



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**Aislamiento y caracterización de  
 $\omega$ -Aminotransferasa a partir de *Fusarium  
oxysporum***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**RITA MARIA CAMPA RAMOS**

**DIRECTOR: DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCIA**

**Hermosillo, Sonora**

**10 de Agosto del 2017**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

OFICIO DE APROVACION DE JURADO

OFICIO DE AUTORIZACION DE EXAMEN DE GRADO

## RESUMEN

La producción de compuestos quirales e intermediarios quirales, en las últimas décadas ha incrementado considerablemente por su demanda en diversas industrias como la agroquímica, la de fragancias y la farmacéutica; tanto los producidos por rutas sintéticas tradicionales como los producidos utilizando tecnología enzimática. Es por esto que el estudio y la identificación de enzimas que ayudan a sintetizar compuestos con actividad óptica tiene una repercusión práctica y científica; entre estas enzimas están las  $\omega$ -Aminotransferasas; las cuales son utilizadas para la síntesis de aminas quirales. En esta investigación se probaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* pero no fueron estereoespecíficas por lo que se utilizaron algunos mohos siendo el *Fusarium oxysporum* el adecuado, con el cual fue detectada una aminotransferasa que mostró estereoespecificidad por (R)-(-)-( $\alpha$ )-Metilbencilamina (R-MBA) a una temperatura de 28°C y un pH de 6.29; a estas condiciones presentó una velocidad de producción de acetofenona de 0.288  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , utilizando 1.2 gramos de células de *Fusarium oxysporum*; estas células fueron rotas por contacto con Nitrógeno líquido. La identificación de la  $\omega$ -Aminotransferasas con estereoespecificidad R fue realizada en un volumen de reacción de 50 mL, utilizando una mezcla de reacción de composición 15 mM de (R)-(-)-( $\alpha$ )-Metilbencilamina, 100 mM piruvato de sodio (PS) y 1 mM piridoxal-5-fosfato; siendo este último el cofactor de la enzima, la temperatura adecuada fue de 32.5°C y un pH de 6.28, presentando una velocidad de 0.301  $\mu\text{M}/\text{min}$ . En cuanto a la determinación de las afinidades por los sustratos y productos no se mostraron inhibiciones ni por reactivos ni por productos, donde observo que siguió una cinética de Michaelis-Menten, donde la  $V_{\text{max}}$  para PS fue de 0.189  $\mu\text{M}/\text{min}$  con una  $K_m$  de 2.093 mM y para R-MBA fue de 0.216  $\mu\text{M}/\text{min}$  con una  $K_m$  de 2.15 mM, para los productos se obtuvo una  $V_{\text{max}}$  de 3.79  $\mu\text{M}/\text{min}$  para la acetona con una  $K_m$  de 0.02 mM y para la alanina una  $V_{\text{max}}$  de 3.81  $\mu\text{M}/\text{min}$  con una  $K_m$  de 0.046 mM por lo que se mostraron afinidades tanto para sustratos como para productos, donde la mayor afinidad la mostro la acetofenona, así mismo su número de recambio fue alto por qué no hubo inhibición.

## ABSTRACT

Chiral and chiral intermediate compounds production has considerably increased in the past decades due to its demand in different industries, like the agro-chemical, the fragrance and the pharmaceutical; the increase has been noted in the ones created by traditional synthetic means as the ones created using enzymatic technology. This is the reason why the study and identification of enzymes that help synthesize compounds with optics has practical and scientific repercussions; among these enzymes are the  $\omega$ -aminotransferases; which are used to synthesize chiral-amines. For this investigation some *Saccharomyces cerevisiae* yeasts were used, but they were not stereospecific, using instead some molds, being the *fusarium oxysporum* the one that proved suitable, an aminotransferase that showed stereo specificity was detected by (R)-(-)-( $\alpha$ ) metilbencilamina (R-MBA) at a temperature of 28°C and pH of 6.29; in these conditions an acetophenone rate of production of 0.288  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$  was shown, utilizing 1.2 grams of *fusarium oxysporum* cells; these cells were broken down in contact with liquid Nitrogen. The  $\omega$ -aminotransferases with R stereo specificity identification was done with a reaction volume of 50 mL, using a composition reaction mix of 15 mM of (R)-(-)-( $\alpha$ )-metilbencilamina, 100 mM of sodium pyruvate (PS) and 1 mM phosphate-5-pyridoxal; the latter been the enzyme cofactor, with an adequate temperature of 32.5C and a pH of 6.28, giving as a result a rate of 0.301  $\mu\text{M}/\text{min}$ . In respect to the determination of affinities of the substrates and products, no inhibition was shown neither by the reactive nor the products, where it was observed that it followed a Michaelis-Menten kinetics, where  $V_{\text{max}}$  for PS was 0.189  $\text{uM}/\text{min}$  with a  $K_{\text{m}}$  of 2.093 mM and for R-MBA was 0.216  $\text{uM}/\text{min}$  with a  $K_{\text{m}}$  of 2.15 mM, for the products a  $V_{\text{max}}$  of 3.79  $\text{uM}/\text{min}$  was obtained for acetone with a  $K_{\text{m}}$  of 0.02 mM and for alanine a  $V_{\text{max}}$  of 3.81  $\text{uM}/\text{min}$  with a  $K_{\text{m}}$  of 0.046 mM was obtained, which shows some affinity for the substrates as well as for the products, the most affinity was shown by the acetophenone, likewise its turnover number was high because there was no inhibition.

