmovilización de biocatalizadores.

Los métodos de inmovilización química se clasifican en función del tipo de unión que se establece entre el biocatalizador y el soporte: por adsorción o por formación de enlaces covalentes. La unión por **adsorción** se produce por interacción de tipo iónico o fuerzas de atracción débiles entre el biocatalizador y el soporte. Este tipo de inmovilización es reversible. La **formación de enlaces covalentes** se produce tras una reacción química entre los grupos reactivos que se encuentran en la superficie del biocatalizador y los grupos funcionales del soporte, dando lugar a la formación de uno o más enlaces covalentes. Para el caso de la inmovilización por **entrecruzamiento**, no existe un soporte propiamente dicho. En este caso se produce una interacción directa entre las moléculas de biocatalizador, que puede ocurrir mediante la formación de enlaces covalentes (usualmente para enzimas, donde se hace uso de compuestos bifuncionales como glutaraldehído) o por floculación (en caso de células). El entrecruzamiento de enzimas se puede dar por formación de agregados o CLEAs (cross-linked enzyme aggregates) o por entrecruzamiento del enzima en su forma cristalina o CLECs (cross-linked enzyme crystals).

En la actualidad, se emplea una amplia gama de soportes para la inmovilización de biocatalizadores. Para seleccionar el método de inmovilización para un determinado biocatalizador es necesario tener en cuenta una serie de factores, como los relacionados con la naturaleza del biocatalizador y del soporte, las condiciones de inmovilización y la futura aplicación del biocatalizador inmovilizado. Estos factores se detallan en la Figura 1.6 [37].



**Figura 1.6.** Consideraciones para la selección del método de inmovilización de biocatalizadores.

Algunas características generales de los soportes utilizados en este trabajo de tesis se detallan en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Características generales de los soportes.

	Agarosa		Eupergit®		LentiKats®
	MANA	Aspártico	C	CM	
Naturaleza	Orgánico natural (agarosa 10 BCL)		Orgánico sintético (acrilamidas)		Orgánico sintético (alcohol polivinílico)
Diámetro de partícula	100 - 300 µm		≈ 150 µm	50 - 300 µm	3 - 4 mm
Tamaño de poro	Límite de exclusión = 10-500 kDa		radio ≈ 10 nm		N.D.
Mecanismo de inmovilización	1. Adsorción iónica 2. Formación de enlaces covalentes		1. Adsorción hidrofóbica 2. Formación de enlaces covalentes		Atrapamiento
Grupos reactivos del soporte	Aminos primarios	Carboxilos		Epóxidos (oxiranos)	-
Grupos reactivos de la proteína	Carboxilos	Aminos		Aminos / sulfhidrilos / hidroxilos	-
Grado de activación (µmol/g)	≈ 250	≈ 500		≈ 600	-

N.D. = no determinado o información no disponible.

### 1.2.3. Inmovilización covalente en soportes de agarosa y derivados

La agarosa es un polímero orgánico natural cuya unidad básica es la agarobiosa, que está compuesta por  $\beta$ -D-galactosa y  $\alpha$ -L-galactosa unidas alternadamente mediante enlace glucosídico (enlace covalente) por las posiciones 1-4. Los geles de agarosa tienen naturaleza hidrofílica debido a la presencia de una alta densidad de grupos hidroxilos en su superficie. Además poseen gran estabilidad química y buenas propiedades mecánicas. Estos geles a menudo se activan para obtener soportes de agarosa funcionalizados con grupos aldehído ( $-\text{COH}$ ), amino ( $-\text{NH}_2$ ), carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), sulfhidrilo ( $-\text{SH}$ ), etc.

En la Figura 1.7 se presenta un esquema general de la preparación de soportes de agarosa amino (MANA-agarosa) y carboxilo (aspártico-agarosa).

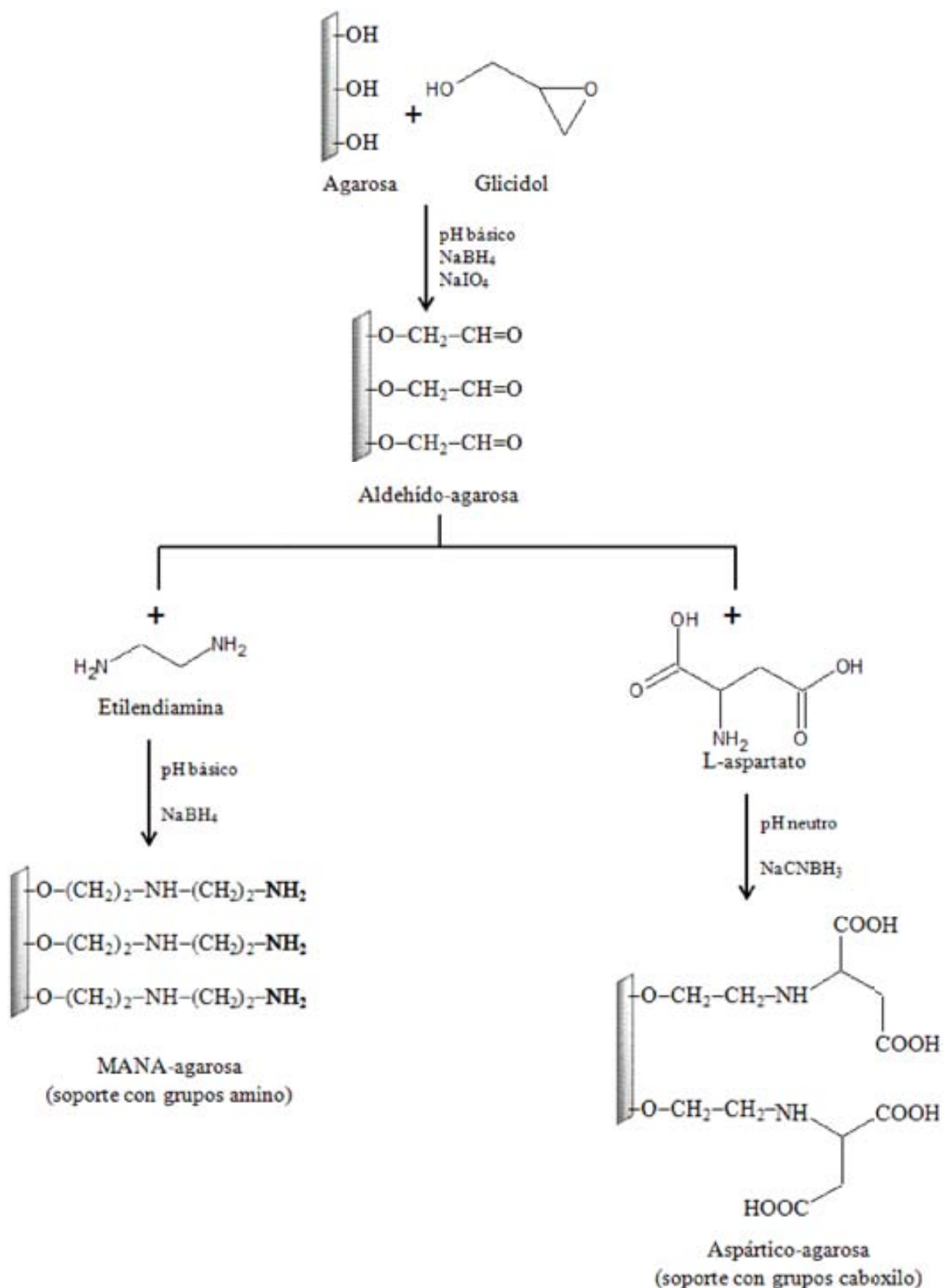
#### 1.2.3.1. Inmovilización de enzimas en soporte MANA-agarosa

La inmovilización de enzimas por formación de enlaces covalentes en el soporte monoaminometil-N-aminoetil agarosa o MANA-agarosa se lleva a cabo al reaccionar los grupos amino primarios ( $-\text{NH}_2$ ) del soporte con los grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) de la superficie enzimática.

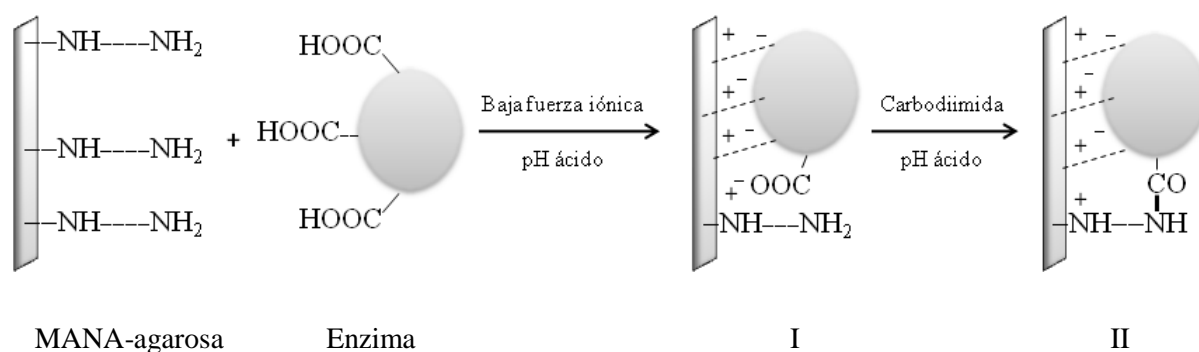
MANA-agarosa es un soporte que consta de dos tipos de grupos amino (Figura 1.8); el primero y más cercano al soporte es una amina secundaria ( $-\text{NH}-$ ) con un  $pK_a$  de 10, mientras que el segundo es una amina primaria ( $-\text{NH}_2$ ) con un  $pK_a$  de 6,8 [38]. Teniendo en cuenta estas propiedades del soporte, la inmovilización de enzimas en MANA-agarosa tiene lugar en dos etapas sucesivas: adsorción iónica y formación de enlaces covalentes.

En condiciones ácidas de pH (5 - 6), el soporte se encuentra cargado positivamente mientras que el enzima tiene carga negativa (enzimas con un punto isoeléctrico  $\leq 6$ ), produciéndose la adsorción iónica entre el enzima y el soporte. Para favorecer la adsorción iónica es necesario mantener una baja fuerza iónica durante el proceso de inmovilización

En las mismas condiciones de pH y fuerza iónica, tiene lugar la etapa de formación de enlaces covalentes entre el amino primario del soporte que se encuentra desprotonado ( $-\text{NH}_2$ ) y los grupos carboxilos del enzima (Figura 1.8).



**Figura 1.7.** Funcionalización del soporte de agarosa con grupos amino (soporte MANA-agarosa) y con grupos carboxilo (soporte aspártico-agarosa).



**Figura 1.8.** Inmovilización de enzimas en soporte MANA-agarosa.  
(I) Etapa de adsorción iónica y (II) etapa de formación de enlaces covalentes.

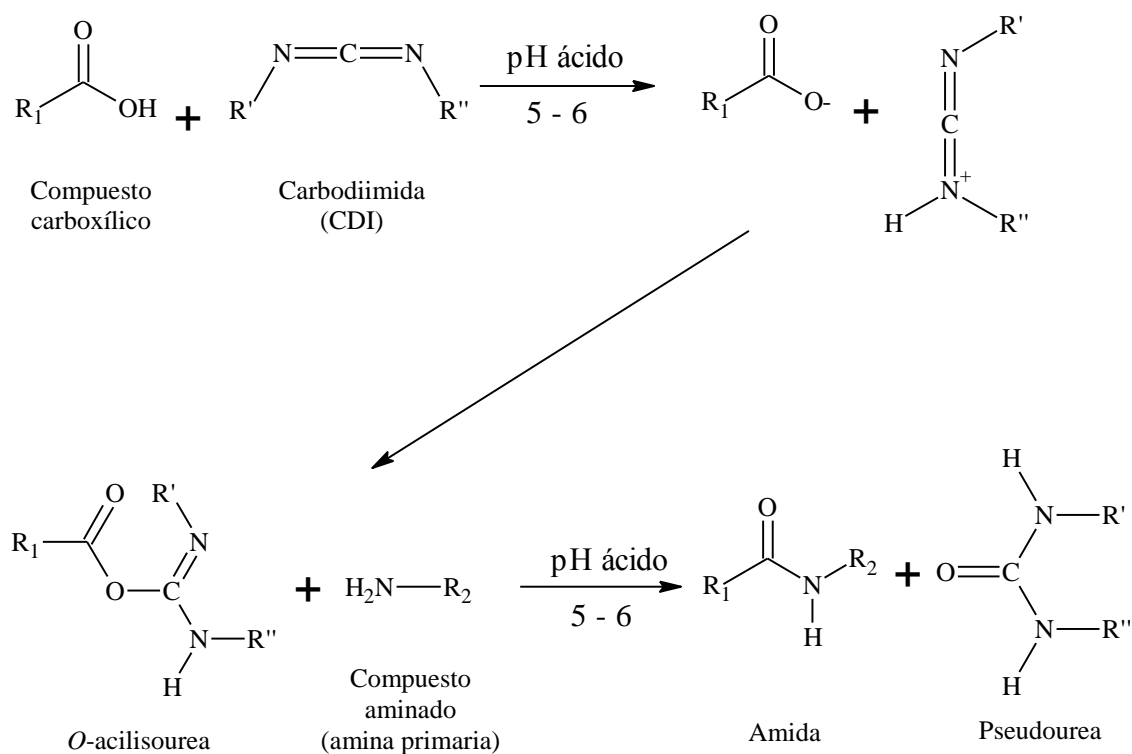
Para que esta reacción se pueda llevar a cabo es necesario añadir compuestos tipo carbodiimidas (CDIs) solubles en agua. Las CDIs son compuestos caracterizados por la presencia del grupo funcional  $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}$ , que actúa como activador de los grupos carboxilos haciéndolos sensibles al ataque nucleofílico de los grupos amino [39]. El mecanismo de activación de grupos carboxilos por CDI se detalla en la Figura 1.9. La concentración óptima de CDI durante el proceso de inmovilización en MANA-agarosa debe ser tal que asegure la formación de enlaces covalentes entre el soporte y el enzima, pero a la vez tenga un mínimo efecto negativo en la estabilidad del biocatalizador.

Pocos estudios han reportado la inmovilización de enzimas en este soporte. Fernández-Lafuente y col., quienes describieron por primera vez la preparación de MANA-agarosa, inmovilizaron el enzima  $\beta$ -galactosidasa en este soporte; obtuvieron una actividad retenida superior al 80% incluso utilizando bajas concentraciones de carbodiimida (1 mM) [38]. Pesic y col. inmovilizaron el enzima cloroperoxidasa en MANA-agarosa tanto por adsorción iónica como por enlaces covalentes mediante el uso de carbodiimida alcanzando 77 y 51% de actividad retenida respectivamente. La inmovilización mediante enlaces covalentes permitió incrementar el tiempo de vida media del enzima hasta en 500 veces y fue usado en la síntesis de Cbz-glicinal [40].

### 1.2.3.2. Inmovilización de enzimas en soporte aspártico-agarosa

La formación de enlaces covalentes entre el enzima y el soporte aspártico-agarosa tiene lugar entre los grupos carboxilos del soporte ( $-\text{COOH}$ ) y los grupos amino de la superficie del enzima ( $-\text{NH}_2$ ). La inmovilización de enzimas en este soporte se realiza en condiciones de

baja fuerza iónica y pH ácido, que favorecen la adsorción iónica del enzima en el soporte. Posteriormente, mediante la adición de carbodiimida tiene lugar la formación de enlaces covalentes.



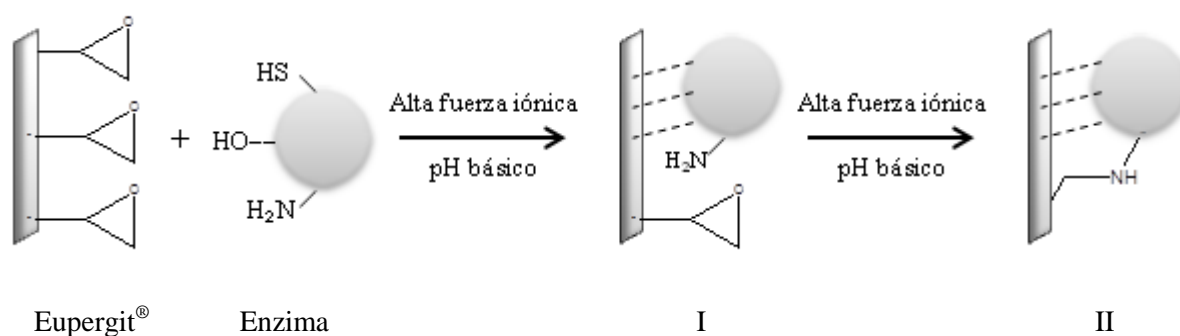
**Figura 1.9.** Mecanismo de activación de grupos carboxilos por carbodiimidas y formación de enlaces covalentes con grupos amino.

#### 1.2.4. Inmovilización covalente en soporte Eupergit<sup>®</sup>

Eupergit<sup>®</sup> es un soporte comercial orgánico-sintético de carácter hidrofóbico que está fabricado por polimerización de bis-acrilamida, metacrilamida y glicidil éter. Actualmente se comercializan tres variedades de este soporte, que son Eupergit<sup>®</sup> C, Eupergit<sup>®</sup> CM y Eupergit<sup>®</sup> C250L. Las principales diferencias entre ellos son el tamaño de las partículas y el grado de activación del soporte (Tabla 1.5) [41].



Eupergit<sup>®</sup> está activado con grupos epóxidos (oxiranos), que pueden reaccionar con los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) de la superficie del enzima en condiciones neutras y básicas de pH. También reaccionan con los grupos tiol ( $-\text{SH}$ ) e hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) en condiciones neutras y ácidas de pH respectivamente [41]. La inmovilización de enzimas por enlaces covalentes en este soporte tiene lugar en dos etapas sucesivas (Figura 1.10). En la primera etapa se produce la adsorción hidrofóbica entre la superficie del soporte y las zonas hidrofóbicas del enzima que se ve favorecida por la alta fuerza iónica. En la segunda etapa tiene lugar la formación de enlaces covalentes en la que los grupos reactivos del enzima ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  y  $-\text{SH}$ ) reaccionan con los epóxidos por ataque nucleofílico formando enlaces C-N, C-O y C-S respectivamente.



**Figura 1.10.** Inmovilización de enzimas en soporte Eupergit<sup>®</sup>.  
(I) Etapa de adsorción hidrofóbica y (II) etapa de formación de enlaces covalentes.

Adicionalmente, con el objetivo de bloquear los grupos epóxidos del soporte que no han reaccionado con el enzima se realiza una incubación con compuestos aminados (ej. metilamina, glicina, etc.) o tioles (ej. mercaptoetanol), los cuales reaccionan con los grupos epóxidos libres [42].

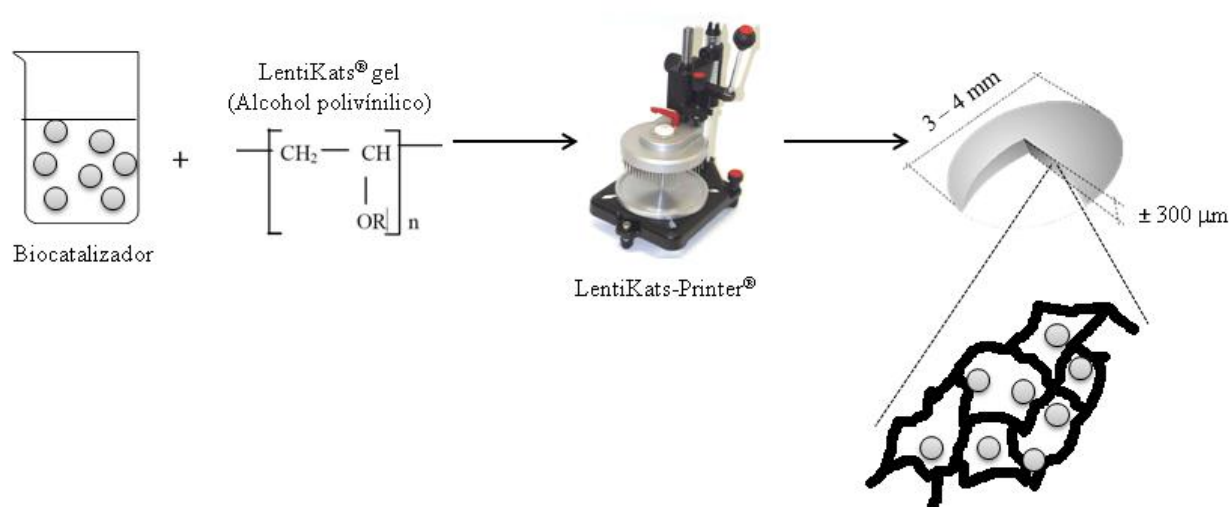
Eupergit<sup>®</sup> es quizás uno de los soportes más ampliamente usados para la inmovilización de enzimas. Actualmente se ha reportado la inmovilización de enzimas tipo lipasas,  $\beta$ -galactosidasa, penicilina G acilasa, tripsina,  $\alpha$ -amilasas, deshidrogenasas, etc. Se han publicado varios artículos haciendo una revisión más exhaustiva de los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> y sus respectivas aplicaciones a nivel industrial [41, 43]. Por ejemplo, el enzima penicilina amidasa inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> fue utilizado en 900 ciclos

de hidrólisis de penicilina G para producir ácido 6-aminopenicilánico (6-APA, compuesto fundamental para la síntesis de penicilinas sintéticas). Dicho proceso se llevó a cabo en un reactor de tanque agitado de 1000 litros y permitió alcanzar una producción de 2000 kg de 6-APA/kg de Eupergit<sup>®</sup> por cada ciclo de reacción [43].

### 1.2.5. Inmovilización por atrapamiento en soporte LentiKats<sup>®</sup>

LentiKats<sup>®</sup> es un gel comercial formado por alcohol polivinílico (PVA), que es un material no tóxico, inerte, con excelentes propiedades mecánicas y, debido a su naturaleza química, muy estable en un amplio rango de pH (3-8,5).

La inmovilización de biocatalizadores por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup> es un método simple y rápido, que consiste en mezclar el biocatalizador (disolución o suspensión) con el gel en estado líquido. Luego se procede a la formación de las partículas lenticulares, gelificación por enfriamiento y finalmente la estabilización de dichas partículas (Figura 1.11) [44].



**Figura 1.11.** Inmovilización por atrapamiento de biocatalizadores (enzimas y células) en soporte LentiKats<sup>®</sup>.

El soporte LentiKats<sup>®</sup> se utiliza tanto para la inmovilización de células, como para la inmovilización de enzimas libres o entrecruzados (CLEA's). La inmovilización siguiendo esta técnica mejoró la estabilidad de los biocatalizadores, y permitió su aplicación en diferentes configuraciones de reactor (en operación tanto discontinua como continua), obteniéndose altos rendimientos de reacción y su reutilización continua (Tabla 1.6). Por ejemplo, para la hidrólisis de malodextrina usando glucoamilasa inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>, el enzima

inmovilizado se reutilizó durante 100 ciclos de reacción conservando el 80% de la actividad inicial [45]. Sin embargo, la principal desventaja de la aplicación de biocatalizadores inmovilizados en LentiKats<sup>®</sup> es la inestabilidad térmica del soporte, puesto que su exposición a temperaturas superiores a 50°C provoca la licuefacción del soporte y por lo tanto la liberación de biocatalizador al medio.

**Tabla 1.6.** Inmovilización de biocatalizadores por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>.

		Actividad retenida (%)	Aplicación	Referencia
Células	<i>Bacillus coagulans</i>	100	Síntesis de ácido láctico	[46]
	<i>Zymomonas mobilis</i>	100	Producción continua de etanol	[47]
	<i>Oenococcus Oeni</i>	100	Tratamiento de zumo de manzanas (fermentación maloláctica)	[48]
Enzima	Inulinasa	48	Hidrólisis de sacarosa	[49]
	$\beta$ -galactosidasa	32	Hidrólisis de lactosa	[50]
	Glucoamilasa	35	Hidrólisis de maltodextrina	[45]
Enzima entrecruzado (CLEA)	Oxinitrilasa	N.D.	Síntesis de cianhidrina	[51]
	Penicilina G acilasa	60	Síntesis de desacetoxicefalosporina ( $\beta$ -lactámico)	[52]
	Dextranacarasa	12	Primer paso en la síntesis de oligosacáridos	[53]

N.D: no determinado.

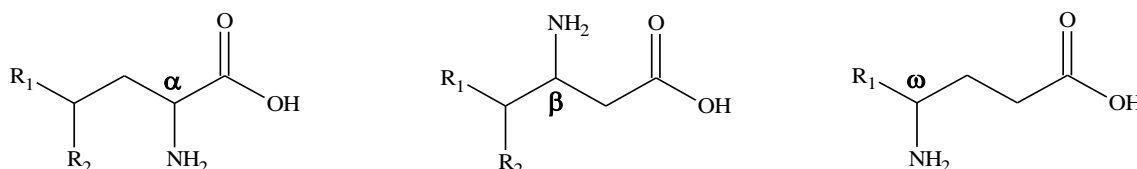
### 1.3. Compuestos aminados de interés biotecnológico

La demanda de compuestos ópticamente activos como aminoácidos, otros compuestos aminados, alcoholes, ácidos carboxílicos, etc, se ha incrementado en la última década, sobre todo en el campo de la industria farmacéutica, alimentaria y agroquímica. En general, estos tipos de compuestos son obtenidos por métodos químicos convencionales; sin embargo, para poder cubrir la demanda ascendente de estos compuestos, se trabaja activamente en la implementación de nuevos procesos de síntesis con especial interés en los procesos biotecnológicos [54, 55].

En la Tabla 1.7 se muestran los grupos de compuestos que son producidos por biotransformación y que a su vez gozan de una alta demanda en el mercado. Entre ellos los aminoácidos, alcoholes y carbohidratos son los compuestos con mayor demanda acaparando el 45% del mercado. En la misma tabla, se muestran los valores promedios de los parámetros técnicos tales como la productividad volumétrica, la concentración final de producto y el rendimiento de reacción, que tienen una influencia directa sobre el coste del proceso y del producto final [54].

#### 1.3.1. Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos que tienen en su estructura química como mínimo la presencia de un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) y un grupo amino primario ( $-\text{NH}_2$ ). Según la posición donde se encuentra el grupo amino primario en la cadena aminoacídica, los aminoácidos se pueden clasificar como  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) u  $\omega$  (omega) aminoácidos (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Clasificación de aminoácidos según la posición del grupo amino primario.

**Tabla 1.7.** Producción de compuestos de interés biotecnológico por biotransformación [54].

Compuesto	Biocatalizador (enzimas y/o células)	Productividad volumétrica (g/L·h)	Concentración final de producto (g/L)	Rendimiento (%)
Aminoácidos	Descarboxilasas	54,6	102	82
	Liasas			
	Amidasas			
	Transferasas			
Alcoholes	Lipasas	4,2	107	88
	Oxidorreductasas			
	Quinasas			
Carbohidratos	Transferasas	3	237	90
	Amilasas			
	Aldolasas			
Ácidos	Lipasas	1,7	108	81
	Esterasas			
	Amidasas			
	Hidroxilasas			
Aminas	Oxigenasas	12,8	80	43,5
	Lipasas			
Amidas	Oxidorreductasas	42	225	96
	Hidratasas			
	Oxidorreductasas			

Los  $\alpha$ -aminoácidos son utilizados principalmente en el campo de la salud y nutrición humana (con un 40% del mercado) y en nutrición animal (55% del mercado) [56]. La producción de estos aminoácidos se puede llevar a cabo por diferentes métodos como extracción, síntesis química, fermentación y biotransformación (síntesis enzimática) [56, 57].

La obtención de aminoácidos por *extracción* es uno de los métodos más antiguos, y se realiza por hidrólisis química y/o enzimática a partir de un material biológico rico en proteínas (cabellos, extractos cárnicos, hidrolizados de plantas, etc.). Estos métodos son aún aplicados para la obtención de aminoácidos de baja demanda como L-prolina y L-serina (Tabla 1.8) [56].

**Tabla 1.8.** Métodos de síntesis de  $\alpha$ -aminoácidos [58].

L-aminoácido	Síntesis	L-aminoácido	Síntesis
Glicina	Química	Lisina	Fermentación
Alanina	Enzimática	Metionina	Quimio-enzimática
Prolina	Extracción, Fermentación	Fenilalanina	Fermentación, Quimio-enzimática, Enzimática
Arginina	Fermentación	Aspartato	Enzimática
Cisteína	Enzimática, Química	Triptófano	Fermentación, Enzimática
Glutamato	Fermentación	Treonina	Fermentación
Glutamina	Fermentación	Tirosina	Extracción, Enzimática
Histidina	Fermentación	Serina	Extracción
Isoleucina	Fermentación	Valina	Enzimática
Leucina	Fermentación		

La *síntesis química* de aminoácidos aún sigue sin ser económicamente rentable a nivel industrial debido a que, entre otras desventajas, se suelen obtener mezclas racémicas de aminoácidos. Sin embargo, su interés radica en su combinación con la síntesis enzimática, es decir cuando el producto racemato de la síntesis química se convierte en un producto enantioméricamente puro acoplado a reacciones enzimáticas. Este es el caso de L-metionina, que se puede obtener por resolución enzimática usando un enzima acilasa a partir del compuesto DL-metionina sintetizado químicamente [55].

La *fermentación* es el método más ampliamente extendido para la síntesis de  $\alpha$ -aminoácidos y el más rentable económicamente [55, 58]. Los inicios de la síntesis de aminoácidos por este método se remontan al año 1957 con el descubrimiento de la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. Dicha bacteria es capaz de producir y liberar al medio de cultivo altas concentraciones de L-glutamato a partir de una fuente de carbono simple (ej. glucosa obtenida a partir del jarabe de azúcar de caña) y en condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo [55]. El aminoácido L-glutamato es comercializado en su forma monosódica (glutamato monosódico, GMS) y es usado como aditivo alimentario. La demanda mundial de

GMS en el año 2011 fue de 2,6 millones de toneladas, y el mayor productor de GMS es la empresa japonesa Ajinomoto con un 25% de participación de mercado [59]. Muchos otros aminoácidos comercializados actualmente son también producidos por fermentación (Tabla 1.8), utilizando cepas naturales hiperproductoras de aminoácidos o cepas genéticamente modificadas para incrementar la producción de los mismos [60].

La producción de aminoácidos por *biotransformación*, mediante el uso de enzimas y/o células, tuvo su inicio hace 40 años con la aplicación de un enzima acilasa en la resolución de L-metionina. Actualmente, varios  $\alpha$ -aminoácidos son producidos por esta vía (Tabla 1.8). La biotransformación es el método por excelencia para la producción de aminoácidos no proteinogénicos (ej. D-aminoácidos, D-hidroxifenilglicina, GABA, 2-aminobutirato) y de derivados de aminoácidos o aminoácidos no naturales (ej. L-*ter*-leucina, hidroxiprolina, L-homofenilalanina, L-DOPA, tienilalanina) [55-57, 61]. Entre el grupo de enzimas más utilizados en la síntesis de aminoácidos se encuentran liasas, deshidrogenasas y transaminasas (Tabla 1.9).

**Tabla 1.9.** Enzimas utilizados en la síntesis de aminoácidos [55, 56].

Grupo de enzima	aminoácido
Liasas	Aspartato, fenilalanina, alanina, DOPA
Deshidrogenasas	Fenilalanina, <i>ter</i> -leucina
Transaminasas	2-aminobutirato, L-homofenilalanina
Hidrolasas	Cisteína
Hidroxilasas	Hidroxiprolina

Los  $\beta$ -aminoácidos están considerados dentro del grupo de los aminoácidos no naturales por tener una pobre distribución en la naturaleza y porque el organismo humano es incapaz de sintetizarlos. Los  $\beta$ -aminoácidos pueden ser clasificados como  $\beta^2$ ,  $\beta^3$  y  $\beta^{2,3}$  según la presencia de sustituyentes en la molécula del aminoácidos (Figura 1.13) [62].

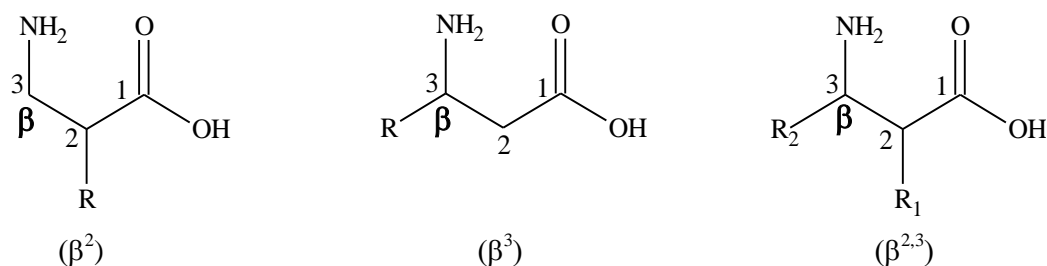


Figura 1.13. Clasificación de  $\beta$ -aminoácidos.

Se ha descrito la existencia de  $\beta$ -aminoácidos naturales, como el  $\beta$ -aminoácido aromático taxol, critoficina y  $\beta$ -glicina, en algas y algunas bacterias. Los  $\beta$ -aminoácidos son utilizados principalmente en la síntesis de fármacos peptidomiméticos y de antibacterianos  $\beta$ -lactámicos [63, 64]. Uno de los compuestos derivados de  $\beta$ -aminoácidos actualmente comercializado es el  $\beta$ -dipéptido carnosina, que es biosintetizado a partir de  $\beta$ -alanina e histidina mediante el enzima  $\beta$ -aminopeptidasa (EC 6.3.2.11). La carnosina es utilizada como agente antioxidante y como suplemento alimenticio en la dieta de deportistas [65]. Los métodos de síntesis de  $\beta$ -aminoácidos se detallan en el capítulo 6.

### 1.3.2. Aminas

Los compuestos aminados (no aminoácidos) enantioméricamente puros también tienen gran importancia a nivel industrial, pues son utilizados como compuestos intermediarios en la síntesis de fármacos y compuestos agroquímicos [5, 66]. Las aminas de importancia en estos campos pueden ser del tipo alquilaminas (cadenas carbonadas simples o ramificadas), arilalquilaminas (presencia de al menos un anillo aromático) y aminoalcoholes (presencia de al menos un grupo hidroxilo  $-OH$  en la cadena carbonada) (Figura 1.14).

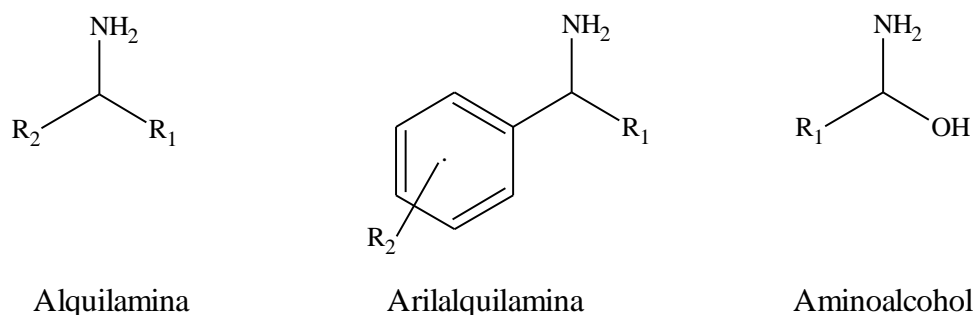


Figura 1.14. Tipos de aminas de interés industrial.



La obtención de compuestos aminados ópticamente puros se lleva a cabo por procesos químicos, siendo los más comunes la cristalización de la mezcla racémica del compuesto aminado con ácidos carboxílicos quirales, y la reducción de compuestos proquirales que tienen en su estructura un doble enlace carbono-nitrógeno (C=N) [55]. Estos compuestos también pueden ser obtenidos por biotransformación por medio de enzimas transaminasas y nitroreductasas, o por métodos de resolución cinética utilizando enzimas tipo lipasas y acilasas, que catalizan la hidrólisis de amidas racémicas y compuestos N-acilaminados respectivamente [55, 66]. También se ha descrito la síntesis de aminas aromáticas por resolución cinética o síntesis asimétrica utilizando  $\omega$ -transaminasas, lo cual se detalla en la sección 1.4.1.3.

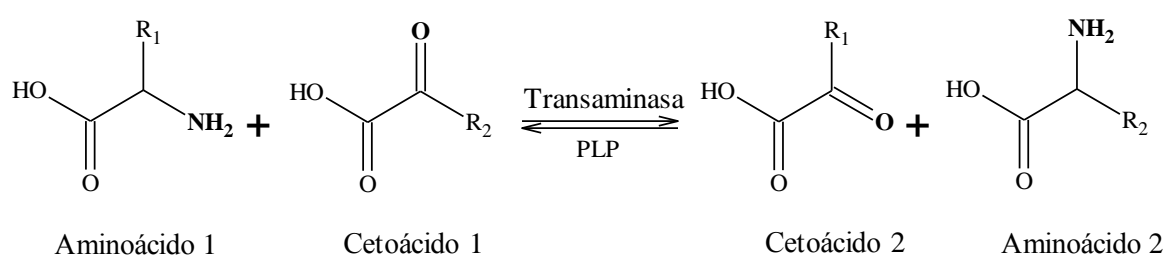
## 1.4. Enzimas transaminasas y amonio liasas

Algunas características generales de los enzimas transaminasas y amonio liasas utilizados en este trabajo de tesis se detallan en la Tabla 1.10.

### 1.4.1. Transaminasas

Los enzimas transaminasas o aminotransferasas (ATs; EC 2.6.1) pertenecen al grupo de transferasas. Todos estos enzimas son dependientes del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) y catalizan la transferencia reversible de grupos amino desde un aminoácido a un cetoácido para dar lugar a la formación de un segundo aminoácido y un coproducto cetoácido (Figura 1.15).

Todos estos enzimas presentan 4 residuos aminoacídicos en el centro activo que se mantienen conservados: Gly197, Asp222, Lys258 y Arg386 (posición según la numeración para L-aspartato transaminasa de corazón porcino), los cuales están directamente relacionados con la unión al cofactor PLP y con sus respectivos sustratos [67].



**Figura 1.15.** Reacción catalizada por transaminasas.

El estudio de análisis de similitud de la secuencia aminoacídica primaria de 14 transaminasas diferentes realizado por Mehta y col., permitió clasificar a estos enzimas en 4 sub-grupos (Tabla 1.11) [67]. Además de la homología estructural, los enzimas de cada sub-grupo son capaces de aceptar sustratos aminoácidos de estructura similar. Así, los enzimas del sub-grupo I aceptan sustratos dicarboxílicos o aromáticos y la reacción de transaminación se lleva a cabo en la posición 2 o alfa ( $-\alpha$ ), mientras que los enzimas del sub-grupo II realizan la reacción de transaminación en una posición distal (en posición  $-\beta$ ,  $-\omega$  o cadena lateral) [67].

**Tabla 1.10.** Características generales de los enzimas.

	Transaminasas		Amonio liasas
	L-aspartato transaminasa	$\omega$ -transaminasa	
Abreviatura	AAT / AT <sup>(a)</sup>	$\omega$ -TA	AspB / AspB-C6 <sup>(b)</sup>
Fuente	Eucariota (músculo de corazón porcino) / Procariota <sup>(a)</sup>	Procariota ( <i>Arthrobacter citreus</i> )	Procariota ( <i>Bacillus</i> sp. YM55-1)
Tipo	Salvaje / Recombinante	Recombinante (expresado en <i>E. coli</i> )	Recombinante (expresado en <i>E. coli</i> )
Masa molecular (kDa)	110	106	200
Estructura cuaternaria	Homodimérica	Homodimérica	Homotetramérica
Cofactor	Piridoxal-5'-fosfato (PLP)	Piridoxal-5'-fosfato (PLP)	NO
Sustratos	L-aspartato y $\alpha$ -cetoglutarato	L-alanina	L-aspartato / $\beta$ -aminobutirato

<sup>(a)</sup> AT es un enzima transaminasa de origen bacteriano que fue proporcionado por el Laboratorio “Joint Biotechnology” de la Universidad de Turku, Finlandia.

<sup>(b)</sup> AspB-C6 es un enzima mutado a partir de AspB.

**Tabla 1.11.** Agrupación de transaminasas según su estructura aminoacídica primaria [67].

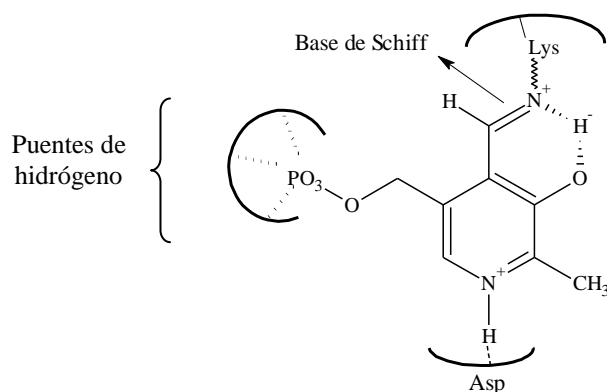
Sub-grupo	Enzima	EC	Sustratos naturales	
			aminoácido	cetoácido
I	Aspartato AT	2.6.1.1	L-aspartato	$\alpha$ -cetoglutarato
	Alanina AT	2.6.1.2	L-alanina	
	Tirosina AT	2.6.1.5	L-tirosina	
II	Omega AT	2.6.1.18	$\beta$ -alanina	piruvato
	GABA AT	2.6.1.19	4-aminobutirato	$\alpha$ -cetoglutarato
III	D-alanina AT	2.6.1.21	D-alanina	$\alpha$ -cetoglutarato
IV	Serina AT	2.6.1.51	L-serina	piruvato

#### 1.4.1.1. Mecanismo catalítico de transaminasas

El cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) juega un rol importante en el mecanismo catalítico de una serie de reacciones enzimáticas tales como descarboxilación, racemización, eliminación y transaminación. En todos los casos, el PLP es imprescindible para mantener la actividad enzimática. Su función consiste en estabilizar la carga negativa que se desarrolla en el centro activo durante el estado de transición que tiene lugar después de la condensación del sustrato aminoácido con el PLP dando lugar a la formación de una base Schiff [68, 69].

En ausencia de sustratos, el cofactor PLP se encuentra unido al apoenzima vía diferentes tipos de interacciones dando lugar a la formación de una aldimina interna relativamente estable. Como se muestra en la Figura 1.16, existen tres puntos de unión entre el PLP y el enzima. El primero, es una unión covalente por formación de una base de Schiff entre el residuo  $\epsilon$ -amino de la Lys258 y el grupo aldehído del PLP. El segundo, es la unión del grupo fosfato del PLP mediante puentes de hidrógeno; y el tercer punto de unión tiene lugar por interacción entre el

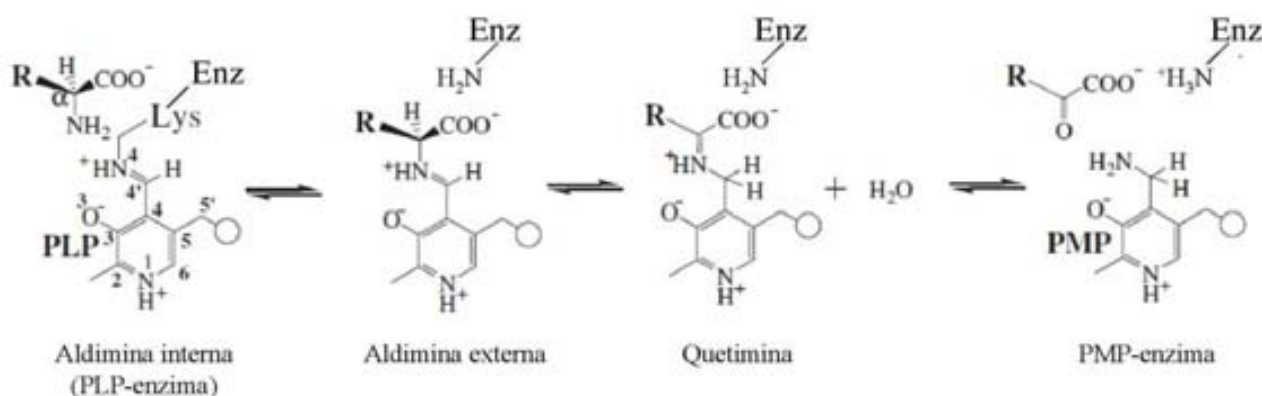
nitrógeno del anillo de piridina del PLP y un residuo Asp222, lo que permite mantener el cofactor en su forma protonada [69, 70].



**Figura 1.16.** Unión del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) en el centro activo de transaminasas formando una aldimina interna.

A pesar de que el PLP se encuentra unido al enzima por varios puntos, éste puede ser fácilmente eliminado del centro activo cuando el enzima se encuentra en un medio en presencia de uno de los sustratos aminoácidos y altas concentraciones de iones fosfato; como consecuencia el enzima pierde su actividad catalítica. Sin embargo, el enzima puede ser reactivado fácilmente al ponerlo en contacto con PLP [71, 72].

La reacción de transaminación catalizada por este grupo de enzimas conlleva una serie de complejos pasos con la formación de varios intermediarios. Cuando el primer sustrato aminoácido llega al centro activo, este se une al PLP desplazando la base de Schiff de la aldimina interna para dar lugar a la formación de una aldimina externa (base de Schiff entre el sustrato y el PLP). A continuación tiene lugar un reordenamiento molecular con la consecuente formación del intermediario quetimina, que se hidroliza para dar lugar a la forma aminada del cofactor o piridoxamina-5'-fosfato (PMP) y a la liberación del producto cetoácido (Figura 1.17). Por último, tiene lugar la reacción reversa, donde el grupo amino del PMP es transferido al sustrato cetoácido dando lugar a la formación del producto aminoácido y a la regeneración de la aldimina interna [73].



**Figura 1.17.** Mecanismo catalítico de la reacción de transaminación.

Asimismo, se ha descrito que los pasos limitantes del mecanismo catalítico de transaminasas corresponden a la unión entre el sustrato aminoácido y el cofactor (por transferencia de protón de 4'-C del PLP a la Lys258 del enzima) y la conversión de aldimina externa a quetimina [74].

#### 1.4.1.2. L-aspartato transaminasa

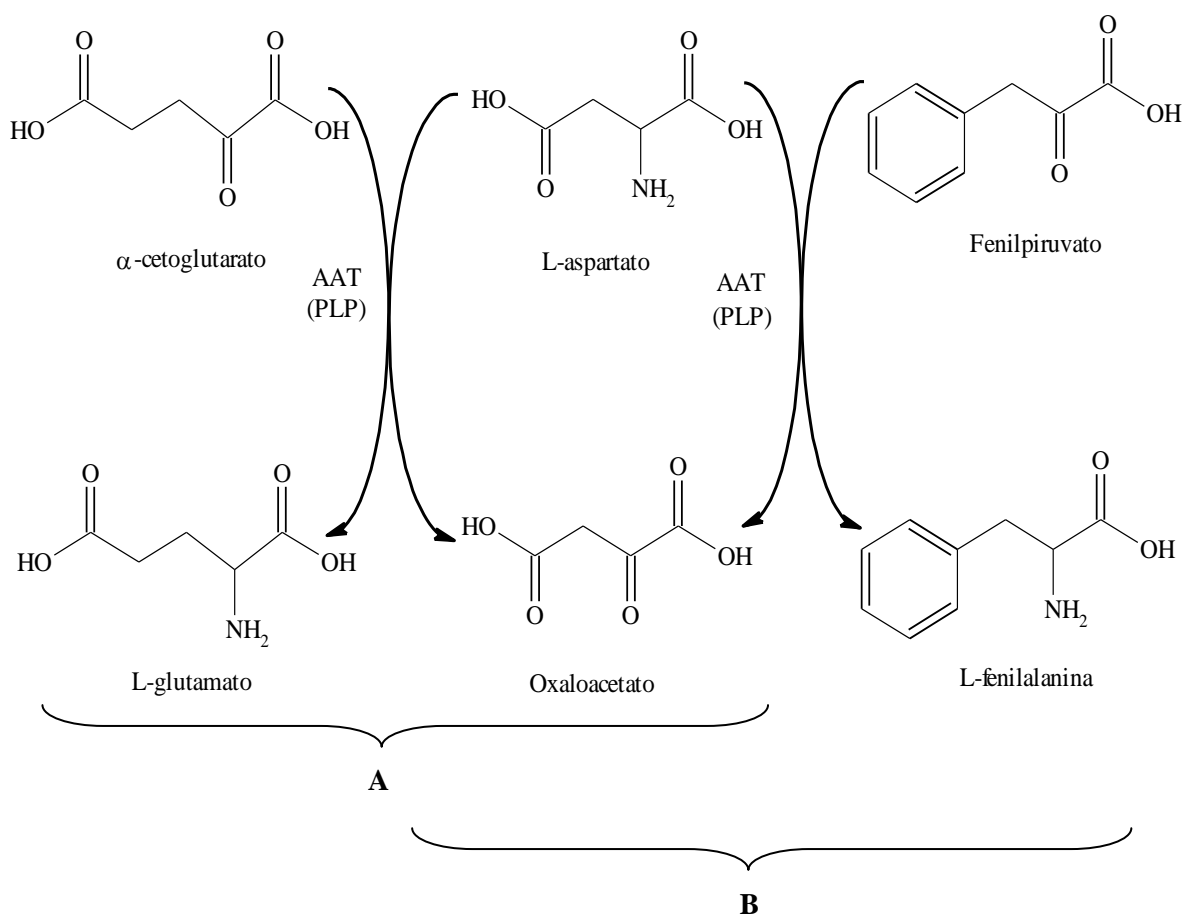
L-aspartato transaminasa o L-aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa (AAT, EC 2.6.1.1), es un enzima ampliamente distribuido tanto en organismos eucariotas como procarioras. El AAT procedente de músculo de corazón porcino es el enzima transaminasa mejor caracterizado y estudiado; además, es comercializado a un bajo coste. Algunas características generales del enzima AAT se describen en la Tabla 1.10.