---

## TABLA DE CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| <b><u>RESUMEN</u></b> .....   | iv   |
| <b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b> .....                                      | ix   |
| <b><u>LISTA DE TABLAS</u></b> .....                                       | xi   |
| <b><u>NOMENCLATURA</u></b> .....  | xii  |
| <b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b> .....                                       | xiii |
| <b><u>CAPITULO 1</u></b> .....  | 1    |
| <b><u>INTRODUCCION Y OBJETIVOS</u></b> .....                              | 1    |
| <u>1.1 Introducción</u> .....   | 1    |
| <u>1.2 Objetivos</u> .....  | 4    |
| <u>1.2.1 Objetivo General</u> .....                                       | 4    |
| <u>1.2.2 Objetivos Específicos</u> .....                                  | 4    |
| <b><u>CAPITULO 2</u></b> .....  | 5    |
| <b><u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u></b> .....                                | 5    |
| <u>2.1 Aminotransferasas</u> .....  | 5    |
| <u>2.2 Mecanismo de reacción</u> .....                                    | 7    |
| <u>2.3 Importancia de la estereoespecificidad</u> .....                   | 8    |
| <u>2.4 Aplicaciones de <math>\omega</math>-Aminotransferasas</u> .....    | 9    |
| <u>2.5 Aminotransferasas para la fabricación de aminas quirales</u> ..... | 9    |
| <u>2.6 Síntesis asimétrica</u> .....                                      | 10   |
| <u>2.7 Crecimiento microbiano</u> .....                                   | 11   |
| <u>2.8 Cinética enzimatica</u> .....                                      | 14   |
| <u>2.9 Modelo de Michaelis-Menen</u> .....                                | 15   |

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>CAPITULO 3</u></b> .....   | <b>19</b> |
| <b><u>MATERIALES Y METODOS</u></b> .....   | <b>19</b> |
| <u>3.1 Metodología</u> .....   | 19        |
| <u>3.2 Preparación de la materia prima</u> .....   | 20        |
| <u>3.3 Reacciones de transaminación</u> .....  | 21        |
| <u>3.4 Pruebas de identificación de estereoselectividad</u> .....  | 22        |
| <u>3.5 Mecanismo de reacción</u> .....   | 23        |
| <u>3.6 Análisis de muestras</u> .....  | 24        |
| <u>3.7 Purificación del microorganismo</u> .....   | 25        |
| <u>3.7.1 Preservación de los hongos (etapa latente)</u> .....  | 29        |
| <u>3.8 Rompimiento celular</u> .....   | 31        |
| <u>3.9 Determinación del efecto de la temperatura</u> .....  | 32        |
| <u>3.10 Determinación del efecto del pH</u> .....  | 33        |
| <u>3.11 Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia</u> .....  | 34        |
| <u>3.12 Determinación de afinidades/inhibiciones por reactivos y productos</u> .....                           | 35        |
| <b><u>CAPITULO 4</u></b> .....   | <b>36</b> |
| <b><u>RESULTADOS Y DISCUSION</u></b> .....   | <b>36</b> |
| <u>4.1 Identificación de <math>\omega</math>-Aminotransferasa</u> .....  | 36        |
| <u>4.2 Selección del hongo con mayor actividad</u> .....   | 38        |
| <u>4.3 Identificación del hongo</u> .....  | 38        |
| <u>4.4 Efecto del rompimiento celular</u> .....  | 39        |
| <u>4.5 Selección de la temperatura y pH de reacción</u> .....  | 40        |
| <u>4.5.1 Comparación de los datos experimentales con los modelos para la temperatura y pH óptimos</u><br>..... | 40        |
| <u>4.6 Efecto de la velocidad de producción de acetofenona</u> .....   | 45        |
| <u>4.7 Efecto de las afinidades/inhibiciones de los reactivos y productos</u> .....                            | 46        |
| <b><u>CAPITULO 5</u></b> .....   | <b>55</b> |



---

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u></b> ..... | <b>55</b> |
| 5.1 Conclusiones .....                             | 55        |
| 5.2 Recomendaciones .....                          | 56        |
| <b><u>CAPITULO 6</u></b> .....                     | <b>57</b> |
| <b><u>APENDICE</u></b> .....                       | <b>57</b> |
| A. Curvas de Calibración .....                     | 57        |
| B. Datos Experimentales .....                      | 57        |
| <b><u>CAPITULO 7</u></b> .....                     | <b>59</b> |
| <b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....                   | <b>59</b> |

---

---

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Síntesis de (S)-Metoxiisopropilamina.....   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Mecanismo de reacción.....  | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Rutas para llegar a la amina quiral: modo síntesis y modo resolución.....                               | 10 |
| <b>Figura 4.</b> Fases de crecimiento microbiano en un medio líquido. ....   | 12 |
| <b>Figura 5.</b> Método turbidimétrico.....  | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Efecto del incremento en la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción.<br>.....          | 17 |
| <b>Figura 7.</b> Metodología de la investigación.....  | 20 |
| <b>Figura 8.</b> Reacción de identificación de S-aminotransferasas. ....   | 21 |
| <b>Figura 9.</b> Reacción de identificación de R-aminotransferasas.....  | 22 |
| <b>Figura 10.</b> Reacción experimental para la detección de R-AT.....   | 24 |
| <b>Figura 11.</b> Producción de acetofenona a partir de (R)-(-)-( $\alpha$ )-Metilbencilamina por<br>transaminación..... | 26 |
| <b>Figura 12.</b> Materia prima para la preparación de medios de cultivos para los hongos ....                           | 28 |
| <b>Figura 13.</b> Proceso de aislamiento .....   | 28 |
| <b>Figura 14.</b> Proceso de solidificación.....   | 28 |
| <b>Figura 15.</b> Crecimiento de los microorganismos .....   | 29 |
| <b>Figura 16.</b> Diagrama del rompimiento celular.....  | 32 |
| <b>Figura 17.</b> Selección del mejor microorganismo.....  | 37 |
| <b>Figura 18.</b> Prueba del PCR.....  | 38 |
| <b>Figura 19.</b> Efecto de la temperatura en la velocidad de producción de acetofenona .....                            | 40 |
| <b>Figura 20.</b> Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción, en la obtención de la<br>temperatura óptima..... | 43 |
| <b>Figura 21.</b> Efecto del pH en la velocidad de producción de acetofenona.....  | 43 |
| <b>Figura 22.</b> Efecto del pH en la velocidad de producción de acetofenona.....  | 42 |
| <b>Figura 23.</b> Velocidad de producción de acetofenona a 32.5°C y pH 6.28 .....  | 45 |
| <b>Figura 24.</b> Efecto del PS en la velocidad de reacción.....   | 46 |
| <b>Figura 25.</b> Efecto del PS en la velocidad de reacción.....   | 47 |
| <b>Figura 26.</b> Efecto de la R-MBA en la velocidad de reacción.....  | 49 |
| <b>Figura 27.</b> Efecto de la R-MBA en la velocidad de reacción.....  | 54 |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 28.</b> Efecto de la Acetofenona en la velocidad de reacción..... | 51 |
| <b>Figura 29.</b> Efecto de la Acetofenona en la velocidad de reacción..... | 52 |
| <b>Figura 30.</b> Efecto de la Alanina en la velocidad de reaccion .....    | 53 |