AAT de corazón porcino tiene una masa molecular de aproximadamente 110 kDa y una estructura homodimérica. El enzima presenta dos centros activos, cada uno con una molécula del cofactor PLP. Este enzima presenta dos isoformas, diferenciadas principalmente por su ubicación dentro de la célula, siendo denominadas citoplasmática y mitocondrial [75]. Además, la secuencia aminoacídica del AAT citoplasmático de corazón porcino ha sido descrita y es actualmente usada como secuencia modelo para el estudio de la estructura primaria de transaminasas [76, 77].

AAT cataliza la reacción de transferencia reversible del grupo amino del aminoácido L-aspartato a  $\alpha$ -cetoglutarato produciendo oxaloacetato y L-glutamato (Figura 1.18. A). Aunque se reconoce a L-aspartato y L-glutamato como los sustratos aminoácidos naturales de

AAT, también se ha descrito que este enzima es capaz de interactuar con menor especificidad con otros aminoácidos tales como L-alanina, L-leucina, L-fenilalanina y L-histidina; e incluso con otros compuestos aminados mono o dicarboxílicos tales como  $\alpha$ -aminopimelato,  $\alpha$ -aminobutirato y  $\gamma$ -aminobutirato [78].

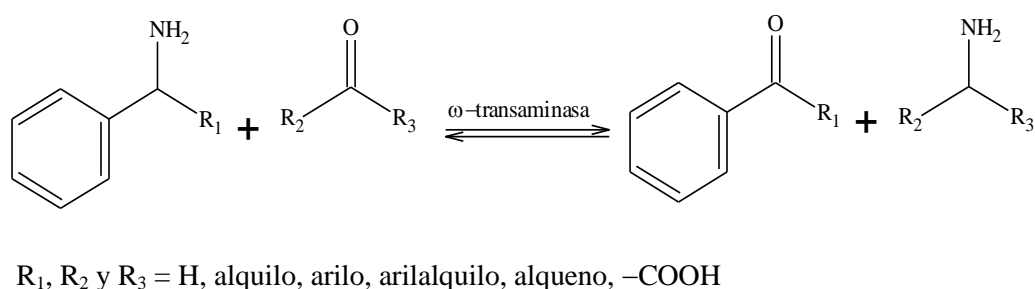
Es de especial relevancia la capacidad de AAT de interactuar con el aminoácido aromático L-fenilalanina, que es un producto biotecnológico de interés. AAT puede catalizar la reacción de transaminación de L-fenilalanina dando como producto su cetona análogo fenilpiruvato. Para la reacción inversa, la aminación de fenilpiruvato tiene lugar utilizando como donador de grupos amino cualquiera de los dos sustratos aminoácidos naturales del enzima, L-aspartato o L-glutamato (Figura 1.18. B) [79].



**Figura 1.18.** Reacciones catalizadas por L-aspartato transaminasa. A: reacción natural y B: síntesis de L-fenilalanina.

### 1.4.1.3. $\omega$ -transaminasas

Los enzimas  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TAs) pertenecen al sub-grupo II de transaminasas (Tabla 1.11), y catalizan la transferencia reversible de grupos amino desde un compuesto aminado (no necesariamente aminoácido) a una cetona para formar el respectivo compuesto cetona y amina. Los  $\omega$ -TAs tienen una amplia especificidad por sustratos, pudiendo catalizar la reacción de transaminación de sustratos alquilaminas o arilalquilaminas (compuestos aromáticos) (Figura 1.19) [80].



**Figura 1.19.** Reacción catalizada por  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TA).

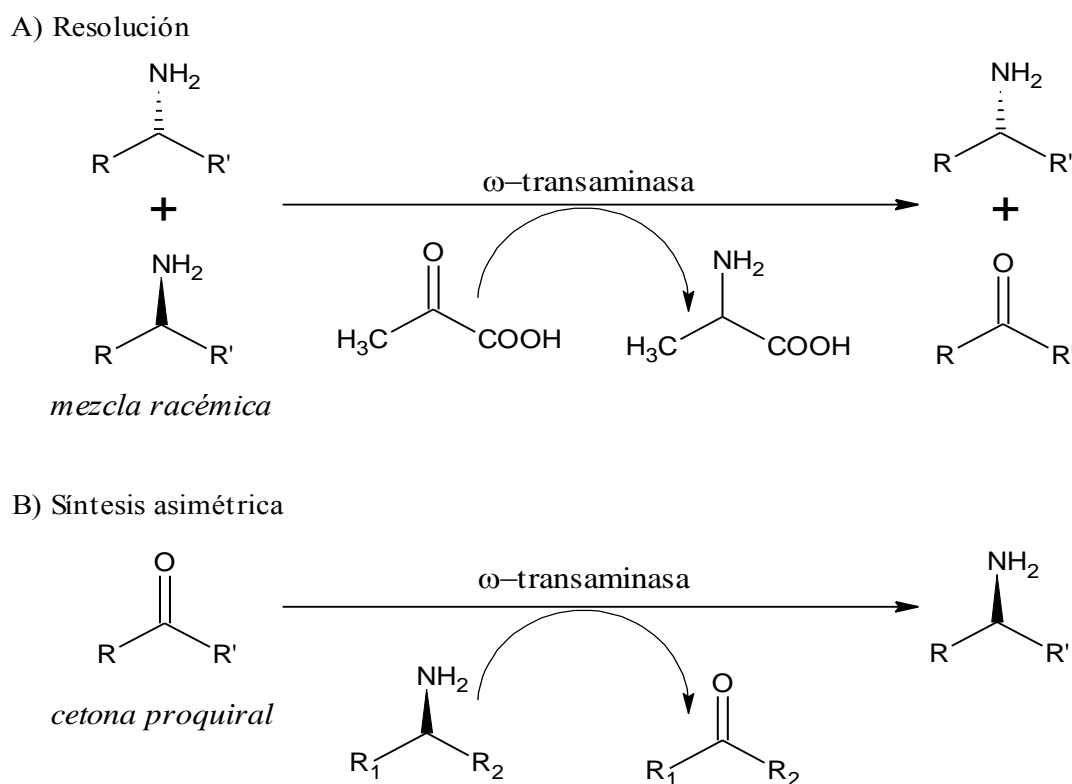
En las últimas décadas se han descrito una serie de  $\omega$ -TAs de diferentes fuentes bacterianas tales como *Vibrio fluvialis* [81], *Chromobacterium violaceum* [82], *Escherichia coli* [83], *Arthrobacter citreus* [84], etc.; todos con diferente especificidad por sustratos. Alguno de estos enzimas son comercializados y utilizados en la síntesis de compuestos bioactivos como  $\beta$ - y  $\omega$ -aminoácidos, aminas quirales, etc, que son usados como intermediarios en la síntesis de fármacos y agroquímicos [85, 86].

En general, muchos de los  $\omega$ -TAs descritos son capaces de aceptar L-alanina como donador de grupos amino para dar lugar a la formación de piruvato. Además, los  $\omega$ -TAs poseen gran estereoselectividad para la formación de compuestos (*-S*)-aminados [86].

El uso de  $\omega$ -TAs en el campo de la biotecnología tiene especial interés en la síntesis de aminas quirales por medio de reacciones de resolución de mezclas racémicas de compuestos aminados, así como en síntesis asimétrica. En el caso de la resolución enzimática, la reacción se lleva a cabo a partir de la mezcla racémica del compuesto aminado de interés y de un aceptor de grupos amino que usualmente es piruvato, donde el enantiómero que no es de interés es desaminado dando lugar a su cetoanálogo (Figura 1.20 A). La principal desventaja



de este tipo de reacción de resolución es que el máximo rendimiento teórico para la síntesis del enantiómero de interés es del 50% [87, 88].



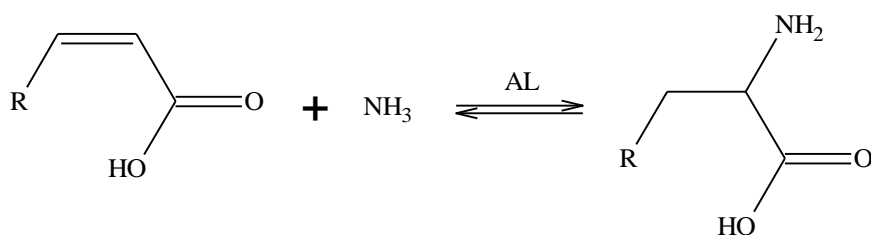
**Figura 1.20.** Reacción catalizada por  $\omega$ -TA en la síntesis de aminas quirales.

Por otro lado, la síntesis asimétrica de aminas quirales utilizando  $\omega$ -TAs se realiza usando un compuesto cetona proquiral y un donador de grupos amino (Figura 1.20 B). De esta forma se podría obtener un rendimiento teórico del 100% del compuesto aminado de interés [89, 90]. A pesar de las ventajas que presenta el uso de  $\omega$ -TAs en la síntesis asimétrica de compuestos aminados, como excelente enantioselectividad y especificidad por un amplio tipo de sustratos, su aplicación presenta una serie de importantes desventajas desde el punto de vista industrial: equilibrio de reacción desfavorable (favorecido hacia la formación de sustratos) y fuerte efecto inhibitorio del enzima por los sustratos y productos de la reacción, lo cual conlleva una baja productividad y en consecuencia un incremento del coste de los procesos [91, 92]. Por tal motivo, actualmente se vienen desarrollando estrategias para minimizar el efecto de estas desventajas, como la recuperación *in-situ* del producto de interés y la eliminación del

coproducto por acoplamiento de reacciones enzimáticas en cascada, usando enzimas o la maquinaria enzimática de células [86, 92].

### 1.4.2. Aminoácido-amonio liasas

Los enzimas aminoácido-amonio liasas (AL) pertenecen al grupo de enzimas carbono-nitrógeno liasas (EC 4.3.1) que catalizan la adición reversible de amonio a un ácido olefínico (doble enlace carbono-carbono) no quiral para formar un L-aminoácido quiral (Figura 1.21).



**Figura 1.21.** Reacción catalizada por aminoácido amonio liasas.

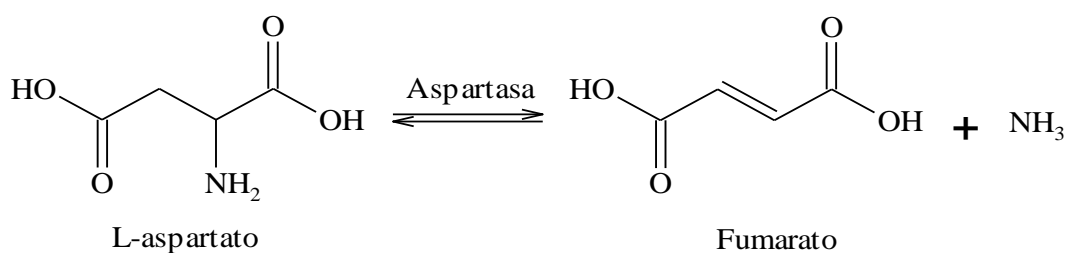
En la actualidad se han descrito una serie de enzimas capaces de catalizar este tipo de reacción (Tabla 1.12), algunos de los cuales son actualmente usados a nivel industrial [93, 94]. Aunque todos estos enzimas pertenecen al mismo grupo y catalizan el mismo tipo de reacción, su mecanismo catalítico difiere en el uso de diferentes cofactores tales como MIO (4-metiliden-imidazol-5-ona) para histidina amonio liasa y fenilalanina amonio liasa; o cationes divalentes ( $\text{Mg}^{+2}$  o  $\text{Mn}^{+2}$ ) para aspartato amonio liasa y metilaspartato amonio liasa [95].

**Tabla 1.12.** Enzimas aminoácido-amonio liasas.

Enzima	Abreviatura	EC	Sustrato	Producto
L-aspartato AL	AAL	4.3.1.1	L-asparato	fumarato
L-metilaspartato AL	MAL	4.3.1.2	L-metilaspartato	mesaconato
L-histidina AL	HAL	4.3.1.3	L-histidina	urocanato
L-fenilalanina AL	PAL	4.3.1.5	L-fenilalanina	trans-cinamato

### 1.4.2.1. L-aspartato amonio liasa

L-aspartato amonio liasa o aspartasa (AAL; EC 4.3.1.1) pertenece a la superfamilia de aspartasas/fumarasas. AAL cataliza la desaminación reversible de L-aspartato para producir fumarato y amonio (Figura 1.22).



**Figura 1.22.** Reacción catalizada por L-aspartato amonio liasa o aspartasa.

Se ha descrito la presencia de este enzima en bacterias como *Escherichia coli* [96], *Hafnia alvei* [97], *Pseudomonas fluorescens* [98], varias especies del género *Bacillus* y en algunas especies acuáticas. Sin embargo, no se ha descrito en plantas superiores ni en mamíferos.

El estudio de aspartasas se remonta al año 1926, cuando Woolf describió por primera vez el enzima aspartasa de *Escherichia coli*, denominado como AspA. Posteriormente se realizaron los estudios de caracterización bioquímica y molecular y cristalización del enzima [96, 99-103]. No es hasta finales de la década de los 90 cuando Kawata y col. reportaron un nuevo enzima aspartasa termoestable producido por *Bacillus* sp. YM55-1, también denominado AspB [104].

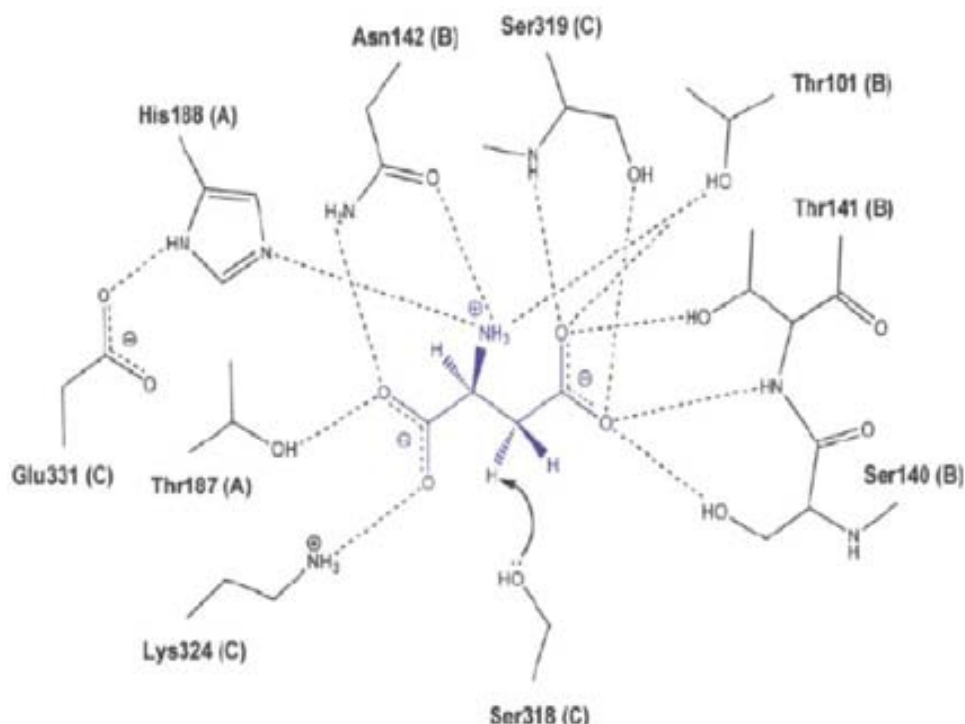
Las principales características de AspA y AspB se muestran en la Tabla 1.13. Los enzimas AspA y AspB presentan características estructurales similares; sin embargo, a diferencia de AspA, AspB carece de regulación alostérica por sustrato y no necesita cofactor para su actividad. Debido a esta característica, a su moderada termoestabilidad y a la alta actividad enzimática que presenta, AspB es considerado de interés para ser aplicado a nivel industrial.

**Tabla 1.13.** Características generales de AspA y AspB.

	<b>AspA</b>	<b>AspB</b>
Fuente	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus</i> sp. YM55-1
Estructura cuaternaria	Homotetramérica	Homotetramérica
Masa molecular	200 kDa 50 kDa por sub-unidad	200 kDa 51 kDa por sub-unidad
Nº de aminoácidos	478 por sub-unidad	468 por sub-unidad
Regulación alostérica	Sí (por su sustrato L-aspartato)	No
Cofactor	Ion metálico (Mg <sup>+2</sup> )	No
Termoestabilidad	No	Moderada (hasta 80°C)
$K_m$ (L-aspartato) a 30°C	2,8 mM	28,5 mM

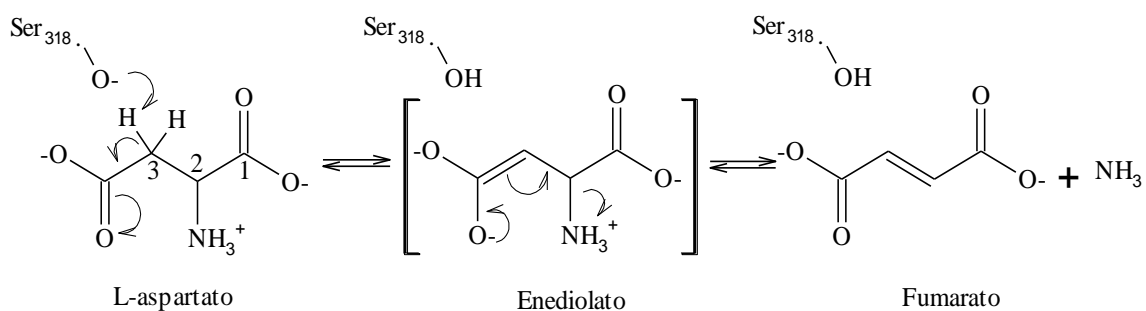
El estudio de la secuencia aminoacídica de aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) confirmó un alto grado de homología (superior al 70%) con aspartasa de *Bacillus subtilis*, mientras que sólo presenta un 40% de similitud con aspartasas de *Escherichia coli* y *Pseudomona fluorescens* [105].

Además, se han reportado estudios de mutagénesis dirigida y cristalización del enzima con y sin el sustrato L-aspartato. Estos estudios han permitido entender mejor el mecanismo catalítico del enzima y el rol e importancia que juegan los residuos aminoacídicos del centro activo (Figura 1.23). En especial, el residuo Lys324, cuyo grupo amino se une mediante puente de hidrógeno al grupo carboxilo (–COOH en C1) del sustrato, sería crucial para la catálisis [106-108].



**Figura 1.23.** Centro activo de AspB en presencia del sustrato L-aspartato.

Asimismo, se ha planteado que el mecanismo de desaminación de L-aspartato catalizada por aspartasas obedece a una catálisis de anti-eliminación. La primera etapa consiste en la captación del protón del C3 por el –OH del residuo Ser318 dando lugar a la formación de un intermediario enediolato. En segundo lugar, el reordenamiento molecular de dicho enediolato da lugar a la formación de fumarato y amonio (Figura 1.24) [106].



**Figura 1.24.** Mecanismo de desaminación de L-aspartato catalizada por aspartasa.

Finalmente, está descrito que AspB posee una alta especificidad por su sustrato natural L-aspartato y no por otro tipo de aminoácidos [104, 109]. Sin embargo se ha reportado que AspB también es capaz de realizar la reacción de aminación de fumarato con alta enantioselectividad utilizando pequeños compuestos nucleofílicos aminados tales como hidroxilamina ( $\text{H}_2\text{NOH}$ ) e hidracina ( $\text{H}_2\text{NNH}_2$ ) para formar los respectivos compuestos derivados de L-aspartato [109].

## 1.5. Referencias

- [1] Hough DW, Danson MJ. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999;3:39-46.
- [2] Rozzell D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Biorganic and Medicinal Chemistry* 1999;7:2253-2261.
- [3] Schmid A, Hollmann F, Park JB, Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology* 2002;13:359-366.
- [4] Straathof AJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 2002;13:548-569.
- [5] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology* 2007;25:66-73.
- [6] Demain AL, Adrio JL. Contribution of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology* 2008;38:41-55.
- [7] Woodley JM. Microbial biocatalytic processes and their development. *Advances in Applied Microbiology* 2006;60:1-15
- [8] Ishige T, Honda K, Shimizu S. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2005;9:174-180.
- [9] Chen RR. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007;74:730-738.
- [10] Nikaido H. Transport across the bacterial outer membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1993;25:581-589.
- [11] Marin K, Kramer R. Amino acid transport systems in biotechnologically relevant bacteria. In: V. F. Wendisch editor. *Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. New York: Microbiology Monographs; 2007.
- [12] Lee YJ, Kim CS, Oh DK. Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004;64:787-793.

- [13] Liu Y, Hama H, Fujita Y, Kondo A, Inoue Y, Kimura A, Fukuda A. Production of S-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols. *Biotechnology and Bioengineering* 1999;64:54-60.
- [14] Nagalakshmi V, Pai JS. Permeabilization of *Escherichia coli* for enhanced penicillin acylase activity. *Biotechnology Techniques* 1994;8:431-434.
- [15] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* 2005;3:510-516.
- [16] Sanchez S, Demain AL. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development* 2011;15:224-230.
- [17] Bonner PLR. Protein purification. New York; 2007.
- [18] Nestl BM, Nebel BA, Hauer B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2011;15:187-193.
- [19] Dalby PA. Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Patents on Biotechnology* 2007;1:1-9.
- [20] Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins. Challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology* 2004;267:15-51.
- [21] Bornscheuer UT. Trends and challenges in enzyme technology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2005;100:181-203.
- [22] Wohlgemuth R. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Current Opinion in Biotechnology* 2010;13:283-292.
- [23] Xue R, Woodley JM. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. *Bioresource Technology* 2012;115:183-195.
- [24] Santacoloma PA, Sin G, Gernaey KV, Woodley JM. Multienzyme-catalyzed processes: next-generation biocatalysis. *Organic Process Research and Development* 2011;15:203-212.
- [25] Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. Multi-enzymatic synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010;14:174-183.



- [26] Bruggink A, Schoevaart R, Kieboom T. Concepts of nature synthesis: cascade catalysis and multistep conversions in concert. *Organic Process Research and Development* 2003;7:622-640.
- [27] Ricca E, Brucher B, Schrittwieser JH. Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives. *Advanced Synthesis and Catalysis* 2011;353:2239-2262.
- [28] Hélaïne V, Rossi J, Gefflaut T, Alaux S, Bolte J. Synthesis of 4,4-disubstituted L-glutamic acids by enzymatic transamination. *Advanced Synthesis and Catalysis* 2001;343:692-697.
- [29] Ge Y, Wang Y, Zhou H, Wang S, Tong Y, Li W. Coimmobilization of glucoamylase and glucose isomerase by molecular deposition technique for one-step conversion of dextrin to fructose. *Journal of Biotechnology* 1999;67:33-40.
- [30] Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA. A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol. *Journal of Organic Chemistry* 2000;65:6940–6943.
- [31] Lee JH, Chung SW, Lee HJ, Jang KS, Lee SG, Kim BG. Optimization of the enzymatic one pot reaction for the synthesis of uridine 5'-diphosphogalactose. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2010;33:71-78.
- [32] Godia F. Biocatalizadores Inmovilizados. In: F. Godia, J. Lopez-Santín editors. *Ingeniería Bioquímica*. Madrid: Editorial Sintesis; 2005.
- [33] Cao L. Carrier-bound immobilized enzymes. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
- [34] Mateo C, Palomares LA, Fernandez-Lafuente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 2007;47:1451-1463.
- [35] Lee JM. Immobilized Enzyme. *Biochemical Engineering*. Washington: Prentice-Hall; 2001.
- [36] Illanes A, González JM, Gómez JM, Valencia P, Wilson L. Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading. *Electronic Journal of Biotechnology* 2010;13 1-9.

- [37] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Review* 2009;38:453-468.
- [38] Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisán JM. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology* 1993;15:546-550.
- [39] Gilles MA, Hudson AQ, Borders CL. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Analytical Biochemistry* 1990;184:244-228.
- [40] Pešić M, López C, Álvaro G, López-Santín J. A novel immobilized chloroperoxidase biocatalyst with improved stability for the oxidation of amino alcohols to amino aldehydes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2012;doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.04.010.
- [41] Boller T, Meier C, Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Organic Process Research and Development* 2002;6:509-519.
- [42] Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 26:509-515.
- [43] Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit<sup>®</sup> C: a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2000;10:157-176.
- [44] [www.geniaLab.de/download/tt-english.pdf](http://www.geniaLab.de/download/tt-english.pdf).
- [45] Rebros M, Rosenberg M, Mlichova Z, Kristofikova L, Paluch M. A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;39:800-804.
- [46] Rosenberg M, Rebros M, Kristofikova L, Malatova K. High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats<sup>®</sup>. *Biotechnology Letters* 2005;27:1943–1947.
- [47] Rebros M, Rosenberg M, Stloukal L, Kristofikova L. High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats. *Letters in Applied Microbiology* 2005;41:412–416.

- [48] Durieux A, Nicolay X, Simon JP. Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in LentiKats<sup>®</sup>. *Biotechnology Letters* 2000;22:1679–1684.
- [49] Fernandes P, Marques MPC, Carvalho F, Cabral JMS. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2009;84:561-564.
- [50] Grosova Z, Rosenberg M, Rebros M, Sipocz M, Sedlackova B. Entrapment of  $\beta$ -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnology Letters* 2008;30:763-767.
- [51] Gröger H, Capan E, Barthuber A, Vorlop KD. Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. *Organic Letters* 2001;3:1969-1972.
- [52] Wilson L, Illanes A, Pessela BCC, Abián O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in LentiKats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnology and Bioengineering Journal* 2004;86:558-562.
- [53] Gómez de Segura A, Alcalde M, Plou FJ, Remaud-Simeon M, Monsan P, Ballesteros A. Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. *Biocatalysis and Biotransformation* 2003;21:325-331.
- [54] Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 2002;13:548-556.
- [55] Breuer M, Ditich KH, Hauer B, Kebeler M, Sturmer, R. Zelinski T. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International Edition* 2004;43:788-824.
- [56] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005;69:1-8.
- [57] Kumagai H. Production of amino acids in Japan. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2000:71-85.

[58] Ikeda M. Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2003;1-35.

[59] [http://www.ajinomoto.com/ir/pdf/FY11\\_data\\_E.pdf](http://www.ajinomoto.com/ir/pdf/FY11_data_E.pdf).

[60] Nielsen J. Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001;55:263-283.

[61] Taylor PP, Pantaleone DP, Senkpeil RF, Fortheringham IG. Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. *Trends in Biotechnology* 1998;16:412-418.

[62] Weiner B, Szymanski W, Janssen DW, Minnaarda AJ, Feringa BL. Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of  $\beta$ -amino acids. *Chemical Society Review* 2010;39:1656-1691.

[63] Aguilar MI, Purcell AW, Devi R, Lew RA, Rossjohn J, Smith AI, Perlmutter P.  $\beta$ -amino acid-containing hybrid peptides-new opportunities in peptidomimetics. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2007;5:2884-2890.

[64] Liljeblad A, Kanerva LT. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure  $\beta$ -amino acids. *Tetrahedron* 2006;62:5831-5854.

[65] Raval KM, Vaswani PS, Majumder DR. Microbial biotransformation: pharmaceutical peptides. *Journal of Biological and Food Science Research* 2012;1:1-14.

[66] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* 2004;15:272-279.

[67] Mehta PK, Hale TI, Christen P. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *European Journal of Biochemistry* 1993;214:549-561.

[68] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annual Review of Biochemistry* 2004;73:383-415.

[69] Mozzarelli A, Bettati S. Exploring the pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes. *The Chemical Record* 2006;6:275-287.

- [70] Denesyuk AI, Denessiouk KA, Korpela T, Johnson MS. Functional attributes of the phosphate group binding cup of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Journal of Molecular Biology* 2002;316:155-172.
- [71] Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry* 1978;24:58-73.
- [72] Scardi V, Scotto P, Iaccrino M, Scarano E. The binding of pyridoxal 5-phosphate to aspartate aminotransferase of pig heart. *Biochemical Journal* 1963;88:172-175.
- [73] Hirotsu K, Goto M, Okamoto A, Miyahara I. Dual substrate recognition of aminotransferases. *The Chemical Record* 2005;5:160-172.
- [74] Liao RZ, Ding WJ, Yu JG, Fang WH, Liu RZ. Theoretical studies on pyridoxal 5'-phosphate-dependent transamination of  $\alpha$ -amino acids. *Journal of Computational Chemistry* 2008;29:1919-1929.
- [75] Martínez-Carrión M, Turano C, Chiancone E, Bossa F, Giartosio A, Riva F, Fasella P. Isolation and characterization of multiple forms of glutamate-aspartate aminotransferase from pig heart. *Journal of Biological Chemistry* 1967;242:2397-2409.
- [76] Doonan S, Doonan HJ, Riva F, Vernon CA, Walker JM. The primary structure of aspartate aminotransferase from pig heart muscle. Partial sequences determined by digestions with pepsin and trypsin. *Biochemical Journal* 1972;130:443-452.
- [77] Huynh QK, Sakakibara R, Watanabe T, Wada H. Glutamic oxaloacetic transaminase isozymes from rat liver. Purification and physicochemical characterization. *Journal of Biochemistry* 1980;88:231-239.
- [78] Scotto P, Scardi V. Interaction of aspartate aminotransferase with amino acids. *Biochemical Journal* 1965;95:657-660.
- [79] Shrawder E, Martínez-Carrión M. Evidence of phenylalanine transaminase activity in the isoenzymes of aspartate transaminase. *Journal of Biological Chemistry* 1972;247:2486-2492.
- [80] Shin JS, Kim BG. Exploring the active site of amine:pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: how the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity. *Journal of Organic Chemistry* 2002;67:2848-2853.

- [81] Yun H, Hwang BY, Lee JH, Kim BG. Use of enrichment culture for directed evolution of the *Vibrio fluvialis* JS17  $\omega$ -transaminase, which is resistant to product inhibition by aliphatic ketones. *Applied Environmental Microbiology* 2005;71:4220-4224.
- [82] Kaulmann U, Smithies K, Smith MEB, Hailes HC, Ward JM. Substrate spectrum of  $\omega$ -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 2007;41:628-637.
- [83] Hwang BY, Lee HJ, Yang YH, Joo HS, Kim BG. Characterization and investigation of substrate specificity of the sugar aminotransferase WecE from *E. coli* K12. *Chemistry and Biology* 2004;11:915-925.
- [84] Koszelewski D, Gcritzer M, Clay D, Seisser B, Kroutil W. Synthesis of optically active amines employing recombinant  $\omega$ -transaminases in *E. coli* cells. *ChemCatChem* 2010;2:73-77.
- [85] Bea HS, Park HJ, Lee SH, Yun H. Kinetic resolution of aromatic  $\beta$ -amino acids by  $\omega$ -transaminase. *Chemical Communications* 2011;47:5894-5896.
- [86] Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W.  $\omega$ -transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -chiral primary amines. *Trends in Biotechnology* 2010;28:324-332.
- [87] Shin JS, Kim BG, Liese A, Wandrey C. Kinetic resolution of chiral amines with  $\omega$ -transaminase using an enzyme-membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2001;73:179-187.
- [88] Höhne M, Robins K, Bornscheuer UT. A protection strategy substantially enhances rate and enantioselectivity in  $\omega$ -transaminase-catalyzed kinetic resolutions. *Advanced Synthesis and Catalysis* 2008;350:807-812.
- [89] Koszelewski D, Lavandera I, Clay D, Guebitz GM, Rozzell D, Kroutil W. Formal asymmetric biocatalytic reductive amination. *Angewandte Chemie International Edition* 2008;47:9337-9340.
- [90] Shin JS, Kim BG. Asymmetric synthesis of chiral amines with  $\omega$ -transaminase. *Biotechnology and Bioengineering* 1999;65:206-211.

- [91] Shin JS, Kim BG. Comparison of the  $\omega$ -transaminase from different microorganisms and application to production of chiral amines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2001;65:1782-1788.
- [92] Tufvesson P, Lima-Ramos J, Jensen JS, Al-Haque N, Neto W, Woodley JM. Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminase. *Biotechnology and Bioengineering* 2011;108:1479-1493.
- [93] Turner NJ. Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of  $\alpha$ -amino and  $\beta$ -amino acids. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010;15:1-7.
- [94] van der Werf M, van den Tweel WJJ, Kamphuis S, Hartman S, de Bont JAM. The potential of liases for industrial production of optically active compounds. *Trends in Biotechnology* 1994;12:95-103.
- [95] Asano Y, Kato Y, Levy C, Baker P, Rice D. Structure and function of amino acid ammonia-lyases. *Biocatalysis and Biotransformation* 2004;22:131-138.
- [96] Falzone CJ, Karsten WE, Conley JD, Viola RE. L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate specificity and role of divalent metal ions. *Biochemistry* 1988;27:9089-9093.
- [97] Yoon MY, Park JH, Choi KJ, Kim JM, Kim YO, Park JB, Kyung JB. Purification and characterization of aspartase from *Hafnia alvei*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1998;31:345-349.
- [98] Takagi JS, Tokushige M, Shimura Y. Cloning and nucleotide sequence of aspartase gene of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biochemistry* 1986;100:697-705.
- [99] Jayasekera MMK, Shi W, Faber K, Viola RE. Evaluation of functionally important amino acids in L-aspartate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1997;36:9145-9150.
- [100] Karsten WE, Viola RE. Kinetic studies of L-aspartase from *Escherichia coli*: pH-dependent activity changes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991;287:60-67.
- [101] Shi W, Dunbar J, Jayasekera MMK, Viola RE, Farber GK. The structure of L-aspartate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1997;36:9136-9144.

- [102] Shi W, Kidd R, Giorgianni F, Schindler JF, Viola RE, Farber GK. Crystallization and preliminary X-ray studies of L-aspartase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1993;234:1248-1249.
- [103] Viola RE. L-aspartase: new tricks from an old enzyme. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 2000;74:295-341
- [104] Kawata Y, Tamura K, Yano S, Mizobata T, Nagai J, Esaki N, Soda K, Tokushige M, Yumoto N. Purification and characterization of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999;366:40-46.
- [105] Kawata Y, Tamura K, Kawamura M, Ikei KM, T., Nagai J, Fujita M, Yano S, Tokushige M, Yumoto N. Cloning and over-expression of thermostable *Bacillus* sp. YM55-1 aspartase and site-directed mutagenesis for probing a catalytic residue. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:1847-1857.
- [106] Fibriansah G, Puthan Veetil V, Poelarends GJ, Thunnissen WH. Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase. *Biochemistry* 2011;50:6053-6062.
- [107] Fujii T, Sakai H, Kawata Y, Hata Y. Crystal structure of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1: structure-based exploration of functional sites in the aspartase family. *Journal of Molecular Biology* 2003;328:635-654.
- [108] Puthan-Veetil V, Raj H, Quax WJ, Janssen DB, Poelarends GJ. Site-directed mutagenesis, kinetic and inhibition studies of aspartate ammonia lyase from *Bacillus* sp. YM55-1. *FEBS Journal* 2009;276:2994-3007.
- [109] Weiner B, Poelarends GJ, Janssen DB, Feringa BL. Biocatalytic enantioselective synthesis of N-substituted aspartic acids by aspartate ammonia lyase. *Chemistry* 2008;14:10094-10100.



# CAPÍTULO 2

---

## *Síntesis de L-fenilalanina catalizada por L-aspartato transaminasa inmovilizado*

**Publicación:**

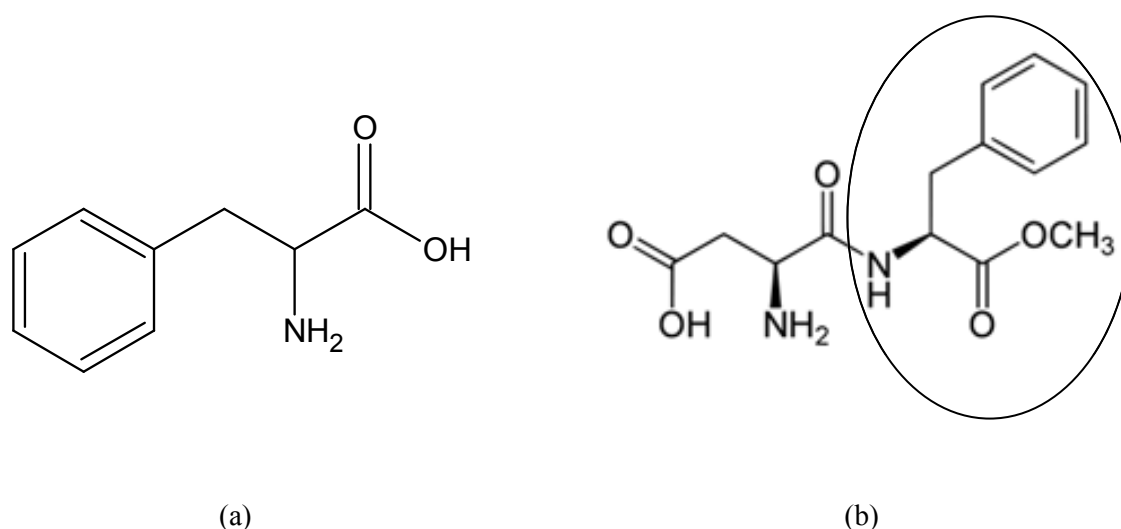
Cárdenas-Fernández M, López C, Álvaro G, López-Santín J. L-phenylalanine synthesis catalyzed by immobilized aspartate aminotransferase. *Biochemical Engineering Journal* 2012;63:15– 21.

## **Resumen**

El aminoácido esencial L-fenilalanina (Phe), ampliamente usado en la industria alimentaria, se produce principalmente mediante métodos quimio-enzimáticos y fermentativos. En este capítulo se presenta una alternativa para la síntesis enzimática de Phe basada en la aplicación de L-aspartato transaminasa (AAT; EC 2.6.1.1) de corazón porcino, que cataliza la reacción de transaminación entre fenilpiruvato y L-aspartato. El enzima se inmovilizó empleando dos tipos de métodos: formación de enlaces covalentes (empleando los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa) y atrapamiento (en LentiKats<sup>®</sup>). Se optimizó la inmovilización utilizando bajas cargas de AAT obteniéndose 40, 70 y 40% de actividad retenida en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> respectivamente. Para la síntesis de Phe se aplicó el enzima libre y los enzimas inmovilizados de alta carga enzimática. Las reacciones catalizadas por el enzima libre y los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup> alcanzaron altos rendimientos de reacción (entorno al 70%) con similares velocidades iniciales: 0,74, 0,80 y 0,84 mmol/L·h respectivamente. Además, los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup> presentaron mejor estabilidad en las condiciones de reacción que el enzima libre, siendo dicho valor un 20% superior al cabo de 192 h.

## 2.1. Introducción

L-fenilalanina (Phe) es un aminoácido aromático esencial que goza de gran demanda comercial a nivel mundial. Se aplica básicamente en la industria farmacéutica, como intermediario para la síntesis de benziloxazolidinona; en la industria alimentaria, como aditivo alimenticio o en nutrición parenteral. Pero su mayor importancia radica en que es uno de los componentes principales para la síntesis del edulcorante no calórico aspartamo (N-(L- $\alpha$ -aspartil)-L-fenilalanina-1-metiléster) (Figura 2.1) [1].



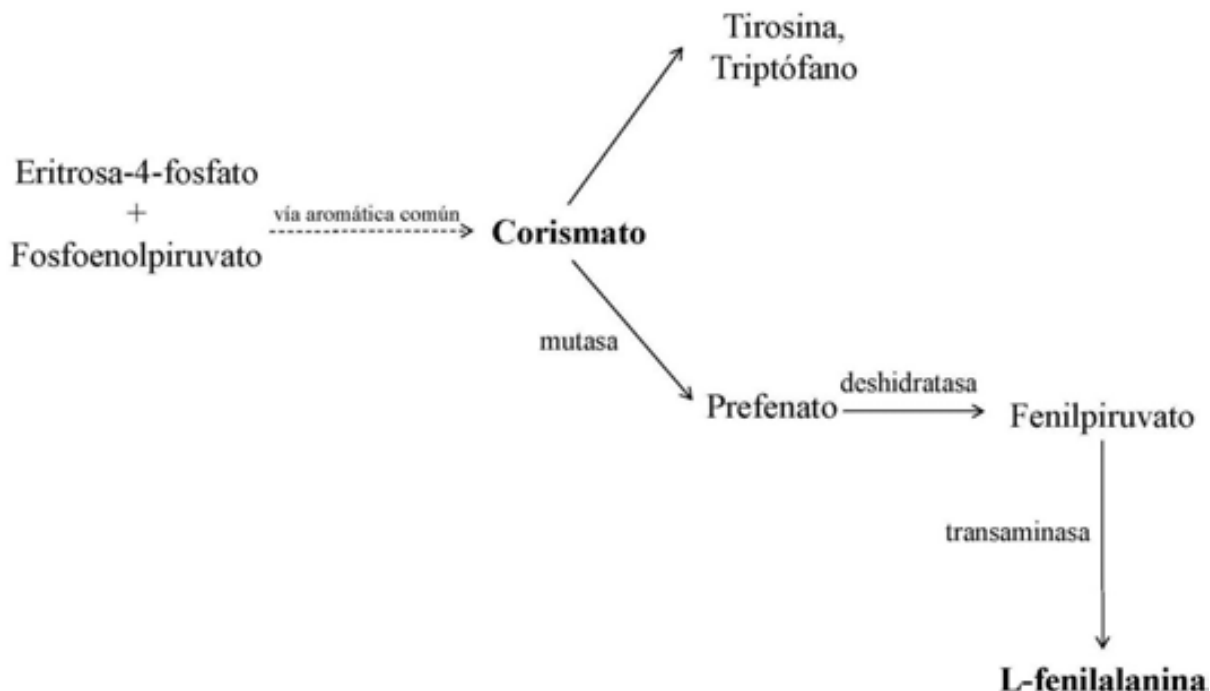
**Figura 2.1.** a) L-fenilalanina y b) Aspartamo (en círculo L-fenilalanina-1-metiléster).

El aminoácido Phe es producido por diferentes métodos, tales como:

1. **Síntesis quimio-enzimática:** tiene lugar a partir de la mezcla racémica de Phe (o derivados) químicamente preparada y posterior resolución enzimática utilizando enzimas tales como amino acilasas o aminoácido amidasas [2].

2. **Síntesis por fermentación:** es uno de los métodos más amplia y exitosamente usado a gran escala. Se lleva a cabo utilizando cepas bacterianas tales como *Brevibacterium flavum* y *Corynebacterium glutamicum*, que son capaces de producir altas concentraciones del aminoácido. Estas cepas han sido aisladas de diferentes ambientes y manipuladas genéticamente para que sean capaces de producir altas concentraciones de Phe. El aminoácido

Phe se sintetiza metabólicamente a partir de corismato (precursor común en la síntesis de aminoácidos aromáticos) mediante una ruta formada por tres reacciones enzimáticas (Figura 2.2) [3].



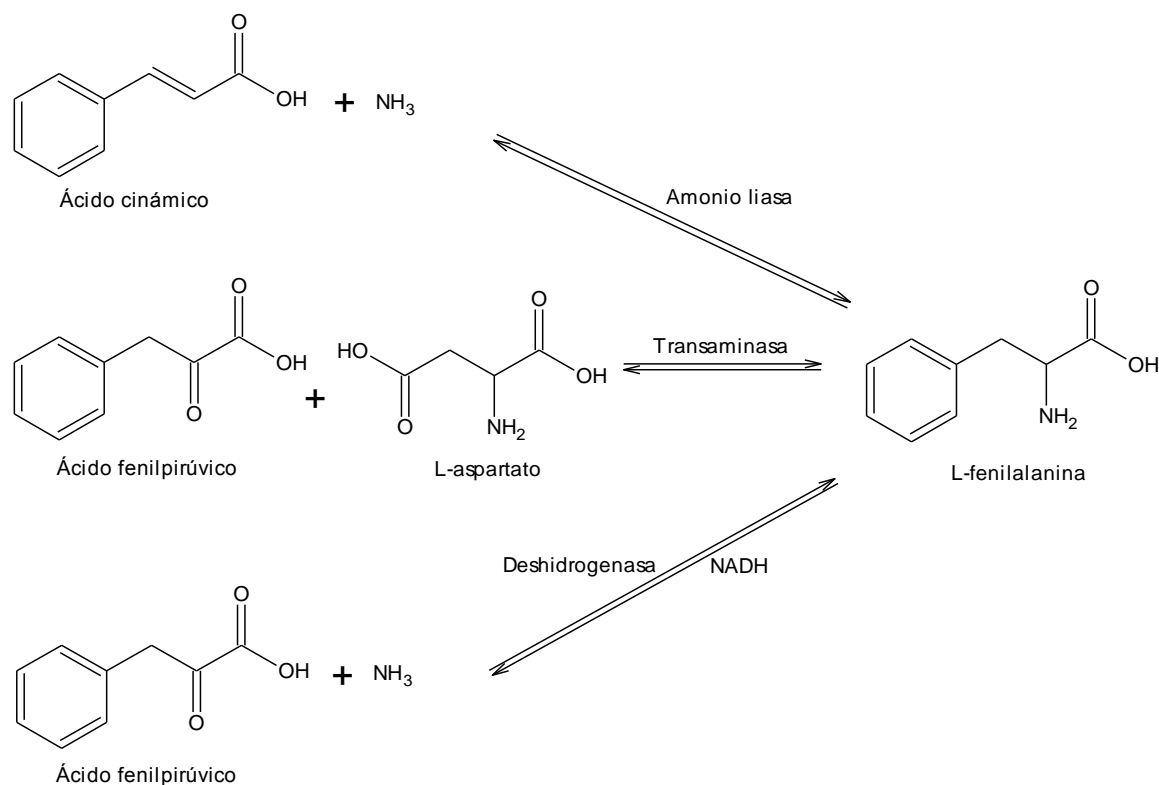
**Figura 2.2.** Vía metabólica bacteriana para la síntesis de L-fenilalanina.

3. **Síntesis por biotransformación:** se lleva a cabo con enzimas tales como L-fenilalanina amonio liasa, L-fenilalanina deshidrogenasa y L-aspartato transaminasa (Figura 2.3) [4].

El enzima fenilalanina amonio liasa cataliza la adición reversible de grupos amino al ácido cinámico. La principal desventaja de este método de síntesis es que el sustrato ácido cinámico tiene un gran efecto inhibitorio sobre el enzima [5-7].

Fenilalanina deshidrogenasa es un enzima dependiente del cofactor NADH y cataliza la aminación reductiva del sustrato fenilpiruvato. Aunque esta reacción es termodinámicamente más favorable hacia la formación de productos y no presenta problemas de inhibición, la principal desventaja de su aplicación en la síntesis de Phe radica en la necesidad de regeneración del cofactor, que se puede realizar acoplando una segunda reacción

(generalmente con otra deshidrogenasa) o aplicando técnicas electroenzimáticas, electroquímicas, etc. En consecuencia el coste total del proceso se incrementa [8, 9].



**Figura 2.3.** Síntesis de L-fenilalanina por biotransformación.

Las transaminasas son enzimas dependientes del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP). Su aplicación en la síntesis de Phe tiene muchas ventajas en comparación con los otros dos enzimas mencionados, entre las que cabe destacar la ausencia de efectos inhibitorios por sustratos o productos, una elevada enantioselectividad y autorregeneración del cofactor PLP.

Se ha reportado la aplicación de transaminasas de origen bacteriano en la síntesis de Phe. En muchos casos, el gen que codifica el enzima es aislado y luego clonado en otra célula huésped como *Escherichia coli* [10-12]. Asimismo, se ha descrito la inmovilización de células *E. coli* recombinantes con alta actividad transaminasa en soportes como  $\kappa$ -carragenina [12] o una

mezcla de este soporte con gelatina [11], y su posterior aplicación en la síntesis de Phe, obteniéndose en ambos casos rendimientos de reacción superiores al 90%.

El enzima L-aspartato transaminasa (AAT, EC 2.6.1.1) ha sido ampliamente estudiado y caracterizado bioquímicamente y molecularmente; por ello es considerado como enzima modelo en el estudio de transaminasas (en la sección 1.4.1.2 se describen en más detalle las principales características del enzima) [13, 14]. Una de las principales aplicaciones de AAT se encuentra en el campo médico-clínico; sin embargo, se han reportado pocos estudios sobre su inmovilización y aplicación en el campo de la biotecnología.

Uno de los primeros estudios de inmovilización de AAT de corazón porcino se llevó a cabo en un soporte de agarosa activado con NaCNBr, alcanzándose un 90% de rendimiento de inmovilización, 46% de actividad retenida y ausencia de limitaciones difusionales. En este estudio, los autores afirman que el residuo Lys258 del centro activo (que se encuentra unido al cofactor PLP por medio de una base de Schiff) no interactúa con el soporte derivado de agarosa ni interviene en el proceso de inmovilización [15].

En otro estudio de inmovilización de AAT en soportes derivados de agarosa (con grupos aldehído y sulfhidrilo) se obtuvo una actividad retenida aparente entre el 30 y 40% al inmovilizar altas cargas enzimáticas por medio de los residuos -SH de la superficie enzimática en el soporte agarosa sulfhidrilo, aunque los autores estimaron que dicha retención podría ser incluso el doble, sugiriendo la presencia de limitaciones difusionales. Es importante remarcar dos conclusiones de este estudio: en primer lugar, que no se deben usar agentes reductores como NaCNBr durante la inmovilización de enzimas dependientes de PLP puesto que reducen la base de Schiff que une el cofactor con el residuo Lys258 del enzima, lo cual conlleva a una pérdida irreversible de la actividad enzimática; en segundo lugar, que el uso de agentes protectores del centro activo del enzima durante el proceso de inmovilización permite incrementar los rendimientos de inmovilización [16].

Más recientemente se realizó un estudio en nuestro laboratorio en el que se describe la inmovilización de varias enzimas dependientes del cofactor PLP, tales como serina hidroximetil transferasa (enzima recombinante genéticamente modificado con la adición de colas de histidina), alanina racemasa y AAT. La inmovilización de estas enzimas se realizó en diferentes soportes tales como aldehído, epóxido e IMAC. Aunque los autores no establecieron un método de inmovilización común para las enzimas dependientes de PLP, se

concluyó que los soportes funcionalizados con grupos epóxido constituyen una buena alternativa, pues permitieron obtener actividades retenidas superiores al 50% después de un proceso de reactivación por incubación de los enzimas inmovilizados con una disolución de PLP. Además confirmaron que los soportes IMAC constituyen un excelente método de purificación-inmovilización (en un solo paso) para enzimas con colas de histidina [17].

En este capítulo se describe la inmovilización del enzima comercial L-aspartato transaminasa de corazón porcino por técnicas de formación de enlaces covalentes y atrapamiento, así como su posterior aplicación en la síntesis del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina.

## **2.2. Objetivos**

### *Objetivo general*

-Establecer un método enzimático para la síntesis del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina usando como biocatalizador L-aspartato transaminasa (AAT) de corazón porcino inmovilizado.

### *Objetivos específicos*

-Estudiar la estabilidad de AAT en las diferentes condiciones de inmovilización aplicadas en este estudio.

-Determinar los parámetros cinéticos de AAT hacia sus sustratos naturales.

-Establecer y optimizar diferentes métodos de inmovilización para AAT.

-Estudiar la estabilidad de AAT inmovilizado en diferentes soportes bajo las condiciones de reacción.



## 2.3. Metodología

### 2.3.1. Enzima y reactivos químicos

L-aspartato transaminasa de corazón porcino (434 unidades/mg de proteína), Eupergit<sup>®</sup> C y los reactivos, de grado analítico, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El soporte agarosa 10 BCL se adquirió en Iberagar (Coíña, Portugal). LentiKats<sup>®</sup> gel fue suministrado por GeniaLab (Braunschweig, Alemania).

### 2.3.2. Ensayos de estabilidad de AAT

Se determinó la estabilidad del enzima AAT en las condiciones necesarias para llevar a cabo los diferentes tipos de inmovilización. Para ello se hizo un seguimiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo:

*i)* a diferentes valores de pH y fuerza iónica; pH 5 y 6 (en tampón MES 25 mM), pH 7 (en tampón fosfato sódico 0,1 M y HEPES 0,1 M), pH 8 (en tampón fosfato sódico 0,1 M + NaCl 0,9 M), pH 9 y 10 (tampón bicarbonato sódico 1 M).

*ii)* en presencia de diferentes concentraciones de N<sup>'</sup>-(3-dimetilaminopropil)-N<sup>'</sup>-etil carbodiimida (CDI): 1, 10, 50 y 100 mM en tampón MES 25 mM pH 6.

*iii)* en presencia de agentes bloqueadores de los grupos epóxidos remanentes del soporte Eupergit<sup>®</sup> C: 2 M de glicina (en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10) y 0,2 M de 2-mercaptoetanol (en tampón HEPES 0,1 M pH 8).

*iv)* en presencia de agentes estabilizadores de la actividad enzimática: 493 mM L-aspartato, 1,7 mM  $\alpha$ -cetoglutarato y 1,7 mM oxaloacetato (en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10).

Todos los estudios de estabilidad se llevaron a cabo con una actividad inicial de AAT de 1 U/mL a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con agitación rotativa (en “roller”).

### 2.3.3. Inmovilización de AAT por enlace covalente en Eupergit<sup>®</sup> C

En primer lugar se hidrató el soporte Eupergit<sup>®</sup> C con agua desionizada a 4°C. Al cabo de 24 h el soporte se separó por filtración al vacío. La inmovilización de AAT se llevó a cabo mezclando 1 mL de soporte húmedo con 10 U de AAT contenidas en 9 mL de disolución tampón (bicarbonato sódico 1 M pH 10 o fosfato sódico 0,1 M + NaCl 0,9 M pH 8). Con el

propósito de mejorar la estabilidad de AAT se adicionó  $\alpha$ -cetoglutarato (1,7 mM) u oxaloacetato (1,7 mM) durante el proceso de inmovilización. Posteriormente los grupos epóxidos remanentes en el soporte se bloquearon por incubación con metilamina 1,5 M (en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10) durante 19 h ó 2-mercaptoetanol 0,2 M (en tampón HEPES 0,1 M pH 8) durante 4 h. Después del proceso de bloqueo, los enzimas inmovilizados se recuperaron por filtración al vacío. Además, en algunos casos se incubó el enzima inmovilizado en PLP 2 mM a 4°C durante 41 h. Finalmente, los biocatalizadores inmovilizados se filtraron al vacío, se lavaron con PLP 2 mM en tampón HEPES 0,1 M pH 7, se filtraron y se almacenaron a 4°C.

### **2.3.4. Inmovilización de AAT por enlace covalente en MANA-agarosa**

La preparación del soporte MANA (monoaminometil-N-aminoetil) agarosa 10 BCL se llevó a cabo a partir del soporte aldehído-agarosa según el método descrito por Fernández-Lafuente [18] y como se describe en la Figura 1.7.

#### **2.3.4.1. Preparación del soporte aldehído-agarosa**

El soporte aldehído-agarosa (glioxil-agarosa) de máxima carga se preparó por esterificación del soporte agarosa 10 BCL con glicidol (2,3-epoxipropanol). Para ello se mezclaron 15 mL de agarosa 10 BCL (densidad = 1,07 g/mL) con 11,6 mL de una disolución de glicidol 2 M conteniendo NaOH 0,32 M y NaBH<sub>4</sub> 0,14 M y la mezcla se mantuvo en agitación rotativa suave a temperatura ambiente durante 19 h. Al cabo de dicho tiempo el soporte se recuperó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua destilada. Luego se añadieron 180 mL de una disolución de periodato sódico 25 mM y la mezcla se mantuvo en agitación magnética suave durante 45 min. La densidad de grupos aldehídos en el soporte se determinó por colorimetría a 475 nm por cuantificación del periodato consumido con una disolución de KI 0,25 M y NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M. Finalmente, el soporte aldehído-agarosa se recuperó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua destilada.

#### **2.3.4.2. Preparación del soporte MANA-agarosa**

Para la preparación del soporte MANA-agarosa, 15 mL de soporte aldehído-agarosa se resuspendieron en 135 mL de etilendiamina 2 M (tampón NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 10) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Las bases de Schiff formadas se redujeron por adición de NaBH<sub>4</sub> (10 mg/mL), manteniéndose la mezcla en agitación durante 2 h a

temperatura ambiente. Finalmente, el soporte MANA-agarosa se filtró al vacío y se lavó con 10 volúmenes de NaCl 1 M en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5, luego con NaCl 1 M en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10 y finalmente con agua destilada. La concentración de grupos aminos primarios en el soporte MANA-agarosa se estimó igual a la de grupos aldehídos en el soporte aldehído-agarosa.

#### **2.3.4.3. Proceso de inmovilización de AAT en MANA-agarosa**

La inmovilización de AAT en MANA-agarosa se llevó a cabo en tres etapas que se describen a continuación:

*i)* adsorción iónica: se mezclaron 9 mL de AAT (10 U) en tampón MES 25 mM pH 6 con 1 mL de soporte. La suspensión se mantuvo en agitación rotativa durante 15 ó 30 min.

*ii)* formación de enlaces covalentes: se retiró un determinado volumen de sobrenadante e inmediatamente después se adicionó el mismo volumen de una disolución fresca de CDI 200 mM (tampón MES 25 mM pH 6) para alcanzar una concentración final de 1, 10 ó 25 mM en la suspensión.

*iii)* desorción: se adicionó a la suspensión NaCl en forma sólida en cantidad necesaria para alcanzar una concentración final de 1 M y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h.

Finalmente, los enzimas inmovilizados se filtraron al vacío, se lavaron con PLP 2 mM en tampón HEPES 0,1 M pH 7, se filtraron y se almacenaron a 4°C.

#### **2.3.5. Inmovilización de AAT por atrapamiento en LentiKats®**

La inmovilización de AAT en el soporte LentiKats® se realizó según el protocolo descrito por la casa comercial GeniaLab. El gel LentiKats® se licuó por calentamiento a 90°C y luego se enfrió a 35°C. A esta temperatura se mezclaron 2 mL de disolución enzimática de AAT (60 U de AAT/mL) en tampón HEPES 0,1 M pH 7 con 8 mL de LentiKats® líquido. La mezcla se colocó en una placa de Petri, y usando la “impresora” LentiKats® se procedió a la formación de las partículas con forma lenticular con un tamaño promedio de 3-4 mm de diámetro (Figura 1.11). Las partículas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta una pérdida del 70% de su peso por efecto de la evaporación del agua contenida en ellas. Luego se añadió la disolución estabilizadora (15 mL por g de partículas lenticulares) y en estas condiciones las partículas se

mantuvieron en agitación rotativa durante 2 h. Finalmente, las partículas se recuperaron por decantación y se almacenaron a 4°C.

### **2.3.6. Seguimiento de los procesos de inmovilización**

Todas las inmovilizaciones de AAT se llevaron a cabo a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con agitación rotativa. En todos los casos se realizó el seguimiento en paralelo de un ensayo “blanco” en el que el volumen del soporte se sustituyó por el mismo volumen de agua. Se midió la actividad enzimática del blanco, suspensión y sobrenadante a lo largo del tiempo.

La **actividad retenida** (%) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad retenida (\%)} = \frac{(\text{Suspensión } t_f - \text{Sobrenadante } t_f)}{\text{Suspensión } t_i} \cdot 100$$

donde:

*Suspensión*  $t_f$  = actividad enzimática de la suspensión al final de la inmovilización.

*Sobrenadante*  $t_f$  = actividad enzimática del sobrenadante al final de la inmovilización.

*Suspensión*  $t_i$  = actividad enzimática de la suspensión al inicio de la inmovilización.

El **rendimiento de inmovilización** (%) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{(\text{Suspensión } t_i - \text{Sobrenadante } t_f)}{\text{Suspensión } t_i} \cdot 100$$

donde:

*Suspensión*  $t_i$  = actividad enzimática de la suspensión al inicio de la inmovilización.

*Sobrenadante*  $t_f$  = actividad enzimática del sobrenadante al final de la inmovilización.

### 2.3.7. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado

AAT libre y los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se emplearon como catalizadores en la síntesis de L-fenilalanina (Phe), a partir del ceto análogo fenilpiruvato y L-aspartato como donador de grupos amino. La composición del medio de reacción fue fenilpiruvato 0,1 M, L-aspartato 0,1 M y PLP 0,1 mM, en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5. La reacción se llevó a cabo con 25 U de AAT libre o inmovilizado por mL de reacción (volumen final de reacción de 10 mL) a 37°C y agitación rotativa.

### 2.3.8. Medida de la actividad enzimática de AAT

El ensayo de actividad enzimática se realizó por acoplamiento de una segunda reacción enzimática catalizada por malato deshidrogenasa (MDH). La reacción de transaminación de L-aspartato catalizada por AAT produce oxaloacetato, que el enzima MDH reduce a malato a la vez que tiene lugar la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. La actividad enzimática de AAT se determinó por espectrofotometría a 340 nm por la disminución de la absorbancia causada por la desaparición de NADH. Se mezclaron 50 µL de muestra enzimática con 950 µL de mezcla reactivo (la concentración final en la cubeta de 1 mL fue de L-aspartato 193 mM, α-cetoglutarato 12 mM, MDH 0,6 U/mL, NADH 0,2 mM en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,5) y se midió la disminución de absorbancia de NADH a 37°C en el espectrofotómetro Cary50Bio UV-visible (Varian, Palo Alto, CA, USA). Una unidad (U) de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la reacción de 1 µmol de L-aspartato a oxaloacetato por minuto a 37°C. El coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm es 6,22 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> [19]. Cuando se evaluó la actividad de las suspensiones en los procesos de inmovilización, fue necesario incorporar agitación magnética a la cubeta espectrofotométrica.

### 2.3.9. Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima de reacción ( $r_{max}$ ) de AAT hacia los sustratos L-aspartato y α-cetoglutarato se calcularon mediante la representación de Lineweaver-Burk. Las velocidades de reacción se midieron según las condiciones descritas en la sección 2.3.8, variando la concentración de sustrato. Para el análisis de los parámetros cinéticos hacia L-aspartato, la concentración del mismo fue de 0,93, 19,3, 96,5 ó 193 mM; asimismo, para el análisis del  $K_m$  y  $r_{max}$  hacia α-cetoglutarato, la

concentración de éste fue de 0,12; 1,2; 6 ó 12 mM. Las velocidades de reacción para cada caso se midieron por duplicado.

### **2.3.10. Medida de concentración de fenilpiruvato y L-fenilalanina**

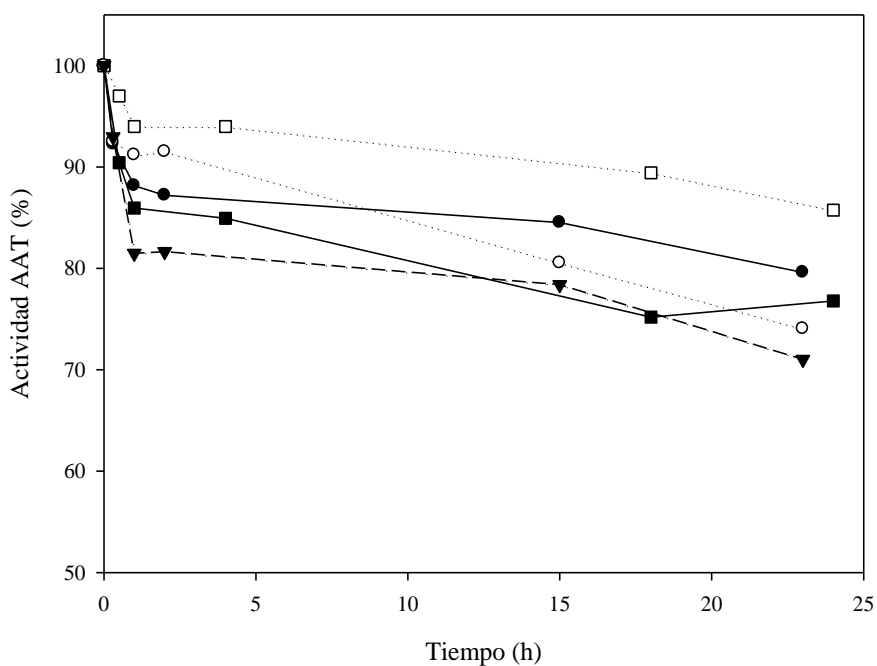
Las concentraciones de fenilpiruvato y L-fenilalanina se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA). Se empleó la columna X-Bridge TM C18 5  $\mu\text{m}$  4,6 mm x 250 mm (Waters, Milford, MA, USA) y detector UV. La fase móvil A consistió en ácido trifluoroacético 0,1% en agua MiliQ y la fase móvil B en ácido trifluoroacético 0,095% en acetonitrilo 80% y agua MiliQ 20%. Se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra y el gradiente de elución se estableció entre 15 y 60% de fase móvil B durante 25 min a un flujo de 1 mL/min a 30°C. La detección de los compuestos se realizó a 260 nm y el análisis cuantitativo se realizó por integración de las áreas usando el método de estándar externo (concentración de estándares entre 1 y 25 mM). El tiempo retención para L-fenilalanina fue  $5,9 \pm 0,1$  min y para fenilpiruvato  $21,3 \pm 0,1$  min (Anexo 1).

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Estabilidad de L-aspartato transaminasa

Los procesos de inmovilización suelen llevarse a cabo en condiciones que pueden ser desfavorables para el enzima y conllevar una posible pérdida de actividad enzimática. De esta forma, se estudió el efecto del pH ácido (5 y 6) a baja fuerza iónica (tampón MES 25 mM), condiciones necesarias para la inmovilización en soporte MANA-agarosa, y pH básico (8, 9 y 10) y alta fuerza iónica (tampón fosfato sódico o bicarbonato sódico 1 M), condiciones para la inmovilización en Eupergit<sup>®</sup> C, sobre la estabilidad del enzima.

Como se observa en la Figura 2.4, AAT es bastante estable en las diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. Los mejores resultados se observaron a pH 6 (tampón MES 25 mM) en que el enzima mantuvo el 87% de su actividad inicial al cabo de 24 h. En todos los casos se observó que la mayor pérdida de actividad se dio durante las primeras horas.



**Figura 2.4.** Estabilidad de AAT a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica: (■) pH 5 y (□) pH 6, en MES 25 mM; (●) pH 8, en fosfato sódico 0,1 M con NaCl 0,9 M; (○) pH 9 y (▼) pH 10, en bicarbonato sódico 1 M. La mezcla enzimática se mantuvo a temperatura ambiente y agitación rotativa durante 24 h. La actividad inicial fue de 1 U de AAT/mL.

También se estudió la estabilidad de AAT en presencia de diferentes compuestos usados como agentes bloqueadores de los grupos epóxidos remanentes de Eupergit<sup>®</sup> C tales como glicina y 2-mercaptoetanol. Tras 24 h de incubación el enzima mantuvo su actividad por encima del 80 y 89% respectivamente (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Estabilidad de AAT en presencia de los agentes bloqueadores de grupos epóxidos. La mezcla enzimática se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación rotativa durante 24 h. La actividad inicial fue de 1 U de AAT/mL.

	Actividad AAT (%)
Blanco	82,8
Glicina 2 M <sup>(a)</sup>	80,2
2-mercaptoetanol 0,2 M <sup>(b)</sup>	89,9

<sup>(a)</sup> Tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10.

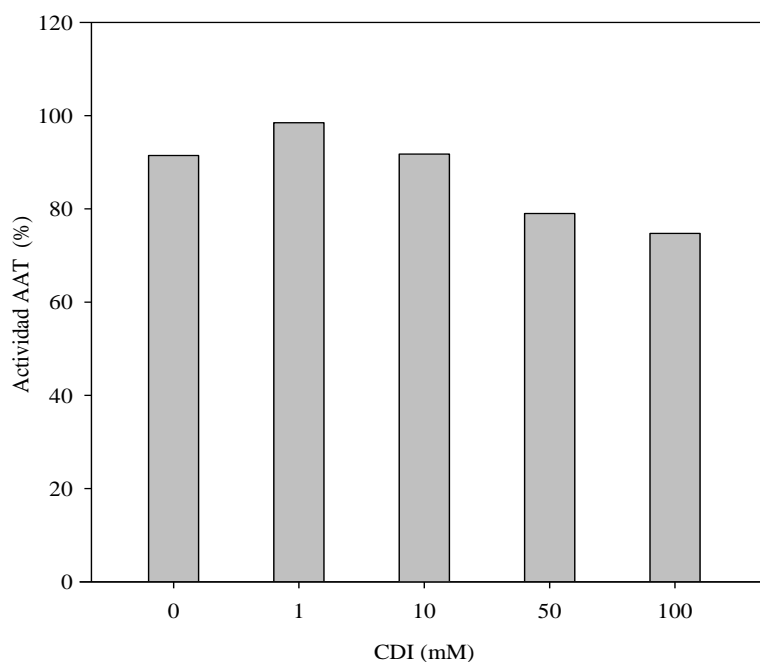
<sup>(b)</sup> Tampón HEPES 0,1 M pH 8.

Por último, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI) sobre la estabilidad del enzima durante 3 horas de incubación. Se observó que a bajas concentraciones de CDI (1 y 10 mM) el enzima mantiene el 100% de su actividad original, y a concentraciones mayores que 50 mM de CDI se evidenció una disminución de actividad superior al 20% (Figura 2.5).

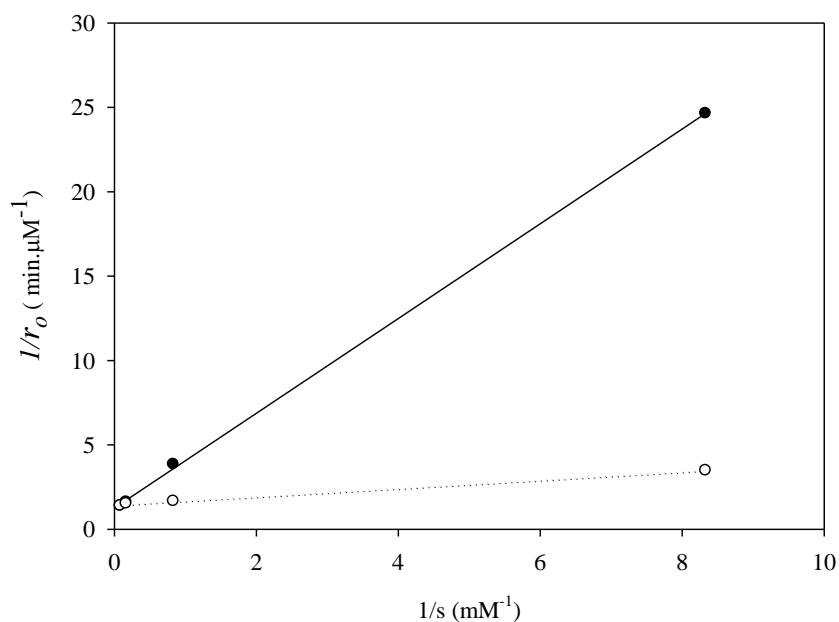
#### **2.4.2. Determinación de los parámetros cinéticos de AAT**

Los parámetros cinéticos constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima de reacción ( $r_{max}$ ) de AAT hacia sus sustratos naturales L-aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato se calcularon mediante la representación de Lineweaver-Burk (Figura 2.6). Los valores de  $K_m$  y  $r_{max}$  hacia L-aspartato fueron 40,93 mM y 0,9  $\mu$ M/min respectivamente; mientras que para el sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato los valores de  $K_m$  y  $r_{max}$  fueron 0,17 mM y 0,7  $\mu$ M/min respectivamente. Estos resultados indican que el enzima tiene mayor afinidad hacia  $\alpha$ -cetoglutarato que hacia L-aspartato.





**Figura 2.5.** Estabilidad de AAT a diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI) en tampón MES 25 mM pH 6. La mezcla enzimática se mantuvo a temperatura ambiente y agitación rotativa durante 3 h con actividad inicial de 1 U de AAT/mL.



**Figura 2.6.** Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $r_{max}$  de AAT (tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,5 a 37°C) empleando como sustratos (●) L-aspartato y (○) α-cetoglutarato.

### **2.4.3. Inmovilización de AAT en Eupergit® C**

El estudio de la inmovilización del enzima debe realizarse en ausencia de limitaciones difusionales, con el fin de evitar el efecto de la difusión de sustratos y/o productos sobre la medida de la actividad enzimática [20]. Con este fin, se trabajó con una baja carga de AAT (10 U/mL de soporte  $\approx$  23  $\mu$ g de proteína/mL de soporte). En la Tabla 2.2 se muestran los principales resultados del estudio de las diferentes condiciones de inmovilización de AAT en Eupergit® C.

La inmovilización de enzimas en el soporte Eupergit® C se suele llevar a cabo a pH básico y alta fuerza iónica, siendo pH 10 el más recomendado, pues así se acelera la reacción entre los grupos aminos del enzima y los grupos epóxidos del soporte [21].

Como se observó en el estudio de estabilidad, a pH 10 AAT mantiene su actividad por encima del 70% después de 24 h. Cuando se realizó la inmovilización a este valor de pH (Método I en Tabla 2.2) se obtuvo un 91% de rendimiento, 40% de actividad retenida y el proceso duró 4 h; sin embargo, después del bloqueo de los grupos epóxidos remanentes con metilamina (pH 10 durante 19 h) y reactivación del enzima por incubación con PLP (pH 7,5 durante 41 h), la actividad retenida se redujo a 18%.

Con el objetivo de preservar la actividad enzimática, AAT se inmovilizó a pH 8 (Método II en Tabla 2.2). En este caso, la actividad retenida se incrementó a 46% aunque el rendimiento disminuyó a 70% y el proceso tuvo una duración de 24 h. Cuando se realizaron los procesos posteriores de bloqueo con metilamina e incubación con PLP, la actividad retenida disminuyó drásticamente a 16%.

De estos resultados se concluye que el bloqueo con metilamina es la etapa crítica, debido al efecto negativo de las condiciones en las que se lleva a cabo (pH 10 durante 19 h). Además, es posible que se produzca una interacción de este compuesto aminado con el cofactor PLP, formándose un complejo PLP-metilamina que se desorbería del centro activo y en consecuencia se produciría una pérdida irreversible de la actividad [17]. Mediante la incubación del enzima inmovilizado con una disolución de PLP no se logró la reactivación, posiblemente debido a la separación del complejo PLP-metilamina con el lavado final del catalizador.

**Tabla 2.2.** Inmovilización de AAT en Eupergit® C (10 U de AAT/mL de soporte).

Método	pH	Tampón	Fuerza iónica	Agente Bloqueante	Agente Estabilizante	Actividad retenida 1 (%) <sup>(b)</sup>	Actividad retenida 2 (%) <sup>(c)</sup>	Tiempo (h) <sup>(c)</sup>	Rendimiento (%)
I <sup>(a)</sup>	10	NaHCO <sub>3</sub>	1 M	MA 1,5 M pH 10	-	40	18	64	91
II <sup>(a)</sup>	8	Fosfato + NaCl	0,1 M + 0,9 M	MA 1,5 M pH 10	-	46	16	84	70
III <sup>(a)</sup>	8	Fosfato + NaCl	0,1 M + 0,9 M	2-ME 0,2 M pH 8	-	48	32	69	72
IV	10	NaHCO <sub>3</sub>	1 M	2-ME 0,2 M pH 8	-	42	29	8	95
V	10	NaHCO <sub>3</sub>	1 M	2-ME 0,2 M pH 8	OA 1,7 mM	52	40	8	95
VI	10	NaHCO <sub>3</sub>	1 M	2-ME 0,2 M pH 8	$\alpha$ -KG 1,7 mM	47	36	8	92

MA: metilamina; 2-ME: 2-mercaptoetanol; OA: oxaloacetato;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato.

<sup>(a)</sup> Reactivación con PLP 2 mM durante 41 horas.

<sup>(b)</sup> Actividad retenida antes del bloqueo de los grupos epóxidos remanentes del soporte.

<sup>(c)</sup> Valores finales después de la inmovilización, bloqueo de los epóxidos remanentes del soporte e incubación/lavado con PLP.

Se ha descrito que 2-mercaptoetanol (2-ME) también se puede usar como agente bloqueante, en cuyo caso, el proceso se realiza a bajos valores de pH y por periodos más cortos [22]. Además, como ya se mencionó anteriormente, se comprobó que AAT es estable en presencia de 2-ME 0,2 M. Cuando el bloqueo de los grupos epóxidos remanentes se llevó a cabo con 2-ME a pH 8 (Método III en Tabla 2.2) se obtuvo un 32% de retención final y la duración total del proceso fue de 69 h. Finalmente, se llevó a cabo una inmovilización al mejor valor de pH (pH 10), empleando el mejor agente bloqueante (2-ME) y con un lavado final con PLP en sustitución del proceso de reactivación del enzima por incubación con PLP (Método IV en Tabla 2.2). En estas condiciones se logró un 95% de rendimiento y 29% de retención en un periodo de tiempo más corto (8 h).

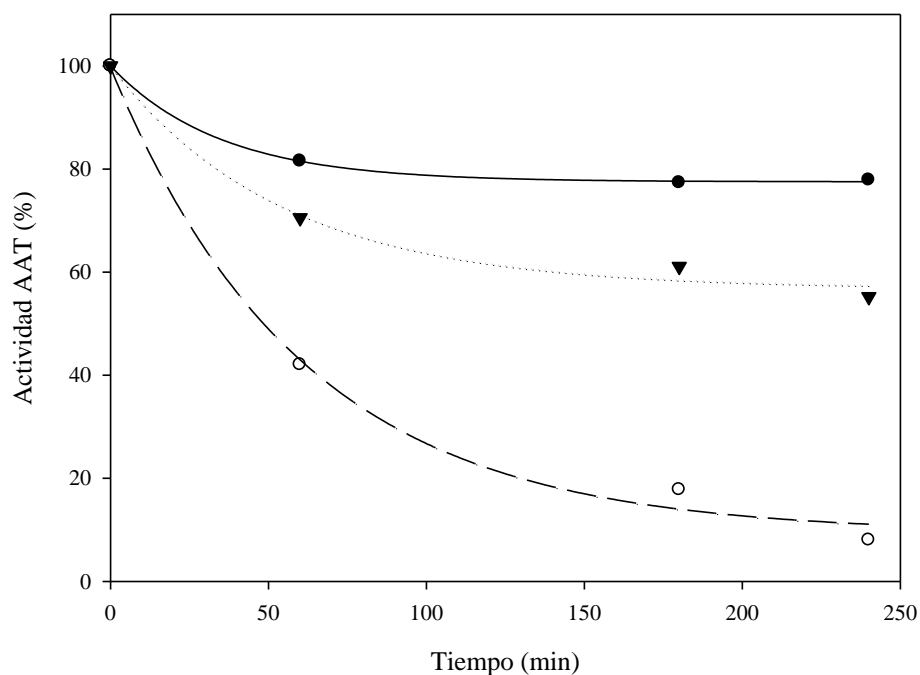
La presencia de sustratos naturales en disoluciones enzimáticas tamponadas prevendría la pérdida de actividad, pues el sustrato se uniría al centro activo del enzima protegiéndolo de la acción de agentes desnaturalizantes o inhibitorios [23]. Se seleccionaron los sustratos naturales del enzima AAT (L-aspartato,  $\alpha$ -cetoglutarato y oxaloacetato) como posibles agentes estabilizantes. Para realizar el estudio, se usó una concentración de L-aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato 10 veces mayor al valor de  $K_m$  de AAT hacia estos sustratos. Para oxaloacetato, otro sustrato ceto ácido, se utilizó la misma concentración que la de  $\alpha$ -cetoglutarato (calculado en la sección 2.4.2). En la Tabla 2.3 se muestran los resultados del efecto protector de los agentes estabilizantes. Los mejores resultados se obtuvieron en presencia de oxaloacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato, mientras que en presencia de L-aspartato se observó una mayor pérdida de actividad con respecto al blanco (realizado en ausencia de sustratos). L-aspartato podría formar el complejo intermediario quetimina (Asp-PLP) con el PLP unido al enzima, y su subsecuente hidrólisis dejaría al enzima en su forma PMP, que es más inestable y propensa a su desorción del centro activo [24].

**Tabla 2.3.** Efecto protector de los agentes estabilizantes en la actividad de AAT. La mezcla enzimática se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 24 h, en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10. La actividad inicial fue de 1 U de AAT/mL.

Agente estabilizante	Concentración	Actividad residual (%)
L-aspartato	409,3 mM	22
$\alpha$ -cetoglutarato	1,7 mM	60
Oxaloacetato	1,7 mM	89
Blanco	-	49

Así, oxaloacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato se seleccionaron como agentes estabilizantes durante el proceso de inmovilización (Método V y VI en Tabla 2.2), obteniéndose similares rendimientos de inmovilización y un incremento en las actividades retenidas hasta 40 y 36% respectivamente.

Finalmente se escogió como el mejor método de inmovilización de AAT en Eupergit<sup>®</sup> C el descrito en la Tabla 2.2, Método V (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Inmovilización de AAT en Eupergit<sup>®</sup> C (10 U/mL de soporte) en presencia de oxaloacetato 1,7 mM, en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 10 (Método V en Tabla 2.2). (●) blanco de inmovilización (enzima sin soporte); (▼) suspensión y (○) sobrenadante.

#### 2.4.4. Inmovilización de AAT en MANA-agarosa

La inmovilización de proteínas vía los grupos carboxilos ( $-\text{COOH}$ ) en soportes aminados suele constituir una buena alternativa, si se tiene en cuenta que los grupos carboxilo representan usualmente la mayor fracción de grupos reactivos en la superficie de las proteínas [18]. Para AAT de corazón porcino, el 20% de sus aminoácidos son carboxílicos (Asp y Glu), mientras que sólo el 10% son aminados (Lys y Arg) [14, 25].

Como soporte aminado se seleccionó monoaminometil-N-aminoetil agarosa (MANA-agarosa), con grupos amino primarios ( $-\text{NH}_2$ ) con un  $pK$  de 6,8. Este soporte se preparó a partir de glioxil-agarosa con una densidad de 270  $\mu\text{mol}$  de grupos aldehídos por mL de soporte.

La inmovilización de proteínas en soporte MANA-agarosa consiste básicamente en tres etapas. En primer lugar, se produce una adsorción iónica de las proteínas que ocurre muy rápidamente y a bajos valores de pH (5 ó 6); a continuación tiene lugar la formación de enlaces covalentes entre los grupos amino del soporte y los grupos carboxilo de las proteínas, que se lleva a cabo en presencia de carbodiimida (CDI) como activador de los grupos carboxilo; por último y a modo de comprobación, se realiza una desorción iónica por adición de NaCl (1 M), lo cual provoca un aumento de la fuerza iónica promoviendo la desorción de las proteínas que no se unieron covalentemente al soporte [18].

Con el objetivo de optimizar el proceso de inmovilización de AAT en MANA-agarosa, se evaluaron diferentes condiciones (Tabla 2.4). Primero, se trató de establecer la concentración adecuada de CDI para garantizar que todo el enzima se uniese covalentemente al soporte. Cuando se adicionaron 1 y 10 mM de CDI, el 89 y 31% del enzima se desorbió, respectivamente (Métodos I y II en Tabla 2.4). Sin embargo, cuando se utilizó una concentración final de 25 mM de CDI, sólo el 3% del enzima se desorbió (Método III en Tabla 2.4). Así, se estableció que 25 mM de CDI es la concentración necesaria para garantizar la mayor formación de enlaces covalentes entre el enzima y el soporte.

Los porcentajes de retención obtenidos en estas tres inmovilizaciones fueron diferentes. La principal diferencia entre los tres métodos consistió en el sistema tampón utilizado, por lo que se puede afirmar que la mayor pérdida de actividad podría estar asociada al sistema tampón. En tal sentido, se decidió realizar las siguientes inmovilizaciones con el tampón MES debido a su mejor capacidad tamponadora a pH 6 y a los buenos resultados de retención. Además se redujo el tiempo de adsorción iónica de 30 a 15 min, obteniéndose una pérdida de actividad durante esta primera etapa de 13% y una actividad retenida final de 70% (Método IV en Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.** Inmovilización de AAT en MANA-agarosa (10 U de AAT/mL de soporte).

Método	Tampon <sup>(a)</sup>	I. Adsorción iónica		II. Enlace covalente <sup>(b)</sup>		III. Desorción iónica <sup>(c)</sup>		
		Tiempo de adsorción iónica(min)	Actividad retenida (%)	Rendimiento (%)	Concentración de CDI (mM)	Actividad retenida (%)	Desorción iónica (%) <sup>(d)</sup>	Actividad retenida (%)
I	Fosfato	30	39	98	1	26	89	3
II	HEPES	30	85	99	10	79	31	52
III	MES	30	65	100	25	61	3	55
IV	MES	15	86	98	25	76	4	70

<sup>(a)</sup> 25 mM pH 6.

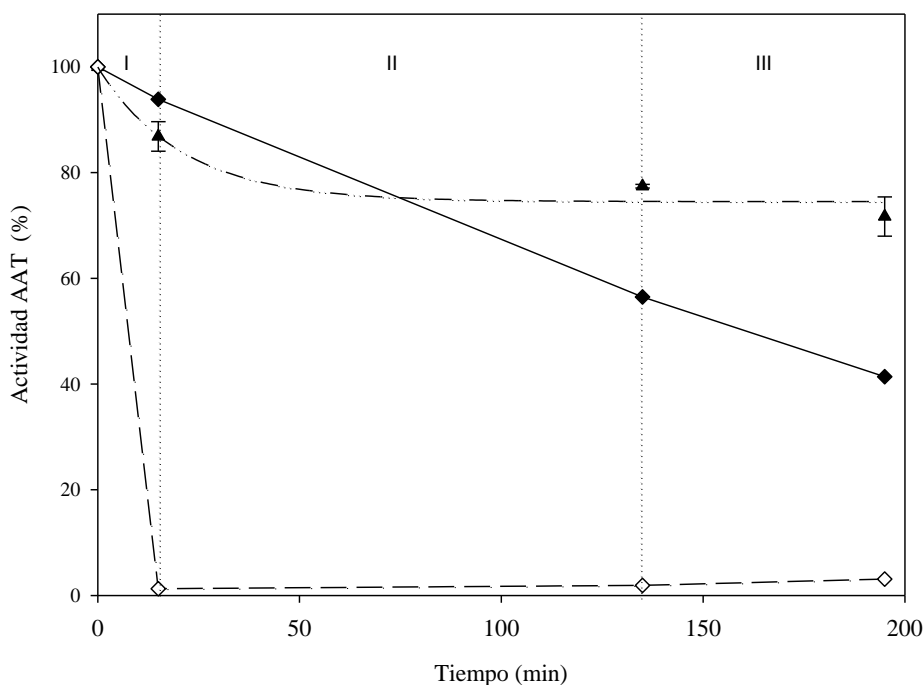
<sup>(b)</sup> Se añadió CDI al final del tiempo de adsorción iónica. El tiempo para la formación de enlaces covalentes fue de 2 h.

<sup>(c)</sup> Se añadió NaCl 1M al final del proceso de formación de enlaces covalentes, y la mezcla se mantuvo en incubación durante 1 h.

<sup>(d)</sup> El rendimiento de desorción iónica se calculó en relación a la actividad enzimática retenida al final del paso de formación de enlaces covalentes.

En todos los procesos de inmovilización se realizó un seguimiento de la actividad enzimática del blanco, suspensión y sobrenadante. Se observó que CDI tiene un efecto menos negativo sobre la actividad de AAT cuando se encuentra unido al soporte que cuando se encuentra libre, lo que se evidenció con una disminución del 11% en la actividad de la suspensión mientras que el blanco perdió un 37% al cabo de 2 h de incubación con 25 mM de CDI (Figura 2.8).

Finalmente se escogió como el mejor método de inmovilización de AAT en MANA-agarosa el descrito en el Método IV en la Tabla 2.4 (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Inmovilización de AAT en MANA-agarosa (10 U/mL de soporte) en tampón MES 25 mM pH 6 (Método IV en Tabla 2.4). (◆) Blanco; (▲) suspensión y (◇) sobrenadante. I. Adsorción iónica; II. Formación de enlaces covalentes con CDI 25 mM y III. Desorción iónica con NaCl 1 M.

#### 2.4.5. Inmovilización de AAT en LentiKats®

La inmovilización por atrapamiento en hidrogeles es una técnica ampliamente utilizada para la inmovilización de células. Algunos autores afirman que esta técnica no sería adecuada para la inmovilización de enzimas debido a su reducido tamaño, de manera que se podría producir una difusión rápida hacia fuera del soporte [26-28]. Se plantea que como paso previo a la



inmovilización por atrapamiento en hidrogeles, sería necesaria la formación de complejos enzimáticos con polielectrolitos o de estructuras supramoleculares por entrecruzamiento del enzima (CLEAs). Sin embargo, otros autores han reportado obtener buenos rendimientos de inmovilización sin la necesidad de pretratar el enzima por métodos de entrecruzamiento [29-32].

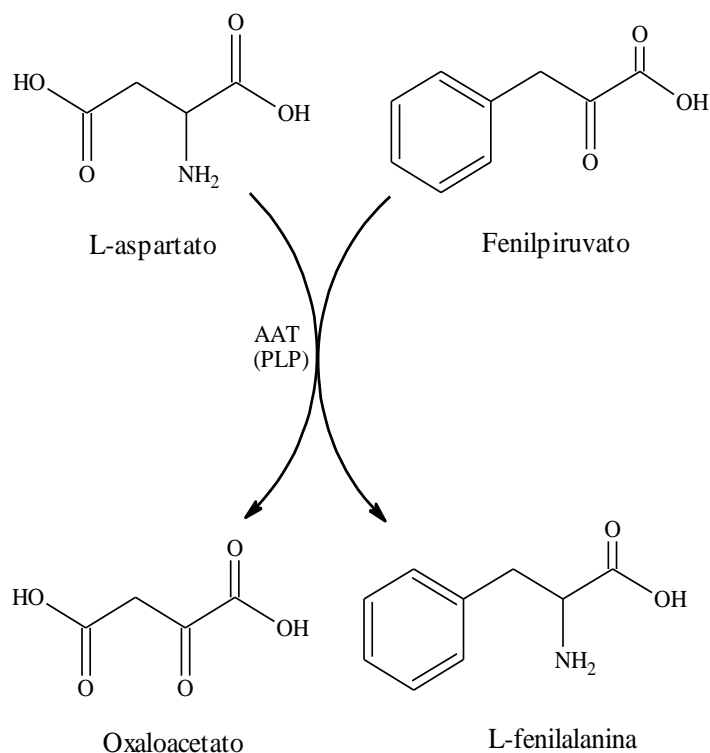
Antes de la inmovilización de AAT por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup>, se intentó realizar el entrecruzamiento del enzima usando glutaraldehído como agente entrecruzante, ya que es uno de los más estudiados y utilizados para este propósito. En los experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído (0,5% en tampón MES 0,1 M pH 6) se observó la formación de agregados; sin embargo estos carecían de actividad enzimática, debido posiblemente a una interacción química entre el grupo aldehído del glutaraldehído y el grupo amino de la Lys258 del centro activo. Esta unión desplazaría al cofactor PLP del centro activo y en consecuencia se produciría una pérdida irreversible de la actividad.

A pesar de que los experimentos de entrecruzamiento fallaron, se continuó con la inmovilización del enzima libre sin ningún tipo de pretratamiento. Se procedió a inmovilizar una baja carga de enzima (12 U de AAT/mL de soporte). Después del proceso de incubación de las partículas lenticulares en la disolución endurecedora, se detectó un 40% de la actividad enzimática en las partículas, mientras que en la disolución endurecedora se midió el 60% de la actividad. Este resultado indicaría que no hay pérdidas de actividad durante el proceso de inmovilización y se descartaría la presencia de limitaciones difusionales en las condiciones de reacción que se emplean en el test de actividad.

#### **2.4.6. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado**

Con el objetivo de sintetizar L-fenilalanina (Phe) mediante el enzima AAT de corazón porcino, se emplearon los sustratos fenilpiruvato y L-aspartato (Asp) como ceto ácido y donador de grupos amino respectivamente, en presencia del cofactor PLP (Figura 2.9).

Se descartó el uso de sistemas tamponadores basados en fosfatos debido a que éstos promueven la desorción del cofactor PLP del centro activo conllevando a la pérdida de actividad [33]. En su lugar se utilizó el tampón orgánico HEPES.



**Figura 2.9.** Reacción de síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT.

La reacción de síntesis de Phe se llevó a cabo usando AAT tanto en su forma libre como inmovilizada. Como se describió anteriormente, la inmovilización de AAT en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se optimizó aplicando una baja actividad enzimática (del orden de 10 U/mL de soporte). Sin embargo, para poder realizar la reacción de interés en un corto tiempo, era necesario utilizar los biocatalizadores inmovilizados con una mayor actividad enzimática (250 U de AAT/mL de soporte).

Entonces se procedió a realizar la inmovilización de AAT según los métodos optimizados ya descritos, con la suficiente carga enzimática para obtener la actividad deseada para los tres soportes, considerando el porcentaje de retención que se había logrado al inmovilizar bajas actividades.

Las actividades retenidas al final de los procesos de inmovilización de alta carga enzimática fueron significativamente menores a las esperadas: 13, 0,5 y 3% para el enzima inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> respectivamente. Esta disminución podría ser

debida a la presencia de limitaciones difusionales que suelen incrementarse cuando la cantidad de proteínas a inmovilizar también aumenta [20].

Las limitaciones difusionales son apreciables cuando la velocidad de difusión de los sustratos y/o productos es menor que la velocidad de la reacción; en ese caso, la difusión limitaría la velocidad observada. En particular, las limitaciones difusionales son rápidamente apreciables cuando se mide la actividad enzimática de los enzimas inmovilizados empleando los sustratos naturales (L-aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato) debido a su rápida cinética de reacción. Sin embargo, el empleo de sustratos no naturales del enzima, como por ejemplo fenilpiruvato, que implica reacciones más lentas, podría resultar en similares cinéticas de reacción tanto para el enzima libre como para el inmovilizado [34].