---

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasifiaccion de enzimas segun su actividad .....                                 | 2  |
| <b>Tabla 2.</b> Preparación para obtener la curva de Acetofenona .....                            | 25 |
| <b>Tabla 3.</b> Identificacion de w-AT.....   | 37 |
| <b>Tabla 4.</b> Velocidad de la Acetofenona después de la ruptura con Nitrogenito líquido.. ..... | 39 |
| <b>Tabla 5.</b> Curva de calibracion de la acetofenona.....                                       | 57 |

---

## NOMENCLATURA

|         |  |
|---------|--|
| AT      | Aminotransferasa                       |
| PMP     | Fosfato de Piridoxamina                |
| PLP     | Piridoxal fosfato                      |
| PS      | Piruvato de Sodio                      |
| HPLC    | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| $V_o$   | Velocidad inicial                      |
| $V_m$   | Velocidad máxima                       |
| [S]     | Concentración del sustrato             |
| PCR     | Reacción en cadena de la polimerasa    |
| ADN     | Acido desoxirribonucleico              |
| R-MBA   | R-Metilbencilamina                     |
| S-MBA   | S-Metilbencilamina                     |
| $K_m$   | Constante de Michaelis                 |
| RIU/F.S | Unidades de índice de refracción       |
| Kb      | Kilobase                               |

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios en primer lugar por darme la oportunidad de seguir viviendo, su amor y bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son el resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los pones en frente mío para que mejore como ser humano y crezca de diversas maneras.

A mis padres Francisca Ramos y Rodarico Campa, por su amor y por su apoyo incondicional para que esto se cumpliera.

A mi director de tesis Dr. Abraham Rogelio Martin García por haberme tenido la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de mi tesis. A todos los miembros de mi jurado que siempre estuvieron apoyándome en todo para que esto se cumpliera.

A mis Hermanas, sobrinos y amigos por sus palabras, cariño incondicional y apoyo moral en todo momento.

A ti Jesús Peralta Haley por siempre estar ahí para mí, por tu amor y apoyo incondicional para que esto se cumpliera.

Muchas gracias.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Introducción

Los enzimas son catalizadores que se producen en las células, nos aceleran las reacciones químicas, permitiendo manejar temperaturas adecuadas y mayores velocidades, como catalizadores que actúan mediante su presencia, no se consumen en la reacción y al finalizar esta quedan libres pudiendo utilizarse de nuevo, por eso se necesitan en pequeñas cantidades. Además tienen otras características: Son muy específicas, por lo que actúan en una determinada reacción sin alterar otras, algunas aumentan la velocidad de la reacción más de un millón de veces [Hernández Jiménez, 2008].

La importancia característica de las enzimas es su alta especificidad sobre la reacción que catalizan. Cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un sustrato único. Esta especificidad se debe a la complementariedad que debe existir entre el sustrato y el centro activo de la enzima [Hernández Jiménez, 2008]. La estructura o conformación de la enzima es la que determina la actividad enzimática, por lo que cualquier perturbación en ella causará una pérdida de actividad [Voet, 2004].

La eficacia de un enzima se mide por la velocidad de transformación del sustrato en producto. La actividad de las enzimas se ve afectada por diversos factores entre los que destacan los siguientes: concentración del sustrato, temperatura, pH e inhibidores [Voet, 2004].

La comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo en 1964, para uniformar la nomenclatura, la siguiente clasificación sistemática, en la cual se consideran 6 grupos principales de enzimas de acuerdo al tipo reacción implicada como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las enzimas según su actividad

| Tipo de enzimas | Actividad   |
|-----------------|---|
| Hidrolasas      | Catalizan reacciones de hidrólisis. Rompen las biomoléculas con moléculas de agua.                              |
| Isomerasas      | Catalizan las reacciones en las cuales un isómero se transforma en otro, es decir, reacciones de isomerización. |
| Ligasas         | Catalizan la unión de moléculas.  |
| Liasas          | Catalizan las reacciones de adición de enlaces o eliminación, para producir dobles enlaces.                     |
| Oxidoreductasas | Catalizan reacciones de óxido-reducción. Facilitan la transferencia de electrones de una molécula a otra.       |
| Tansferasas     | Catalizan la transferencia de un grupo de una sustancia a otra.   |