Debido a que la velocidad de reacción del ensayo de actividad enzimática estaba limitada por la velocidad de difusión, la cantidad de biocatalizador inmovilizado empleado en la reacción de síntesis de Phe se calculó empleando los resultados de actividad retenida obtenidos para las inmovilizaciones a baja carga enzimática. Todas las reacciones de síntesis de Phe se realizaron con 25 U de AAT libre o su equivalente inmovilizado por mL de reacción.

Las velocidades iniciales de reacción ( $r_0$ ) correspondientes a la formación de Phe fueron similares para las reacciones catalizadas por el enzima libre y las catalizadas por el enzima inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup> (Tabla 2.5). Estos resultados confirman que la baja actividad retenida observada para los biocatalizadores de alta carga enzimática es debida básicamente a las limitaciones difusionales observadas al realizar el ensayo de actividad. Además, verifican las suposiciones realizadas para calcular las actividades retenidas a altas cargas enzimáticas. Asimismo, se obtuvieron rendimientos de reacción superiores al 70% tanto en la reacción catalizada por el enzima libre como las catalizadas por el enzima inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup>.

Las limitaciones difusionales están muy bien estudiadas cuando se inmovilizan enzimas en soportes porosos [34, 35]. Sin embargo este fenómeno no está muy bien descrito cuando la inmovilización se realiza por atrapamiento en soportes, como por ejemplo LentiKats<sup>®</sup>. Algunos autores observaron una disminución de las velocidades de reacción cuando inmovilizaron enzimas por esta técnica [28, 29]. Las diferencias entre las cinéticas del enzima libre e inmovilizado se atribuyen, o bien al hidrogel utilizado, que podría actuar como una

barrera difusional, o bien a un cambio de la conformación enzimática inducido por la interacción del enzima con el soporte [31].

**Tabla 2.5.** Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AAT libre e inmovilizado. Las reacciones se llevaron a cabo con 0,1 M fenilpiruvato, 0,1 M L-aspartato, 0,1 mM PLP y 25 U de AAT/mL de reacción (tampón HEPES 0,1 M pH 7,5) a 37°C durante 8 días.

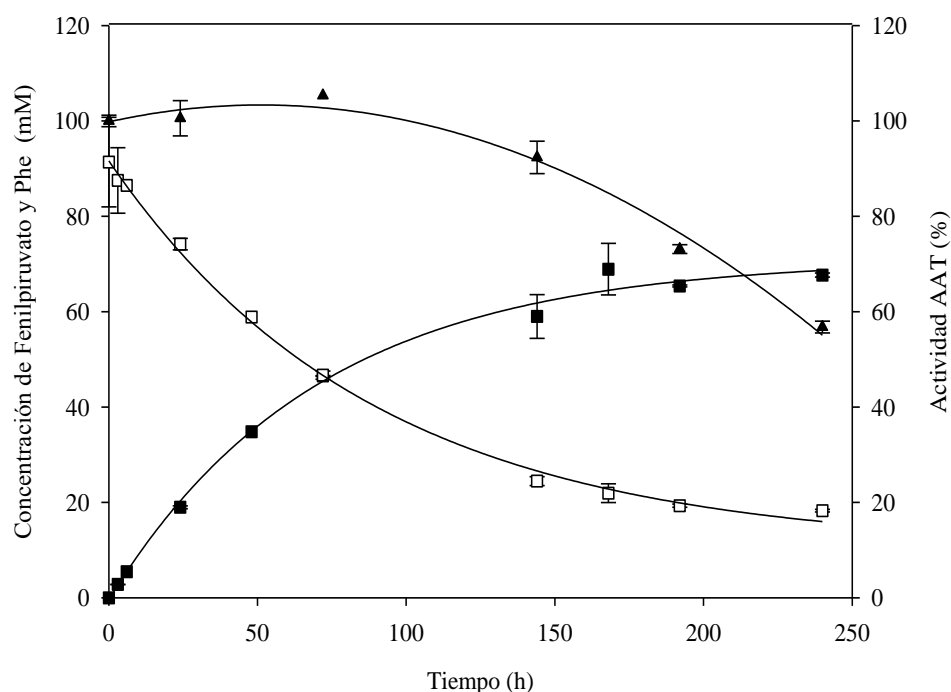
Parámetros	AAT			
	Libre	Eupergit® C	MANA-agarosa	LentiKats®
Rendimiento (%)	68,3 ± 1,1	73,7 ± 2,5	4,7 ± 0,1	72,5 ± 7,0
Actividad residual (%)	52,9 ± 1,1	73,1 ± 0,9	55,0 ± 0,2	71,4 ± 2,2
Velocidad inicial $r_o$ (mmol/L·h) <sup>(a)</sup>	0,74	0,80	0,07	0,84

<sup>(a)</sup>  $R^2 \geq 0,95$

En relación a la síntesis de Phe catalizada por AAT inmovilizado en MANA-agarosa, el rendimiento y la velocidad inicial de reacción resultaron ser de un orden de magnitud menor en comparación con el enzima libre (Tabla 2.5). A pesar del escaso rendimiento de formación de producto, la concentración de fenilpiruvato disminuyó en 73% al final de la reacción. Además, se observó que durante la reacción el color del soporte MANA-agarosa, originalmente blanquecino, cambió gradualmente a naranja. Con el objetivo de esclarecer este hecho, se realizó un blanco poniendo en contacto una disolución 0,1 M de fenilpiruvato con el soporte MANA-agarosa (sin enzima) y se midió la concentración de fenilpiruvato en el tiempo a las mismas condiciones que la reacción de síntesis (tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y 37°C). Se observó de nuevo el cambio de color del soporte así como una disminución similar de la concentración de fenilpiruvato. Para descartar una posible adsorción iónica de este compuesto en el soporte se incrementó la fuerza iónica a 1 M, pero no se observó desorción de fenilpiruvato al medio. La causa de este fenómeno podría ser la reacción entre los grupos  $-NH_2$  remanentes del soporte (que no reaccionaron durante la inmovilización) y el grupo carbonilo ( $-C=O$ ) del fenilpiruvato, que podrían formar enlaces de Schiff [36], o bien otros tipos de interacciones. En uno u otro caso, el resultado es una disminución importante de la

concentración del sustrato fenilpiruvato en el medio de reacción, lo que conlleva una disminución de su disponibilidad en la reacción enzimática. Por lo tanto, se podría afirmar que el uso de enzimas inmovilizados en soportes amino como biocatalizadores debería evitarse cuando se utilicen sustratos con grupos carbonilo, por posibles interacciones entre el sustrato y el soporte, a menos que los grupos amino del soporte hayan sido bloqueados previamente.

Los perfiles de producción de Phe y consumo de fenilpiruvato en la reacción catalizada por AAT libre fueron similares a los obtenidos en las reacciones catalizadas por los enzimas inmovilizados en Eupergit® C (Figura 2.10) y LentiKats®.

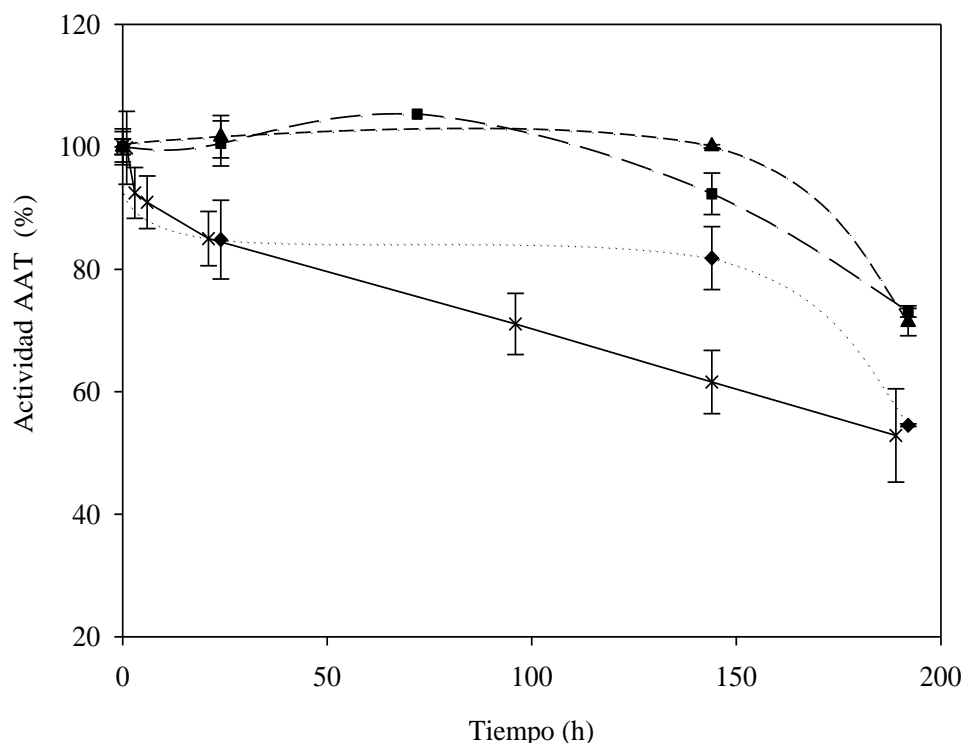


**Figura 2.10.** Cinética de conversión de fenilpiruvato a L-fenilalanina catalizada por AAT inmovilizado en Eupergit® C: (■) L-fenilalanina; (□) fenilpiruvato; (▲) actividad de AAT inmovilizado. La reacción se llevó a cabo con 0,1 M fenilpiruvato, 0,1 M L-aspartato, 0,1 mM PLP y 25 U/mL de reacción (tampón HEPES 0,1 M pH 7,5) a 37°C.

Se ha descrito que la constante de equilibrio ( $K_c$ ) de la reacción catalizada por AAT a 37°C es cercana a 1, lo que significa que el rendimiento de reacción se vería limitado a un 50% [37]. En nuestros experimentos, el rendimiento de reacción se incrementó hasta el 73%, lo cual podría ser debido a la reacción de descarboxilación espontánea que sufre el producto

oxaloacetato [37]. Así, la disminución de la concentración del producto desplazaría el equilibrio de la reacción hacia la producción de Phe.

Por otro lado, se midió la actividad enzimática de AAT libre e inmovilizado durante el curso de la reacción (Figura 2.11). Después de 72 h de reacción todos los enzimas inmovilizados mantuvieron el 100% de su actividad inicial, mientras que el enzima libre perdió el 30%. Al cabo de las 192 horas de reacción, las actividades para el enzima libre y los inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> fueron de 53, 73, 55 y 71% respectivamente. Estos resultados muestran una mejora moderada en la estabilidad de AAT en las condiciones de reacción (tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y 37°C) cuando el enzima está inmovilizado en los soportes utilizados.



**Figura 2.11.** Perfiles de estabilidad enzimática de AAT durante la reacción de síntesis de L-fenilalanina en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C. (×) AAT libre; (■) AAT inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C; (◆) AAT inmovilizado en MANA-agarosa y (▲) AAT inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>.

## 2.5. Conclusiones

Se optimizó la inmovilización de bajas cargas del enzima L-aspartato transaminasa (AAT) tanto por formación de enlaces covalentes en soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa como por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>. Las condiciones a las que se llevaron a cabo las inmovilizaciones pueden ser extrapolables para la inmovilización de altas cargas enzimáticas.

Se observaron limitaciones difusionales en los biocatalizadores inmovilizados de alta carga enzimática únicamente cuando la reacción se realizó con los sustratos naturales del enzima. Sin embargo, la difusión dejó de ser limitante cuando se emplearon sustratos no naturales, lo cual permite la aplicación del enzima inmovilizado en la síntesis de L-fenilalanina (Phe).

Se obtuvieron altos rendimientos de Phe ( $\geq 70\%$ ) con AAT inmovilizado en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup>, con un significativo incremento de la estabilidad enzimática con respecto a la reacción catalizada por el enzima libre.

Durante la reacción de síntesis se produjeron interacciones inespecíficas entre el sustrato fenilpiruvato y el soporte MANA-agarosa, lo que dio lugar a bajos rendimientos de reacción.

## 2.6. Referencias

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005;69:1-8.
- [2] Kamphuis J, Boesten WHJ, Broxterman QB, Hermes HFM, van Balken JAM, Meijer EM, Schoemaker HE. New developments in the chemo-enzymatic production of amino acids. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 1990;42:133-186.
- [3] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006:615-626.
- [4] Sanchez S, Demain AL. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development* 2011;15:224-230.
- [5] Yue H, Yuan Q, Wang W. Enhancement of L-phenylalanine production by  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Food Engineering* 2007;79:878-884.
- [6] Serpil T, Bulent A, Tuncer HO. Bioconversion of trans-cinamic acid to L-phenylalanine by L-phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula Glutinis*: parameters and kinetics. *Enzyme and Microbial Technology* 1995;17:445-452.
- [7] Jia SR, Cuib JD, Li Y, Sunc AY. Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acids by high-level expression of phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 2008;42 193-197.
- [8] Hummel W, Kula MR. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry* 1989;184:1-13.
- [9] Hummel W, Schmidt E, Wandrey C, Kula MR. L-phenylalanine dehydrogenase from *Brevibacterium* sp. for production of L-phenylalanine by reductive amination of phenylpyruvate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1986;25:175-185.
- [10] Chao YP, Lai ZJ, Chen P, Chern JT. Enhanced conversion rate of L-phenylalanine by coupling reactions of aminotransferases and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnology Progress* 1999;15:453-458.



- [11] Hu Y, Tang T, Yang W, Zhou H. Bioconversion of phenylpyruvic acid to L-phenylalanine by mixed-gel immobilization of *Escherichia coli* EP8-10. *Process Biochemistry* 2009;44:142-145.
- [12] Leng Y, Zheng P, Sun ZH. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52. *Process Biochemistry* 2006;41:1669-1672.
- [13] Jenkins WT, Yphantis DA, Sizer IW. Glutamic aspartic transaminase. I. Assay, purification and general properties. *Journal of Biological Chemistry* 1959;234:51-57.
- [14] Martínez-Carrión M, Turano C, Chiancone E, Bossa F, Giartosio A, Riva F, Fasella P. Isolation and characterization of multiple forms of glutamate-aspartate aminotransferase from pig heart. *Journal of Biological Chemistry* 1967;242:2397-2409.
- [15] Kurkijarvi K, Korpela T. Comparison of the coupling recoveries of immobilized aspartate aminotransferase. Specific activity, enzyme-bound coenzyme, and transaminationable active centers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1983;8:135-144.
- [16] Kurkijarvi K, Korpela T. Immobilization of aspartate aminotransferase on agarose. *Biochimie* 1989;71:439-448.
- [17] López C, Ríos SD, López-Santín J, Caminal G, Álvaro G. Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. *Biochemical Engineering Journal* 2010;49:414-421.
- [18] Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisán JM. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology* 1993;15:546-550.
- [19] McComb RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RC, Bowers GN. Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clinical Chemistry* 1976;22:141-150.
- [20] Illanes A, González JM, Gómez JM, Valencia P, Wilson L. Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading. *Electronic Journal of Biotechnology* 2010;13 1-9.

- [21] Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit<sup>®</sup> C: a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2000;10:157-176.
- [22] Hernaiz MJ, Crout DHG. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:26-32.
- [23] Álvaro G, Fernández-Lafuente R, Blanco RM, Guisán JM. Stabilizing effect of penicillin G sulfoxide, a competitive inhibitor of penicillin G acylase: its practical applications. *Enzyme and Microbial Technology* 1991;13:210-214.
- [24] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural and evolutionary considerations. *Annual Review of Biochemistry* 2004;73:383-415.
- [25] Huynh QK, Sakakibara R, Watanabe T, Wada H. Glutamic oxaloacetic transaminase isozymes from rat liver. Purification and physicochemical characterization. *Journal of Biochemistry* 1980;88:231-239.
- [26] Czichocki G, Dautzenberg H, Capan E, Vorlop KD. New and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme-complexes in LentiKats. *Biotechnology Letters* 2001;23:1303-1307.
- [27] Wilson L, Illanes A, Pessela BCC, Abián O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in LentiKats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnology and Bioengineering Journal* 2004;86:558-562.
- [28] Gröger H, Capan E, Barthuber A, Vorlop KD. Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. *Organic Letters* 2001;3:1969-1972.
- [29] Fernandes P, Marques MPC, Carvalho F, Cabral JMS. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2009;84:561-564.
- [30] Gómez de Segura A, Alcalde M, Plou FJ, Remaud-Simeon M, Monsan P, Ballesteros A. Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-

1299, and its effect on product selectivity. *Biocatalysis and Biotransformation* 2003;21:325-331.

[31] Grosova Z, Rosenberg M, Rebros M, Sipocz M, Sedlackova B. Entrapment of  $\beta$ -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnology Letters* 2008;30:763-767.

[32] Rebros M, Rosenberg M, Mlichova Z, Kristofikova L, Paluch M. A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;39:800-804.

[33] Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry* 1978;24:58-73.

[34] Suau T, Álvaro G, Benaiges MD, López-Santín J. Performance of an immobilized fuculose-1-phosphate aldolase for stereoselective synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 2009;27:136-142.

[35] Forni L. Mass and heat transfer in catalytic reactions. *Catalysis Today* 1999;52:147-152.

[36] Carey FA, Sundberg RJ. editors. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and mechanisms*. 2007. p. 1199.

[37] Fotheringham IG. Synthesis of L-phenylalanine by fermentation and chemoenzymatic methods. In: D. J. Ager editor. *Handbook of Chiral Chemicals*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 648.



# CAPÍTULO 3

---

## *Síntesis de L-aspartato catalizada por L-aspartato amonio liasa inmovilizado*

**Publicación:**

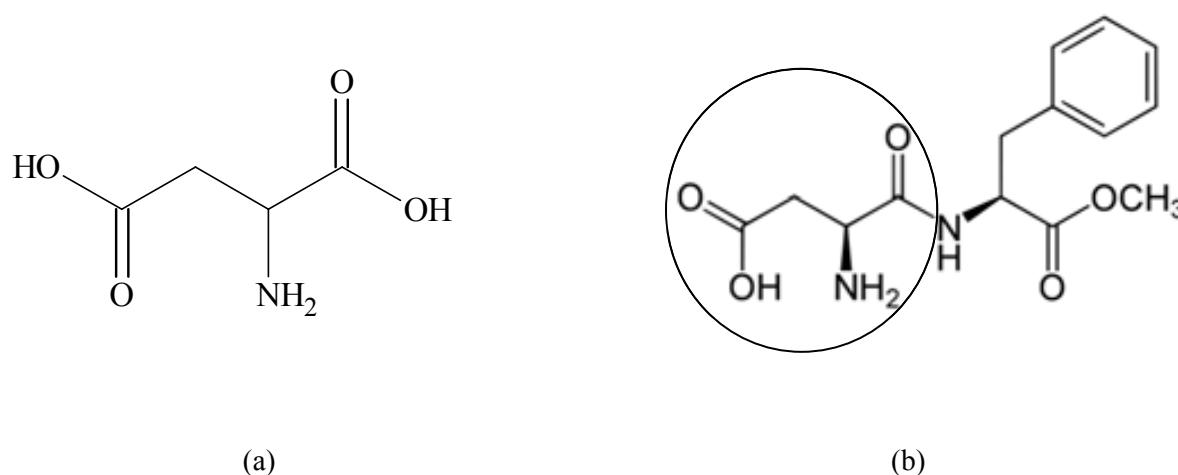
Cárdenas-Fernández M, López C, Álvaro G, López-Santín J. Immobilized L-aspartate ammonia-lyase from *Bacillus* sp. YM55-1 as biocatalyst for highly concentrated L-aspartate synthesis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2012,35(8):1437-1444.

## **Resumen**

El aminoácido L-aspartato (Asp) goza de una alta demanda especialmente en la industria farmacéutica y alimentaria. La síntesis de Asp se realiza preferentemente por biotransformación usando el enzima aspartasa de *Escherichia coli* o AspA. L-aspartato amonio liasa de *Bacillus* sp. YM55-1 o aspartasa (AspB, EC 4.3.1.1) cataliza la conversión reversible de L-aspartato a fumarato y amonio con una alta especificidad hacia su sustrato. El enzima AspB se expresó en *Escherichia coli* y se purificó parcialmente por precipitación térmica y saturación con sulfato amónico obteniéndose un factor de purificación de 7,7 y actividad específica de 334 U/mg de proteína. AspB se inmovilizó a través de enlaces covalentes en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa y por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup>, y se alcanzaron porcentajes de retención de 25, 85 y 63% respectivamente. Por último, AspB libre y los tres biocatalizadores inmovilizados se emplearon en la síntesis de altas concentraciones L-aspartato ( $\geq 450$  mM  $\approx 60$  g/L). Los biocatalizadores inmovilizados se reutilizaron eficientemente en 5 ciclos de reacción de síntesis de L-aspartato, manteniendo alrededor del 90% de su actividad inicial y alcanzando una conversión superior al 90% en todos los casos.

### 3.1. Introducción

L-aspartato (Asp) es uno de los aminoácidos con mayor demanda en el mercado, debido principalmente a que es componente del edulcorante artificial aspartamo (Figura 3.1). También se aplica en la industria farmacéutica, en nutrición parenteral, como aditivo alimenticio y además es usado como materia prima para la síntesis enzimática del aminoácido L-alanina [1].



**Figura 3.1.** a) L-aspartato y b) Aspartamo (en círculo L-aspartato).

Inicialmente, Asp se producía por métodos químicos, por ejemplo mediante la hidrólisis del aminoácido asparagina que a su vez se obtenía a partir de hidrolizados proteicos. Con el descubrimiento del enzima aspartasa producido por *Escherichia coli* o AspA (en capítulo 1 sección 1.4.2.1 se describen en más detalle las principales características de este enzima), la producción de Asp por fermentación usando esta cepa reemplazó rápidamente a los métodos químicos. Posteriormente, se realizó el estudio de la ruta metabólica implicada en la síntesis del aminoácido, la caracterización del enzima AspA, el aislamiento del gen que codifica el enzima y su posterior clonación. Con toda esta información, actualmente la síntesis del aminoácido Asp por vía enzimática usando AspA es el método de preferencia [2].

En líneas generales, la síntesis a nivel industrial de Asp catalizada por AspA tiene lugar a partir de ácido fumárico o incluso de su precursor, anhídrido maleico (Figura 3.2). Tras la síntesis enzimática, la recuperación de Asp se consigue por precipitación por adicción de ácido sulfúrico [2].





bacterias como *Pseudomonas fluorescens* [7], *Serratia marcescens* [8], *Bacillus subtilis* [9] y *Brevibacterium flavum* [10]. Además, se ha reportado el enzima L-aspartato deshidrogenasa dependiente del cofactor NAD(P), que fue utilizado en la síntesis Asp alcanzando un 90% de conversión y concentraciones finales de hasta 112 mM de Asp. Sin embargo, para poder hacer el proceso económicamente más atractivo, los autores plantearon la necesidad de acoplar una segunda reacción enzimática con el objetivo de regenerar el cofactor [11].

Hace poco más de una década se ha descrito un nuevo enzima aspartasa termoestable producido por *Bacillus* sp. YM55-1, denominado AspB (en el capítulo 1 sección 1.4.2.1 se describen en más detalle las principales características de este enzima). AspB goza de excelentes características en comparación con AspA de *E. coli*, tales como su alta actividad catalítica, termoestabilidad y la no dependencia de cofactor para mantener su capacidad catalítica [12]. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la aplicación de AspB en la síntesis del aminoácido Asp, ni mucho menos se ha establecido un método de inmovilización (ni de las células con actividad AspB ni del enzima aislado) para mejorar aún más las características del enzima, lo que permitiría su potencial utilización en la síntesis del Asp.

En este capítulo se describe la inmovilización del enzima L-aspartato amonio liasa de *Bacillus* sp. YM55-1 o AspB por formación de enlaces covalentes y atrapamiento, así como la posterior aplicación del enzima (libre e inmovilizado) en la síntesis de altas concentraciones de L-aspartato y la reutilización de los biocatalizadores inmovilizados.

## **3.2. Objetivos**

### *Objetivo general*

-Establecer un método enzimático para la síntesis de altas concentraciones del aminoácido L-aspartato usando como biocatalizador L-aspartato amonio liasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) inmovilizado.

### *Objetivos específicos*

-Purificar parcialmente el enzima AspB.

-Estudiar la estabilidad de AspB en las diferentes condiciones de inmovilización aplicadas en este estudio.

-Inmovilizar AspB por los métodos de formación de enlaces covalentes y de atrapamiento.

-Determinar los parámetros cinéticos para la reacción de síntesis de L-aspartato catalizada por el enzima libre e inmovilizado.

-Estudiar la estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados mediante su reutilización en la síntesis de altas concentraciones de L-aspartato.

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Enzima y reactivos químicos

Todos los reactivos químicos, de grado analítico, y Eupergit<sup>®</sup> C fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El soporte agarosa 10 BCL fue adquirido en Iberagar (Coíña, Portugal). LentiKats<sup>®</sup> gel fue suministrado por GeniaLab (Braunschweig, Alemania). El enzima recombinante L-aspartato amonio liasa o aspartasa (AspB) fue clonado en *Escherichia coli* BL21(D3) por c-LEcta (Leipzig, Alemania) quien suministró la cepa y el plásmido.

#### 3.3.2. Expresión de aspartasa (AspB)

La cepa recombinante *E. coli* BL21(D3) con actividad AspB fue cultivada por la Planta Piloto de Fermentación del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. El cultivo de la cepa se llevó a cabo en un medio definido de minerales [13] que contenía 0,05 g/L de kanamicina, empleando un biorreactor Biostat<sup>®</sup> B de 5 L (Sartorius, Goettingen, Alemania) a 30°C y pH 7. El valor de pO<sub>2</sub> se mantuvo al 30% de saturación a 1 vvm adaptando la velocidad de agitación entre 200 y 900 rpm. El pH se controló por adición de NaOH 30% o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La expresión del enzima se indujo por adición de 100 µM de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (8 h de cultivo) y se mantuvo bajo las mismas condiciones durante 16 h. Al final del proceso de cultivo ( $DO_{600nm} = 136 \approx 41,4$  g de peso seco de células – DCW/L de cultivo) las células se separaron por centrifugación (4000 rpm a 4°C durante 15 min) y se lavaron dos veces con tampón HEPES 0,1 M pH 7.

#### 3.3.3. Purificación parcial de AspB

El precipitado celular se resuspendió en tampón HEPES 0,1 M pH 7 hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 100; luego las células se lisaron mediante doble disrupción mecánica a 21 kpsi (Constant System LTD, Warwickshire, Inglaterra). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (8000 rpm a 4°C durante 30 min). Se recuperaron 20 mL de extracto crudo a los que se adicionó L-aspartato sólido para alcanzar una concentración final de 0,1 M y 11% (p/v) de sulfato amónico sólido (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla se calentó a 72°C durante 5 min e inmediatamente se enfrió a 4°C. Las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación (8500 rpm a 4°C durante 30 min). Finalmente, se recuperaron 18 mL de sobrenadante y se

añadió  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido hasta un 60% (p/v) de saturación final. La mezcla se mantuvo en agitación suave a 4°C durante 30 min. El enzima precipitado se recuperó por centrifugación y se almacenó como suspensión en 60% (p/v) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 4°C. Se tomaron muestras en cada uno de los pasos de purificación, que se analizaron mediante la técnica de electroforesis en gel (SDS-PAGE). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL, USA) usando albúmina sérica bovina como estándar (Anexo 2).

### **3.3.4. Ensayos de estabilidad de AspB**

El enzima AspB libre (2 U/mL) se incubó en las condiciones requeridas por las diferentes técnicas de inmovilización, y se realizó un seguimiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo en dichas condiciones:

*i)* a diferentes valores de pH y fuerza iónica: pH 5 y 6 (en tampón MES 25 mM); pH 7 (en HEPES 0,1 M); pH 8, 9 y 10 (en tampón bicarbonato sódico 1 M).

*ii)* en presencia de diferentes concentraciones de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimida (CDI): 1, 10, 25 y 50 mM (en tampón MES 25 mM pH 6).

*iii)* en presencia de agentes bloqueadores de los grupos epóxidos remanentes del soporte Eupergit<sup>®</sup> C: metilamina 1,5 M y glicina 2 M (en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 9), 2-mercaptoetanol 0,2 M (en tampón HEPES 0,1 M pH 7).

### **3.3.5. Inmovilización de AspB por enlace covalente en Eupergit<sup>®</sup> C**

Previamente, el soporte Eupergit<sup>®</sup> C se hidrató con agua desionizada a 4°C. Al cabo de 24 h el soporte se separó por filtración al vacío. La inmovilización de AspB se llevó a cabo mezclando 1 mL de soporte húmedo con 9 mL de disolución enzimática (63 U de AspB) en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 8 ó 9. La suspensión se mantuvo en agitación rotativa (en “roller”) y temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 15 h. Al cabo de dicho tiempo, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío. Los grupos epóxidos remanentes del soporte se bloquearon por incubación del soporte con 2-mercaptoetanol 0,2 M (tampón HEPES 0,1 M pH 7) en agitación rotativa y temperatura ambiente durante 4 h. Al final del proceso, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5, se filtró y se almacenó a 4°C.

### 3.3.6. Inmovilización de AspB por enlace covalente en MANA-agarosa

La preparación del soporte MANA (monoaminometil-N-aminoetil) agarosa 10 BCL se realizó según el método descrito por Fernández-Lafuente [14] y como ya se detalló en la sección 2.3.4.2. Se utilizó el soporte MANA-agarosa con una densidad de grupos amino primarios ( $-NH_2$ ) de 220  $\mu\text{mol/mL}$  de soporte. Para la inmovilización de AspB se mezcló 1 mL de soporte con 9 mL de disolución enzimática (57 U de AspB) en tampón MES 25 mM pH 6. La mezcla se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se retiró un determinado volumen del sobrenadante e inmediatamente se adicionó el mismo volumen de una disolución fresca de CDI 200 mM (tampón MES 25 mM pH 6) para alcanzar una concentración final en la suspensión enzimática de 10 ó 25 mM. La mezcla se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, para comprobar la formación de enlaces covalentes, se adicionó a la suspensión NaCl en forma sólida para alcanzar una concentración de 1 M y la suspensión se mantuvo en agitación durante 1 h. Al final del proceso, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5, se filtró y se almacenó a 4°C.

### 3.3.7. Inmovilización de AspB por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>

La inmovilización de AspB en el soporte LentiKats<sup>®</sup> se realizó según el protocolo descrito por la casa comercial GeniaLab. El gel LentiKats<sup>®</sup> se licuó por calentamiento a 90°C y luego se enfrió a 35°C. A esta temperatura se mezclaron 2 mL de la disolución enzimática (980 U de AspB) en tampón HEPES 0,1 M pH 7 con 8 mL de LentiKats<sup>®</sup> líquido. Mediante la “impresora” LentiKats<sup>®</sup> se formaron partículas con forma lenticular, con un diámetro de 3-4 mm, sobre una placa Petri (Figura 1.11). Una vez formadas las partículas, se mantuvieron a temperatura ambiente hasta una pérdida de peso del 70% por efecto de la evaporación del agua contenida en ellas. Luego se añadió la disolución estabilizadora y las partículas se mantuvieron en agitación rotativa durante 2 h. Finalmente, el enzima inmovilizado se recuperó por decantación, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y se almacenó a 4°C.

### 3.3.8. Seguimiento de los procesos de inmovilización

En todos los casos se realizó el seguimiento en paralelo de un ensayo “blanco” en el que el volumen del soporte se sustituyó por el mismo volumen de agua. Para todos los procesos de inmovilización, se tomaron muestras del blanco, la suspensión y el sobrenadante a lo largo del tiempo y se analizó la actividad enzimática. El cálculo de la *actividad retenida* (%) y del

*rendimiento de inmovilización (%)* se realizó de acuerdo a las fórmulas descritas en la sección 2.3.6.

### **3.3.9. Síntesis de L-aspartato catalizada por AspB libre e inmovilizado**

AspB libre y los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se emplearon como biocatalizadores para la síntesis de L-aspartato (Asp). Para ello, se añadieron 2 U de AspB por mL de reacción (volumen final de 30 mL). El medio de reacción contenía los sustratos fumarato 0,5 M y NH<sub>4</sub>Cl 1 M en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5. La reacción se llevó a cabo a 37°C y en agitación rotativa. Se tomaron muestras durante el curso de la reacción para el análisis de la concentración de Asp. La reacción enzimática se detuvo por separación del catalizador. Para ello, las muestras de los biocatalizadores inmovilizados se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. Para el caso del enzima libre fue necesario utilizar eppendorfs con membrana de ultrafiltración con un tamaño de corte de 50 kDa (Millipore<sup>®</sup>, MA, USA). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min y el filtrado se recuperó para su posterior análisis.

### **3.3.10. Reutilización de AspB inmovilizado**

Los enzimas AspB inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se reutilizaron en 5 ciclos de reacción de síntesis de L-aspartato con una duración de 24 horas cada ciclo. Al final de cada ciclo de reacción, los biocatalizadores inmovilizados se recuperaron por filtración al vacío y se lavaron con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5. En cada ciclo de reacción, se midió la concentración de producto a diferentes tiempos y se calculó la velocidad inicial de formación de producto ( $r_o$ ).

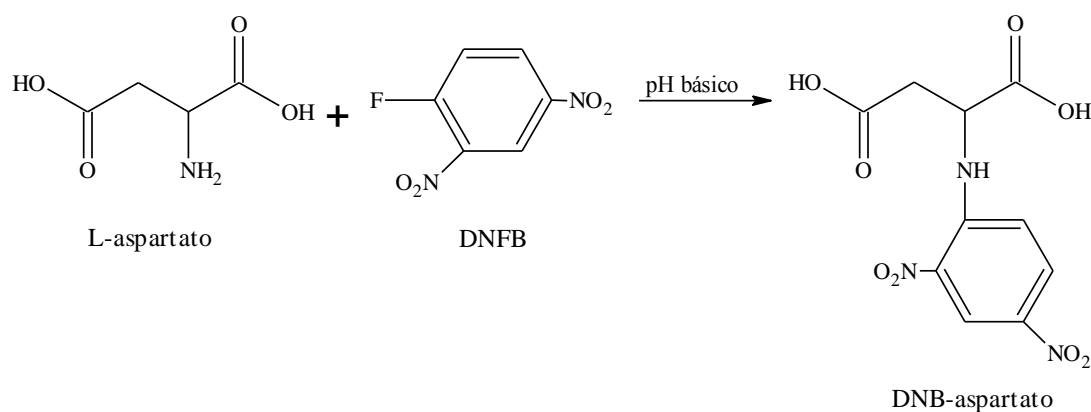
### **3.3.11. Medida de la actividad enzimática de AspB**

La actividad enzimática de AspB se determinó espectrofotométricamente por medición del incremento de absorbancia a 240 nm que tiene lugar por la aparición de fumarato como producto de desaminación de L-aspartato. Se mezclaron 10 µL de muestra con 990 µL del reactivo de actividad que contenía L-aspartato 0,1 M en tampón HEPES 50 mM pH 7. El incremento de la absorbancia se midió en el espectrofotómetro Cary50 Bio UV-visible (Varian, Palo Alto, CA, USA) a 240 nm y 30°C. El coeficiente de extinción molar de fumarato a 240 nm es  $2,53 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [15]. Una unidad (U) de AspB se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de fumarato por minuto a 30°C.

### 3.3.12. Medida de concentración de L-aspartato

La concentración de L-aspartato (Asp) se determinó por el método de derivatización con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) (Figura 3.3). Se mezclaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra con 40  $\mu\text{L}$  de DNFB (37,6 mM en acetona) y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaHCO}_3$  1 M. La mezcla se incubó a 40°C durante 1,5 h. La reacción se detuvo por adición de 20  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M y 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo 20% (v/v).

El Asp derivatizado se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA), con la columna X-Bridge TM C18 5  $\mu\text{m}$  4,6 mm x 250 mm (Waters, Milford, MA, USA) y detector UV. La fase móvil A estaba compuesta por ácido trifluoroacético 0,1% en agua MiliQ y la fase móvil B por ácido trifluoroacético 0,095% en acetonitrilo 80% y agua MiliQ 20%. Se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra derivatizada y el gradiente de elución se estableció entre 31,3 y 48,8% de fase móvil B durante 25 min a un flujo de 1 mL/min a 30°C. Los cromatogramas se detectaron a 360 nm y el análisis cuantitativo se realizó por integración de las áreas usando el método de estándar externo (concentración de estándar entre 1 y 25 mM). El tiempo de retención para L-aspartato derivatizado fue de  $12,6 \pm 0,1$  min (Anexo 3).



**Figura 3.3.** Derivatización de L-aspartato con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB).

### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Purificación de AspB

Está descrito que AspB es un enzima moderadamente termoestable manteniendo su actividad por encima del 80% después de 1 h de incubación a 55°C, y con una temperatura óptima de actividad de 65°C a pH 7,5 [12]. La purificación parcial de AspB recombinante se realizó teniendo en cuenta su termoestabilidad, siguiendo la metodología descrita previamente [12].

Después de la precipitación a 72°C en presencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración final de 60% del valor de saturación, se recuperó un 65% de la actividad enzimática obteniéndose una actividad específica de 333,8 U/mg de proteína y un factor de purificación de 7,7 con respecto al extracto crudo (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Purificación parcial de AspB.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg prot.)	Actividad recuperada (%)	Factor de purificación
Extracto crudo <sup>(a)</sup>	20	12945	299	43,3	100	1,0
Precipitación térmica <sup>(b)</sup>	18	10989	46	238,9	85	5,5
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>(c)</sup>	0,7	8344	25	333,8	65	7,7

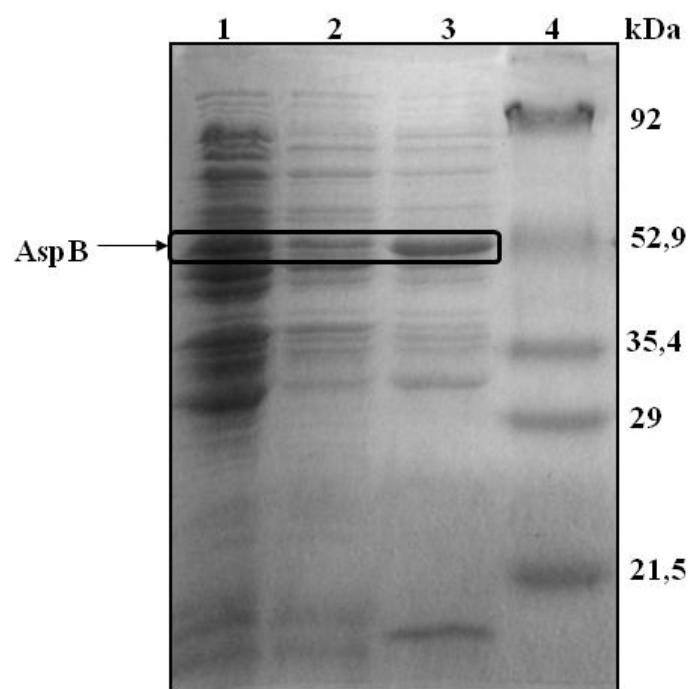
<sup>(a)</sup> El extracto crudo se obtuvo a partir de un cultivo celular de 41,4 g DCW/L de cultivo y según como se detalla en la sección 3.3.3.

<sup>(b)</sup> Precipitación térmica a 72°C en presencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11% (p/v) de saturación y L-aspartato 0,1 M durante 5 min.

<sup>(c)</sup> Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% (p/v) de saturación a 4°C durante 30 min.



AspB tiene una estructura homotetramérica con una masa molecular de 200 kDa y aproximadamente de 50 kDa por monómero. En el análisis de electroforesis SDS-PAGE (Figura 3.4) se puede observar que AspB es la proteína predominante en el paso final de purificación.



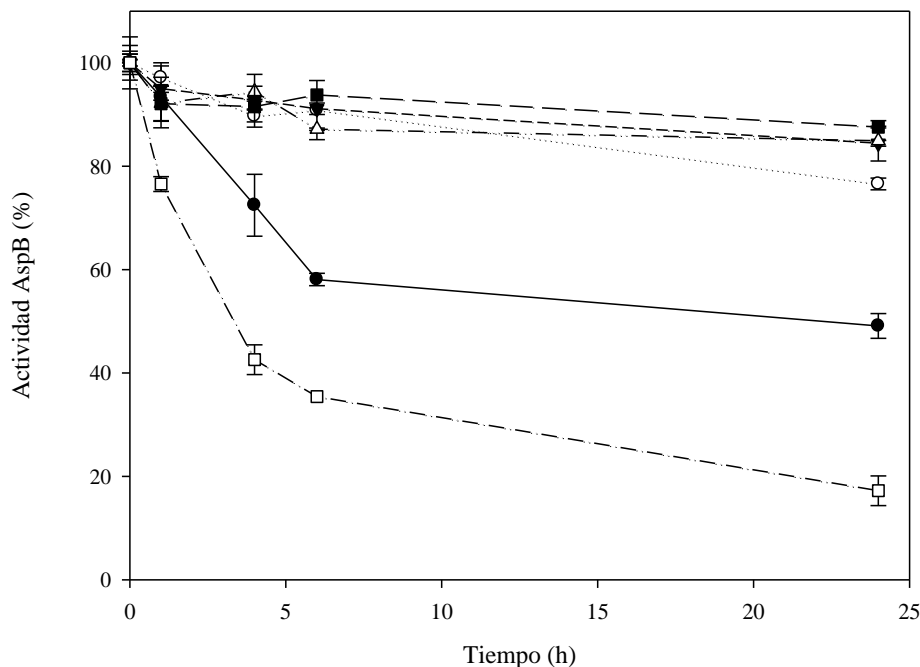
**Figura 3.4.** Análisis SDS-PAGE de la purificación parcial de AspB. *Carril 1:* extracto crudo; *carril 2:* precipitación térmica a 72°C durante 5 min en presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  11% (p/v) de saturación y 0,1 M de L-aspartato; *carril 3:* precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% (p/v) de saturación; *carril 4:* marcador de peso molecular de amplio rango BioRad®.

### 3.4.2. Estabilidad de AspB

Como se ha descrito previamente en el capítulo 2 de esta tesis, antes de proceder a la inmovilización de enzimas es necesario conocer su estabilidad cuando se encuentran sometidos a las condiciones (pH, fuerza iónica, etc.) en que se llevan a cabo los procesos de inmovilización.

El estudio de estabilidad de AspB libre a diferentes condiciones de pH evidenció que el enzima es bastante estable entre los pH 6 y 9 manteniendo su actividad por encima del 80%

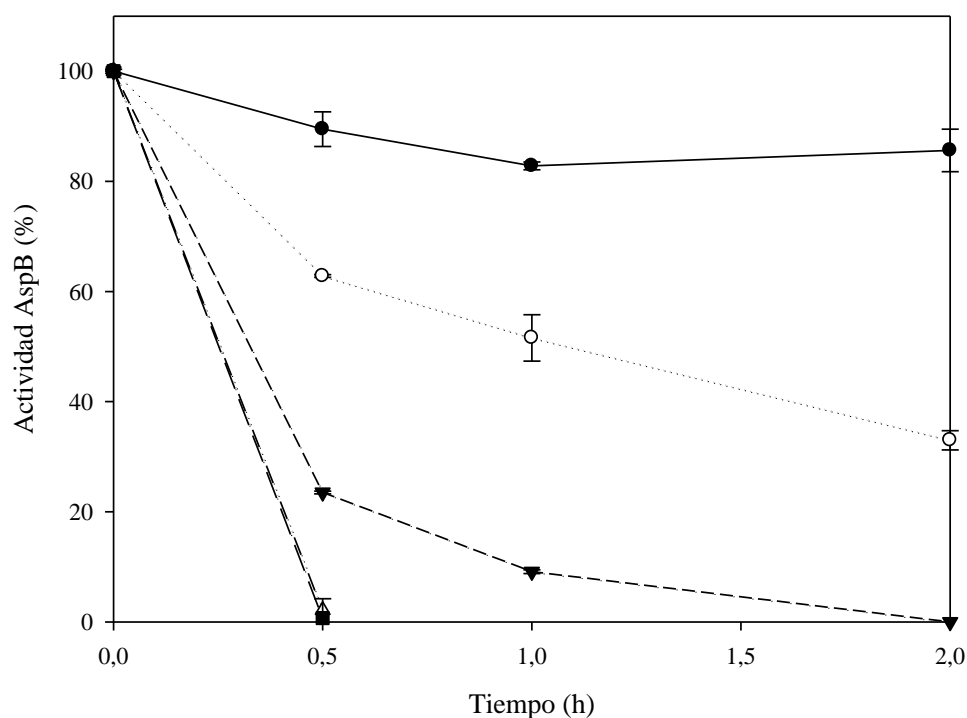
después de 24 h de incubación; sin embargo, a pH 5 y 10 el enzima AspB perdió más del 50% de actividad en el mismo periodo de tiempo (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Estabilidad de AspB a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica: (●) pH 5 y (○) pH 6, en tampón MES 25 mM; (▼) pH 7, en tampón HEPES 0,1 M; (△) pH 8, (■) pH 9 y (□) pH 10, en tampón bicarbonato sódico 1 M.

También se analizó la estabilidad del enzima a diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI), compuesto utilizado como promotor de la formación de los enlaces covalentes entre los grupos carboxílicos del enzima y los grupos aminos primarios ( $-\text{NH}_2$ ) del soporte MANA-agarosa. Como se muestra en la Figura 3.6, AspB es muy inestable en presencia de CDI, cuyo efecto negativo en la actividad enzimática se incrementa al aumentar la concentración de CDI.

Además se analizó el efecto de los agentes bloqueadores de los grupos epóxidos remanentes usados en la inmovilización de Eupergit<sup>®</sup> C. AspB fue bastante estable en presencia de metilamina, glicina y 2-mercaptoetanol, observándose una disminución de actividad en presencia de estos reactivos similar a la de sus respectivos blancos (Tabla 3.2). Esto indica que la pérdida de actividad estaría asociada al pH.



**Figura 3.6.** Estabilidad de AspB a diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI) en tampón MES 25 mM pH 6: (●) Blanco; (○) 1 mM; (▼) 10 mM; (△) 25 mM; (■) 50 mM.

**Tabla 3.2.** Estabilidad de AspB en presencia de los agentes bloqueadores de grupos epóxido. La mezcla enzimática contenía 2 U de AspB/mL, y se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 24 h.

	Actividad AspB (%)
2-mercaptoetanol 0,2 M <sup>(a)</sup>	85,9 ± 1,8
Blanco 1 <sup>(a)</sup>	84,4 ± 0,6
Metilamina 1,5 M <sup>(b)</sup>	92,9 ± 2,4
Glicina 2 M <sup>(b)</sup>	93,1 ± 0,6
Blanco 2 <sup>(b)</sup>	87,9 ± 0,2

<sup>(a)</sup> Tampón HEPES 0,1 M pH 7.

<sup>(b)</sup> Tampón bicarbonato sódico 1 M pH 9.

### 3.4.3. Inmovilización de AspB

La inmovilización covalente de enzimas implica una reacción química entre los grupos funcionales del soporte y los grupos reactivos pertenecientes a los residuos aminoacídicos que se encuentran en la superficie enzimática tales como los grupos amino de lisina o los grupos carboxilo de aspartato y glutamato [16].

La estructura primaria de AspB está actualmente descrita: el 5,8% de sus aminoácidos son lisinas, 3,6% son aspartatos y 8,6% son glutamatos [17], los cuales estarían disponibles para reaccionar y permitirían la unión covalente del enzima con un amplio rango de soportes.

#### 3.4.3.1. Inmovilización de AspB en Eupergit® C

La inmovilización de AspB en soporte Eupergit® C se realizó inicialmente a pH 8 pues, como se mostró en el estudio de estabilidad, el enzima era ligeramente más estable a este valor de pH que a valores más altos. Así, se obtuvo un 25% de actividad retenida, y el proceso duró más de 28 horas. Cuando la inmovilización del enzima se llevó a cabo a pH 9 se obtuvo una actividad retenida similar pero el tiempo del proceso se redujo a 15 h (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Inmovilización de AspB en Eupergit® C.

Método	pH <sup>(a)</sup>	Actividad retenida 1 <sup>(b)</sup> (%)	Actividad retenida 2 <sup>(c)</sup> (%)	Rendimiento (%)	Tiempo <sup>(d)</sup> (h)
I	8	28	25	87	32
II	9	26	24	96	19

<sup>(a)</sup>Tampón bicarbonato sódico 1 M.

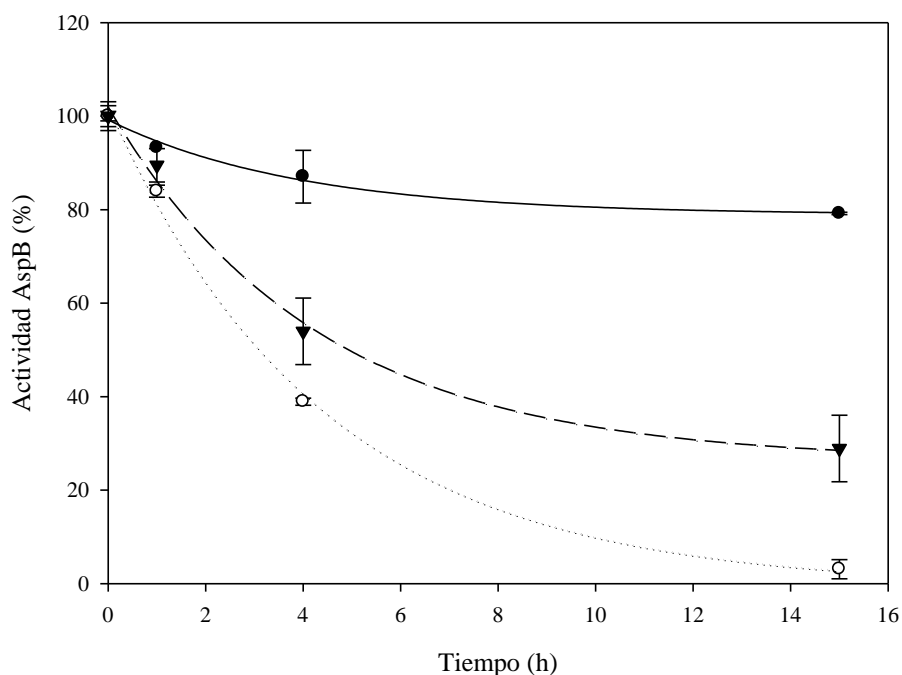
<sup>(b)</sup>Actividad retenida antes del bloqueo de los grupos epóxidos remanentes del soporte Eupergit® C con 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,2 M en tampón HEPES 0,1 M pH 7.

<sup>(c)</sup> Actividad retenida después del proceso de bloqueo con 2-ME durante 4 horas y del lavado con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5.

<sup>(d)</sup> Tiempo total, considerando el proceso de inmovilización y el bloqueo con 2-ME.

Para la etapa de bloqueo de los grupos epóxidos remanentes del soporte se pueden utilizar diferentes compuestos como glicina, metilamina o 2-mercaptoetanol, y como ya se mencionó previamente, el enzima AspB es estable en presencia de todos estos compuestos. Se seleccionó 2-mercaptoetanol debido a que las condiciones necesarias para el bloqueo usando este compuesto son más suaves (pH neutro) y se realiza en tiempos más cortos (4 h), en comparación con los otros dos compuestos mencionados que requieren incubaciones a pH alcalino y durante más de 24 h [18, 19]. Después de esta etapa, se observó que el enzima inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C no perdió actividad en ninguno de los casos (Tabla 3.3).

A pH 9, el rendimiento de inmovilización fue bastante alto pero la actividad de la suspensión disminuyó significativamente con respecto al blanco de inmovilización tras 15 h. Dicho blanco conservó el 80% de su actividad inicial después del mismo tiempo (Figura 3.7). Esta pérdida de actividad durante la inmovilización podría ser debida a cambios conformacionales del enzima, al impedimento estérico causado por la interacción química entre el enzima y el soporte y/o a limitaciones difusionales.



**Figura 3.7.** Inmovilización de AspB en Eupergit<sup>®</sup> C en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 9. (●) Blanco de inmovilización; (○) sobrenadante y (▼) suspensión.

### **3.4.3.2. Inmovilización de AspB en MANA-agarosa**

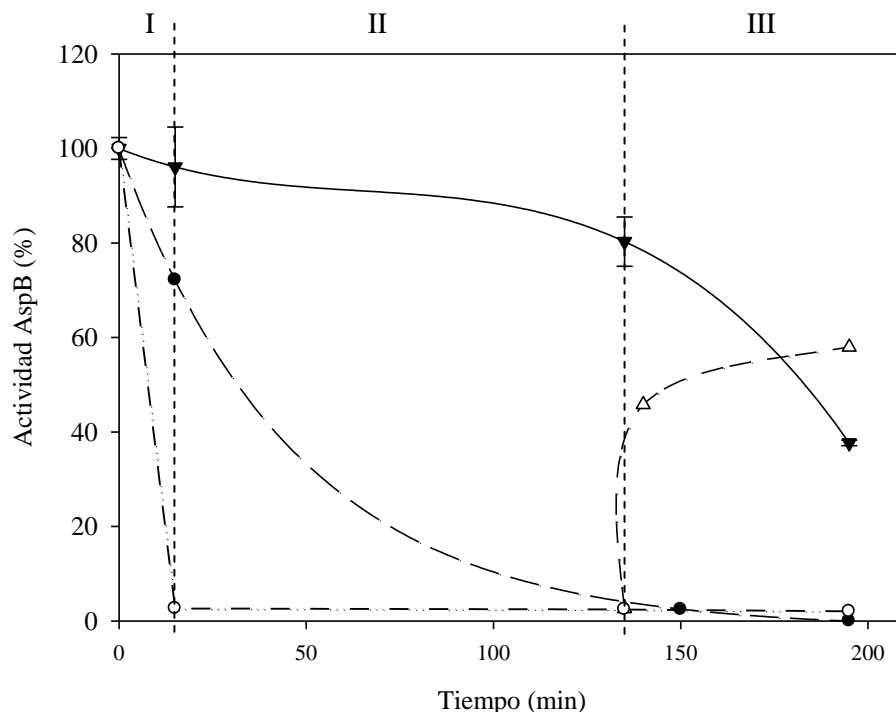
Como ya se mencionó previamente, la inmovilización de enzimas en soporte MANA-agarosa se realiza en condiciones ácidas de pH y baja fuerza iónica [14].

La inmovilización de AspB en este soporte se llevó a cabo a pH 6, debido a que el enzima es muy inestable a pH 5. La duración de la etapa de adsorción iónica se estableció en 15 min lográndose más de 95% de adsorción del enzima al soporte. Para la formación de enlaces amida entre los grupos carboxílicos del enzima iónicamente adsorbido y los grupos amino del soporte, es necesaria la adición de carbodiimida (CDI). Posteriormente, para comprobar el grado de formación de enlaces covalentes se incrementa la fuerza iónica añadiendo NaCl 1 M con lo cual se logra la desorción del enzima que no se unió covalentemente al soporte. Debido a que AspB es muy inestable en presencia de CDI, inicialmente se utilizó una concentración final de CDI de 10 mM. Sin embargo, se observó que el 35% del enzima se desorbió después de 2 h de incubación con CDI y tras la adición de NaCl 1 M, lo cual indica que dicha concentración de CDI no es suficiente para completar la formación de enlaces covalentes. Con el objetivo de incrementar la retención del enzima, se decidió aumentar la concentración final de CDI a 25 mM aun teniendo en cuenta el efecto negativo que podría tener dicha concentración de CDI sobre el enzima. Después de 2 h de incubación con CDI se adicionó NaCl, y no se observó desorción del enzima. Paralelamente se siguió la actividad de un blanco de desorción, en que se pusieron en contacto el enzima y el soporte pero no se adicionó CDI en la segunda etapa. En este caso sí se observó desorción de la enzima cuando se adicionó NaCl (Figura 3.8).

Adicionalmente, en concordancia con los datos obtenidos para el enzima L-aspartato transaminasa (capítulo 2), no se observó pérdida de actividad de AspB durante el proceso de incubación con CDI 25 mM, en comparación con el blanco que perdió más del 95% de actividad. Esto podría ser debido a la mejora de estabilidad del enzima cuando se encuentra unido al soporte.

Además, se observó que la actividad de la suspensión disminuyó un 40% tras la adición de NaCl, que se podría explicar como efecto de la alta fuerza iónica (1 M). Debido a esto, en las siguientes inmovilizaciones de AspB en MANA-agarosa se evitó la adición de NaCl por tener un efecto negativo en el enzima y se da por asegurado que todo el enzima estaría covalentemente unido al soporte.

En estas condiciones, se obtuvo un 99% de rendimiento de inmovilización y 85% de actividad retenida (Tabla 3.4).



**Figura 3.8.** Inmovilización de AspB en MANA-agarosa (tampón MES 25 mM pH 6). I: adsorción iónica; II: formación de enlaces covalentes con CDI 25 mM; III: desorción iónica con NaCl 1 M. (●) Blanco de inmovilización, (○) sobrenadante, (▼) suspensión y (△) blanco de desorción (sin adición de CDI).

### 3.4.3.3. Inmovilización de AspB en LentiKats®

Por último, AspB fue inmovilizado por atrapamiento en el soporte LentiKats®. Tras la formación de las lentejas y el proceso de endurecimiento de las mismas, se obtuvo un 10% de actividad retenida (Tabla 3.4). Además, se observó que después de 2 h de tratamiento de los LentiKats® con la disolución endurecedora, el 28% de la actividad total ofrecida al inicio de la inmovilización había difundido hacia afuera del soporte, con lo cual el rendimiento de inmovilización fue del 72%. La baja actividad retenida observada podría ser debida a la presencia de limitaciones difusionales o a cambios conformacionales del enzima, lo cual se discutirá en el apartado 3.4.4.

**Tabla 3.4.** Inmovilización de AspB por enlace covalente en soporte Eupergit® C y MANA-agarosa y por atrapamiento en LentiKats®.

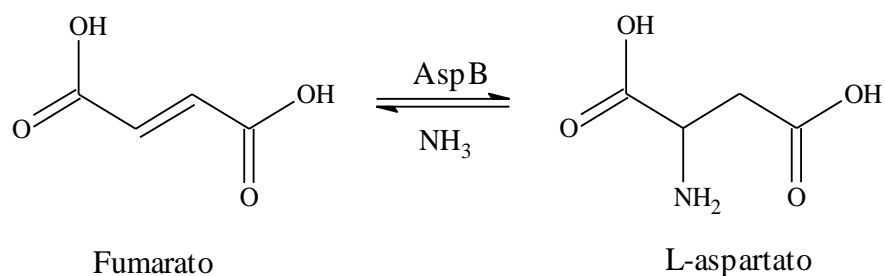
	Soporte		
	Eupergit® C	MANA-agarosa	LentiKats®
Actividad (U/mL de soporte)	63	57	98
pH	9	6	7
Tampón / Fuerza iónica	NaHCO <sub>3</sub> 1 M	MES 25 mM	HEPES 0,1 M
Tiempo de inmovilización (h)	19,0	2,3	3,0
Rendimiento de inmovilización (%)	96	99	72
Actividad retenida (%)	24	85	10 <sup>(a)</sup> / 63 <sup>(b)</sup>

(a) Actividad retenida con limitaciones difusionales.

(b) Actividad retenida sin limitaciones difusionales.

### 3.4.4. Síntesis de L-aspartato

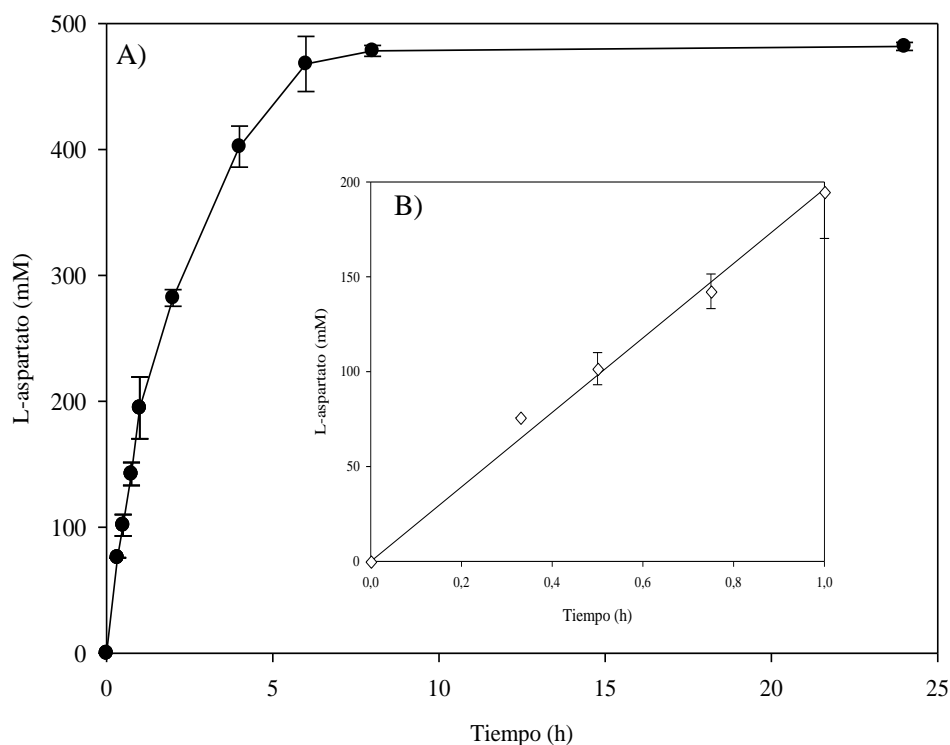
AspB cataliza la reacción de aminación reversible de fumarato para producir el aminoácido L-aspartato (Figura 3.9) [12].



**Figura 3.9.** Reacción de síntesis de L-aspartato catalizada por AspB.



AspB libre y los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se utilizaron como biocatalizadores en la síntesis de altas concentraciones de L-aspartato. En la Figura 3.10 A, se presenta como ejemplo el curso de la reacción catalizada por AspB inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C.



**Figura 3.10.** Perfil de producción de L-aspartato en la reacción catalizada por AspB inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C. La reacción se llevó a cabo con 0,5 M fumarato, 1 M NH<sub>4</sub>Cl y 2 U de AspB /mL en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C durante 24 h.

En la Tabla 3.5 se muestran los parámetros de reacción obtenidos en la síntesis de Asp llevada a cabo con el enzima libre y los enzimas inmovilizados. Como se puede observar, la conversión y la concentración final de producto fueron similares tanto para el enzima libre como para los catalizadores inmovilizados, obteniéndose alrededor de 450 mmol de L-aspartato/L de reacción ( $\approx$  60 g de Asp/L).

Las velocidades iniciales ( $r_o$ ) se calcularon a partir de los valores de la concentración de producto frente al tiempo durante la primera hora de reacción (Figura 3.10 B). Los valores calculados para AspB inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa fueron similares a los del enzima libre.

**Tabla 3.5.** Parámetros de la reacción de síntesis de L-aspartato (Asp) catalizada por AspB libre e inmovilizados. Las reacciones se llevaron a cabo con 0,5 M fumarato, 1 M NH<sub>4</sub>Cl y 2 U de AspB/mL en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C durante 24 h.

Parámetros	AspB		
	Libre	Eupergit® C	MANA-agarosa LentiKats®
Conversión (%)	87,2 ± 1,0	96,7 ± 1,0	93,4 ± 0,1
Concentración de producto (mmol Asp/L)	435,9 ± 5,1	483,3 ± 5,0	467,2 ± 0,3
Velocidad inicial $r_o$ (mmol/L·h) <sup>(a)</sup>	211,2	200,9	191,3
$K_m$ (mM) <sup>(b)</sup>	213,1	244,0	244,4
$r_{max}$ (mM/h) <sup>(b)</sup>	287,6	238,9	228,7

<sup>(a)</sup>  $R^2 \geq 0,95$ .

<sup>(b)</sup> Los parámetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $r_{max}$  (velocidad máxima de reacción) fueron calculados por integración a partir de los datos de evolución de la concentración de L-aspartato en la reacción de síntesis.

Mención aparte merece el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>. En la primera reacción de síntesis que se llevó a cabo con este biocatalizador, se calculó la cantidad necesaria de soporte considerando la actividad retenida medida mediante el ensayo de actividad enzimática, que resultó ser del 10% de la ofrecida inicialmente. En este caso se observó que la velocidad inicial en la reacción de síntesis fue 6,1 veces mayor que la del enzima libre y, por tanto, que la velocidad teóricamente esperada. Este resultado indicaría que la actividad retenida en el enzima inmovilizado es mayor que la observada mediante el ensayo de actividad; por ende, supondría la presencia de limitaciones difusionales cuando se aplica el enzima inmovilizado como catalizador en las condiciones del ensayo de actividad. En previos estudios de inmovilización de enzimas tales como inulina [20],  $\beta$ -glucosidasa [21] y  $\beta$ -galactosidasa [22] en LentiKats<sup>®</sup>, se obtuvieron actividades retenidas de 48, 39 y 32% respectivamente, y en todos los casos los autores reportaron variaciones en los parámetros cinéticos, de lo cual concluyeron la presencia de limitaciones difusionales. Asimismo, como se describió en el capítulo 2 de esta tesis, también se observó la presencia de limitaciones cuando se inmovilizaron altas cargas de AAT en este mismo soporte.

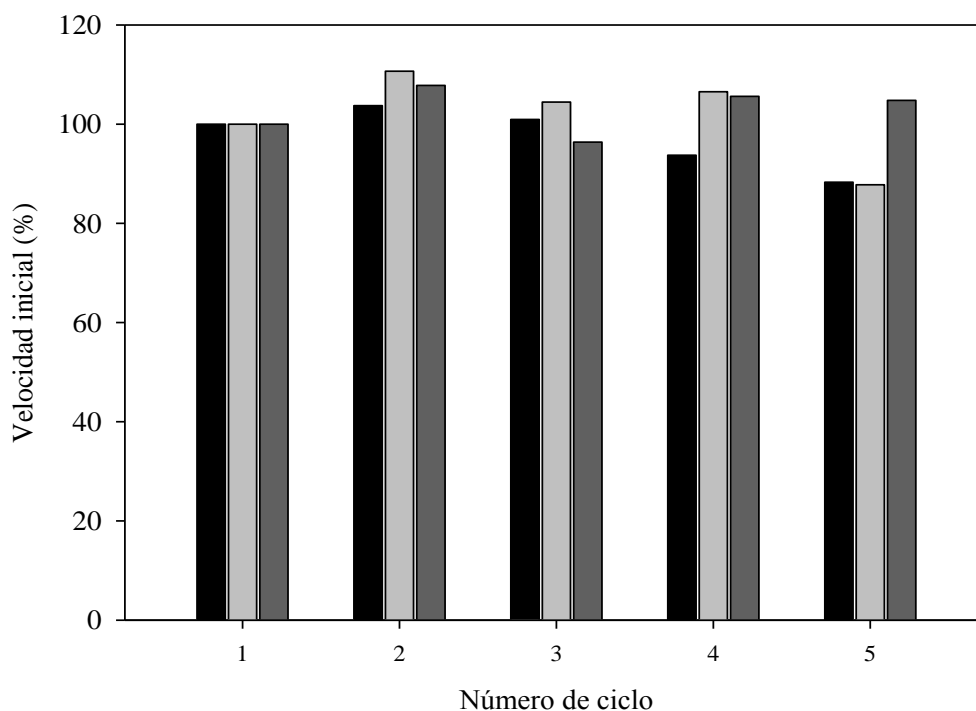
Está descrito que una posibilidad para mejorar la eficacia de la inmovilización cuando hay limitaciones difusionales internas es incrementar la concentración de sustratos en el medio de reacción, lo cual permite alcanzar velocidades de reacción cercanas a la velocidad máxima [23, 24]. En este trabajo, la concentración del sustrato limitante en la reacción de síntesis (0,5 M fumarato) fue 5 veces mayor que la de L-aspartato en el ensayo de actividad. Dicho valor parece ser suficientemente alto como para minimizar el efecto de las limitaciones difusionales. De acuerdo a los resultados de velocidad inicial de reacción para el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>, se recalculó la actividad retenida resultando en aproximadamente 63%. En base a este nuevo valor, se realizó una segunda reacción de síntesis utilizando el enzima inmovilizado necesario. En este caso, la velocidad inicial de reacción y la concentración de producto al final del proceso de síntesis fueron similares a las del enzima libre (Tabla 3.5).

Adicionalmente, se calcularon los parámetros cinéticos de constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $r_{max}$ ) para el enzima libre y los tres enzimas inmovilizados por integración a partir de los datos de evolución de la concentración del producto de la reacción de síntesis de L-aspartato (Tabla 3.5). El valor de  $K_m$  del enzima libre fue similar al del derivado inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> y ligeramente superior a los de los

inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa, lo cual es común cuando los enzimas se inmovilizan por enlace covalente. Asimismo, se obtuvo una ligera disminución de  $r_{max}$  para los tres inmovilizados enzimáticos con respecto al enzima libre, en concordancia con los resultados obtenidos para las velocidades iniciales respectivas.

### 3.4.5. Reutilización de los biocatalizadores inmovilizados

Los enzimas AspB inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup> se reutilizaron como catalizadores en la reacción de síntesis de L-aspartato. Las velocidades iniciales de los 3 inmovilizados se mantuvieron por encima del 90% de la actividad inicial después de 5 ciclos de reacción de 24 horas cada ciclo (Figura 3.11). La concentración de Asp fue superior a 450 mM ( $\approx$  60 g/L) y se alcanzaron conversiones alrededor del 90% en cada ciclo de reacción para todos los catalizadores inmovilizados.



**Figura 3.11.** Reutilización de AspB inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> C (negro), MANA-agarosa (gris claro) y LentiKats<sup>®</sup> (gris oscuro) en la síntesis de L-aspartato.

### 3.5. Conclusiones

El enzima AspB recombinante se expresó en *E. coli* y se purificó parcialmente alcanzando alta actividad específica. Se establecieron tres métodos simples y rápidos para la inmovilización de AspB en Eupergit<sup>®</sup> C, MANA-agarosa y LentiKats<sup>®</sup>.

Se observó la presencia de limitaciones difusionales sólo en el caso del enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> cuando se aplicó el ensayo de medida de actividad enzimática empleando L-aspartato como sustrato. Sin embargo, al incrementar la concentración de los sustratos en el medio de reacción de síntesis, la difusión dejó de ser el paso limitante de la reacción.

Los enzimas inmovilizados resultantes se reutilizaron en 5 ciclos de reacción para la síntesis de altas concentraciones del aminoácido L-aspartato ( $\geq 450$  mM).

AspB inmovilizado en MANA-agarosa podría ser considerado como el biocatalizador más apropiado para la síntesis de Asp, debido a la simplicidad del método de inmovilización, la alta retención enzimática y los buenos resultados obtenidos en la reutilización. Sin embargo, cualquiera de los tres biocatalizadores inmovilizados podría ser utilizado en la síntesis de otros compuestos derivados de aspartato o en diferentes medios de reacción.

### 3.6. Referencias

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005;69:1-8.
- [2] Taylor PP. Synthesis of L-aspartic acid. In: D. J. Ager editor. *Handbook of Chiral Chemicals*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 317.
- [3] Kumagai H, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Amino acid production. *The prokaryotes*. New York: Springer; 2006. p. 756.
- [4] Viola RE. L-aspartase: new tricks from an old enzyme. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 2000;74:295-341.
- [5] Liese A, Seelbach K, Buchholz A, Haberland J. *Industrial Biotransformations*. Weinheim: Wiley-VHC; 2006. p. 494.
- [6] Tosa T, Sato T, Mori T, Matuo Y, Chibata I. Continuous production of L-aspartic acid by immobilized aspartase. *Biotechnology and Bioengineering* 1973;15:69-84.
- [7] Takagi JS, Tokushige M, Shimura Y. Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biochemistry* 1986;100:697-705.
- [8] Omori K, Akatsuka H, Komatsubara S. Construction of a versatile promoter analysis vector and its use for analysis of the *Serratia marcescens* aspartase promoter region. *Plasmid* 1994;32:233-237.
- [9] Sun DX, Setlow P. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* and operon, which codes for L-asparaginase and L-aspartase. *Journal of Bacteriology* 1991;173:3831-3845.
- [10] Asai Y, Inui M, Vertes A, Kobayashi M, Yukawa H. Cloning and sequence determination of the aspartase-encoding gene from *Brevibacterium flavum* MJ233. *Gene* 1995;158:87-90.
- [11] Li Y, Kawakami N, Oduor HJ, Ashida H, Ishikawa T, Shibata H, Sawa Y. A novel L-aspartate dehydrogenase from the mesophilic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1:

molecular characterization and application for L-aspartate production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011;90:1953-1962.

[12] Kawata Y, Tamura K, Yano S, Mizobata T, Nagai J, Esaki N, Soda K, Tokushige M, Yumoto N. Purification and characterization of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999;366:40-46.

[13] Ruiz J, Pinsach J, Álvaro G, González G, de Mas C, Resina D, López-Santín J. Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry* 2009;44:1039-1045.

[14] Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisán JM. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology* 1993;15:546-550.

[15] Tokushige M. Aspartate ammonia-lyase. *Methods in Enzymology* 1985;113:618-627.

[16] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Review* 2009;38:453-468.

[17] Kawata Y, Tamura K, Kawamura M, Ikei KM, T., Nagai J, Fujita M, Yano S, Tokushige M, Yumoto N. Cloning and over-expression of thermostable *Bacillus* sp. YM55-1 aspartase and site-directed mutagenesis for probing a catalytic residue. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:1847-1857.

[18] Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 26:509-515.

[19] Mateo C, Torres R, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Hidalgo A, Lopez-Gallego F, Abian O, Palomo JM, Betancor L, Pessela BC, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. Epoxy amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 2003;4:772-777.

[20] Fernandes P, Marques MPC, Carvalho F, Cabral JMS. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2009;84:561-564.

[21] Figueira JA, Goncalves FF, Sato HH, Fernandes P. Screening of supports for the immobilization of  $\beta$ -glucosidase. *Enzyme Research* 2011;2011:1-8.

[22] Grosova Z, Rosenberg M, Rebros M, Sipocz M, Sedlackova B. Entrapment of  $\beta$ -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnology Letters* 2008;30:763-767.

[23] Engasser JM, Coulet P. Comparison of intrinsic stabilities of free and bound enzymes by graphical removal of diffusional effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977;485:29-36.

[24] Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysts, an Introduction*. Berlin; 1988.



# CAPÍTULO 4

---

*Síntesis multienzimática  
de L-fenilalanina catalizada por  
aspartasa (AspB) y transaminasa (AT)*

## **Resumen**

El aminoácido aromático esencial L-fenilalanina (Phe), ampliamente usado en la industria alimentaria, se produce principalmente mediante métodos quimio-enzimáticos y fermentativos. Este capítulo constituye un aporte para la síntesis de Phe mediante un método multienzimático “one-pot” a partir de fumarato y fenilpiruvato utilizando como biocatalizadores los enzimas aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) y transaminasa (AT EC 2.6.1) bacteriano.

Se compararon los enzimas AAT (de corazón porcino) y AT (de origen bacteriano) en la síntesis de Phe. Se comprobó que AT tiene mayor afinidad por el sustrato Phe que el enzima AAT. Para la reacción de síntesis de Phe catalizada por AT utilizando L-aspartato (Asp) como donador de grupos aminos se obtuvo un rendimiento de reacción de 77%.

Se optimizaron las condiciones de la reacción de síntesis multienzimática simultánea, determinándose la compatibilidad de los enzimas en las condiciones operacionales de reacción (pH 7,5 y 37°C), la proporción de sustratos fenilpiruvato y Asp (1:1,25), y la relación de concentraciones entre los enzimas AspB y AT (0,3 y 2 U de AspB y AT por mL de reacción respectivamente). A estas condiciones se alcanzó un rendimiento global de reacción de 83%.

## 4.1. Introducción

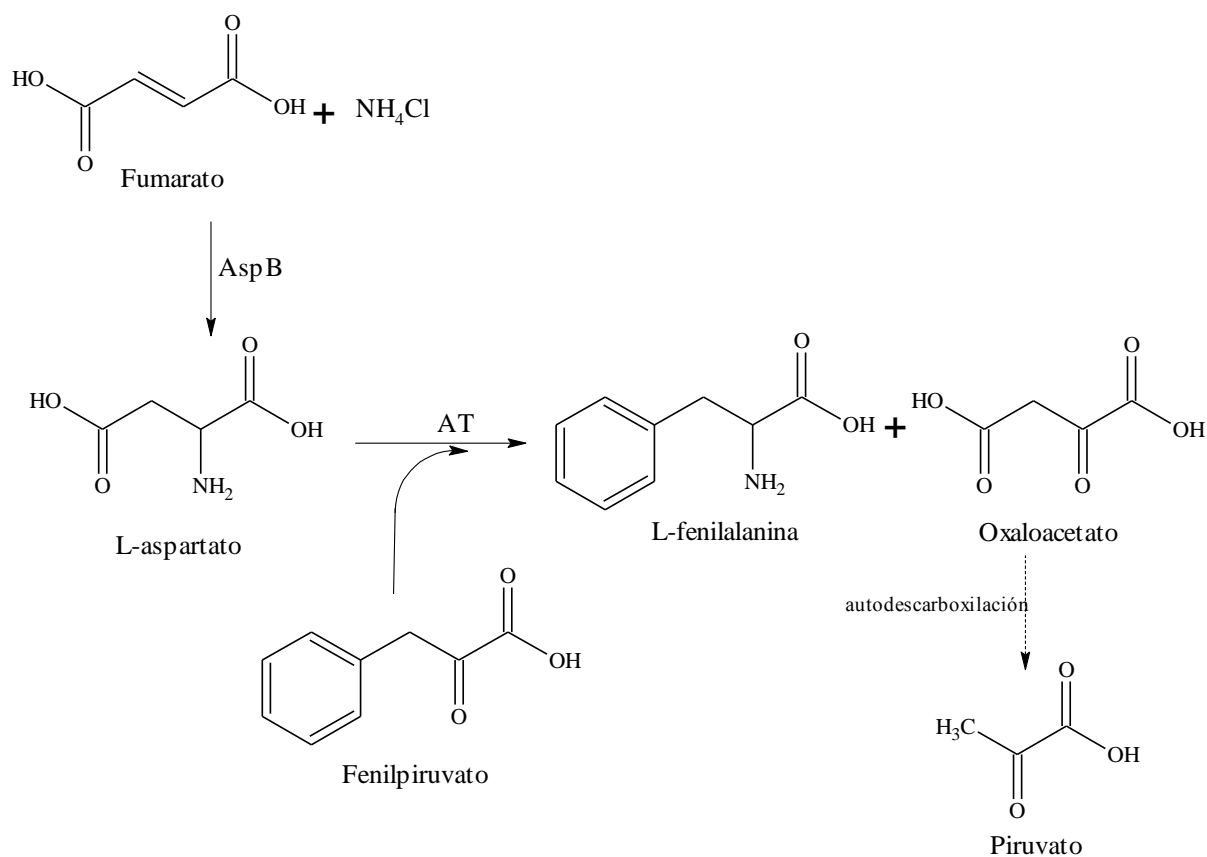
L-fenilalanina (Phe) es un aminoácido aromático esencial de mucha importancia comercial, puesto que es uno de los ingredientes principales en la síntesis del edulcorante no calórico aspartamo. Asimismo, tiene una gran demanda en la industria farmacéutica y alimentaria [1]. El uso de transaminasas o aminotransferasas (ATs) tales como L-aspartato transaminasa o L-tirosina transaminasa en la síntesis de Phe presenta una serie de ventajas como la autorregeneración del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP), alta enantioselectividad y ausencia de inhibición por sustratos o productos (Introducción capítulo 2). Sin embargo, una de las principales desventajas es el bajo rendimiento de reacción debido a que la constante de equilibrio ( $K_c$ ) de la reacción de síntesis de Phe es pequeña (cerca a 1).

La síntesis de Phe catalizada por ATs se lleva a cabo a partir de fenilpiruvato, que es la cetona análoga a Phe, y un donador de grupos amino que suele ser L-glutamato o L-aspartato (sustratos aminados naturales del enzima). Entre ellos, L-aspartato (Asp) favorece el incremento del rendimiento de reacción, debido a que el oxaloacetato (producto de su desaminación) se autodescarboxila para formar piruvato (por efecto del pH y de la temperatura), lo que permite desplazar el equilibrio de reacción hacia la formación de Phe (Figura 4.1) [2]. En el capítulo 2 se llevó a cabo la síntesis de Phe usando como biocatalizador AAT de corazón porcino a partir de concentraciones equimolares de sustratos fenilpiruvato y Asp, y se observó un incremento del 23% del rendimiento con respecto al 50% teóricamente esperado, lo cual fue asociado a la autodescarboxilación de oxaloacetato.

Por otro lado, como se indica en el capítulo 3, el enzima aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) se utilizó en la síntesis del aminoácido Asp a partir de fumarato y cloruro de amonio, alcanzándose rendimientos de reacción superiores al 90% y altas concentraciones del aminoácido ( $\geq 60$  g/L).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3, se puede establecer un proceso multienzimático para la síntesis de Phe a partir de fumarato y fenilpiruvato por acoplamiento de las reacciones catalizadas por aspartasa (AspB) y transaminasa (AT). En la primera etapa de la reacción, AspB catalizaría la reacción de aminación de fumarato para dar lugar a Asp; en la segunda etapa, el producto de la primera reacción, Asp, serviría de sustrato donador de grupos amino para la reacción de transaminación de fenilpiruvato para dar lugar a la formación de L-fenilalanina (Figura 4.1). De esta manera se sustituiría el uso del sustrato L-

aspartato por fumarato, mucho más barato, lo cual permitiría disminuir el coste del proceso de síntesis de Phe.



**Figura 4.1.** Reacción multienzimática para la síntesis de L-fenilalanina catalizada por AspB (aspartasa) y AT (transaminasa).

Se han reportado pocos estudios relacionados con la síntesis acoplada de Phe utilizando el sistema multienzimático aspartasa-transaminasa. Xu y col. estudiaron la síntesis acoplada de Phe utilizando las cepas de *E. coli* EA1 y EP8-10 con alta actividad aspartasa y transaminasa respectivamente. En este estudio establecieron como relación óptima de concentraciones de sustratos fenilpiruvato:fumarato la relación 1:1,2 y la relación de concentración de células EA1:EP8-10 (aspartasa y transaminasa respectivamente) como 0,4:1. Con estos valores obtuvieron un rendimiento final de la reacción acoplada del 97% [3]. Además, Chao y col.

también estudiaron la síntesis acoplada de Phe usando como biocatalizador una cepa de *E. coli* recombinante, la cual co-expresaba tanto aspartasa (AspA) como transaminasa (AspC). Esta reacción se llevó a cabo con una concentración de fumarato 7 veces mayor que la de fenilpiruvato, obteniéndose un rendimiento máximo de 78 y 83% para Asp y Phe respectivamente y una acumulación considerable de Asp al final del proceso. Adicionalmente, en este mismo estudio inmovilizaron la misma cepa por atrapamiento en soporte Ca-alginato, y observaron la presencia de limitaciones difusionales [4]. Estos dos recientes estudios señalan la potencialidad de acoplar la reacción de aspartasa con transaminasa para la síntesis de Phe; sin embargo, a nuestro entender no se ha reportado hasta el momento la síntesis de este aminoácido por reacción acoplada usando enzimas libres.

Las reacciones enzimáticas simultáneas o procesos multienzimáticos “one-pot” constituyen una de las estrategias más elegantes usadas en la síntesis de productos de interés cuando se pretenden evitar los pasos de recuperación y/o purificación de los productos intermediarios de la reacción. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones, tales como compatibilidad de los biocatalizadores, concentración de sustratos y biocatalizador, sistema de reacción, etc (capítulo 1 sección 1.1.3).

En este capítulo se describe la síntesis multienzimática “one-pot” del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina catalizada por los enzimas aspartasa (AspB) y transaminasa (AT).

## **4.2. Objetivos**

### ***Objetivo general***

Establecer un método multienzimático para la síntesis del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina (Phe) catalizada por L-aspartato amonio liasa (aspartasa, AspB) y transaminasa (AT).

### ***Objetivos específicos***

- Determinar los parámetros de la reacción de síntesis de Phe catalizada por AT utilizando L-aspartato como donador de grupos amino.
- Establecer las condiciones de la reacción multienzimática para la síntesis de Phe, considerando la compatibilidad de los enzimas AspB y AT.
- Determinar la relación óptima de concentración de L-aspartato y fenilpiruvato en la síntesis de Phe.
- Determinar la relación óptima de la concentración de los biocatalizadores (AspB y AT) en la síntesis de Phe.

## 4.3. Metodología

### 4.3.1. Enzimas y reactivos químicos

Todos los reactivos químicos, de grado analítico, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El enzima recombinante L-aspartato amonio liasa o aspartasa (AspB) fue clonado en *Escherichia coli* BL21(D3) por c-LEcta (Leipzig, Alemania) quien suministró la cepa y el plásmido. El enzima transaminasa (AT) parcialmente purificado fue proporcionado por el profesor Timo Korpela del Laboratorio “Joint Biotechnology” de la Universidad de Turku, Finlandia.

### 4.3.2. Expresión y purificación de AspB

La cepa recombinante *E. coli* BL21(D3) con actividad AspB fue cultivada en la Planta Piloto de Fermentación (PPF) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). El cultivo se realizó en un medio definido de minerales [5] que contenía 0,05 g/L de kanamicina. Las condiciones de cultivo son las detalladas en la sección 3.3.2. Asimismo, la purificación de AspB se realizó según el método descrito en la sección 3.3.3.

### 4.3.3. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por AT

El enzima transaminasa (AT) se empleó como catalizador en la síntesis de L-fenilalanina (Phe), a partir del compuesto cetona análogo fenilpiruvato (FP) y el donador de grupos amino L-aspartato (Asp). La composición del medio de reacción fue FP 0,1 M, Asp 0,1 M y PLP 0,1 mM, en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5. La reacción se llevó a cabo con 2 U de AT/mL de reacción en un volumen final de reacción de 2 mL, en agitación orbital a 350 rpm (Thermoshaker HLC, Bovenden, Alemania) y 37°C durante 48 h. Se tomaron alícuotas a lo largo del tiempo y la reacción se detuvo mediante la separación del enzima, por centrifugación (13000 rpm durante 5 min) utilizando eppendorfs con membrana de ultrafiltración con un tamaño de corte de 10 kDa (Millipore®, MA, USA). El filtrado se recuperó para el análisis de la concentración de fenilpiruvato y fenilalanina.

#### **4.3.4. Optimización de las condiciones de reacción multienzimática**

##### **4.3.4.1. Determinación de la proporción de Asp y FP**

Se determinó el rendimiento de reacción de síntesis de Phe catalizada por AT utilizando FP y diferentes concentraciones de Asp como donador de grupos amino. Para ello, se utilizó 0,1 M de FP y 0,1, 0,125, 0,25 ó 0,5 M de Asp en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 0,1 mM de PLP. La reacción se llevó a cabo con 2 U de AT/mL de reacción en un volumen final de reacción de 1 mL, en agitación orbital a 350 rpm y 37°C durante 48 h. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo y la reacción se detuvo según se explicó en la sección 4.3.3.

##### **4.3.4.2. Determinación de la concentración de enzimas**

Se determinaron los parámetros de la reacción multienzimática (velocidades iniciales y rendimientos de reacción) de la síntesis de Phe catalizada por AspB y AT, utilizando fumarato, NH<sub>4</sub>Cl y fenilpiruvato como sustratos y variando la proporción de la concentración de los enzimas. Las reacciones se llevaron a cabo con 0,15 M de fumarato, 0,3 M de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 M de fenilpiruvato y 0,1 mM de PLP en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5. La concentración de AspB se mantuvo fija a 0,3 U/mL de reacción y la concentración de AT fue de 1, 2 ó 3 U/mL de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 3 mL, en agitación orbital a 350 rpm y 37°C durante 48 h. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo para el seguimiento de las concentraciones de Asp, FP y Phe. La reacción se detuvo según se explica en la sección 4.3.3. El rendimiento global de la reacción se calculó como el producto de los rendimientos de las reacciones catalizadas por AspB y AT.

#### **4.3.5. Medida de la actividad enzimática de AspB y AT**

La actividad de AspB se determinó según el método descrito en la sección 3.3.11. La actividad de AT se determinó según el método descrito en la sección 2.3.8.

#### **4.3.6. Medida de la concentración de sustratos y productos**

La medida de la concentración de L-aspartato se determinó por el método de derivatización con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) y se analizó por HPLC según el método descrito en la sección 3.3.12. La medida de la concentración de fenilpiruvato y L-fenilalanina se realizó por HPLC y según el método descrito en la sección 2.3.10.



## 4.4. Resultados y discusión

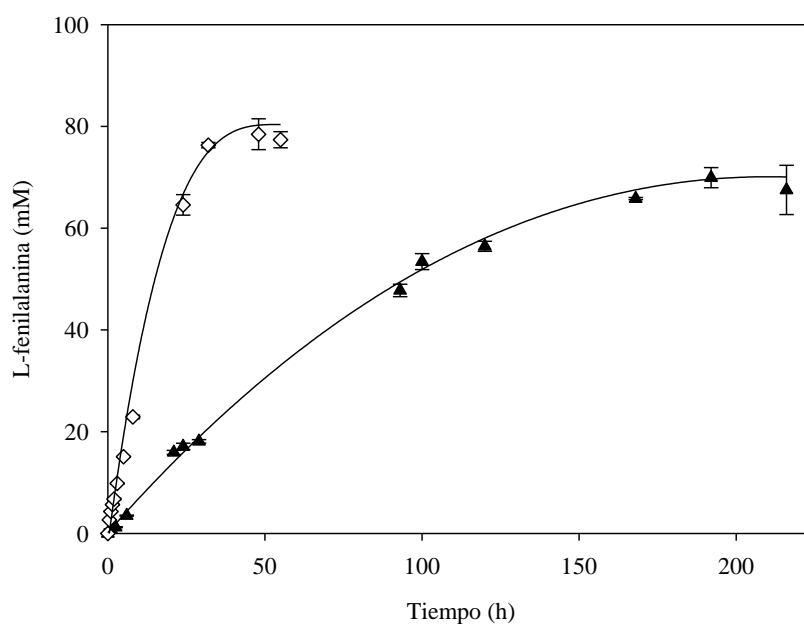
### 4.4.1. Síntesis de L-fenilalanina catalizada por transaminasa (AT)

Como se explicó en el capítulo 2 de esta tesis, la reacción de síntesis de L-fenilalanina (Phe) se llevó a cabo con el enzima comercial L-aspartato transaminasa (AAT) de corazón porcino. En esta sección, se describe la reacción de síntesis de Phe catalizada por el enzima transaminasa (AT) de origen bacteriano que fue proporcionado por el profesor Timo Korpela del Laboratorio “Joint Biotechnology” de la Universidad de Turku, Finlandia.

Para comprobar si AT era capaz de catalizar la reacción de aminación del sustrato fenilpiruvato (ceto análogo de Phe) usando L-aspartato como donador de grupos amino, se realizó la reacción de síntesis de Phe en las condiciones establecidas para la reacción catalizada por AAT (concentración 0,1 M para ambos sustratos, pH 7,5 y 37°C). Al comparar los valores de velocidad inicial de reacción, se observó que la reacción catalizada por AT fue 5,5 veces más rápida que la reacción catalizada por AAT, incluso utilizando 12,5 veces menor actividad enzimática (Tabla 4.1). Se calculó el cociente del valor de velocidad inicial ( $r_o$ ) entre la actividad enzimática utilizada (U/mL), que resultó ser 69 veces mayor para AT que para AAT (Tabla 4.1), lo cual nos estaría indicando que posiblemente AT tiene mayor afinidad por fenilpiruvato y Phe que el enzima AAT. Para confirmar esta suposición, se calcularon los parámetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $r_{max}$  (velocidad máxima de reacción) de AAT y AT hacia Phe mediante el método integral a partir de los datos del curso de reacción de síntesis de Phe. Como se observa en la Tabla 4.1, el valor de  $K_m$  hacia Phe fue de 342,5 y 84,5 mM para AAT y AT respectivamente, lo que confirma que AT tiene mayor afinidad por el aminoácido Phe que AAT.

El rendimiento de reacción para la reacción catalizada por AT fue de 77,2% al cabo de 48 h mientras que para AAT fue de 68,3% al cabo de 8 días (Figura 4.2, Tabla 4.1).

En base a la alta velocidad de reacción y alto rendimiento, se confirma que el enzima transaminasa (AT) de origen bacteriano es una excelente opción como catalizador de la síntesis de Phe.



**Figura 4.2.** Síntesis de L-fenilalanina catalizada por ( $\diamond$ ) AT (2 U/mL) y ( $\blacktriangle$ ) AAT (25 U/mL). Ambas reacciones se llevaron a cabo con 0,1 M de fenilpiruvato, 0,1 M de L-aspartato y 0,1 mM de PLP en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C.

**Tabla 4.1.** Comparación de AAT y AT en la síntesis de L-fenilalanina utilizando 0,1 M fenilpiruvato, 0,1 L-aspartato y 0,1 mM PLP en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C.

	Enzimas	
	AAT <sup>(a)</sup>	AT
Fuente	Corazón porcino (Sigma-Aldrich <sup>®</sup> )	Bacteriano (Universidad de Turku)
Actividad (U/mL de reacción)	25	2
Velocidad inicial $r_o$ (mmol Phe/L·h) <sup>(b)</sup>	0,74	4,04
Rendimiento (%)	68,3	77,2
Tiempo de reacción	8 días	48 h
$r_o$ / actividad ( $\mu\text{molPhe}/\mu\text{molAsp}$ )	$4,9 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$
$K_m$ (mM) <sup>(c)</sup>	342,5	84,5
$r_{max}$ (mM/h) <sup>(c)</sup>	3,3	7,5

<sup>(a)</sup> Síntesis de Phe catalizada por AAT descrita en el capítulo 2 (Tabla 2.5).

<sup>(b)</sup>  $R^2 \geq 0,95$ .

<sup>(c)</sup> Los parámetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $r_{max}$  (velocidad máxima de reacción) fueron calculados por el método integral.

#### 4.4.2. Optimización del proceso multienzimático

La aplicación de reacciones multienzimáticas “one-pot” o simultáneas es una de las mejores estrategias utilizadas en bioprocesos para evitar los pasos de recuperación y purificación de productos intermediarios. Sin embargo, una de las principales limitaciones es la relacionada con la compatibilidad de los biocatalizadores a utilizar. Debido a ello, la síntesis de productos mediante sistemas multienzimáticos es menos frecuente que los procesos enzimáticos usando un solo enzima [6]. Una de las principales consideraciones a tener en cuenta es que los biocatalizadores aplicados en el proceso “one-pot” deben ser catalíticamente activos y estables en las condiciones de reacción [7].

En el capítulo 3, se aplicó el enzima aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) en la síntesis de altas concentraciones de L-aspartato (Asp) a partir de fumarato y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , con rendimientos superiores al 90%. Las mismas condiciones de reacción (tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y  $37^\circ\text{C}$ ) se aplicaron en la síntesis de Phe catalizada por AT (sección 4.4.1). Entonces, se decidió evaluar la estabilidad de AT a lo largo del tiempo a dichas condiciones de pH y temperatura. Se observó que AT mantuvo el 91% de su actividad al cabo de 24 h y perdió tan solo 17% después de 54 horas de incubación. Además, no se ha reportado que los sustratos ni los productos de reacción de síntesis ejerzan un efecto inhibitorio en los enzimas en estudio. Así, se puede afirmar que los enzimas AT y AspB son compatibles en las condiciones de reacción y por lo tanto pueden ser utilizados en la síntesis multienzimática simultánea de Phe.

Con el objetivo de incrementar los rendimientos de Phe, se procedió a la determinación de la concentración adecuada de L-aspartato para la reacción catalizada por AT (reacción no acoplada) y de la mejor relación de concentración de los enzimas AspB y AT para las reacciones multienzimáticas simultáneas.