Las transferasas son las enzimas que catalizan aquellas reacciones celulares donde un grupo de átomos se transfieren de un sustrato a otro. Las transferasas más comunes son: fosfotransferasas, las aminotransferasas, las glicosiltransferasas, las transcetolasas y las transaldolasas. La importancia de la biosíntesis de aminoácidos y aminos con actividad óptica ha crecido en los últimos veinte años porque aminos quirales se utilizan como productos farmacéuticos intermedios y finales [Shin y Kim, 1997; Stirling 1992; Pannuri et al., 2006, Martin et al., 2007(a), Koszelewski et al., 2009, Koszelewski et al., 2010(a), Koszelewski et al., 2010(b), Behrens et al., 2011], y en síntesis asimétrica y la resolución de químicos [Pannuri et al., 2006, Martin et al., 2007(a), 2007(b), Koszelewski et al., 2009, Koszelewski et al., 2010(a),



Koszelewski et al., 2010(b), Behrens et al., 2011]. Las aminotransferasas intervienen en la síntesis de compuestos con actividad óptica. La síntesis asimétrica ha adquirido una gran importancia; esta incluye métodos enzimáticos, estereoquímicos y también catalíticos [Gerlach et al., 2005]. Una síntesis asimétrica es una reacción en la que a partir de un arreglo proquiral se genera un arreglo quiral de tal modo que los productos estereoisómeros (enantiómeros o diastereómeros) se forman en cantidades desiguales. Para obtener un buen resultado en una síntesis asimétrica se ha de pasar por estados diastereomorfos transitorios, con energías diferentes, durante la reacción. Estos determinan qué enantiómero se forma en exceso. Los estados diastereomorfos transitorios con energías diferentes se pueden generar adicionando conformeros quirales al medio de reacción. Estos se pueden incorporar a su vez a través de disolventes quirales, reactivos modificados en forma quiral o catalizadores quirales para formar estados diastereomorfos transitorios [Enders and Hoffmann, 1985]. Dada la importancia económica en la producción de fármacos quirales y productos intermedios quirales varias compañías han desarrollado tecnologías a base de enzimas para producir estos compuestos. Cambrex Corporation tiene tecnología patentada que utiliza aminotransferasas para la producción de distintos productos alifáticos, heterocíclicos, aromáticos y aminas quirales. Estas aminas se producen utilizando las aminotransferasas como biocatalizadores en gran escala. Estas aplicaciones de aminotransferasas se derivaron de una  $\omega$ -Aminotransferasade tipo salvaje obtenido de *Athrobactercitreus*; la cual fue mejorada por medio de técnicas de biología molecular. Hay dos maneras posibles de llegar a una amina quiral: la síntesis y la resolución. La síntesis consiste en la transferencia del grupo amino de un donante amino (por lo general isopropilamina) a una cetona proquiral para producir la deseada amina quiral y la resolución implica la transferencia selectiva de un grupo amino del isómero deseado a un aceptor del grupo carbonilo, dejando atrás la cetona correspondiente y la amina quiral deseada. En la mayoría de los casos, la síntesis es la ruta preferida por los rendimiento global en el modo de síntesis (máximo teórico del 100%) es mejor que en el modo de resolución (máximo teórico del 50%). Sin embargo, algunas cetonas proquirales se han encontrado que son sustratos muy pobres y no producirían a escala industrial la amina quiral deseada por lo que en estos casos la resolución ha sido utilizada con éxito para producir la amina quiral; la cual en una primera etapa es generada por un proceso que genera una mezcla racemica de aminas. Uno de los productos que se han estudiado ampliamente y se han producido a escala industrial es el de

aminotetralinas. La reacción de síntesis global se ve dificultada por el equilibrio de la reacción y por la reacción de la competencia no enzimática entre tetralona sustituido y aminotetralina. Ambas reacciones son reacciones de equilibrio y el rendimiento de conversión final depende de múltiples factores, incluyendo la estabilidad de la enzima, las concentraciones de sustratos y la velocidad de reacción. La conversión de la reacción principal puede variar de 70 a 98%. Para desarrollar mejoras y hacer un proceso rentable se requiere de aminotransferasas con tolerancia a las concentraciones altas de aminas, alta actividad específica, termoestabilidad para reducir el tiempo de ciclo del proceso, un menor uso de la enzima, y lograr un alto rendimiento global [Martin et al., 2007(a)]. En la preparación de aminas enantioméricamente puras la importancia de las  $\omega$ -aminotransferasas está aumentando debido a su enantioselectividad [Koszelewski et al., 2010(a)]. Las  $\omega$ -Aminotransferasa se identificaron hace más de 50 años, pero debido a la falta de enzimas adecuadas, no era posible usarlas de manera eficiente en síntesis orgánica.

## 1.2 Objetivo General

Aislar y caracterizar  $\omega$ -Aminotransferasa con estereoespecificidad selectiva en organismos del reino fungí

## 1.3 Objetivos Específicos

- Identificar el microorganismo capaz de realizar el proceso de transaminación.
- Identificar la estereoselectividad de  $\omega$ -Aminotransferasa.
- Determinar el efecto de la temperatura y pH en la velocidad de reacción.
- Determinar las afinidades por los sustratos y productos.

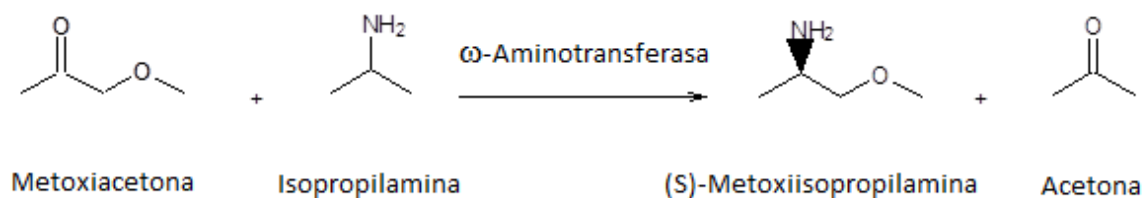
## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Aminotransferasas