##### 4.4.2.1. Determinación de la proporción de FP y Asp

Se analizó el efecto de diferentes relaciones fenilpiruvato:L-aspartato (FP:Asp) sobre el rendimiento de reacción. Para ello, esta relación varió de 1:1 y 1:5 manteniendo constante la concentración de FP. El rendimiento de reacción se analizó al cabo de 48 h, alcanzando un 99,9% cuando la relación de FP:Asp fue de 1:5, mientras que el rendimiento más bajo se obtuvo cuando se utilizaron concentraciones equimolares de los sustratos (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Síntesis enzimática de Phe catalizada por AT a distintas concentraciones de L-aspartato (Asp). Las reacciones se llevaron a cabo con 0,1 M de fenilpiruvato (FP), 0,1 mM de PLP en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y 2 U de AT/mL de reacción a 350 rpm y 37°C durante 48 h.

L-aspartato (mM)	Relación de Sustratos (FP:Asp)	Rendimiento (%)
0,1	1:1	78,5
0,125	1:1,25	93,3
0,25	1:2,5	98,1
0,5	1:5	99,9

Basados en estos resultados, se escogió 0,125 M de Asp como la concentración óptima para la reacción de síntesis de Phe catalizada por AT, debido a que se obtiene un incremento significativo del rendimiento de reacción con respecto a la relación 1:1. Para la síntesis multienzimática de Phe se descartó el uso de concentraciones mayores de Asp, a pesar de que los rendimientos fueron prácticamente del 100%, para evitar la acumulación excesiva de Asp en el medio de reacción, lo cual podría interferir en las etapas posteriores de recuperación del producto de interés.

#### 4.4.2.2. Determinación de la concentración de enzimas

Según los resultados del capítulo 3, el rendimiento de la reacción de síntesis de Asp a partir de fumarato y NH<sub>4</sub>Cl empleando el enzima AspB como catalizador puede ser superior al 90%. Teniendo en cuenta este valor, se establecieron unas concentraciones de 0,15 M de fumarato y 0,3 M de NH<sub>4</sub>Cl, con el fin de obtener una concentración de Asp superior a 0,125 M, lo que garantizaría un rendimiento de la segunda reacción superior al 90%.

A continuación, se procedió a determinar la relación óptima de actividades de los enzimas AspB y AT. Para ello, se mantuvo constante la concentración de AspB (0,3 U/mL de reacción) y se varió la concentración de AT (1, 2 ó 3 U/mL de reacción). Las velocidades iniciales ( $r_o$ ) y los rendimientos de Asp para las reacciones catalizadas por AspB fueron similares para las tres reacciones, puesto que la primera reacción de la serie no se vio afectada por las diferencias de actividad enzimática de AT. En promedio,  $r_o$  fue de 25 mmol de Asp/L·h y el rendimiento de 88% (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Relación óptima de las concentraciones de enzimas AspB y AT.

Las reacciones se llevaron a cabo con fumarato 0,15 M, NH<sub>4</sub>Cl 0,3 M, fenilpiruvato 0,1 M y PLP 0,1 mM en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y 0,3 U de AspB/mL de reacción, a 37°C durante 48 h.

	Transaminasa (AT)		
	1 U/mL	2 U/mL	3 U/mL
Velocidad inicial $r_o$ AspB (mmol/L·h)	25,0	24,2	25,5
Velocidad inicial $r_o$ AT (mmol/L·h)	4,2	7,3	8,5
Rendimiento Asp (%) <sup>(a)</sup>	91,2	87,3	84,5
Rendimiento Phe (%) <sup>(b)</sup>	84,1	94,5	89,5
Rendimiento global (%) <sup>(c)</sup>	76,7	82,5	75,6

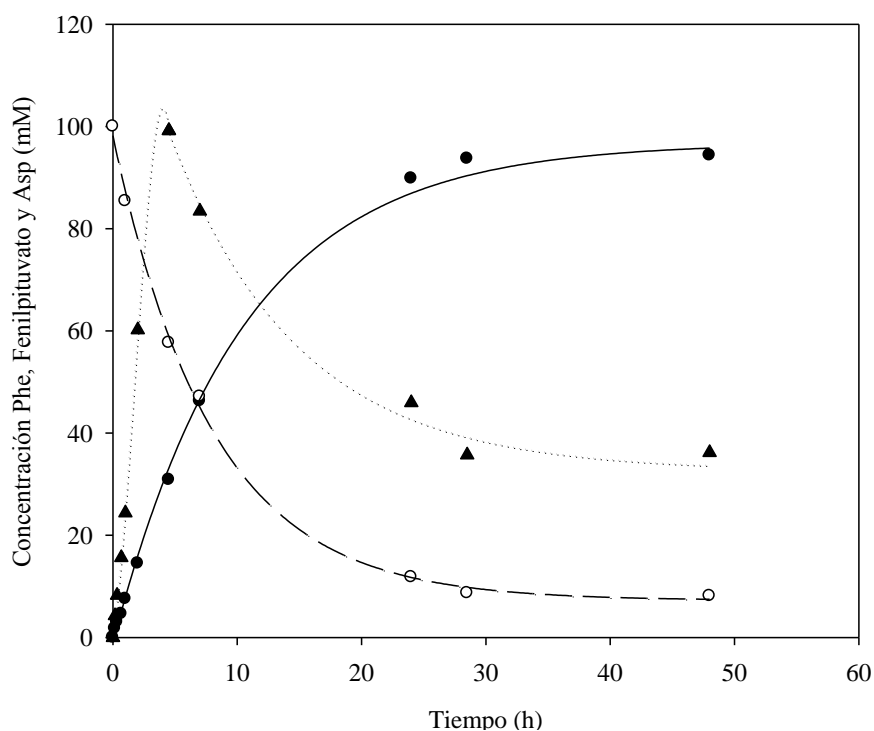
<sup>(a)</sup> El rendimiento de Asp se calculó a partir de la suma de los valores de concentración de Phe y Asp al final de la reacción en relación a la concentración inicial de fumarato.

<sup>(b)</sup> El rendimiento de Phe se calculó en base a la concentración de fenilpiruvato al inicio de la segunda reacción.

<sup>(c)</sup> El rendimiento global de reacción se calculó como el producto de los rendimientos de Phe y Asp.

Para la reacción catalizada por AT, se observó que las velocidades iniciales aumentaron aunque no en la misma proporción que la actividad enzimática utilizada, dado que el sustrato de la segunda reacción de la serie es un compuesto intermedio y, por tanto, su concentración no es constante ni comparable entre los tres casos analizados. El mayor rendimiento de Phe se obtuvo cuando se utilizaron 2 U de AT/mL de reacción alcanzando 95%, que equivale a una acumulación de Phe de 95 mM al final de la reacción de síntesis. De igual manera, el mayor rendimiento global de la reacción fue de 83% y se obtuvo en la reacción catalizada por 2 U de AT/mL (Tabla 4.3).

Además, en las tres reacciones de síntesis multienzimática de Phe se observó que la reacción catalizada por AspB es mucho más rápida que la catalizada por AT, lo cual conllevó una rápida acumulación de Asp al cabo de las primeras horas de reacción, con su posterior disminución y consecuente incremento de la concentración de Phe (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Síntesis multienzimática de L-fenilalanina catalizada por AspB y AT utilizando 0,3 y 2 U/mL de reacción respectivamente. La reacción se llevó a cabo con 0,15 M de fumarato, 0,3 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 M de fenilpiruvato y 0,1 mM de PLP en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 a 37°C. (○) fenilpiruvato, (▲) L-aspartato y (●) L-fenilalanina.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos, las mejores condiciones de reacción para la síntesis multienzimática de Phe son: 0,15 M de fumarato, 0,3 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 M de fenilpiruvato, 0,1 mM de PLP y con 0,3 y 2 U/mL de reacción para AspB y AT respectivamente, en tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 y 37°C (Figura 4.3).

## 4.5. Conclusiones

Se estableció un método para la síntesis enzimática del aminoácido aromático esencial L-fenilalanina (Phe) mediante una reacción multienzimática “one-pot” catalizada por L-aspartato amonio liasa o aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) y transaminasa (AT).

El enzima AT (de origen bacteriano) resultó ser una mejor opción como biocatalizador en la síntesis de Phe que AAT de corazón porcino, puesto que AT cataliza la reacción de transaminación más rápidamente y tiene mayor afinidad por Phe.

Los enzimas AspB y AT fueron compatibles en actividad y estabilidad en las condiciones de reacción de síntesis de Phe (pH 7,5 y 37°C).

La optimización de las relaciones de concentraciones de sustratos y de biocatalizadores en la reacción de síntesis multienzimática simultánea permitió obtener altos rendimientos de Phe ( $\approx$  95%).

Para mejorar la productividad del proceso de síntesis multienzimática de Phe catalizada en reacciones simultáneas por AspB y AT, se plantea como alternativa la co-inmovilización de ambos enzimas, que permitiría mejorar su estabilidad, de manera que pudieran ser reutilizados en varios ciclos de reacción de síntesis del aminoácido.

## 4.6. Referencias

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005;69:1-8.
- [2] Fotheringham IG. Synthesis of phenylalanine by fermentation and chemoenzymatic methods. In: D. J. Ager editor. *Handbook of Chiral Chemicals*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 648.
- [3] Xu H, Wei P, Zhou H, Fan W, Ouyang P. Efficient production of L-phenylalanine catalyzed by coupled enzymatic system of transaminase and aspartase. *Enzyme and Microbial Technology* 2003;33:537-543.
- [4] Chao YP, Lo TE, Luo NS. Selective production of L-aspartic acid and L-phenylalanine by coupling reactions of aspartase and aminotransferase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:19-25.
- [5] Ruiz J, Pinsach J, Álvaro G, González G, de Mas C, Resina D, López-Santín J. Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry* 2009;44:1039-1045.
- [6] Ricca E, Brucher B, Schrittwieser JH. Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives. *Advanced Synthesis and Catalysis* 2011;353:2239-2262.
- [7] Santacoloma PA, Sin G, Gernaey KV, Woodley JM. Multienzyme-catalyzed processes: next-generation biocatalysis. *Organic Process Research and Development* 2011;15:203-212.



# CAPÍTULO 5

---

## *Síntesis de aminas aromáticas catalizada por $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) inmovilizado*

**Publicación:**

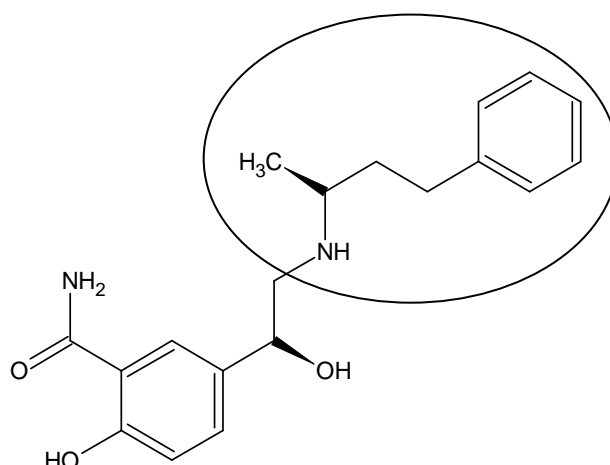
Cárdenas-Fernández M, Neto W, López C, Álvaro G, Tufvesson P, Woodley JM. Immobilization of *Escherichia coli* containing  $\omega$ -transaminase activity in LentiKats®. *Biotechnology Progress* 2012,28(3): 693–698.

## Resumen

El enzima  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) cataliza inespecíficamente la desaminación reversible de aminas aromáticas. Las células recombinantes *Escherichia coli* con actividad  $\omega$ -TA se permeabilizaron con 0,1% de bromuro de cetrimonio consiguiendo un aumento de la actividad catalítica del 40%. Las células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas se inmovilizaron por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>, obteniéndose una retención del 100% de actividad para ambos casos. Tanto las células  $\omega$ -TA libres como las inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup> se usaron como biocatalizadores en la síntesis de las aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB), usando isopropilamina (IPA) y L-alanina (Ala) como donadores de grupos amino. Adicionalmente, el enzima  $\omega$ -TA expresado en *E. coli* se purificó parcialmente por doble precipitación con sulfato amónico al 35 y 60% (p/v) de concentración de saturación. Se obtuvo un factor de purificación de 3,2 y actividad específica de 1,9 U/mg de proteína. Para la inmovilización covalente de  $\omega$ -TA parcialmente purificado se utilizaron varios soportes, siendo sólo factible en Eupergit<sup>®</sup> CM con 20% de actividad retenida. Además, el enzima  $\omega$ -TA se inmovilizó por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup> y se obtuvo una retención del 52%. Por último, se estudió la reutilización de las células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas libres e inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup> así como el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> en la síntesis de AFB usando IPA como donador de grupos amino. La inmovilización tanto de las células como del enzima en LentiKats<sup>®</sup> permitió mejorar la estabilidad de los biocatalizadores, que se reutilizaron hasta en 5 y 10 ciclos de reacción manteniendo 80 y 70% de la actividad original respectivamente. De acuerdo a los cálculos de productividad catalítica, el enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> sería considerado como el mejor biocatalizador para ser usado en la síntesis de AFB.

## 5.1. Introducción

La producción de compuestos aminados es de gran interés sobre todo para la industria farmacéutica y agroquímica. Estos compuestos son utilizados como intermediarios en la síntesis de fármacos o de compuestos químicamente activos [1, 2]. Por ejemplo, 3-amino-1-fenilbutano (AFB) se utiliza en la síntesis del fármaco dilevalol (Figura 5.1), antihipertensivo que actúa como antagonista competitivo específico de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos.



**Figura 5.1.** Fármaco dilevalol (el círculo señala el compuesto aminado AFB).

Los métodos de biosíntesis de compuestos aminados se basan principalmente en el empleo de enzimas tipo hidrolasas y transaminasas [3].

La síntesis de compuestos aminados usando  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TAs) (capítulo 1 sección 1.4.1.3) puede realizarse por métodos de resolución a partir de una mezcla racémica del compuesto aminado o por síntesis asimétrica utilizando un compuesto donador de grupos amino y un compuesto cetona proquiral (Figura 1.20).

Los  $\omega$ -TAs presentan una elevada enantioselectividad y afinidad por un amplio rango de sustratos tipo alquilaminas y arilalquilaminas [4]. Sin embargo, la principal desventaja del uso de estos enzimas es que los valores de la constante de equilibrio ( $K_c$ ) de reacción son pequeños, lo que conlleva que la reacción esté más favorecida hacia la formación de sustratos.

Otra desventaja es la relacionada con el fuerte efecto inhibitorio del enzima por los sustratos y productos de reacción [5, 6].

Los estudios de síntesis asimétrica de compuestos aminados realizados con  $\omega$ -TAs se han llevado a cabo tanto con células (nativas o recombinantes) [7, 8] como con el enzima (purificado o parcialmente purificado) [5, 9, 10], y han estado enfocados básicamente a solucionar las desventajas de su aplicación. De esta manera, para desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de productos, se plantea el uso de una o más estrategias, tales como:

i) Incrementar la concentración del compuesto donador de grupos amino. Por ejemplo, para obtener un 90% de conversión del compuesto cetona a su respectivo compuesto aminado, para reacciones con una  $K_c$  de 1, la concentración del donador de grupos amino debería ser 10 veces superior a la del compuesto cetona; si la  $K_c$  fuese de  $10^{-2}$  el exceso debería ser de unas 1000 veces [11, 12].

ii) Eliminar el co-producto de reacción, es decir, la cetona resultante de la desaminación del donador de grupos amino. Esto se puede llevar a cabo por métodos *in-situ* (ej. con resinas de intercambio, evaporación, etc.); por acoplamiento de reacciones enzimáticas usando deshidrogenasas [10, 13] o descarboxilasas [14]; o en caso de células, mediante su maquinaria enzimática [15].

El uso de células es una excelente alternativa para eliminar el co-producto de reacción. Su principal desventaja radica en la posible formación de productos no deseados, aunque esto se puede superar usando células recombinantes que sobreexpresen el enzima, con lo cual se incrementaría la velocidad de reacción de interés y se disminuirían las reacciones colaterales [16]. Otra estrategia para incrementar la velocidad de reacción catalizada por células consiste en la permeabilización de las membranas celulares, que actúan como barreras semipermeables dificultando el paso de sustratos y productos. La permeabilización de las membranas se realiza tratando las células con agentes permeabilizantes como disolventes (ej. etanol) o surfactantes (ej. bromuro de cetrimonio) (capítulo 1 sección 1.1.1).

Por otro lado, a pesar de los avances realizados con respecto al uso de  $\omega$ -TAs, pocos estudios han reportado la inmovilización de células con actividad  $\omega$ -TA o la inmovilización del propio enzima.

Martin y col. inmovilizaron células (secadas por aspersión) con actividad  $\omega$ -TA por atrapamiento en soporte de Ca-alginato y las utilizaron en la síntesis de acetofenona y aminotetralina. Los autores observaron un incremento del valor de  $K_m$  de las células inmovilizadas de hasta 5 veces con respecto a las células libres; este efecto se relacionó básicamente con la presencia de limitaciones difusionales [17].

Además, se ha reportado la inmovilización del enzima  $\omega$ -TA purificado de *Vibrio fluvialis* en soporte quitosano, Eupergit<sup>®</sup> C y Tentagel SCOOSu con actividades retenidas de 18, 11 y 0,5% respectivamente [18]. Asimismo, se ha descrito la inmovilización de este mismo enzima por atrapamiento usando soportes derivados de sílica sol-gel, alcanzando una retención de alrededor del 25% de actividad enzimática; la inmovilización en este soporte mejoró la estabilidad del enzima, lo que permitió su reutilización hasta en 5 ciclos de síntesis de 1-feniletilamina manteniendo un 90% de su actividad inicial [19].

En este capítulo se describe la síntesis de las aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada tanto por células con actividad  $\omega$ -TA (libres e inmovilizadas) como por el enzima  $\omega$ -TA parcialmente purificado (libre e inmovilizado). Por último se estudia la reutilización y se compara la productividad catalítica de los biocatalizadores inmovilizados en la síntesis de AFB.

## **5.2. Objetivos**

### *Objetivo general*

-Sintetizar las aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB), usando como biocatalizadores células con actividad  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) inmovilizadas y el enzima  $\omega$ -TA inmovilizado.

### *Objetivos específicos*

-Establecer un método de permeabilización de células con actividad  $\omega$ -TA para incrementar su actividad catalítica.

-Inmovilizar células con actividad  $\omega$ -TA por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>.

-Seleccionar un donador de grupos amino para la síntesis enzimática de las aminas aromáticas utilizando células  $\omega$ -TA.

-Purificar parcialmente el enzima  $\omega$ -TA y estudiar su estabilidad en las diferentes condiciones de inmovilización aplicadas en este estudio.

-Inmovilizar el enzima  $\omega$ -TA por métodos de formación de enlaces covalentes y atrapamiento.

-Estudiar la reutilización de los biocatalizadores inmovilizados para la síntesis de AFB.

-Establecer el mejor biocatalizador para la síntesis de AFB por comparación de la producción catalítica.

## 5.3. Metodología

### 5.3.1. Enzima y reactivos químicos

Todos los reactivos químicos, de grado analítico, y Eupergit<sup>®</sup> CM fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El soporte agarosa 10 BCL fue adquirido en Iberagar (Coíña, Portugal). LentiKats<sup>®</sup> gel fue suministrado por GeniaLab (Braunschweig, Alemania). El enzima recombinante  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA) fue clonado en *Escherichia coli* BL21(D3) por la compañía c-LEcta (Leipzig, Alemania) quien suministró la cepa y el plásmido.

### 5.3.2. Expresión de $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA)

La cepa recombinante *E. coli* BL21(D3) con actividad  $\omega$ -TA se cultivó en la Planta Piloto de Fermentación (PPF) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). EL cultivo se realizó en un medio definido de minerales [20] que contenía 0,05 g/L de kanamicina. Las condiciones de cultivo son las detalladas en la sección 3.3.2. Al final del proceso ( $DO_{600nm} = 30 \approx 9,9$  g de células en peso seco – DCW/L de cultivo), las células se separaron por centrifugación (4000 rpm a 4°C durante 15 min) y se lavaron dos veces con tampón HEPES 0,1 M pH 7.

### 5.3.3. Permeabilización de células con actividad $\omega$ -TA

El precipitado celular se resuspendió en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 (0,8 g DCW/mL). La suspensión celular se trató con los agentes permeabilizantes bromuro de cetrimonio (CTAB) a una concentración final de 0,1, 0,2 y 0,4% (p/v) (tampón fosfato potásico 0,1 M pH 8) o con etanol a una concentración final de 20, 40 y 60% (v/v). En todos los casos, se trataron 0,1 g de células y el volumen final fue de 4 mL. Las suspensiones celulares se mantuvieron en agitación orbital (Thermoshaker HLC, Bovenden, Alemania) a 200 rpm y 25°C durante 20 min. Después de este tiempo las células se recuperaron por centrifugación (8000 rpm a 4°C durante 10 min) y se lavaron con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7.

### 5.3.4. Inmovilización de células $\omega$ -TA en LentiKats<sup>®</sup>

La inmovilización por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup> de células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas se realizó según el protocolo descrito por la casa

comercial GeniaLab. El gel LentiKats<sup>®</sup> se licuó por calentamiento a 90°C, y posteriormente se enfrió a 30°C. A esta temperatura, se mezclaron 2 mL de suspensión de células no permeabilizadas (0,8 g DCW/mL) o permeabilizadas (0,3 g DCW/mL) con 8 mL de LentiKats<sup>®</sup> gel. A continuación se procedió a la formación de las partículas lenticulares por medio de la “impresora” LentiKats<sup>®</sup> dando lugar a partículas de 3-4 mm de diámetro. Las partículas se dejaron secar hasta alcanzar un 30% del peso inicial. Al cabo de este tiempo, se adicionó la disolución endurecedora (15 mL por g de partículas lenticulares) y la suspensión se mantuvo en agitación rotativa (en “roller”) a temperatura ambiente (22 ± 2°C) durante 2 h. Finalmente, las partículas se separaron por decantación, se lavaron con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 y se almacenaron a 4°C.

### **5.3.5. Purificación parcial de $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA)**

El precipitado de células de *E. coli* con actividad  $\omega$ -transaminasa (obtenidas al final del cultivo) se resuspendió en tampón HEPES 0,1 M pH 7 conteniendo PLP 0,1 mM hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 100; luego, las células se lisaron mediante doble disrupción mecánica a 21 kpsi (Constant System LTD, Warwickshire, Inglaterra). Los restos celulares se separaron por centrifugación a 8000 rpm y 4°C durante 40 min. El extracto crudo se recuperó y se procedió a la purificación parcial del enzima por doble precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para ello, se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido a 100 mL de extracto crudo para alcanzar un 35% (p/v) de concentración de saturación y se mantuvo en agitación magnética suave a 4°C durante 30 min. Las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación (8000 rpm a 4°C durante 30 min). Se recuperaron 96 mL de sobrenadante y se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido para alcanzar un 60% (p/v) de saturación final. La mezcla se mantuvo en agitación magnética suave a 4°C durante 30 min. El enzima precipitado se recuperó por centrifugación y se almacenó como suspensión en una disolución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 60% (p/v) a 4°C. Se tomaron muestras en cada uno de los pasos de purificación y se analizaron la actividad enzimática y la concentración de proteínas por el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL, USA). La cuantificación de proteínas se realizó usando albúmina sérica bovina como estándar (Anexo 2).

### **5.3.6. Ensayos de estabilidad del enzima $\omega$ -TA**

Se evaluó la estabilidad del enzima  $\omega$ -TA parcialmente purificado midiendo su actividad enzimática a lo largo del tiempo cuando se incubó a diferentes condiciones requeridas por las diferentes técnicas de inmovilización:



i) a diferentes valores de pH y fuerza iónica: pH 5 y 6 (en tampón MES 25 mM), pH 7 (en tampón HEPES 0,1 M), pH 8, 9 y 10 (en tampón bicarbonato sódico 1 M).

ii) en presencia de diferentes concentraciones de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimida (CDI): 25, 50 y 100 mM; y etilendiamina (EDA): 0,1, 0,5 y 1 M. En todos estos casos se utilizó tampón MES 25 mM pH 6.

Todos los estudios de estabilidad se llevaron a cabo con una actividad inicial de 4 U/mL en un volumen final de 4 mL con agitación rotativa a temperatura ambiente.

### **5.3.7. Inmovilización por enlace covalente de $\omega$ -TA en soportes derivados de agarosa**

En esta sección se describe la inmovilización de  $\omega$ -TA en dos soportes derivados de agarosa: MANA-agarosa (soporte amino) y aspártico-agarosa (soporte carboxilo). Para ello, primero se preparó el soporte aldehído-agarosa 10 BCL (densidad = 1,07 g/mL) según el método de Fernández-Lafuente [21] y como se describe en el apartado 2.3.4.1. La densidad de grupos aldehído fue de 220  $\mu$ mol por mL de soporte.

#### **5.3.7.1. Inmovilización de $\omega$ -TA en MANA-agarosa**

Se utilizó el soporte monoaminometil-N-aminoetil agarosa o MANA-agarosa (220  $\mu$ mol de grupos  $-\text{NH}_2$ /mL de soporte), que se preparó según el método de Fernández-Lafuente y como se describe en la sección 2.3.4.2. Para la inmovilización del enzima, se mezcló 1 mL de MANA-agarosa con 9 mL de tampón MES 25 mM pH 6 conteniendo 40 U de  $\omega$ -TA. Para promover la adsorción iónica la suspensión se mantuvo en agitación rotativa y temperatura ambiente durante 15 min. Para la formación de enlaces covalentes se adicionó CDI a una concentración final de 25 mM y la suspensión se mantuvo en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 2 h. Finalmente, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP, se filtró y se almacenó a 4°C.

#### **5.3.7.2. Preparación del soporte aspártico-agarosa**

Para la preparación del soporte aspártico-agarosa (Asp-agarosa) se resuspendió el soporte aldehído-agarosa en una disolución de L-aspartato 3 M y cianoborohidruro sódico 0,2 M, se ajustó el pH a 7 y la suspensión se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 15 h. Inmediatamente después se adicionó  $\text{NaBH}_4$  (10 mg/mL) y  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M, el

pH se ajustó a 10 y la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 h. Finalmente, se lavó el soporte resultante con 10 volúmenes de una disolución de acetato sódico 0,1 M y NaCl 1 M a pH 6 y seguidamente con abundante agua destilada. La densidad de grupos carboxilos en Asp-agarosa se estimó como el doble de la de aldehídos (440  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{COOH}/\text{mL}$  de soporte).

#### **5.3.7.3. Aminación de la superficie de $\omega$ -TA**

Con el objetivo de incrementar la densidad de grupos  $-\text{NH}_2$  de la superficie del enzima, se procedió a la modificación química del mismo por aminación. Para ello, se mezclaron 5 mL de  $\omega$ -TA (70 U) con 45 mL de tampón MES 50 mM pH 6 conteniendo etilendiamina 0,5 M y carbodiimida 50 mM. La mezcla se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, el  $\omega$ -TA aminado ( $\omega$ -TA- $\text{NH}_2$ ) se recuperó por precipitación con sulfato amónico al 60% (p/v) de saturación.

#### **5.3.7.4. Inmovilización de $\omega$ -TA y $\omega$ -TA- $\text{NH}_2$ en soporte aspártico-agarosa**

Para la inmovilización de  $\omega$ -TA y  $\omega$ -TA- $\text{NH}_2$  en el soporte Asp-agarosa, se mezcló 1 mL de Asp-agarosa con 9 mL de tampón MES 25 mM pH 6 conteniendo 40 U de  $\omega$ -TA o  $\omega$ -TA- $\text{NH}_2$ . La suspensión se mantuvo en agitación durante 15 min. Posteriormente se adicionó CDI a una concentración final de 25 mM y la suspensión se mantuvo en agitación rotativa. Finalmente, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP, se filtró y se almacenó a 4°C.

#### **5.3.8. Inmovilización por enlace covalente de $\omega$ -TA en Eupergit<sup>®</sup> CM**

Se hidrató el soporte Eupergit<sup>®</sup> CM con agua desionizada a 4°C durante 24 h. La inmovilización de  $\omega$ -TA se llevó a cabo mezclando 1 mL de soporte húmedo con 9 mL de disolución enzimática (40 U de  $\omega$ -TA) en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 8 ó 9. Los grupos epóxidos remanentes del soporte se bloquearon por incubación con 2-mercaptoetanol 0,2 M (tampón HEPES 0,1 M pH 7) durante 4 h. Finalmente, el enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP, se filtró y se almacenó a 4°C.

### 5.3.9. Inmovilización por atrapamiento de $\omega$ -TA en LentiKats®

La inmovilización  $\omega$ -TA en LentiKats® se realizó siguiendo el procedimiento especificado en la sección 2.3.5 de este manuscrito. Para ello se mezclaron 2 mL de disolución enzimática (3,2 U de  $\omega$ -TA en tampón HEPES 0,1 M pH 7) con 8 mL de soporte LentiKats® líquido. El enzima inmovilizado se recuperó por decantación, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP y se almacenó a 4°C.

### 5.3.10. Seguimiento de los procesos de inmovilización

Todas las inmovilizaciones del enzima  $\omega$ -TA se llevaron a cabo a temperatura ambiente y agitación rotativa. En todos los casos se realizó el seguimiento en paralelo de un ensayo “blanco” en el que el volumen del soporte se sustituyó por el mismo volumen de agua.

Se tomaron alícuotas del blanco, suspensión y sobrenadante a lo largo del tiempo y se midió la actividad enzimática.

El cálculo de *actividad retenida (%)* y del *rendimiento de inmovilización (%)* se realizó de acuerdo a las formulas descritas en la sección 2.3.6.

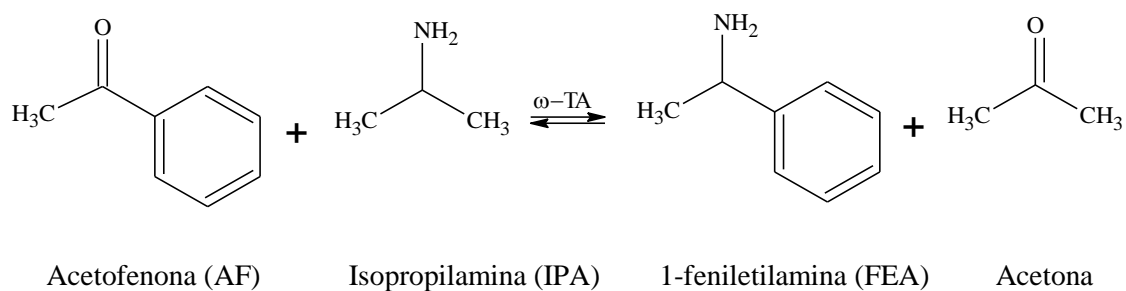
### 5.3.11. Síntesis de aminas aromáticas con biocatalizadores con actividad $\omega$ -TA

La síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) (Figura 5.2) se realizó usando células no permeabilizadas y permeabilizadas tanto libres como inmovilizadas en LentiKats® (0,02 g DCW/mL de reacción).

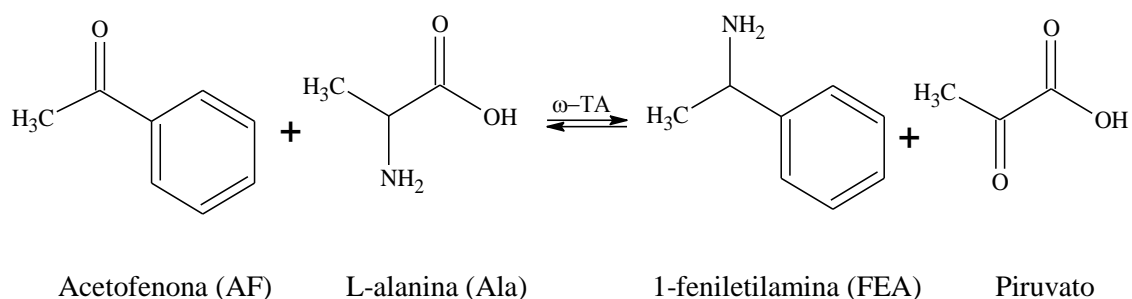
FEA se sintetizó por medio de 2 reacciones usando 6 mM de acetofenona (AF) y 1 M de isopropilamina (IPA) ó 0,1 M de L-alanina (Ala) como donadores de grupos amino. AFB se sintetizó usando 6 mM de 4-fenil-2-butanona (FB) y 1 M de IPA. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 2 mL en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 y 2 mM de PLP en agitación orbital (Thermoshaker HLC, Bovenden, Alemania) a 500 rpm y 30°C.

Asimismo, para la síntesis de AFB se utilizó el enzima  $\omega$ -TA parcialmente purificado así como los respectivos catalizadores inmovilizados en Eupergit® CM y LentiKats® (0,5 U/mL de reacción) en las mismas condiciones descritas previamente.

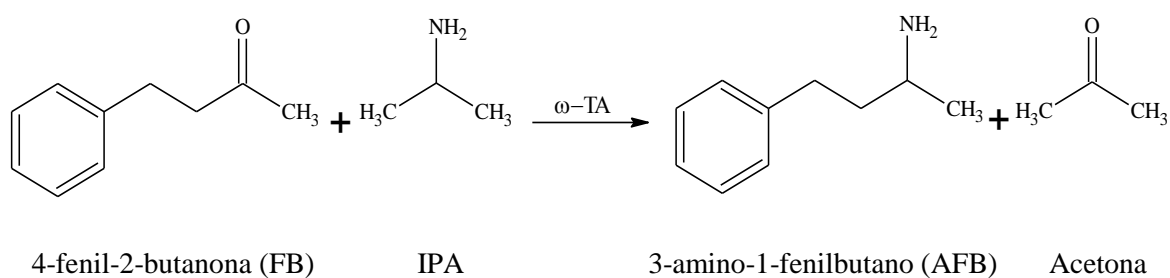
a.



b.



c.



**Figura 5.2.** Síntesis de aminas aromáticas 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA).

### 5.3.12. Reutilización de biocatalizadores inmovilizados con actividad $\omega$ -TA

Las células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas tanto libres como inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup>, así como el enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>, se reutilizaron en varios ciclos de reacción de síntesis de AFB. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 4 mL (para células libres e inmovilizadas) ó 3 mL (para el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup>), en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 conteniendo 6 mM de FB, 1 M de IPA y 2 mM de PLP. La cantidad de células libres o inmovilizadas se calculó a partir de los valores de velocidad inicial de reacción obtenidos según la sección 5.3.11, con el fin de alcanzar unas velocidades iniciales de 0,05  $\mu\text{mol}$  de AFB/mL·min para células libres y 0,03  $\mu\text{mol}$  de AFB/mL·min para células inmovilizadas. En el caso del enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> se partió de una velocidad inicial de 0,2 U/mL. Las reacciones se llevaron a cabo en agitación orbital a 500 rpm y 30°C durante 3 h para el caso de células libres e inmovilizadas y 2,3 h para el enzima inmovilizado. Al final de cada ciclo de reacción los biocatalizadores inmovilizados se recuperaron y lavaron 3 veces con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7. La recuperación de las células no permeabilizadas y permeabilizadas se realizó por centrifugación a 8000 rpm y 4°C durante 10 min. Se determinaron las velocidades iniciales y rendimientos de reacción para cada ciclo.

### 5.3.13. Medida de la actividad enzimática de $\omega$ -TA

La actividad enzimática de  $\omega$ -TA se determinó por espectrofotometría midiendo el incremento de absorbancia a 300 nm causado por la aparición de acetofenona, que es el producto de la reacción de desaminación de 1-feniletilamina (FEA). Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra con 900  $\mu\text{L}$  de la mezcla reactiva que contenía FEA 11 mM, dimetilsulfóxido 1,25% (v/v), piruvato 11 mM y PLP 0,1 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,4. El incremento de absorbancia se siguió en el espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible a 300 nm y 30°C. Una unidad de  $\omega$ -TA se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de acetofenona por minuto a 30°C. El coeficiente de extinción molar de acetofenona a 300 nm y 30°C es 0,28  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3.14. Medida de la concentración de las aminas aromáticas

Los análisis de las reacciones de síntesis de FEA y AFB realizadas con las células  $\omega$ -TA (libres e inmovilizadas) se realizaron en el Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU). Los compuestos se analizaron mediante cromatografía líquida usando un HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) con una columna Luna 3  $\mu\text{m}$  C18(2) 50 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil A consistió en ácido trifluoroacético 0,1% en agua MiliQ y la fase móvil B en acetonitrilo 100%. Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra a un flujo de 2 mL/min. El gradiente de elución se estableció de la siguiente manera: 0 min (0% de fase móvil B); 1 min (10% de fase móvil B); 2,5 min (10% de fase móvil B); 5,9 min (60% de fase móvil B), 6 min (0% de fase móvil B), 7 min (0% de fase móvil B). El compuesto FEA se detectó a 210 nm con un tiempo de retención de  $2,1 \pm 0,1$  min y AFB a 254 nm con un tiempo de retención de  $4,1 \pm 0,1$  min.

El análisis de la reacción de síntesis de AFB catalizada por el enzima  $\omega$ -TA (libre e inmovilizado) se realizó en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Los análisis se llevaron a cabo mediante un HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA), con la columna X-Bridge TM C18 5  $\mu\text{m}$  4,6 mm x 250 mm (Waters, Milford, MA, USA) y detector UV. La fase móvil A consistió en ácido trifluoroacético 0,1% en agua MiliQ y la fase móvil B en ácido trifluoroacético 0,095% y acetonitrilo 80% en agua MiliQ. Se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra y el gradiente de elución se estableció entre 40 y 100% de fase móvil B durante 15 min a un flujo de 1 mL/min a 30°C. Los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 254 nm. El tiempo de retención para AFB fue de  $4,1 \pm 0,1$  min y para FB fue  $8,8 \pm 0,1$  min (Anexo 4).

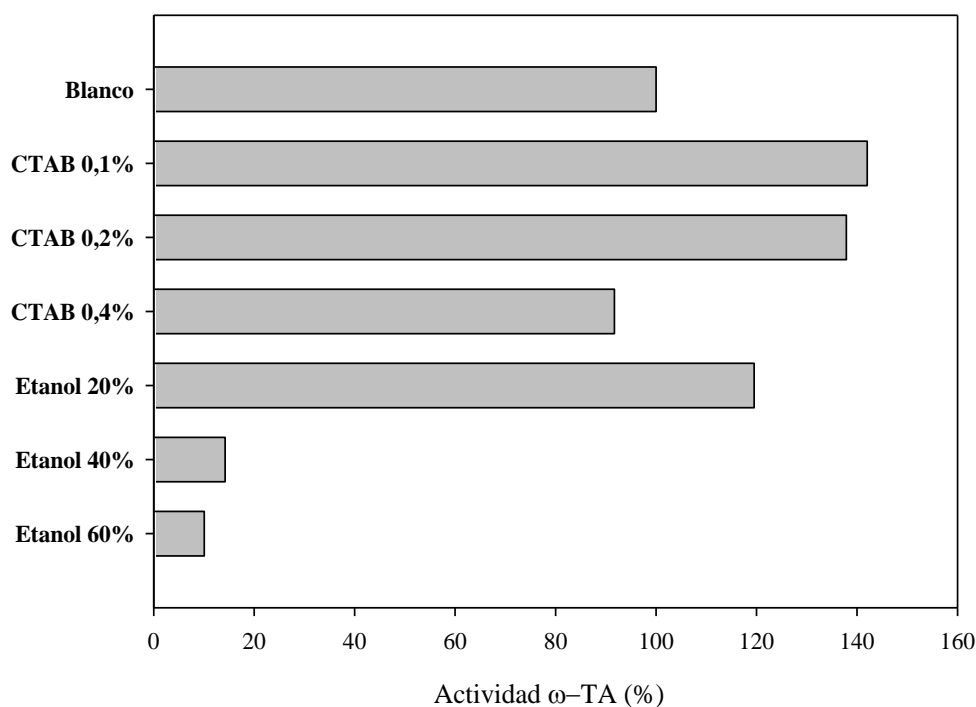
Todos los análisis cuantitativos se realizaron por integración de las áreas usando el método de estándar externo.

## 5.4. Resultados y discusión

### 5.4.1. Síntesis de aminas aromáticas catalizada por células con actividad $\omega$ -TA

#### 5.4.1.1. Permeabilización de células $\omega$ -TA

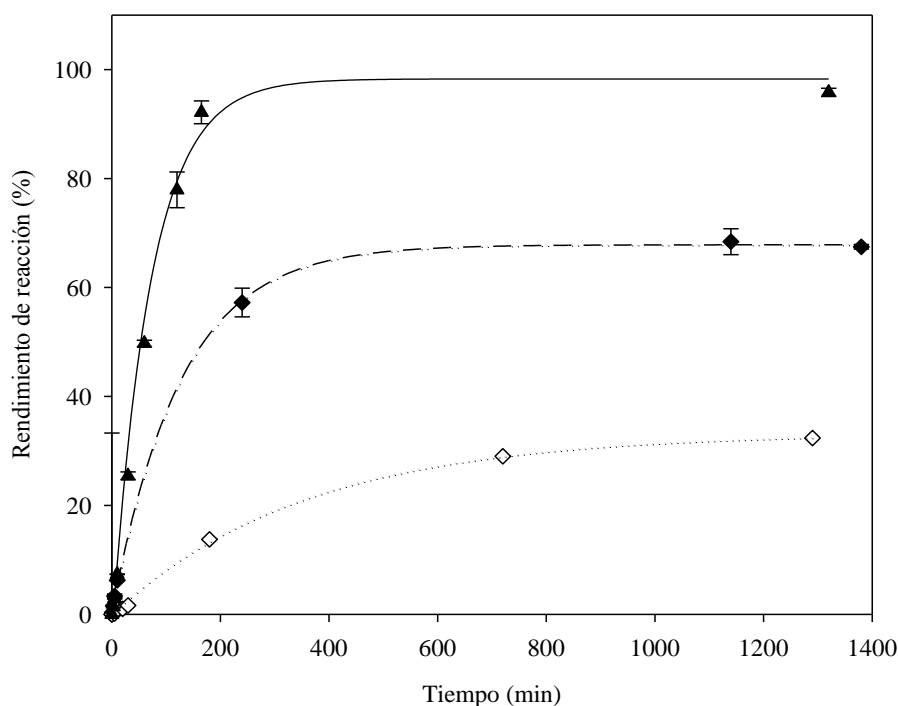
Con el objetivo de incrementar la actividad catalítica de las células  $\omega$ -TA, se evaluó el efecto de diferentes agentes permeabilizantes de las membranas celulares tales como etanol y bromuro de cetrimonio (CTAB). El uso de bajas concentraciones de CTAB (0,1 y 0,2%) tuvo un efecto positivo en la permeabilización celular, ya que permitió incrementar la velocidad de reacción enzimática catalizada por las células en alrededor de 40%. Asimismo, se obtuvo un incremento de 20% en la velocidad de reacción cuando las células se trataron con 20% de etanol. Sin embargo, el empleo de altas concentraciones de etanol (40 y 60%) tuvo un efecto negativo (Figura 5.3). Así, se estableció para los próximos experimentos un método para la permeabilización de células de *E. coli* con actividad  $\omega$ -TA que consiste en 0,1% de CTAB en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 8 a 25°C durante 20 min.



**Figura 5.3.** Permeabilización de células  $\omega$ -TA con bromuro de cetrimonio - CTAB (tampón fosfato potásico 0,1 M pH 8) y etanol. En todos los casos se trataron 0,1 g de DCW a 25°C durante 20 min en un volumen final de 4 mL.

### 5.4.1.2. Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por células $\omega$ -TA

Inicialmente, se realizó la reacción de síntesis de FEA como reacción modelo (Figura 5.2 a y b), usando bajas concentraciones de acetofenona (6 mM) debido a su baja solubilidad en agua (5,5 g/L) y al efecto inhibitorio sobre el enzima a concentraciones superiores de 10 mM (datos no publicados). Con el objetivo de desplazar el equilibrio hacia la síntesis del producto se utilizaron altas concentraciones del donador de grupos amino: 1 M para el caso de isopropilamina (IPA) y 0,1 M para L-alanina (Ala). Para la reacción catalizada por las células  $\omega$ -TA no permeabilizadas, se obtuvieron velocidades iniciales de 1,69 y 0,13  $\mu\text{mol}$  de FEA/g DCW $\cdot$ min y rendimientos de 68,2 y 31,3% al cabo de aproximadamente 24 h de reacción cuando se usó IPA y Ala respectivamente (Figura 5.4, Tabla 5.1).



**Figura 5.4.** Rendimientos de reacción en la síntesis de aminas aromáticas: (◆) Reacción con 6 mM de acetofenona y 1 M de isopropilamina; (◇) Reacción con 6 mM de acetofenona y 0,1 M de L-alanina; (▲) Reacción con 6 mM de 4-fenil-2-butanona y 1 M isopropilamina. Las reacciones se llevaron a cabo con células  $\omega$ -TA no permeabilizadas (0,02 g DCW/mL de reacción) en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 y 2 mM PLP, agitación orbital a 500 rpm y 30°C.



En estudios previos se demostró que la reacción de transaminación de acetofenona a FEA es termodinámicamente desfavorable y está limitada además por el fuerte efecto de inhibición del enzima tanto por los productos de la reacción como por el sustrato cetona incluso a muy bajas concentraciones [6, 22]. Las limitaciones termodinámicas se pueden superar retirando el co-producto de reacción, lo que se puede realizar *in-situ* o acoplado una segunda reacción enzimática. Los co-productos formados por la desaminación de IPA y Ala son acetona y piruvato, respectivamente. En principio, la acetona se podría eliminar por evaporación y el piruvato se podría degradar acoplado otras reacciones enzimáticas en cascada, catalizadas por enzimas tales como deshidrogenasas [8, 9, 14, 23]. Sin embargo, en este último caso la principal desventaja es la regeneración del cofactor enzimático NADH, y como consecuencia el incremento del coste global del proceso. Cuando se usan células como biocatalizadores, estas pueden emplear su maquinaria enzimática para la eliminación de los co-productos de reacción, como en el caso del piruvato, que es sustrato intermediario de muchas reacciones enzimáticas celulares. Sin embargo, en nuestro estudio se observó que la velocidad de reacción con IPA fue un orden de magnitud más rápida que con Ala (Tabla 5.1).

El bajo rendimiento obtenido para la reacción con Ala no se podría explicar como consecuencia de la lenta velocidad de reacción puesto que la reacción parece llegar a su fin al cabo de 12 h. Previamente, Shin y Kim reportaron similares rendimientos de reacción usando Ala como donador de grupos amino, aunque dicho rendimiento se incrementó a un 90% al aumentar la concentración de células en el medio de reacción [5].

Además de la diferencia de la concentración de sustratos usados (1 M de IPA y 0,1 M de Ala), lo cual influiría considerablemente en el gradiente de concentración (del exterior al interior), nuestros resultados se podrían explicar como consecuencia del lento transporte de Ala al interior de la célula (por difusión facilitada) o de la posible metabolización de Ala por otras vías metabólicas celulares y subsecuente disminución de su disponibilidad para el enzima  $\omega$ -TA. Otra causa de la diferencia de las velocidades de reacción podría ser la acumulación en el interior de la célula del co-producto piruvato que no estaría siendo metabolizado según lo esperado. En cualquiera de los casos, el equilibrio de reacción estaría más favorecido hacia la formación de sustratos (acetofenona/Ala) que a la formación de productos (FEA/piruvato) [24].

**Tabla 5.1.** Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por células  $\omega$ -TA libres no permeabilizadas y permeabilizadas.