Las aminotransferasas o transaminasas son enzimas del grupo de las transferasas que catalizan la reacción de transferencia del grupo amino, de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido. Las transaminaciones son reacciones de intercambio de un radical amino ( $-\text{NH}_2$ ) entre dos grupos carbonados, siendo reemplazado el radical amino por una función cetona. El papel de las reacciones de transaminación es doble: Permiten realizar la interconversión reversible de los aminoácidos a  $\alpha$ -cetoácidos y posibilitan la separación de la parte nitrogenada de los aminoácidos aportados en exceso, constituyendo el primer paso del catabolismo de muchos aminoácidos [Murray, 2001]. Las aminotransferasas se pueden aplicar para ayudar a sintetizar compuestos con actividad óptica, la síntesis asimétrica ha adquirido una gran importancia; esta incluye métodos enzimáticos, estereoquímicos y también catalíticos. La catálisis asimétrica es por mucho el método más eficaz, dado que con una pequeña cantidad de catalizador quiral (enzimas) permite sintetizar una gran cantidad de una sustancia ópticamente activa [Gerlach et al., 2005], dado que su número de recambio es muy alto. Las reacciones en las que se rompen enlaces con centros quirales pueden emplearse para obtener otro tipo de información de gran importancia: la rotación específica de compuestos ópticamente puros [Morrison and Boyd, 1998]. Un compuesto ópticamente puro es 100% de un enantiomero, a diferencia de una mezcla racémica que es 0% en pureza óptica (ya que el 50% de un enantiomero cancela la actividad óptica del 50% del otro enantiomero) [Jaramillo, 2002]. En la preparación de aminas enantioméricamente puras la importancia de las  $\omega$ -aminotransferasas está aumentando debido a su enantioselectividad [Koszelewski et al., 2010(a)]. La importancia de la biosíntesis de aminoácidos y aminas con actividad óptica ha crecido en los últimos veinte años porque aminas quirales se utilizan como productos farmacéuticos intermedios y finales [Pannuri et al., 2006,

Martin et al., 2007(a), 2007(b), Koszelewski et al., 2009, Koszelewski et al., 2010(a), Koszelewski et al., 2010(b), Behrens et al., 2011]. De forma general las aminas quirales son producidas por métodos que implican catalizadores inorgánicos, biocatalizadores, o una combinación de ambos. Los métodos que implican biocatalizadores para la producción de aminas quirales se han centrado en la resolución cinética usando hidrolasas [Jaeger et al. 1996; Sheldon, 1996; Iglesias et al. 1997] y aminotransferasas [Shin y Kim, 1997; Stirling 1992; Pannuri et al., 2006, Martin et al., 2007(a), Koszelewski et al., 2009, Koszelewski et al., 2010(a), Koszelewski et al., 2010(b), Behrens et al., 2011]. El uso de las aminotransferasas a escala industrial, es en la forma de células, y no en su forma purificada dado que eleva los costos de producción [Martin et al., 2007]. Sin embargo esta práctica a gran escala genera dos desafíos importantes: el primero se refiere a la pérdida de biocatalizadores, ya que algunos pasos de aislamiento requieren la adición de sustancias que inactiven las enzimas (hidrólisis ácida, hidrólisis básica, extracción por solventes) y calentamiento o enfriamiento de las corrientes de proceso con el producto deseado. El segundo es la pérdida de producto atrapado en la torta formada durante la centrifugación / filtración para eliminar el biocatalizador agregado en la forma de células secadas por aspersión. El 60% de las reacciones bioquímicas conocidas intervienen dos sustratos y se obtienen dos productos. Casi todas las reacciones con dos sustratos son reacciones de transferasas en la que la enzima cataliza la transferencia de un grupo funcional específico de uno de los sustratos al otro (en ellas dos sustratos reaccionan para formar dos productos) [Voet, 2004]. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de reacción de transaminación; el cual consiste en la síntesis de (S)-Metoxiisopropilamina a partir de metoxiacetona e isopropilamina; produciendo a la par acetona [Matcham et. al. 1999].



**Figura 1.** Síntesis de (S)-Metoxiisopropilamina.

Dada la importancia económica en la producción de fármacos quirales e intermediarios quirales, varias compañías han desarrollado enzimas y tecnologías para producir estos compuestos.

## 2.2 Mecanismo de reacción

Un mecanismo de reacción consiste en la descripción detallada de la secuencia de cambios en la posiciones de los núcleos y de los electrones que tienen lugar como consecuencia de la transformación de los reactantes en productos [Contreras, 2004].

Como se muestra en la Figura 2 la enzima que está unida al piridoxal fosfato (PLP) que es la coenzima, después reacciona con la amina donadora y forma una aldimina la cual está unida a la enzima por doble enlace y mediante una reacción de tautomerización forma la cetimina cambiando su enlace del Carbono al Nitrógeno, después reacciona y libera una cetona, después mediante una reacción se forma la enzima como piridoxamina fosfato unida a la amina después como es muy inestable reacciona y forma otra cetona diferente y reacciona con una amina y forma la cetimina y después mediante una reacción se forma la aldimina cambiando su enlace del Nitrógeno al Carbono uniéndose por un doble enlace a la enzima, después libera un grupo amino y reacciona formando el piridoxal fosfato unido a la enzima.

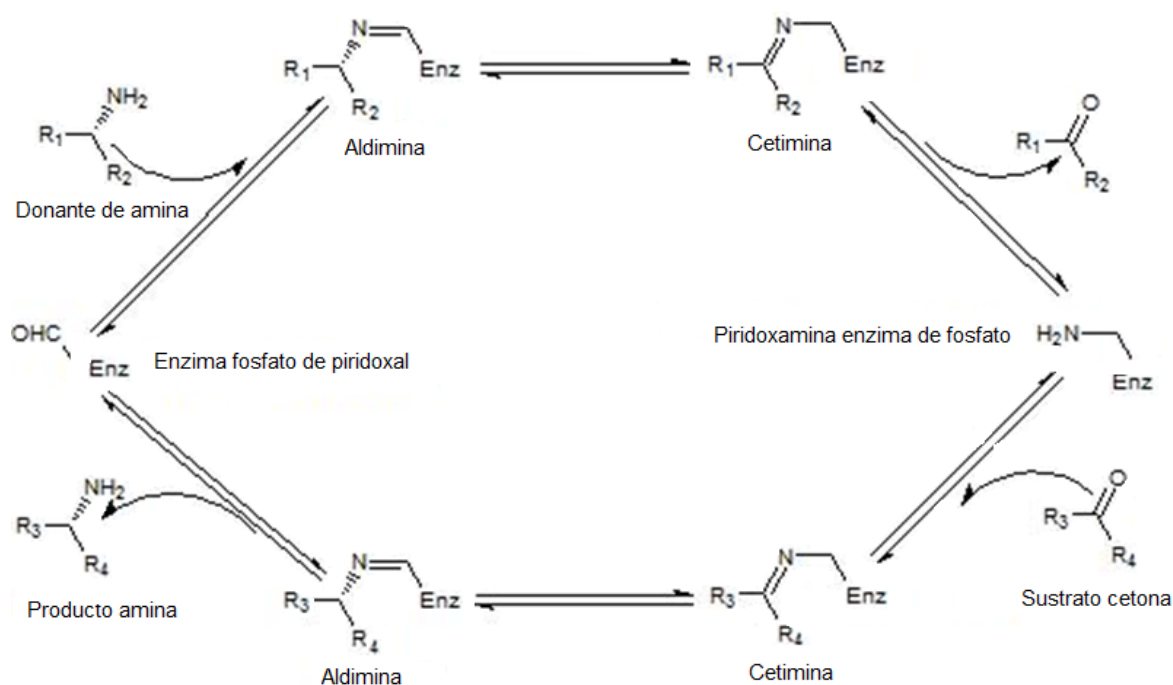


Figura 2. Mecanismo de reacción.

### 2.3 Importancia de la estereoespecificidad

La estereoespecificidad opera en una sola parte de los estereoisómeros, muchas enzimas presentan estereoespecificidad, lo cual significa que actúan sobre un solo estereoisómero del sustrato; la estereoespecificidad de las reacciones biológicas ha dado un gran impulso al desarrollo de métodos sintéticos muy estereoselectivos, por ejemplo al sintetizar una hormona es importante utilizar reacciones estereoselectivas que produzcan el isómero correcto, ya que solo ese estereoisómero mostrara actividad (estereoespecifica) en un sistema biológico [Morrison and Boyd, 1998]. Los alimentos y los ingredientes activos de medicamentos deben tener configuraciones adecuadas a fin de ser útiles al organismo. Un método conveniente en el que podemos especificar una configuración determinada es la empleada por los prefijos R (“rectus”) y S (“sinister”), nomenclatura para designar enantiómeros. Este sistema utiliza estas

letras mayúsculas (R y S) para designar la configuración de cada centro quiral a una molécula quiral, a diferencia de otros sistemas este designa todos los centros quirales posibles en una molécula y no solamente uno [Jaramillo, 2002].

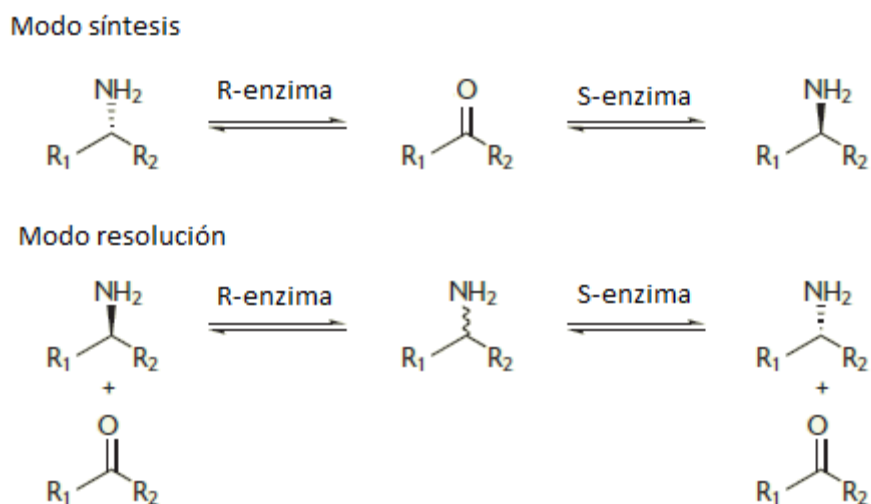
## 2.4 Aplicaciones de $\omega$ -Aminotransferasas

Las aminas quirales han encontrado una amplia aplicación en el servicio a la síntesis asimétrica, las aminas quirales son parte esenciales de muchos fármacos. Existen empresas que fabrican una amplia variedad de aminas quirales con una pureza quiral muy alta, usando las aminotransferasa. A través de la biotransformación, se han desarrollado procedimientos rentables para la fabricación a escala comercial de más de 120 aminas incluyendo: Aminotetralinas, Metilbencilaminas, aminas polifuncionales entre otra gran variedad de aminas. Los enantiómeros interactúan de manera diferente en cada caso con receptores y enzimas, es por eso que en la naturaleza se producen efectos fisiológicos diferentes, algunos en su configuración S tienen características diferentes a la configuración R [Grunenthal, 2005].