		Células $\omega$ -TA libres			
		No permeabilizadas		Permeabilizadas	
Sustratos	Producto	$r_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ cél)	Rend. <sup>(a)</sup> (%)	$r_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ cél)	Rend. <sup>(a)</sup> (%)
AF+IPA	FEA	1,69	58,2	2,16	61,3
AF+Ala	FEA	0,13	31,3	N.R.	N.R.
FB+IPA	AFB	2,88	91,6	3,49	91,9

Las reacciones se llevaron a cabo con células  $\omega$ -TA (0,02 g DCW/mL de reacción) en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 conteniendo 6 mM de cetona (AF o FB), 1 M IPA ó 0,1 M Ala y 2 mM de PLP. AF: acetofenona; IPA: isopropilamina; Ala: L-alanina; FB: 4-fenil-2-butanona;  $r_0$ : velocidad inicial; N.R.: no se detectó reacción.

<sup>(a)</sup> Rendimiento después de  $\pm$  24 h de reacción.

Por otro lado, cuando se usó Ala como sustrato, se observó que la conversión de acetofenona (55%) fue significativamente superior que el rendimiento de FEA (31%), pero esta diferencia fue menor cuando el donador de grupos amino fue IPA (71% conversión y 58% rendimiento).

Cuando se aplicaron células  $\omega$ -TA permeabilizadas, la velocidad de reacción de acetofenona e IPA fue superior a la de las células no permeabilizadas, y los rendimientos de reacción fueron similares (Tabla 5.1). Sin embargo, no se detectó presencia de producto cuando la reacción se realizó con Ala. Yu y Kim reportaron bajos rendimientos de reacción usando células  $\omega$ -TA permeabilizadas y concentraciones de sustratos (AF y Ala) similares a las de nuestro estudio, y explicaron sus resultados como consecuencia de la baja excreción del producto FEA [8]. Sin embargo, esto no podría ser una explicación para nuestro estudio, puesto que este problema no se observó cuando la reacción se llevó a cabo con IPA. Otra causa que podría explicar este fenómeno podría ser que el sistema de transporte de Ala hacia el interior celular estaría siendo afectado negativamente por la permeabilización celular.

En una segunda parte, se estudió la síntesis de AFB usando el cetoanálogo 4-fenil-2-butanona (FB) e IPA como donador de grupos aminos (Figura 5.2 c). A diferencia de la acetofenona (AF), se ha descrito que FB es más reactivo, tiene un menor efecto inhibitorio y el equilibrio de reacción es más favorable hacia la aminación [5]. Así, la velocidad inicial de esta reacción fue 1,7 veces mayor que la reacción entre acetofenona e IPA y el rendimiento tras 3 horas de reacción fue superior al 90% (Figura 5.4), tanto para las células no permeabilizadas como permeabilizadas (Tabla 5.1). Además, la conversión y el rendimiento para la reacción de FB con IPA fueron similares, lo cual podría ser debido a que su cinética de reacción es más rápida o a que FB es menos propensa que AF a la degradación por reacciones colaterales.

#### 5.4.1.3. Inmovilización de células $\omega$ -TA en LentiKats<sup>®</sup> y síntesis de FEA y AFB

La inmovilización de células no permeabilizadas y permeabilizadas se llevó a cabo por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>, usando suspensiones celulares con una concentración final de 0,8 y 0,3 g DCW/mL para las células no permeabilizadas y permeabilizadas respectivamente. Teniendo en cuenta una relación de volúmenes entre la suspensión celular y la disolución de LentiKats<sup>®</sup> de 1:4, se inmovilizaron 0,17 g de células no permeabilizadas y 0,06 g de células permeabilizadas por gramo de soporte LentiKats<sup>®</sup>, equivalente a una velocidad inicial de 0,29 y 0,13  $\mu\text{mol}$  de FEA/min·g de LentiKats<sup>®</sup>, respectivamente (Tabla 5.2).

Las células inmovilizadas se utilizaron como biocatalizadores en la síntesis de las aminas aromáticas FEA y AFB. Tanto las velocidades iniciales como los rendimientos de las reacciones catalizadas por las células inmovilizadas, ya sean no permeabilizadas o permeabilizadas (Tabla 5.3), fueron similares a los valores obtenidos empleando células libres (Tabla 5.1).

Estos resultados indican que el rendimiento de inmovilización es del 100% y que no hay presencia de limitaciones difusionales para dichas reacciones. Se reportaron resultados similares de rendimiento de inmovilización cuando se inmovilizaron otros microorganismos en este mismo soporte [25-28]. Sin embargo, en el caso de células con actividad  $\omega$ -TA, nuestros resultados representan una gran mejora con respecto a estudios previos. Así, Martin y col. observaron un incremento de 4 veces en el valor de  $K_m$  cuando inmovilizaron *E. coli* con actividad  $\omega$ -TA en soporte Ca-alginato, y consideraron como causa la presencia de limitaciones difusionales [17].

**Tabla 5.2.** Inmovilización por atrapamiento en soporte LentiKats<sup>®</sup> de células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas.

	Células $\omega$ -TA	
	No permeabilizadas	Permeabilizadas
$r_o$ de la suspensión celular ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g DCW}$ ) <sup>(a)</sup>	1,69	2,16
Concentración celular en LentiKats <sup>®</sup> (g de DCW/g de LentiKats <sup>®</sup> )	0,17	0,06
$r_o$ teórica de las células inmovilizadas ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g LentiKats}^{\text{®}}$ ) <sup>(a)</sup>	0,29	0,13
$r_o$ experimental de las células inmovilizadas ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g LentiKats}^{\text{®}}$ ) <sup>(a)</sup>	0,31	0,13
Tiempo de proceso (horas)	3	3

<sup>(a)</sup> Velocidad inicial de reacción para la reacción de síntesis de 1-feniletilamina (FEA) llevada a cabo con acetofenona 6 mM, isopropilamina 1 M y PLP 2 mM en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7, durante 10 min.

**Tabla 5.3.** Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) y 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizadas por células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas inmovilizadas por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>.

Células $\omega$ -TA inmovilizadas en LentiKats <sup>®</sup>					
Sustratos	Producto	No Permeabilizadas		Permeabilizadas	
		$r_o$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g c\acute{e}l}$ )	Rend. <sup>(a)</sup> (%)	$r_o$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g c\acute{e}l}$ )	Rend. <sup>(a)</sup> (%)
AF+IPA	FEA	1,68	68,8	2,11	68,4
FB+IPA	AFB	2,61	94,7	3,21	99,6

Las reacciones se llevaron a cabo con las células inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup> (0,02 g DCW/mL de reacción) en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 conteniendo 6 mM de cetona (AF o PB), 1 M de IPA y 2 mM de PLP.

AF: acetofenona; IPA: isopropilamina; FB: 4-fenil-2-butanona;  $r_o$ : velocidad inicial de reacción.

<sup>(a)</sup> Rendimiento después de 24 horas de reacción.

## 5.4.2. Síntesis de aminas aromáticas catalizada por el enzima $\omega$ -TA

### 5.4.2.1. Purificación parcial de $\omega$ -TA

Una vez disruptadas las células y obtenido el extracto crudo, se procedió a la recuperación del enzima usando sulfato amónico como agente precipitante de proteínas. Se realizaron dos precipitaciones sucesivas con 35 y 60% (p/v) de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se recuperó el 81,8% del enzima con un factor de purificación de 3,2 (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** Purificación parcial de  $\omega$ -TA.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (U)	Prot. (mg)	Actividad específica (U/mg prot)	Actividad recuperada (%)	Factor de Purificación
Extracto crudo <sup>(a)</sup>	100	863	1500	0,6	100	1,0
Precipitación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 35% <sup>(b)</sup>	96	791	1140	0,7	91,7	1,2
Precipitación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% <sup>(b)</sup>	10	706	380	1,9	81,8	3,2

<sup>(a)</sup> El extracto crudo se obtuvo a partir de un cultivo celular de 9,9 g DCW/L de cultivo según como se detalla en la sección 5.3.5.

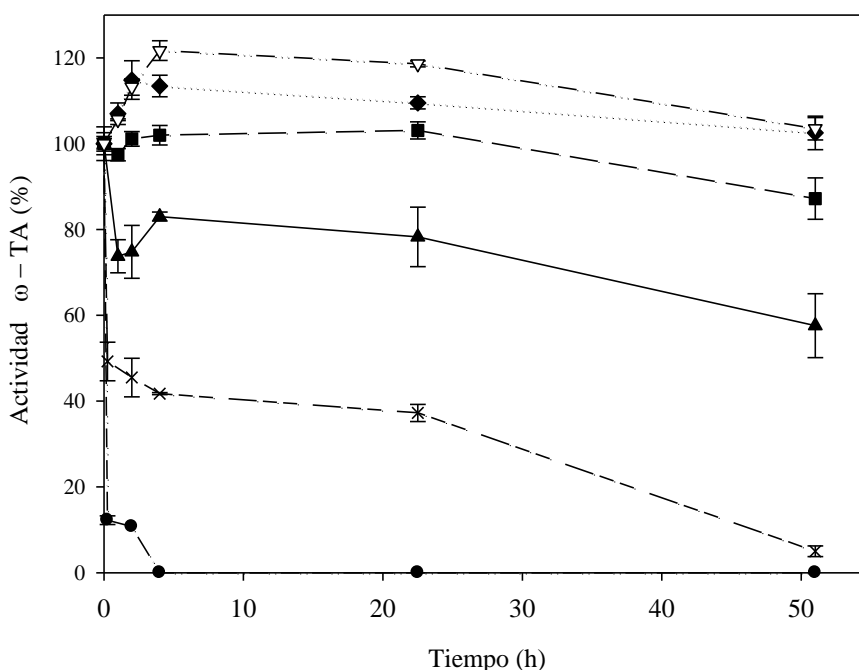
<sup>(b)</sup> Las precipitaciones se llevaron a cabo con agitación magnética suave a 4°C durante 30 min.

### 5.4.2.2. Estabilidad de $\omega$ -TA

Antes de la inmovilización del enzima se estudió su estabilidad a los diferentes valores de pH requeridos por los distintos métodos de inmovilización aplicados en este trabajo. Como se muestra en la Figura 5.5,  $\omega$ -TA es muy inestable a pH 9 y 10 perdiendo más del 50% de su actividad en las primeras horas de incubación; a pH 5 el enzima perdió 40% de actividad a las 51 h mientras que a pH 6 sólo perdió un 13% de la actividad inicial en el mismo tiempo. Cuando el enzima se incubó a pH 7 y 8 la actividad enzimática se incrementó en un 21 y 13% respectivamente al cabo de 4 h de incubación, y aparentemente no se observó pérdida de actividad al final del estudio (51 h). La pérdida de actividad enzimática está asociada a

factores físicos como altas temperaturas, alta fuerza iónica o pH; sin embargo, la hiperactivación enzimática es un fenómeno más complicado de explicar que suele observarse cuando por algún efecto físico el centro activo del enzima se ve más expuesto a los sustratos o porque el enzima adopta una conformación más activa [29].

De esta forma, se estableció que los valores de pH 6, 7 y 8 son los más adecuados para proceder a la inmovilización del enzima  $\omega$ -TA.



**Figura 5.5.** Estabilidad  $\omega$ -TA a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica: (▲) pH 5 y (■) pH 6, en tampón MES 25 mM; (▽) pH 7 en tampón HEPES 0,1 M; (◆) pH 8, (x) pH 9 y (●) pH 10, en tampón bicarbonato sódico 1 M.

Además, se evaluó la estabilidad del enzima a diferentes concentraciones de carbodiimida (CDI) y etilendiamina (EDA), que son reactivos empleados en diferentes procesos de inmovilización. Como se observa en la Tabla 5.5, el uso de concentraciones de CDI inferiores a 50 mM tuvo un efecto activador del enzima. Además,  $\omega$ -TA fue bastante estable en concentraciones de EDA menores de 0,5 M, condiciones a las que mantuvo más del 85% de su actividad al cabo de 24 h.

**Tabla 5.5.** Estabilidad de  $\omega$ -TA en presencia de carbodiimida (CDI) y etilendiamina (EDA) después de 24 h de incubación (4 U/mL en tampón MES 25 mM pH 6).

	Concentración	Actividad $\omega$ -TA (%)
Blanco	-	118,3 $\pm$ 3,7
	25	145,5 $\pm$ 4,1
CDI (mM)	50	131,8 $\pm$ 4,4
	100	68,2 $\pm$ 3,6
	0,1	97,8 $\pm$ 10,4
EDA (M)	0,5	84,1 $\pm$ 10,1
	1,0	43,6 $\pm$ 1,1

#### 5.4.2.3. Inmovilización de $\omega$ -TA en soportes de derivados de agarosa

Se estudió la inmovilización del enzima por formación de enlaces covalentes en soportes derivados de agarosa. Para ello se utilizaron los soportes MANA-agarosa (amino agarosa) y Asp-agarosa (carboxilo agarosa).

La inmovilización de  $\omega$ -TA en el soporte MANA-agarosa (220  $\mu$ mol de grupos  $-\text{NH}_2$ /mL de soporte) se llevó a cabo a pH 6. Como ya se explicó en los capítulos 2 y 3, la adsorción iónica es la primera etapa de inmovilización de enzimas en este soporte, que suele darse en tiempos relativamente cortos (15 min según los experimentos realizados con los enzimas AAT y AspB) y que se evidencia por una disminución de la actividad del sobrenadante. Sin embargo para el enzima  $\omega$ -TA no se observó disminución de la actividad en el sobrenadante al cabo de 15 min, por lo que se concluyó que no hubo adsorción iónica del enzima al soporte. Para que la adsorción iónica se lleve a cabo, es necesario que el enzima tenga una carga neta negativa, lo cual se logra cuando el enzima se encuentra a un valor de pH por encima de su punto isoeléctrico ( $pI$ ). Actualmente, no se ha descrito la caracterización de este enzima  $\omega$ -TA, por lo que su  $pI$  es desconocido; sin embargo está descrito que el  $pI$  del  $\omega$ -TA de *Vibrio fluvialis* JS17 es de 5,4 [22]. Asumiendo que el  $pI$  de nuestro enzima es similar, a pH 6 la carga neta del enzima debería ser negativa y la adsorción iónica entre el enzima y el soporte debería haberse producido. A pesar de no haber adsorción iónica, se procedió a la adición de CDI a

una concentración final de 25 mM y la suspensión se mantuvo en agitación durante 2 h. Al cabo de este tiempo la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión no varió, por lo que se dedujo que la formación de enlaces covalentes no tuvo lugar. En conclusión, el soporte MANA-agarosa no es un soporte adecuado para la inmovilización del  $\omega$ -TA.

Como alternativa, se utilizó el soporte aspártico-agarosa (Asp-agarosa), que se activó a partir del soporte aldehído-agarosa alcanzando un grado estimado de activación de 440  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{COOH}/\text{mL}$  de soporte.

Para favorecer un mayor número de enlaces covalentes entre el soporte y el enzima se procedió a la modificación química por aminación de la superficie enzimática. Para ello se utilizó el compuesto diaminado etilendiamina (EDA), de manera que uno de sus grupos amino reaccionaría con un grupo carboxilo de la superficie enzimática en presencia de CDI y el otro grupo amino quedaría libre para poder reaccionar con el soporte [30, 31]. La modificación por aminación del enzima ( $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub>) se llevó a cabo con EDA 0,5 M y CDI 50 mM a pH 6. Se descartó el uso de concentraciones mayores de EDA porque éste favorece la formación de agregados proteicos que conllevarían la pérdida de actividad [31]. El enzima  $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub> se recuperó por precipitación con sulfato amónico al 60% (p/v) de saturación. A pesar de haber limitado la concentración de EDA, tras la precipitación se observó una pérdida de actividad del 74%, que podría ser indicativa de la formación de agregados. De hecho, éstos se observaron durante el proceso de modificación química y se eliminaron por centrifugación previa a la precipitación del enzima modificado, aunque no se descartó que dichos agregados proteicos pudieran tener actividad enzimática.

La inmovilización de  $\omega$ -TA y  $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub> en el soporte Asp-agarosa se llevó a cabo a pH 6, con lo cual se garantizaría que el soporte estuviese cargado negativamente y que sus grupos carboxilos reaccionasen con los grupos amino del enzima en presencia de CDI. En ninguno de los procesos de inmovilización se observó la adsorción iónica del enzima al soporte. A pesar de ello, se procedió a añadir CDI a una concentración final de 25 mM y las suspensiones se mantuvieron en agitación durante aproximadamente 27 h. Al cabo de este tiempo se calculó que el 15 y 23% de  $\omega$ -TA y  $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub> quedaron retenidos covalentemente en el soporte Asp-agarosa respectivamente. Por último, para la recuperación del enzima inmovilizado se realizó una filtración a vacío y se lavó el soporte con tampón conteniendo PLP, tal y como se había establecido para la inmovilización covalente de AAT (capítulo 2). Tras este proceso, la



actividad retenida disminuyó drásticamente al 2 y 4% para  $\omega$ -TA y  $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub> respectivamente (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6.** Inmovilización de  $\omega$ -TA (no modificado) y  $\omega$ -TA-NH<sub>2</sub> (modificado por aminación) en soporte aspártico-agarosa (Asp-agarosa).

	Soporte Asp-agarosa	
	$\omega$ -TA	$\omega$ -TA-NH <sub>2</sub>
Actividad (U/mL de soporte)	40	40
Tiempo de inmovilización (h)	27	27
Rendimiento de inmovilización (%)	11	20
Actividad retenida (%) <sup>(a)</sup>	15	23
Actividad retenida final (%) <sup>(b)</sup>	2	4

Ambos procesos de inmovilización se llevaron a cabo en tampón MES 25 mM pH 6 con adición de CDI a una concentración final de 25 mM.

<sup>(a)</sup> Actividad retenida al final del proceso de inmovilización.

<sup>(b)</sup> Actividad retenida después del lavado con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP.

#### 5.4.2.4. Inmovilización de $\omega$ -TA en Eupergit<sup>®</sup> CM

A pesar de que la inmovilización covalente de enzimas en el soporte Eupergit<sup>®</sup> CM es más favorable a pH elevados, se decidió realizar la inmovilización de  $\omega$ -TA en este soporte a pH 8 debido a que el enzima es muy inestable a valores de pH más altos. Para una actividad ofrecida de 40 U por mL de soporte, se obtuvo un 20% de actividad retenida y 70% de rendimiento de inmovilización. Este proceso tuvo una duración de 72 h incluyendo el bloqueo de los grupos epóxidos remanentes del soporte con 2-ME 0,2 M a pH 7 y el lavado con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo PLP 1 mM (Tabla 5.7).

#### 5.4.2.5. Inmovilización de $\omega$ -TA en LentiKats<sup>®</sup>

Por último, se llevó a cabo la inmovilización de  $\omega$ -TA por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup>. Se alcanzó un rendimiento aparente de inmovilización de casi el 99% de la actividad enzimática inicial pero sólo se observó un 52% de actividad retenida (Tabla 5.7). Esto se podría deber a cambios conformacionales del enzima al interactuar con el soporte o a la presencia de limitaciones difusionales. No se pudo descartar ninguna de estas causas ya que no se pudo medir la actividad después del tratamiento de las partículas de LentiKats<sup>®</sup> con la disolución endurecedora debido a la baja sensibilidad del método de medida de la actividad enzimática.

**Tabla 5.7.** Inmovilización de  $\omega$ -TA en Eupergit<sup>®</sup> CM y LentiKats<sup>®</sup>.

	Soporte	
	Eupergit <sup>®</sup> CM	LentiKats <sup>®</sup>
Actividad (U/mL de soporte)	40	3
pH	8	7
Tampón / Fuerza iónica	NaHCO <sub>3</sub> 1 M	HEPES 0,1 M
Tiempo de inmovilización (h)	72	3
Rendimiento de inmovilización (%)	70	99
Actividad retenida (%) <sup>(a)</sup>	20	52

<sup>(a)</sup> Actividad retenida tras el lavado con tampón HEPES 0,1 M pH 7,5 conteniendo 1 mM de PLP.

#### 5.4.2.6. Síntesis de AFB catalizada por $\omega$ -TA libre e inmovilizado

El enzima  $\omega$ -TA libre y los enzimas inmovilizados en Eupergit<sup>®</sup> CM y LentiKats<sup>®</sup> se emplearon como catalizadores en la síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB) utilizando su ceto análogo 4-fenil-2-butanona (FB) como sustrato e isopropilamina (IPA) como donador de grupos amino (Figura 5.2 c). La reacción de síntesis se seleccionó en base a los resultados de velocidad de reacción y rendimientos obtenidos en la sección 5.4.1.

Se observó que la velocidad inicial de reacción ( $r_0$ ) para el enzima inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> CM fue un orden de magnitud menor que para el enzima libre y el rendimiento sólo llegó al 61% después de 2,3 h de reacción (Tabla 5.8). Como se discutió en la sección 5.4.1, la reacción de síntesis de AFB utilizando IPA es más rápida que la reacción de síntesis de FEA usando el mismo donador de grupos amino. La medida de actividad enzimática  $\omega$ -TA se realizó con la reacción más lenta de las dos, que es la de desaminación de FEA. La baja  $r_0$  para la reacción de síntesis de AFB utilizando el inmovilizado en Eupergit<sup>®</sup> CM puede estar asociada a la presencia de limitaciones difusionales, debido a que esta reacción es más rápida que la reacción de medida de actividad.

Por otro lado, la velocidad inicial de la reacción catalizada por el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> fue similar a la catalizada por el enzima libre, por lo cual en este caso se descarta la presencia de limitaciones difusionales en la medida de actividad enzimática. Asimismo, los rendimientos de reacción fueron superiores al 90% en concordancia con los resultados obtenidos para la reacción de síntesis de AFB catalizada por células  $\omega$ -TA (Tabla 5.8).

**Tabla 5.8.** Síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por  $\omega$ -TA libre e inmovilizado. Las reacciones se realizaron con 6 mM de 4-fenil-2-butanona, 1 M de isopropilamina, 2 mM PLP, 0,5 U de  $\omega$ -TA/mL de reacción (tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7) a 30°C durante 2,3 h.

	$\omega$ -TA		
	Libre	Eupergit <sup>®</sup> CM	LentiKats <sup>®</sup>
Rendimiento (%)	94,5	60,8	94,7
Velocidad inicial $r_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) <sup>(a)</sup>	0,184	0,025	0,199

<sup>(a)</sup>  $R^2 \geq 0.95$ .

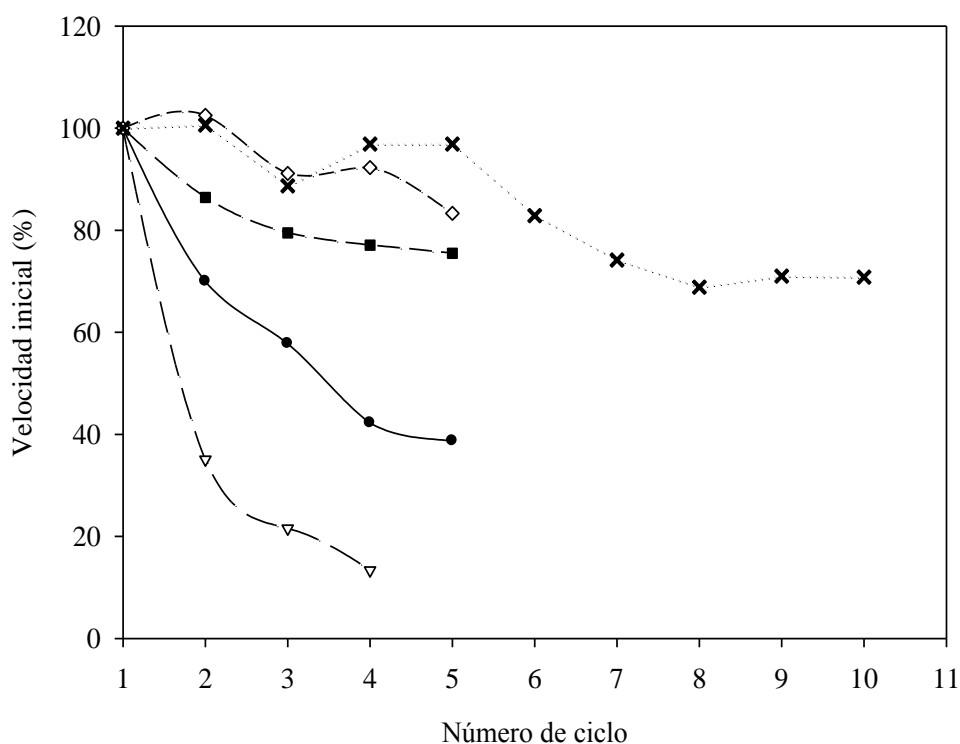
### 5.4.3 Reutilización de células y enzima inmovilizados con actividad $\omega$ -TA

Debido a la importancia que tiene el compuesto 3-amino-1-fenilbutano (AFB) en la industria farmacéutica como sustrato en la síntesis del antihipertensivo dilevalol, se eligió la reacción de síntesis de AFB para el estudio de reutilización de los biocatalizadores estudiados: el

enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> y las células  $\omega$ -TA no permeabilizadas y permeabilizadas tanto libres como inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup>. En todos los casos se compararon las velocidades iniciales de reacción para cada ciclo con sus respectivas velocidades iniciales en el primer ciclo de reacción.

Como se muestra en la Figura 5.6, las células libres permeabilizadas perdieron alrededor del 65% de actividad al cabo del primer ciclo de reacción, mientras que las células libres no permeabilizadas perdieron el 61% después de 4 ciclos. Cuando se usaron las células libres como biocatalizadores, la pérdida de actividad podría ser debida a los procesos de recuperación del biocatalizador (centrifugaciones y lavados) y/o a la lisis celular durante la reacción. Claramente se observa que este efecto estaría afectando de forma más severa a las células permeabilizadas, lo cual estaría asociado a la debilidad de la membrana celular que predispone a las células a su lisis. En relación a las células no permeabilizadas y permeabilizadas inmovilizadas en LentiKats<sup>®</sup>, éstas perdieron sólo un 24 y 17% de su actividad inicial al cabo de 5 ciclos de reacción respectivamente. El enzima  $\omega$ -TA parcialmente purificado inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> conservó alrededor del 90% de su actividad inicial después del ciclo 4 de reacción de síntesis de AFB, mientras que al cabo de 10 ciclos sólo perdió un 30% de su actividad (Figura 5.6). Estos resultados demuestran que la inmovilización por atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup> tanto del enzima parcialmente purificado como de las células con actividad  $\omega$ -TA mejora considerablemente la estabilidad del biocatalizador.

En el caso de las células libres el rendimiento de reacción fue superior al 90% en el primer ciclo de reacción y fue disminuyendo de manera gradual en concordancia con la disminución de las velocidades iniciales de reacción, alcanzando un valor de 63% para células no permeabilizadas al finalizar el quinto ciclo y 24% para células permeabilizadas al cabo del cuarto ciclo de reacción. Para el caso de los biocatalizadores inmovilizados (células y enzima), en el primer ciclo de reacción el rendimiento fue superior al 95% en todos los casos; para las células inmovilizadas disminuyó ligeramente al fin del quinto ciclo de reacción alcanzando un 86 y 85% para las células no permeabilizadas y permeabilizadas respectivamente; para el enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> el rendimiento se mantuvo por encima del 95% al fin del décimo ciclo de reacción.



**Figura 5.6.** Reutilización de biocatalizadores con actividad  $\omega$ -TA en la síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB). (●) Células no permeabilizadas libres; (▽) células permeabilizadas libres; (■) células no permeabilizadas e inmovilizadas en LentiKats®; (◇) células permeabilizadas e inmovilizadas en LentiKats®; (×) enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats®. La velocidad inicial para células libres fue  $0,05 \mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ , para células inmovilizadas fue  $0,03 \mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$  y para  $\omega$ -TA inmovilizado fue  $0,2 \text{ U}/\text{mL}$ .

#### 5.4.4. Determinación de la producción catalítica

Se calculó la producción catalítica para la reacción de síntesis de AFB expresada como  $\mu\text{mol}$  de producto formado por gramo de células (DCW) para el primer ciclo de reacción. Además, se calculó la producción catalítica acumulada al cabo de 5 ciclos de reacción para lo cual se consideraron los rendimientos de reacción en cada ciclo (Tabla 5.9).

Para el cálculo de la producción catalítica usando el enzima inmovilizado, se utilizó el valor equivalente de actividad enzimática en relación a la cantidad de células. Se consideró como punto de partida la suspensión celular antes del proceso de lisis mecánica ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 100 \approx 33 \text{ g DCW}/\text{L}$ ), y se tuvieron en cuenta las pérdidas de actividad en los procesos de purificación

parcial (28%) e inmovilización (48%) obteniéndose el valor final de 102,7 U inmovilizadas/g DCW.

**Tabla 5.9.** Producción catalítica para la reacción de síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por células  $\omega$ -TA libres e inmovilizadas y el enzima  $\omega$ -TA inmovilizado.

		Producción catalítica ( $\mu\text{mol/g DCW}$ )	
		1 <sup>er</sup> ciclo de reacción	Acumulada (5 ciclos de reacción)
Células libres <sup>(a)</sup>	No permeabilizadas	275	1140
	Permeabilizadas	275	594 <sup>(c)</sup>
Células Inmovilizadas <sup>(a)</sup>	No permeabilizadas	285	1375
	Permeabilizadas	295	1430
Enzima inmovilizado <sup>(b)</sup>		1167	6039

<sup>(a)</sup> Se utilizaron 0,02 g DCW/mL de reacción.

<sup>(b)</sup> Se utilizaron 0,2 U de  $\omega$ -TA/mL de reacción, y se aplicó el factor de 102,7 U de  $\omega$ -TA/g DCW.

<sup>(c)</sup> Productividad catalítica calculada hasta 4 ciclos de reacción.

La producción catalítica al cabo del primer ciclo de reacción de síntesis de 3-amino-1-fenilbutano (AFB) catalizada por el enzima inmovilizado fue 4 veces mayor que para la reacción catalizada por las células libres e inmovilizadas. En cuanto a la producción catalítica acumulada en los 5 ciclos de reacción, se alcanzaron valores mayores para las células inmovilizadas que para las células libres, debido a la disminución del rendimiento en cada ciclo de reacción catalizado por éstas últimas (Tabla 5.9).

## 5.5. Conclusiones

Tanto las células *Escherichia coli* recombinantes con actividad  $\omega$ -TA como el enzima parcialmente purificado se utilizaron en la síntesis de la amina aromática 3-amino-1-fenilbutano (AFB) alcanzando altos rendimientos de reacción ( $\geq 95\%$ ).

Para el caso de las células  $\omega$ -TA, el uso del surfactante CTAB permite incrementar la actividad catalítica significativamente. Asimismo, el rendimiento de reacción para la síntesis de FEA usando isopropilamina (IPA) como donador de grupos aminos es mucho mayor que cuando se usa L-alanina.

La inmovilización por enlace covalente del enzima  $\omega$ -TA parcialmente purificado fue sólo posible en el soporte Eupergit<sup>®</sup> CM. Además se llevó a cabo la inmovilización por atrapamiento en LentiKats<sup>®</sup>. Este último fue el soporte elegido para aplicar el enzima como biocatalizador en la síntesis de AFB, pues permitió alcanzar un mayor porcentaje de retención de actividad y no se observaron limitaciones difusionales en la reacción de síntesis de AFB.

La inmovilización por atrapamiento tanto de células como del enzima mejora significativamente la estabilidad de los biocatalizadores, pues permite su reutilización al menos durante 5 ciclos en la reacción de síntesis de AFB para las células  $\omega$ -TA y 10 ciclos para el enzima, con mínimas pérdidas de actividad. Esto se traduce en una mejora en la productividad del biocatalizador y en consecuencia en la disminución de los costes asociados a su uso en los procesos de síntesis.

El enzima inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> es el mejor biocatalizador para la síntesis de AFB en términos de producción catalítica.

## 5.6. Referencias

- [1] Constable D, Dunn P, Hayler J, Humphrey G, Leazer J, Linderman R, Lorenz K, Manley J, Pearlman B, Wells A, Zaks A, Zhang T. Key green chemistry research areas - a perspective from pharmaceutical manufacturers. *Green Chemistry* 2007;9:411-420.
- [2] Pollar DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology* 2007;25:66-73.
- [3] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* 2004;15:272-279.
- [4] Shin JS, Kim BG. Exploring the active site of amine:pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: how the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity. *Journal of Organic Chemistry* 2002;67:2848-2853.
- [5] Shin JS, Kim BG. Asymmetric synthesis of chiral amines with  $\omega$ -transaminase. *Biotechnology and Bioengineering* 1999;65:206-211.
- [6] Shin JS, Kim BG. Comparison of the  $\omega$ -transaminase from different microorganisms and application to production of chiral amines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2001;65:1782-1788.
- [7] Shin JS, Kim BG. Kinetic resolution of alpha-methylbenzylamine with omega-transaminase screened from soil microorganisms: application of a biphasic system to overcome product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 1997;55:348-358.
- [8] Yun H, Kim BG. Asymmetric synthesis of (S)- $\alpha$ -methylbenzylamine by recombinant *Escherichia coli* co-expressing omega-transaminase and acetolactate synthase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2008;72:3030-3033.
- [9] Cassimjee KJ, Branney C, Abedi V, Wellsd A, Berglund P. Transaminations with isopropyl amine: equilibrium displacement with yeast alcohol dehydrogenase coupled to in situ cofactor regeneration. *Chemical Communications* 2010;46:5569-5571.



- [10] Truppo MD, Turner NJ, Rozzell JB. Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase. *Chemical Communications* 2009;2127–2129.
- [11] Tufvesson P, Lima-Ramos J, Jensen JS, Al-Haque N, Neto W, Woodley JM. Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminase. *Biotechnology and Bioengineering* 2011;108:1479-1493.
- [12] Tufvesson P, Jensen JS, Kroutil W, Woodley JM. Experimental determination of thermodynamic equilibrium in biocatalytic transamination. *Biotechnology and Bioengineering* 2012;109:2159-2162.
- [13] Koszelewski D, Clay D, Rozzell D, Kroutil W. Deracemisation of alpha-chiral primary amines by one-pot, two-step cascade reaction catalysed by omega-transaminase. *European Journal of Organic Chemistry* 2009;14:2289-2292.
- [14] Hohne M, Kuhl S, Robins K, Bornscheuer UT. Efficient asymmetric synthesis of chiral amines by combining transaminase and pyruvate decarboxylase. *ChemBioChem* 2008;9:363-365.
- [15] Ingram CU, Bommer MS, Dalby PA, Ward JM, Hailes HC, Lye GJ. One-pot synthesis of amino-alcohols using a *de-novo* transketolase and beta-alanine: pyruvate transaminase pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;96:559-569.
- [16] Karel SF, Libicki SB, Robertson CR. Immobilization of whole cells: the engineering principle. *Chemical Engineer & Science* 1985;40:1321-1354.
- [17] Martin AR, Shonnard D, Pannuri S, Kamat S. Characterization of free and immobilized (S)-aminotransferase for acetophenone production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007;76:843-851.
- [18] Yi SS, Lee CW, Kim J, Kyung D, Kim BG, Lee YS. Covalent immobilization of  $\omega$ -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads. *Process Biochemistry* 2007;42:895–898.
- [19] Lee CW, Yi SS, Kim J, Lee YS, Kim BG. Improved immobilized enzyme systems using spherical sol-gel enzyme beads. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006;11:277-281.

- [20] Ruiz J, Pinsach J, Álvaro G, González G, de Mas C, Resina D, López-Santín J. Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry* 2009;44:1039-1045.
- [21] Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisán JM. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology* 1993;15:546-550.
- [22] Shin JS, Yun H, Jang JW, Park I, Kim BG. Purification, characterization, and molecular cloning of a novel amine:pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003;61:463–471.
- [23] Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W.  $\omega$ -Transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -chiral primary amines. *Trends in Biotechnology* 2010;28:324–332.
- [24] Koszelewski D, Gçritzer M, Clay D, Seisser B, Kroutil W. Synthesis of optically active amines employing recombinant  $\omega$ -transaminases in *E. coli* cells. *ChemCatChem* 2010;2:73–77.
- [25] Durieux A, Nicolay X, Simon JP. Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in LentiKats<sup>®</sup>. *Biotechnology Letters* 2000;22:1679–1684.
- [26] Parascandola P, Branduardi P, Alteriis E. PVA-gel (Lentikats<sup>®</sup>) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;38:184-189.
- [27] Rebros M, Rosenberg M, Stloukal L, Kristofikova L. High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats. *Letters in Applied Microbiology* 2005;41:412–416.
- [28] Rosenberg M, Rebros M, Kristofikova L, Malatova K. High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats<sup>®</sup>. *Biotechnology Letters* 2005;27:1943–1947.
- [29] Theil F. Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives. *Tetrahedron* 2000;56:2905-2919.

[30] Montes T, Grazu V, Lopez-Gallego F, Hermoso JA, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers. *Biomacromolecules* 2006;7:3052-3058.

[31] Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Guisán JM. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme and Microbial Technology* 1995;17:517-523.



# CAPÍTULO 6

---

## *Inmovilización de aspartasa mutado (AspB-C6)*

## **Resumen**

El enzima aspartasa mutado o AspB-C6 es un enzima obtenido por evolución dirigida a partir del enzima aspartato amonioliasa o aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB, EC 4.3.1.1). El interés de este enzima radica en que es capaz de catalizar la reacción de aminación regioselectiva del ácido crotónico en posición beta ( $-\beta$ ) para dar lugar a la formación del ácido  $\beta$ -aminobutírico.

El enzima AspB-C6 se expresó en *Escherichia coli* y se purificó parcialmente siguiendo el protocolo de purificación establecido para AspB, que consiste en una precipitación térmica a 72°C y una precipitación con sulfato amónico al 60% (p/v) de concentración de saturación. Se recuperó un 53% del enzima con un factor de purificación de 5,7; ambos valores fueron menores a los obtenidos para el enzima nativo.

Asimismo, AspB-C6 se inmovilizó en Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa por extrapolación de los métodos de inmovilización descritos para AspB. Los rendimientos de inmovilización fueron similares en ambos casos; sin embargo los porcentajes de retención enzimática fueron significativamente inferiores para AspB-C6, obteniéndose valores de 15 y 45% cuando el enzima se inmovilizó en Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa respectivamente.

## 6.1. Introducción

Los  $\beta$ -aminoácidos son un grupo de aminoácidos que presentan en su estructura química al menos un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) con un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) en posición beta ( $-\beta$ ) (capítulo 1, sección 1.3.1). Los  $\beta$ -aminoácidos son utilizados en la síntesis de  $\beta$ -oligopéptidos, que son moléculas constituidas por una cadena corta de aminoácidos unidos por enlace peptídico en posición  $\beta$ . Estos oligopéptidos están siendo probados como nuevos fármacos peptidomiméticos, puesto que al tener una estructura química diferente a los oligopéptidos naturales, no son reconocidos por las proteasas humanas [1]. Además, los  $\beta$ -aminoácidos son compuestos intermediarios para la síntesis de algunos antibióticos, como aquellos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos.

La síntesis de  $\beta$ -aminoácidos se puede realizar por catálisis metálica (usando metales de transición y ligandos quirales), órgano-catálisis (usando pequeñas moléculas orgánicas quirales) y biocatálisis [2, 3]. La síntesis biocatalítica de  $\beta$ -aminoácidos se lleva a cabo básicamente por métodos de resolución usando enzimas del grupo hidrolasas, tales como penicilina acilasa,  $\beta$ -lactamasa, acilasa I,  $\alpha$ -quimotripsina y lipasas (tipo A y B). Los enzimas lipasas son los más utilizados, pues con ellos se han obtenido altos rendimientos en la síntesis de este tipo de aminoácidos [2]. Además, recientemente se ha reportado la aplicación de un enzima  $\omega$ -transaminasa de *Mesorhizobium* sp. en la resolución de una amplia gama de  $\beta$ -aminoácidos aromáticos [4].

En el presente capítulo se emplea el enzima aspartasa mutado o AspB-C6, obtenido mediante ingeniería de proteínas a partir del enzima aspartasa nativo o AspB, como catalizador de la reacción de aminación en posición beta ( $-\beta$ ) de ácido crotónico para la síntesis de  $\beta$ -aminobutirato. Además, como parte de los objetivos del proyecto europeo (ERA-IB Eng Biocat), se describe la inmovilización de AspB-C6 por formación de enlaces covalentes según los métodos de inmovilización establecidos para el enzima nativo AspB (capítulo 3).

## **6.2. Objetivo**

### ***Objetivo general***

Inmovilizar el enzima aspartasa mutado (AspB-C6) en los soportes Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa por extrapolación de los métodos de inmovilización establecidos para el enzima aspartasa nativo (AspB) en dichos soportes.

### ***Objetivo específico***

- Purificar parcialmente el enzima AspB-C6, según el método establecido para AspB.
- Determinar la especificidad para la reacción de aminación de ácido crotonico catalizada por AspB-C6.



## 6.3. Metodología

### 6.3.1. Enzima y reactivos químicos

Todos los reactivos químicos, de grado analítico, y Eupergit<sup>®</sup> C fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El soporte agarosa 10 BCL fue adquirido en Iberagar (Coíña, Portugal). El enzima recombinante aspartasa-C6 (AspB-C6) fue clonado en *Escherichia coli* BL21(D3) por c-LEcta (Leipzig, Alemania), quien suministró la cepa y el plásmido.

### 6.3.2. Expresión de aspartasa mutado (AspB-C6)

La cepa recombinante *E. coli* BL21(D3) con actividad AspB-C6 se cultivó en la Planta Piloto de Fermentación (PPF) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). EL cultivo se realizó en un medio definido de minerales que contenía 0,05 g/L de kanamicina. Las condiciones de cultivo son las detalladas en la sección 3.3.2. Al final de la fermentación ( $DO_{600nm} = 177 \approx 53,9$  g peso seco de célula – DCW/L de cultivo) las células se separaron por centrifugación (4000 rpm a 4°C durante 15 min) y se lavaron dos veces con tampón HEPES 0,1 M pH 8.

### 6.3.3. Purificación parcial de aspartasa mutado (AspB-C6)

El precipitado celular se resuspendió en tampón HEPES 0,1 M pH 8 hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 100. Las células se lisaron mediante doble disrupción mecánica a 21 kpsi (Constant System LTD, Warwickshire, Inglaterra). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (8000 rpm a 4°C durante 40 min). A 35 mL de extracto crudo se adicionaron 1,4 mL de ácido crotónico 2,5 M (disolución en tampón HEPES 0,1 M pH 8), para alcanzar una concentración final de 0,1 M, y sulfato amónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sólido para obtener una concentración del 11% (p/v) de saturación. La mezcla se calentó a 72°C durante 5 min e inmediatamente se enfrió a 4°C. Las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación (8500 rpm a 4°C durante 30 min). Finalmente, se recuperaron 30 mL de sobrenadante, y se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido hasta un 60% (p/v) de saturación. La mezcla se mantuvo en agitación magnética suave a 4°C durante 30 min. El enzima precipitado se recuperó por centrifugación y se almacenó como suspensión en 60% (p/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4°C. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL, USA) usando albúmina sérica bovina como estándar (Anexo 2).

#### **6.3.4. Inmovilización de AspB-C6 en Eupergit® C**

La inmovilización de AspB-C6 en soporte Eupergit® C se llevó a cabo según el método optimizado para la inmovilización de aspartasa nativo (AspB) en este mismo soporte (sección 3.4.3.1). Para la inmovilización de AspB-C6, se mezcló 1 mL de soporte húmedo con 9 mL de disolución enzimática (1,3 U de AspB-C6) en tampón bicarbonato sódico 1 M pH 9 y la mezcla se mantuvo en agitación rotativa (en “roller”) a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 15 horas. Luego la suspensión se separó por filtración al vacío. Se recuperó el soporte y se procedió al bloqueo de los grupos epóxidos remanentes. Para ello se añadieron 9 mL de 2-mercaptoetanol 0,2 M (tampón HEPES 0,1 M pH 7), y la suspensión se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. El enzima inmovilizado se recuperó por filtración al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 8 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, se filtró y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **6.3.5. Inmovilización de AspB-C6 en MANA-agarosa**

La obtención del soporte MANA-agarosa 10 BCL (220  $\mu\text{mol}$  de  $-\text{NH}_2/\text{mL}$  de soporte) se realizó según lo descrito en la sección 2.3.4. AspB-C6 se inmovilizó según el método establecido para la inmovilización de aspartasa (AspB) en dicho soporte (sección 3.4.3.2). Para la inmovilización de AspB-C6, se mezcló 1 mL de soporte con 9 mL de disolución enzimática (1,5 U de AspB-C6) en tampón MES 25 mM pH 6 y la mezcla se mantuvo en agitación rotativa a temperatura ambiente durante 15 min. Luego, para la formación de los enlaces covalentes entre el soporte y el enzima, se retiraron 1,25 mL de sobrenadante y se añadió el mismo volumen de una disolución fresca de CDI 200 mM (tampón MES 25 mM pH 6) para alcanzar una concentración final de CDI de 25 mM; la suspensión se mantuvo en agitación rotativa durante 2 h. El enzima inmovilizado se recuperó por filtraron al vacío, se lavó con tampón HEPES 0,1 M pH 8 conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, se filtró y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **6.3.6. Seguimiento de los procesos de inmovilización**

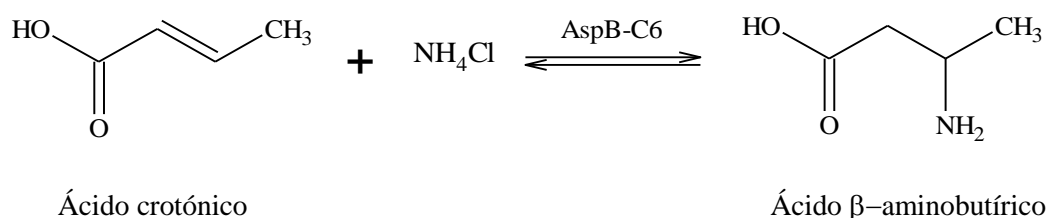
Todas las inmovilizaciones de AspB-C6 se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación rotativa. En todos los casos se realizó el seguimiento en paralelo de un ensayo “blanco” en el que el volumen del soporte se sustituyó por el mismo volumen de agua. Se analizó la actividad enzimática del blanco, suspensión y sobrenadante a lo largo del tiempo. El cálculo de *actividad retenida (%)* y del *rendimiento de inmovilización (%)* se realizó de acuerdo a las formulas descritas en la sección 2.3.6.

### 6.3.7. Medida de la actividad enzimática de AspB-C6

Debido a que AspB-C6 es un enzima mutado obtenido por ingeniería de proteínas, no se ha descrito un método cinético para la medida de su actividad enzimática. El grupo c-LEcta (Leipzig, Alemania) propuso un método de punto final, que consiste en la síntesis de ácido  $\beta$ -aminobutírico y su posterior derivatización y análisis por HPLC.

#### 6.3.7.1. Síntesis de $\beta$ -aminobutirato

El enzima aspartasa mutado (AspB-C6) cataliza la aminación de ácido crotonico para dar lugar a la formación de ácido  $\beta$ -aminobutírico (Figura 6.1).

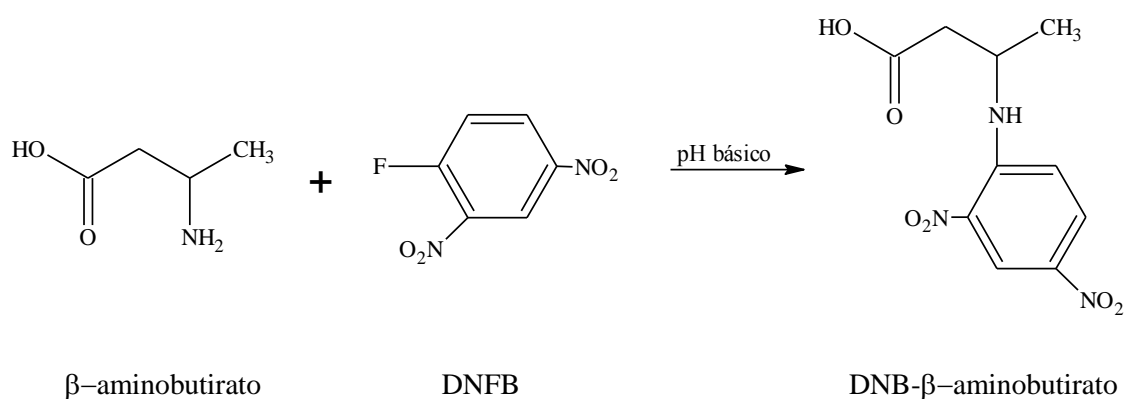


**Figura 6.1.** Reacción catalizada por aspartasa mutado (AspB-C6).

La síntesis de ácido  $\beta$ -aminobutírico se llevó a cabo mezclando 25  $\mu$ L de muestra enzimática (AspB-C6) con 48  $\mu$ L de tampón HEPES-MgCl<sub>2</sub> pH 8, 12  $\mu$ L de ácido crotonico y 15  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>Cl (ambos en el mismo tampón). La concentración final de los componentes de la reacción fue 0,1 M de HEPES, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 M de ácido crotonico y 0,2 de NH<sub>4</sub>Cl. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación orbital (Thermoshaker HLC, Bovenden, Alemania) a 350 rpm y 37°C durante 4 h. Se realizó un blanco de reacción en el cual se añadieron 12  $\mu$ L del tampón en vez de ácido crotonico. La reacción se detuvo por calentamiento a 80°C durante 20 min. Luego las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante que contenía el producto de reacción  $\beta$ -aminobutirato.