## 2.5 Aminotransferasas para la fabricación de aminas quirales

Entre los métodos que permiten obtener sustancias quirales enantiopuras destacan: la síntesis enantioselectiva estequiométrica, donde cada molécula del reactivo quiral genera una molécula de producto quiral, y la catálisis asimétrica, donde se alcanza una multiplicación de la quiralidad, ya que una molécula del catalizador quiral puede generar cientos o miles de moléculas quirales, el segundo método es muy atractivo pues permite aprovechar los reactivos requeridos de manera más eficiente y sustentable. En la catálisis asimétrica podemos distinguir entre biocatalizadores, como son las enzimas, que se conocen desde mediados del siglo XIX a través de los trabajos de Pasteur, y los catalizadores organometálicos que se desarrollaron durante la segunda mitad del siglo XX. Ejemplos sobresalientes en este campo fueron reconocidos con el otorgamiento del Premio Nobel de Química 2001 a William Knowles (producción de la (S)-Dopa, medicamento fundamental para el tratamiento del mal de Parkinson), RyoriNoyori (síntesis enantioselectiva del agente antiinflamatorio (S)-Naproxen) y

Barry Sharpless (oxidación enantioselectiva de alcoholes alílicos) [Juaristi, 2002]. Las aminotrasferasas se pueden utilizar de dos modos diferentes: síntesis y resolución, como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Rutas para llegar a la amina quiral: modo síntesis y modo resolución.

## 2.6 Síntesis asimétrica

Una síntesis asimétrica es una reacción en la que a partir de un agrupamiento proquiral se genera un agrupamiento quiral de tal modo que los productos estereoisómeros (enantiómeros o diastereómeros) se forman en cantidades desiguales.

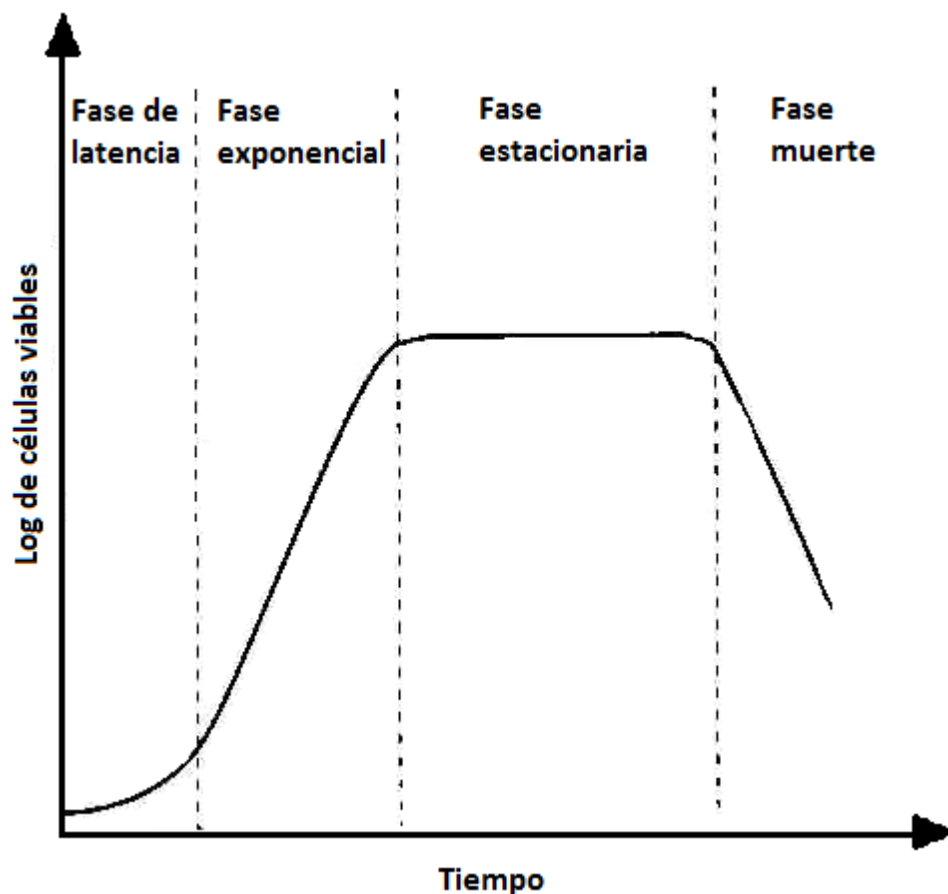
La preparación de sustancias enantioméricamente puras puede realizarse siguiendo tres métodos diferentes: Disociación racémica clásica, utilización de elementos constituyentes quirales naturales (“chiral pool”) y síntesis asimétrica [Grunenthal, 2005]. La síntesis asimétrica en especial ha adquirido una gran importancia. Ésta incluye métodos enzimáticos, estereoquímicos y también catalíticos. La catálisis asimétrica es con mucho el método más eficaz, dado que con un mínimo de catalizador quiral se puede sintetizar un máximo de sustancias ópticamente activas. Las moléculas quirales no poseen ningún eje de rotación



impropio. Sólo se diferencian por sus propiedades físicas, a saber: la dirección en la que desvían la luz polarizada lineal en la misma magnitud. En entornos aquirales, los dos enantiómeros poseen las mismas propiedades químicas, biológicas y físicas. En cambio, en entornos quirales, sus propiedades pueden ser muy diferentes. Los métodos asimétricos para preparar aminas ópticamente activas se encuentran en alta demanda en síntesis asimétrica, ya que son de gran valor productos o de productos intermedios clave para un gran número de compuestos bioactivos. Para la preparación de aminas enantioméricamente puras,  $\omega$ -transaminasas ha recibido recientemente un aumento de atención. En la actualidad, la búsqueda de nuevos  $\omega$ -transaminasas se está llevando a cabo mediante el cribado de microorganismos. Sin embargo, el número de casos de  $\omega$ -transaminasas con una secuencia de genes conocidos es todavía bastante pequeño:  $\omega$ -transaminasas de *Vibrio fluvialis*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2 y *Arthrobacter citreus*.

## 2.7 Crecimiento microbiano

En la Figura 4 se muestra la curva de crecimiento de una población microbiana, dividiéndose en cuatro fases denominadas fase de latencia, fase exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.