### 6.3.7.2. Derivatización de $\beta$ -aminobutirato

La concentración de  $\beta$ -aminobutirato se determinó por el método de derivatización con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DNFB) (Figura 6.2). Para ello, se mezclaron 25  $\mu$ L del sobrenadante de la reacción de síntesis con 40  $\mu$ L de DNFB (37,6 mM en acetona) y 10  $\mu$ L de  $\text{NaHCO}_3$  1 M y la mezcla se mantuvo en agitación orbital a 350 rpm y 40°C durante 1,5 h. La reacción se detuvo por adición de 20  $\mu$ L de HCl 1 M y 100  $\mu$ L de acetonitrilo 20% (v/v). La concentración de  $\beta$ -aminobutirato derivatizado (DNB- $\beta$ -aminobutirato) se analizó mediante HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA) según las condiciones descritas en la sección 3.3.12.



**Figura 6.2.** Derivatización de  $\beta$ -aminobutirato con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DNFB).

La detección del compuesto se realizó a 360 nm y el análisis cuantitativo se llevó a cabo por integración de las áreas usando el método de estándar externo (concentración de estándar entre 1 y 25 mM). El tiempo de retención para  $\beta$ -aminobutirato derivatizado fue  $22,8 \pm 0,1$  min (Anexo 5).

### 6.3.7.3. Cálculo de la actividad enzimática de AspB-C6

La actividad enzimática de AspB-C6 se calculó en base al valor de la concentración de  $\beta$ -aminobutirato formado en la reacción de síntesis, y según la siguiente fórmula:

$$\frac{U_{\text{AspB-C6}}}{\text{mL}} = (C_{\text{muestra}} - C_{\text{blanco}}) \cdot \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}} \cdot \text{tiempo}}$$

Donde:

$C_{\text{muestra}}$  = concentración de  $\beta$ -aminobutirato en la muestra,

$C_{\text{blanco}}$  = concentración de  $\beta$ -aminobutirato en el blanco de reacción,

$V_{\text{total}}$  = 100  $\mu\text{L}$ ,

$V_{\text{muestra}}$  = 25  $\mu\text{L}$ ,

tiempo = 240 min

Una unidad (U) de AspB-C6 se define como la actividad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -aminobutirato por minuto a 37°C y pH 8.

### 6.3.8. Análisis de $\alpha$ -aminobutirato

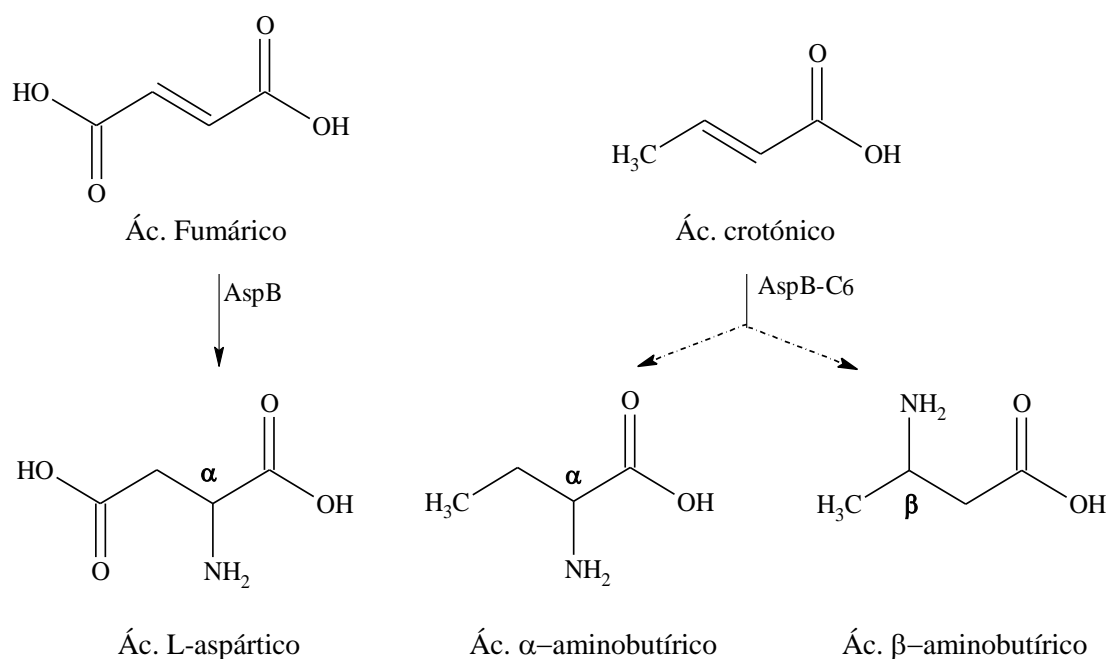
El compuesto  $\alpha$ -aminobutirato (químicamente puro) se analizó por el método de derivatización con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono (DNFB) y se detectó por HPLC según las condiciones descritas en la sección 3.3.12. El tiempo de retención para  $\alpha$ -aminobutirato fue  $28,9 \pm 0,1$  min (Anexo 5).

## 6.4. Resultados y discusión

El enzima aspartasa mutado (AspB-C6) es un enzima obtenido por ingeniería de proteínas mediante la técnica de evolución dirigida a partir del enzima nativo L-aspartato amonio liasa o aspartasa (AspB). Los experimentos de evolución dirigida fueron realizados por la empresa c-LEcta (Leipzig, Alemania).

### 6.4.1. Determinación de la especificidad de AspB-C6

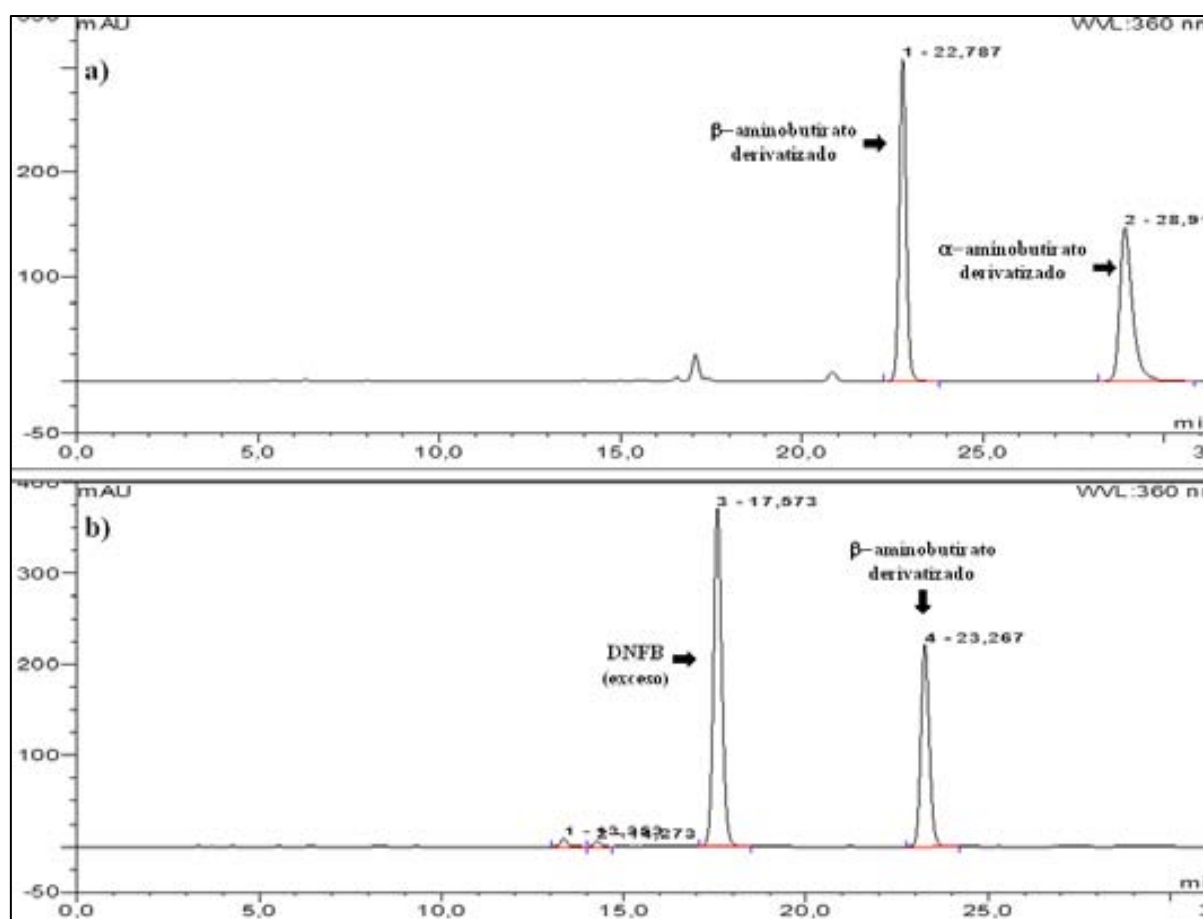
El enzima nativo AspB cataliza la aminación del ácido fumárico para dar lugar a la formación de L-aspartato, mientras que el enzima mutado AspB-C6 es capaz de catalizar la reacción de aminación del ácido crotonico (información aportada por la empresa c-LEcta). Desde el punto de vista de la estructura química de los sustratos, tanto AspB como AspB-C6 aceptan sustratos ácidos carboxílicos de cadena simple de 4 carbonos. En el caso de AspB el sustrato puede ser monocarboxílico, mientras que el sustrato de AspB debe tener dos grupos carboxílicos (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Reacciones catalizadas por AspB y AspB-C6.

Además, está descrito que AspB realiza la reacción de aminación del ácido fumárico exclusivamente en posición alfa ( $-\alpha$ ). En el caso de AspB-C6, al usar el ácido crotonico como sustrato, la aminación se podría dar tanto en posición alfa ( $-\alpha$ ) como en beta ( $-\beta$ ), lo cual daría lugar a la formación de los productos ácido  $\alpha$ -aminobutírico y ácido  $\beta$ -aminobutírico, respectivamente (Figura 6.3).

En el presente estudio, se comprobó que la reacción de aminación del ácido crotonico catalizada por AspB-C6 tiene lugar exclusivamente en la posición beta ( $-\beta$ ) dando lugar a la formación de un único producto, el ácido  $\beta$ -aminobutírico, y descartándose por tanto la formación del ácido  $\alpha$ -aminobutírico (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Especificidad de AspB-C6. a) Estándares de  $\alpha$  y  $\beta$ -aminobutirato derivatizados con DNFB (concentración para ambos compuestos de 25 mM). b) Producto de la reacción catalizada por AspB-C6 (0,3 M de ácido crotonico, 0,2 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  en tampón HEPES 0,1 M pH 8) derivatizado con DNFB.

### 6.4.2. Purificación parcial de AspB-C6

Para la purificación de AspB-C6, se consideró que el enzima tenía las mismas características intrínsecas descritas para el enzima nativo (AspB), como la termoestabilidad. La purificación de AspB-C6 se llevó a cabo según el método establecido para AspB (capítulo 3) mediante dos precipitaciones: la primera fue una precipitación térmica a 72°C en presencia de 0,1 M de ácido crotonico y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 11% de saturación; la segunda fue una precipitación con una concentración final de 60% (p/v) de saturación de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, se recuperó un 53% de la actividad enzimática de partida con un factor de purificación de 5,7 (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1.** Purificación parcial de AspB-C6.

<b>Paso de purificación</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Proteína (g)</b>	<b>Actividad específica (U/g prot)</b>	<b>Actividad recuperada (%)</b>	<b>Factor de purificación</b>
Extracto crudo	35	8,1	0,76	10,7	100	1
Precipitación térmica <sup>(a)</sup>	30	5,7	0,18	31,7	70	3,0
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>(b)</sup>	3	4,3	0,07	61,4	53	5,7

<sup>(a)</sup> Precipitación térmica a 72°C en presencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11% (p/v) de saturación y ácido crotonico 0,1 M durante 5 min.

<sup>(b)</sup> Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% (p/v) de saturación a 4°C durante 30 min.

Los valores finales de actividad recuperada y factor de purificación de AspB-C6 difieren significativamente de aquellos obtenidos para el enzima nativo AspB (65% de recuperación y 7,7 de factor de purificación). La mayor diferencia entre ambos procesos de purificación se observó en la primera etapa de precipitación térmica (72°C) en la que se perdió un 30% del enzima AspB-C6 mientras que sólo se había perdido un 15% de AspB. Ello podría ser una consecuencia de la evolución dirigida, que habría provocado algunos cambios de la estructura aminoacídica de AspB afectando negativamente a las características de AspB-C6. El enzima podría resultar menos resistente a las temperaturas elevadas, o bien menos afín al ácido crotonico, con lo cual el efecto protector frente a la desnaturalización térmica que este compuesto ejerce sobre el enzima sería menor.



### 6.4.3. Inmovilización de AspB-C6

Se asumió que el enzima aspartasa mutado (AspB-C6) presentaba las mismas características de estabilidad (pH, fuerza iónica, etc.) que el enzima aspartasa nativo (AspB). Así, la inmovilización de AspB-C6 por formación de enlaces covalentes en los soportes Eupergit® C y MANA-agarosa se llevó a cabo según los protocolos establecidos y optimizados para AspB (capítulo 3).

Como se muestra en la Tabla 6.2, para la inmovilización de AspB-C6 se obtuvo un 85 y 95% de rendimiento de inmovilización en soportes Eupergit® C y MANA-agarosa respectivamente. Estos valores fueron similares a los obtenidos para AspB cuando se inmovilizó en dichos soportes (96 y 99% para Eupergit® C y MANA-agarosa, respectivamente). Sin embargo, los valores de actividad retenida fueron inferiores para AspB-C6, siendo del 15% para Eupergit® C y 45% para MANA-agarosa, mientras que para AspB las actividades retenidas fueron de 24 y 85% respectivamente.

**Tabla 6.2.** Inmovilización de AspB-C6 por formación de enlaces covalentes en soportes Eupergit® C y MANA-agarosa.

	Soporte	
	Eupergit® C	MANA-agarosa
Actividad (U/mL de soporte)	1,3	1,5
pH	9	6
Tampón / Fuerza iónica	NaHCO <sub>3</sub> 1 M	MES 25 mM
Tiempo de inmovilización (h)	19,0	2,3
Rendimiento de inmovilización (%)	85	95
Actividad retenida (%)	15	45

La evolución dirigida de enzimas presenta una serie de ventajas entre las que cabe destacar la mejora de las propiedades catalíticas del enzima. Sin embargo, la variación al azar de uno o más aminoácidos en la secuencia aminoacídica del enzima puede afectar negativamente a alguna de sus propiedades [5, 6].

En este caso, aunque se desconoce cuáles son las modificaciones de la secuencia aminoacídica de AspB para obtener AspB-C6, se ha logrado que el nuevo enzima reconozca sustratos monocarboxílicos insaturados y sobre todo que sea capaz de realizar la reacción de adición de grupos amino en la posición beta ( $-\beta$ ) de la cadena carbonada. Esto constituye un gran avance teniendo en cuenta la gran importancia e interés que tienen los compuestos  $\beta$ -aminoácidos en la industria farmacéutica.

Por otro lado, parece ser que la evolución dirigida también afectó negativamente al enzima, haciendo que éste sea aparentemente menos termoestable (según los resultados de purificación). Además, no se puede descartar que hayan tenido lugar otras modificaciones, las cuales han podido afectar en menor o mayor medida al enzima AspB-C6. Esto podría justificar las diferencias obtenidas mediante la extrapolación de los métodos de inmovilización establecidos para AspB y aplicados al enzima mutado AspB-C6.

## 6.5. Conclusiones

El enzima aspartasa mutado (AspB-C6) cataliza la reacción de aminación regioselectiva de ácido crotonico dando lugar a la formación exclusiva de ácido  $\beta$ -aminobutírico.

Los métodos de purificación parcial e inmovilización por enlaces covalentes en Eupergit<sup>®</sup> C y MANA-agarosa establecidos previamente para el enzima nativo AspB no fueron del todo extrapolables para el enzima mutado AspB-C6, lo cual puede ser debido a las modificaciones de la secuencia aminoacídica del enzima causadas por las mutaciones realizadas por la técnica de evolución dirigida.

## 6.6. Referencias

- [1] Aguilar MI, Purcell AW, Devi R, Lew RA, Rossjohn J, Smith AI, Perlmutter P.  $\beta$ -amino acid-containing hybrid peptides-new opportunities in peptidomimetics. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2007;5:2884-2890.
- [2] Liljeblad A, Kanerva LT. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure  $\beta$ -amino acids. *Tetrahedron* 2006;62:5831-5854.
- [3] Weiner B, Szymanski W, Janssen DW, Minnaarda AJ, Feringa BL. Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of  $\beta$ -amino acids. *Chemical Society Review* 2010;39:1656-1691.
- [4] Bea HS, Park HJ, Lee SH, Yun H. Kinetic resolution of aromatic  $\beta$ -amino acids by  $\omega$ -transaminase. *Chemical Communications* 2011;47:5894-5896.
- [5] Wang X, Minasov G, Shoichet BK. Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *Journal of Molecular Biology* 2002;320:85-95.
- [6] Dalby PA. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 2011;21:473-480.

# Conclusiones generales

---

Se establecieron procesos de biotransformación para la síntesis de los aminoácidos L-aspartato (Asp), L-fenilalanina (Phe) y  $\beta$ -aminobutirato y el compuesto aminado 3-amino-1-fenilbutano (AFB) mediante enzimas y/o células con actividad transaminasa y amonio liasa. Con el fin de mejorar la eficacia de los procesos, se establecieron diferentes métodos de inmovilización de los biocatalizadores utilizados.

Se estableció un método para la síntesis enzimática de altas concentraciones del aminoácido L-aspartato (Asp) a partir de fumarato utilizando el enzima aspartato amonio liasa o aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 (AspB) inmovilizado en MANA-agarosa, Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup>. En todos los casos se obtuvieron rendimientos superiores al 90% ( $\approx$  60 g Asp/L) y los enzimas inmovilizados se reutilizaron hasta en 5 ciclos de reacción de síntesis de Asp. El enzima inmovilizado en MANA-agarosa es considerado como el biocatalizador más apropiado para la síntesis de Asp, debido a la simplicidad del método de inmovilización, la alta retención enzimática y los buenos resultados obtenidos en la reutilización (**capítulo 3**).

La síntesis enzimática de Phe se llevó a cabo inicialmente mediante una reacción de transaminación entre los sustratos aspartato y fenilpiruvato catalizada por el enzima L-aspartato transaminasa (AAT) de corazón porcino inmovilizado en los soportes MANA-agarosa, Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup>. Se demostró que las inmovilizaciones en Eupergit<sup>®</sup> C y LentiKats<sup>®</sup> constituyen las mejores alternativas en términos de retención enzimática en el soporte, estabilidad del biocatalizador resultante y rendimiento de reacción (**capítulo 2**). El enzima AT (de origen bacteriano) resultó ser una mejor opción que AAT de corazón porcino como biocatalizador en la síntesis de Phe, puesto que cataliza la reacción de transaminación más rápidamente y porque tiene mayor afinidad por Phe (**capítulo 4**).

Además, se estudió la síntesis de Phe mediante dos reacciones enzimáticas simultáneas catalizada por los enzimas aspartasa (AspB) y transaminasa (TA) empleando fumarato y fenilpiruvato como sustratos. Se evidenció que los dos enzimas son compatibles en el medio de reacción y se establecieron las concentraciones óptimas de sustratos y enzimas para mejorar el rendimiento de la reacción, alcanzándose un rendimiento global de 83% (**capítulo 4**). Se puede afirmar que la reacción catalizada por AspB y TA es una excelente alternativa para la síntesis multienzimática de Phe puesto que, al remplazar el uso del sustrato L-aspartato (Asp) por el más económico fumarato, permitiría disminuir los costes de producción del aminoácido.

El enzima aspartasa mutado (AspB-C6) se empleó como catalizador de la reacción de aminación regioselectiva de ácido crotonico dando lugar a la formación de ácido  $\beta$ -aminobutírico. Se estudió la extrapolación del método de inmovilización de AspB para el enzima mutado AspB-C6, aunque los resultados de inmovilización y retención enzimática disminuyeron con respecto a los obtenidos para AspB (*capítulo 6*). Esto podría estar asociado a las modificaciones de la secuencia aminoacídica del enzima causadas por las mutaciones realizadas por la técnica de evolución dirigida.

La amina aromática 3-amino-1-fenilbutano (AFB) se sintetizó enzimáticamente a partir de 4-fenil-2-butanona y de isopropilamina empleando células *Escherichia coli* (no permeabilizadas y permeabilizadas) y el enzima con actividad  $\omega$ -transaminasa ( $\omega$ -TA). En ambos casos se alcanzaron altos rendimientos de reacción ( $\geq 95\%$ ). El método de atrapamiento en el soporte LentiKats<sup>®</sup> resultó ser adecuado para la inmovilización tanto de células  $\omega$ -TA como del enzima, obteniéndose alta retención y ausencia de limitaciones difusionales. Esto permitió la reutilización de los biocatalizadores inmovilizados en varios ciclos de síntesis de AFB. El enzima  $\omega$ -TA inmovilizado en LentiKats<sup>®</sup> fue el mejor biocatalizador para la síntesis de AFB en términos de producción (*capítulo 5*).

Finalmente, una de las principales limitaciones de la aplicación de biocatalizadores inmovilizados en procesos de síntesis es la presencia de limitaciones difusionales. En este trabajo de tesis, varios de los enzimas inmovilizados utilizados presentaban limitaciones difusionales al catalizar la reacción correspondiente a sus sustratos naturales. Sin embargo, las limitaciones difusionales dejaron de ser una limitante en las reacciones de síntesis al trabajar con reacciones más lentas utilizando sustratos no naturales del enzima (*capítulo 2*) o al incrementar la concentración de los sustratos en el medio de reacción (*capítulo 3*).





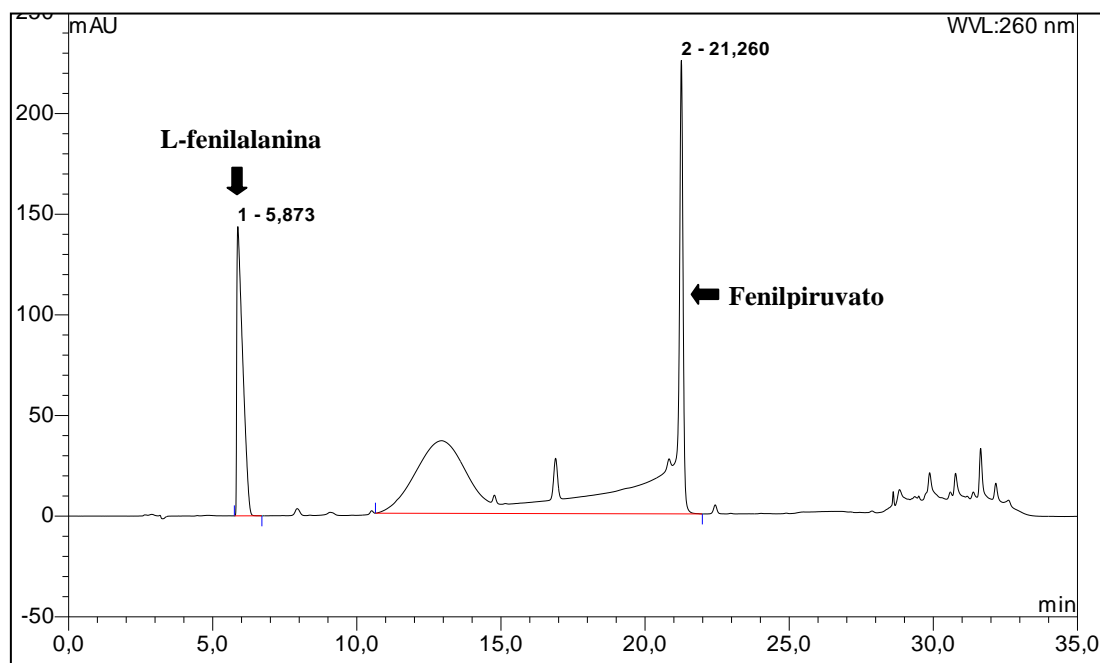
# Anexos

---

## Anexo 1. Cromatogramas y curva patrón de L-fenilalanina y fenilpiruvato

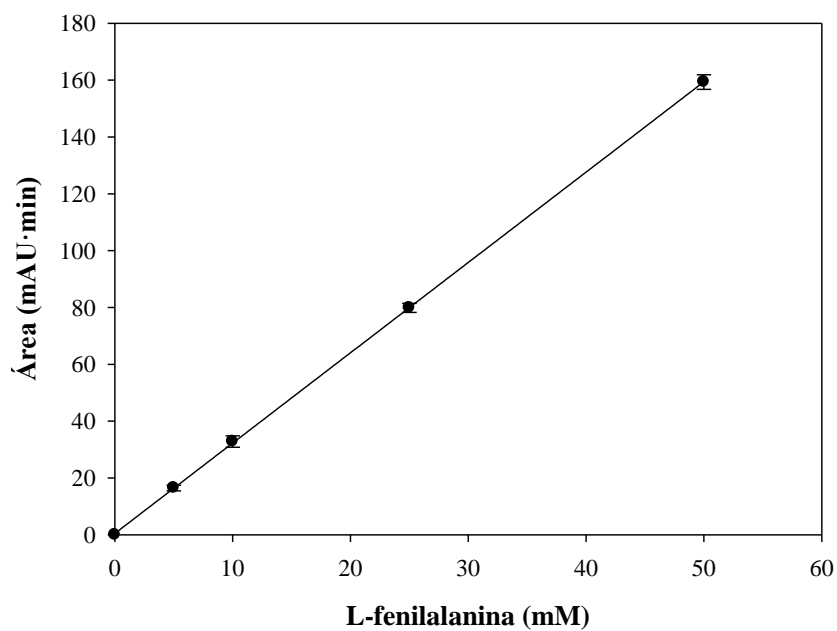
### 1.1. Cromatograma de L-fenilalanina y fenilpiruvato

Las condiciones se detallan en la sección 2.3.10.



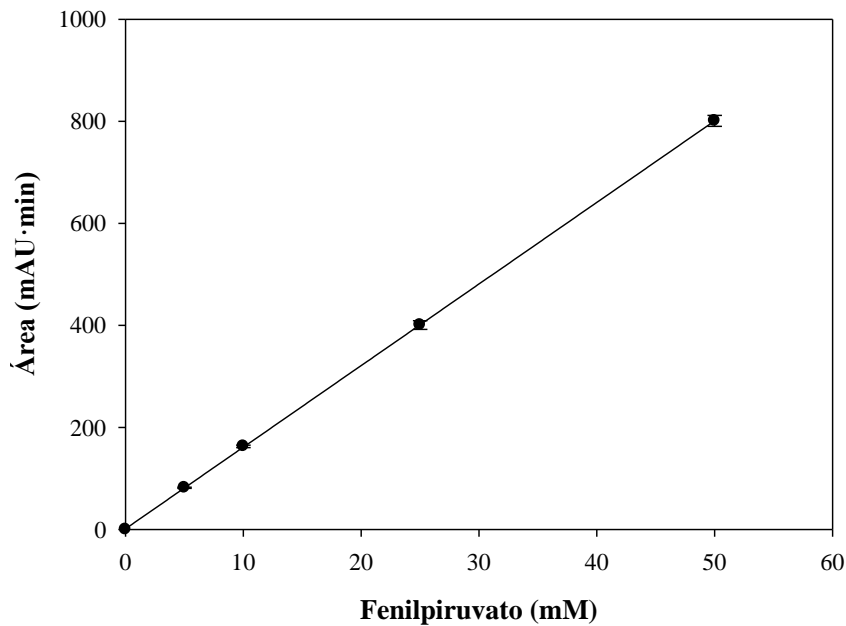
### 1.2. Curva patrón de L-fenilalanina (Phe) y fenilpiruvato (FP)

Phe (mM)	Área (mAU·min)	FP (mM)	Área (mAU·min)
50	159,34 ± 2,57	50	800,92 ± 10,65
25	79,85 ± 1,59	25	400,64 ± 8,36
10	32,81 ± 2,01	10	162,88 ± 2,34
5	16,47 ± 0,98	5	81,65 ± 1,12



$$R^2 = 0,99$$

$$\text{L-phenilalanina (mM)} = 0,3186 \cdot \text{Área (mAU}\cdot\text{min)}$$

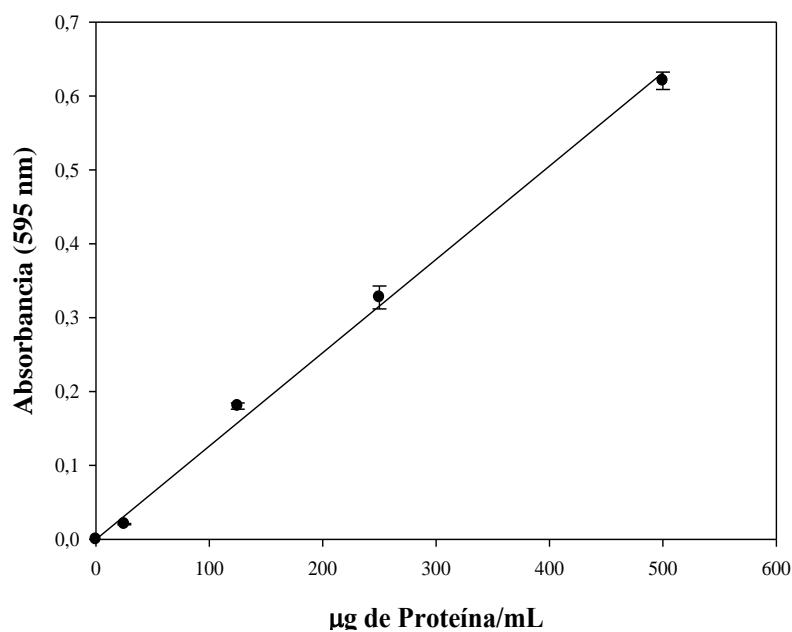


$$R^2 = 0,99$$

$$\text{Fenilpiruvato (mM)} = 0,2853 \cdot \text{Área (mAU}\cdot\text{min)}$$

**Anexo 2. Curva patrón de proteínas con albúmina sérica bovina (BSA)**

<b>BSA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Absorbancia (595 nm)</b>
500	$0,6206 \pm 0,0118$
250	$0,3274 \pm 0,0156$
125	$0,1804 \pm 0,0042$
25	$0,0206 \pm 0,0080$



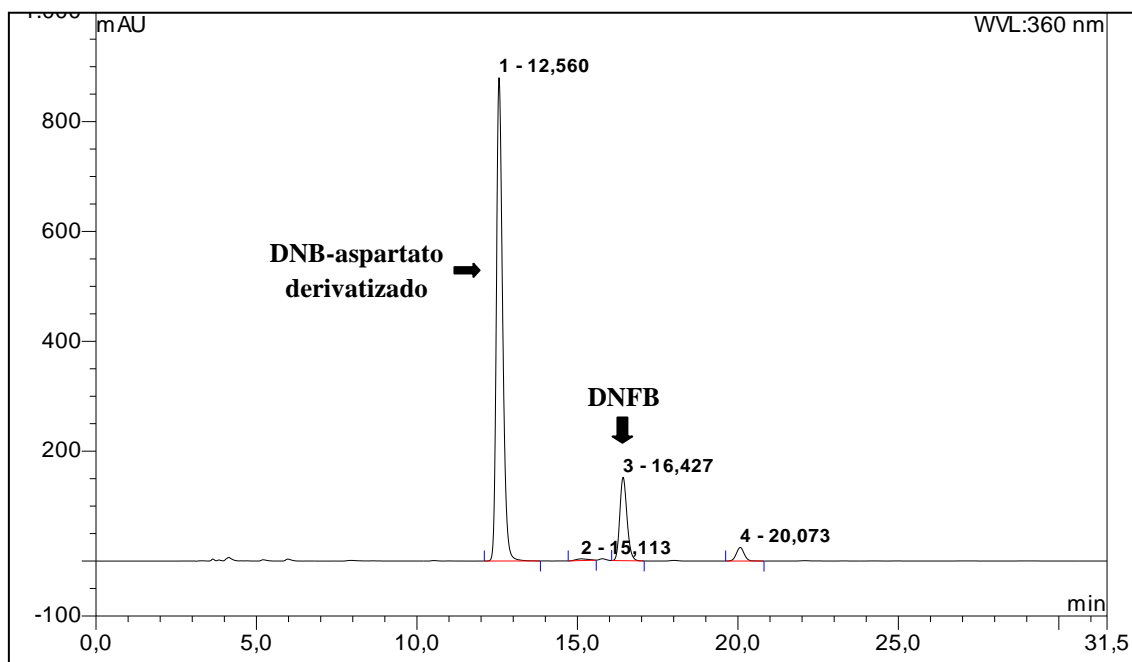
$$R^2 = 0,98$$

$$\frac{\text{g Proteína}}{\text{L}} = 0,7692 \cdot \text{Absorbancia (muestra)}$$

### Anexo 3. Cromatograma y curva patrón de L-aspartato derivatizado

#### 3.1. Cromatograma de L-aspartato derivatizado (DNB-aspartato)

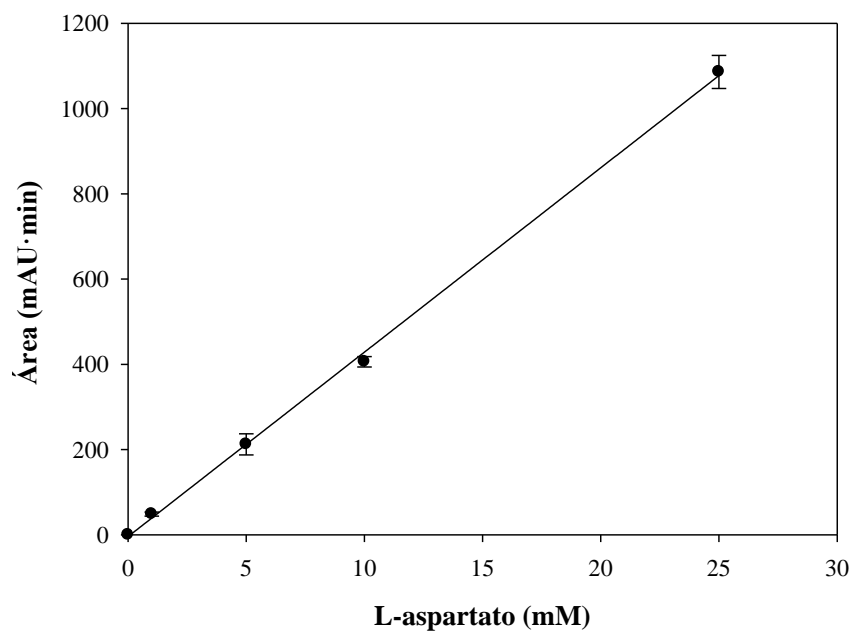
Las condiciones se detallan en la sección 3.3.12.



#### 3.2. Curva patrón de L-aspartato (Asp)

La concentración de Asp es equivalente a la concentración de DNB-aspartato una vez realizada la derivatización.

Asp (mM)	Área (mAU·min)
25	1085,89 ± 38,89
10	405,97 ± 12,15
5	212,28 ± 24,67
1	48,67 ± 4,68



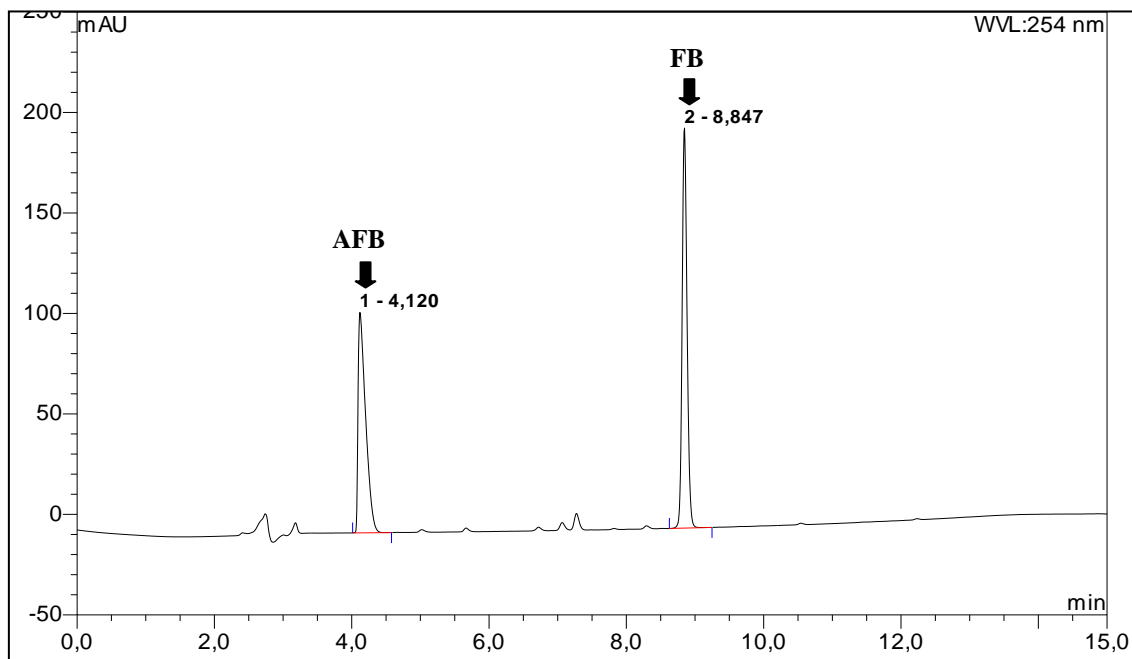
$$R^2 = 0,99$$

$$\text{L-aspartato (mM)} = 0,0232 \cdot \text{Área (mAU} \cdot \text{min)}$$

#### Anexo 4. Cromatograma y curva patrón de 3-amino-1-fenilbutano y 4-fenil-2-butanona

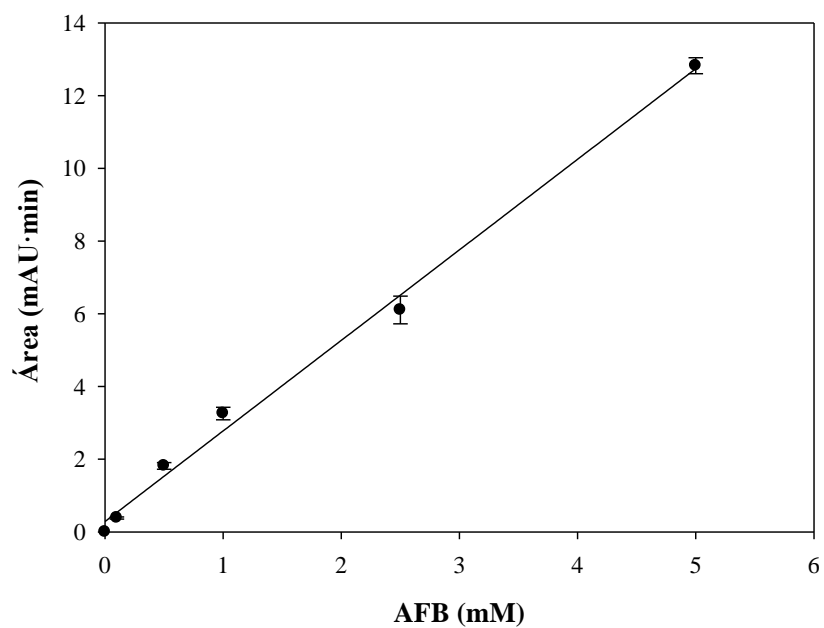
##### 4.1. Cromatograma de 3-amino-1-fenilbutano (AFB) y 4-fenil-2-butanona (FB)

Las condiciones se detallan en la sección 5.3.14.



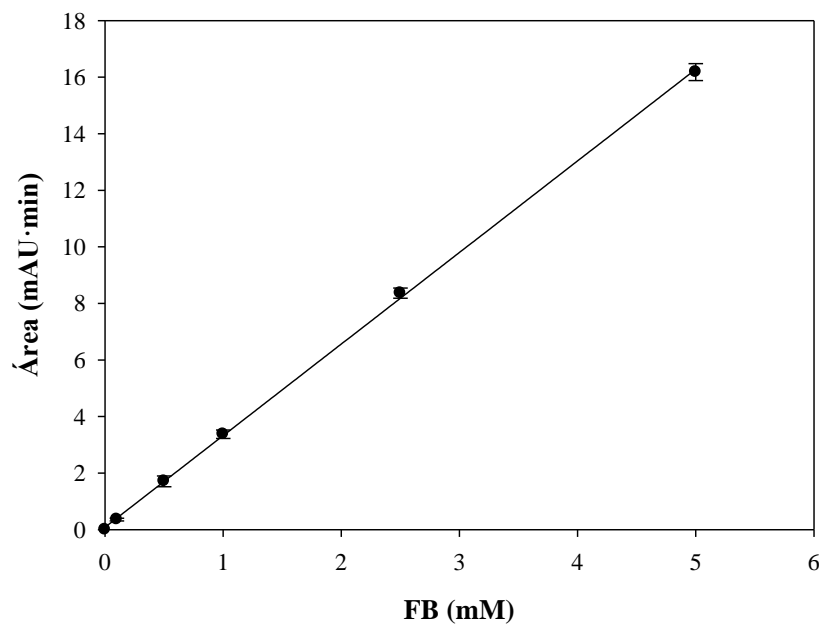
##### 4.2. Curva patrón de AFB y FB

AFB (mM)	Área (mAU·min)	FB (mM)	Área (mAU·min)
5	12,82 ± 0,22	5	16,18 ± 0,30
2,5	6,10 ± 0,38	2,5	8,36 ± 0,18
1	3,26 ± 0,17	1	3,37 ± 0,15
0,5	1,82 ± 0,09	0,5	1,71 ± 0,19
0,1	0,38 ± 0,03	0,1	0,36 ± 0,05



$$R^2 = 0,98$$

$$\text{AFB (mM)} = 0,3880 \cdot \text{Área (mAU} \cdot \text{min)}$$



$$R^2 = 0,99$$

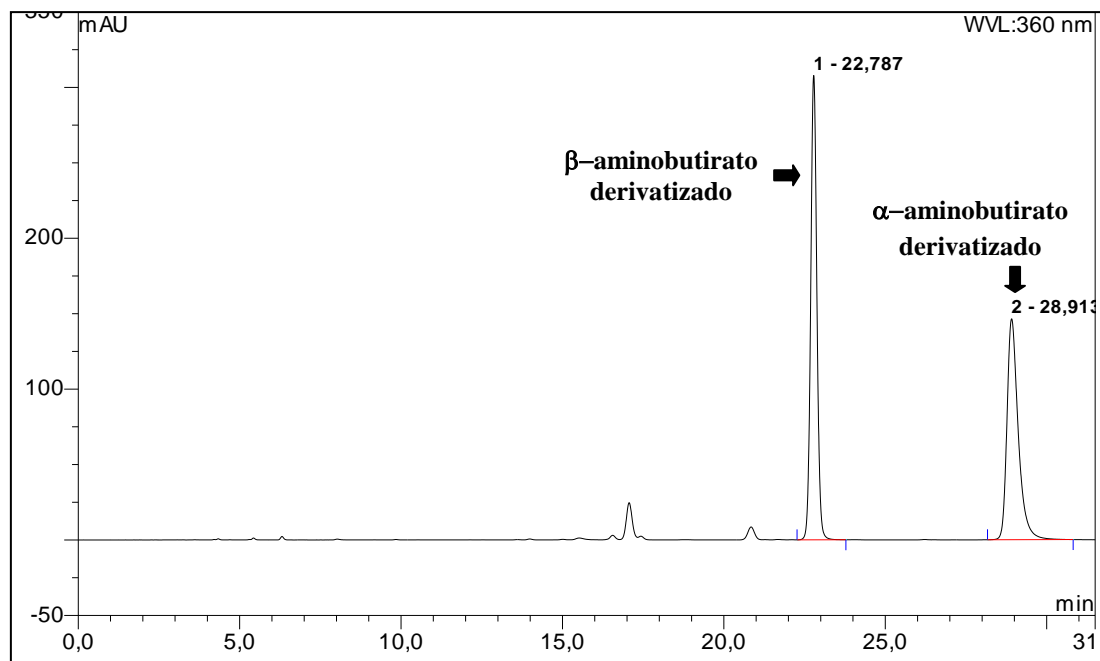
$$\text{FB (mM)} = 0,3065 \cdot \text{Área (mAU} \cdot \text{min)}$$



## Anexo 5. Cromatograma y curva patrón de $\beta$ -aminobutirato

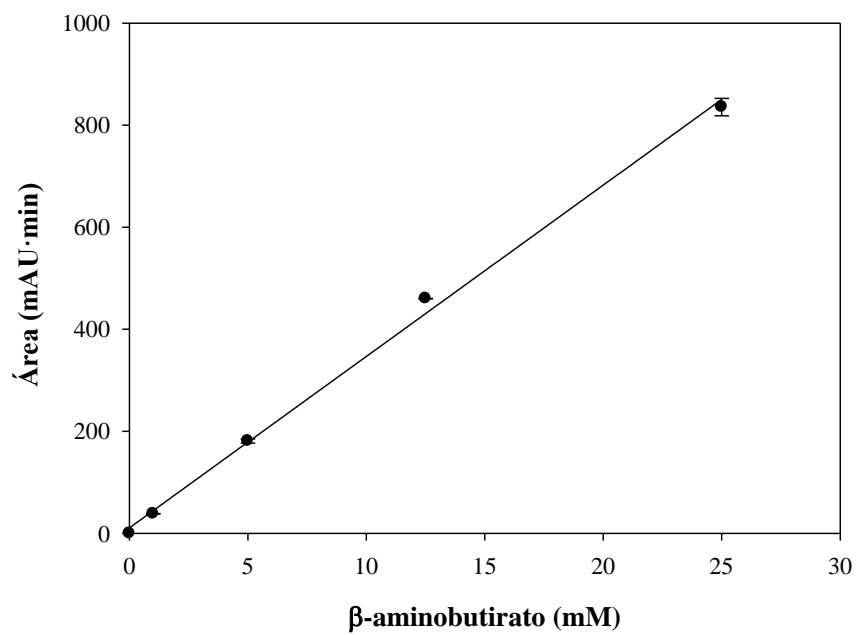
### 5.1. Cromatograma de $\beta$ -aminobutirato

Las condiciones se detallan en la sección 6.3.7.



### 5.2. Curva patrón de $\beta$ -aminobutirato ( $\beta$ -abut)

$\beta$ -abut (mM)	Área (mAU·min)
25	835,46 $\pm$ 17,17
12,5	460,10 $\pm$ 0,34
5	181,01 $\pm$ 4,07
1	38,36 $\pm$ 0,52



$$R^2 = 0,98$$

$$\beta\text{-aminobutirato (mM)} = 0,0293 \cdot \text{Área (mAU}\cdot\text{min)}$$