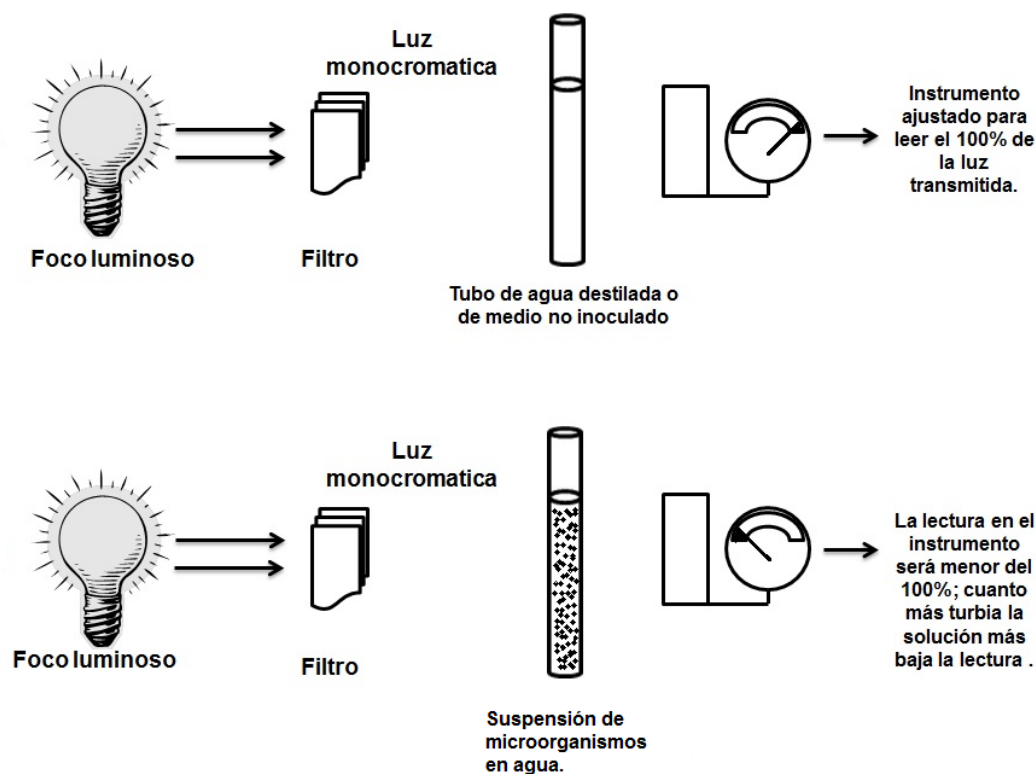
**Figura 4.** Fases de crecimiento microbiano en un medio líquido.

En la fase de latencia, el crecimiento no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado latencia este tiempo puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones. Esta fase representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición, aquí se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente, no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. En la fase exponencial o fase logarítmica se observa el periodo de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura,

composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial. En la fase estacionaria, aquí vemos que los microorganismos no pueden crecer indefinidamente en forma exponencial, existen limitaciones de crecimiento como es por el agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcanza un número de células elevado para un espacio reducido, o por la combinación de alguna de las anteriores causas. En la fase de muerte, es donde se observa una disminución de microorganismos, donde las células pueden seguir vivas y continúan metabolizando pero va a comenzar una disminución.

En los medios sólidos se suelen inocular mediante asa de siembra, diseminando los microorganismos sobre la superficie libre en cajas Petri, tras la incubación a la temperatura y condiciones pertinentes, dando lugar a colonias. La densidad de cada colonia es muy alta, esto se debe a que en el medio sólido, a diferencia del líquido, los microorganismos no pueden dispersarse, y durante mucho tiempo este medio sólido permite un aporte continuo de nutrientes (por difusión desde el entorno de la colonia, hacia ella), y eliminación continua de productos de desecho (por difusión desde la colonia hacia fuera).

El crecimiento microbiano se mide por cambios sucesivos en el número de células o por el aumento de peso de la masa de las células. Hay varios métodos para enumerar las células o estimar la masa de éstas. Para la determinación de la masa microbiana directamente calculando el peso seco o húmedo de la muestra, otra forma de determinarlo de una manera indirecta es determinando la actividad metabólica de la célula. Un método más sencillo y útil para obtener la estimación relativa de la masa bacteriana es utilizar métodos ópticos (turbidimétricos) que consisten en medir la turbidez, ya que, dentro de ciertos límites, las suspensiones bacterianas dispersan la luz proporcionalmente a su concentración [Pedrique, 2008]. En la Figura 5 se observa el método turbidimétrico, que consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo microbiano. Las suspensiones microbianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua. La dispersión de luz es dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. El espectrofotómetro mide la densidad óptica (D.O) es decir la absorbancia (una medida de la luz transmitida a través de la suspensión).



**Figura 5.** Método turbidimétrico.

A medida que aumenta la concentración de nutrientes aumenta la velocidad de crecimiento hasta llegar a una concentración que ya no es limitante y se sigue aumentando no aumentará la velocidad de crecimiento. Así mismo la concentración de nutrientes tiene efecto sobre el crecimiento total ya que una gran parte del nutriente es convertido en masa celular, si se limita la cantidad de nutriente se limitará también la cantidad de material celular [Pedrique, 2008].

## 2.8 Cinética enzimática

La medida de la velocidad de una reacción y la forma en que cambia su respuesta a diferentes condiciones muestran íntima relación con el crecimiento seguido por la reacción, por lo que son indicadores de su mecanismo de reacción, es importante el estudio cinético dado que se puede determinar las afinidades de unión de los sustratos e inhibidores de una enzima y establecer su

velocidad catalítica máxima [Voet, 2004]. La medida de la velocidad es un paso esencial en la técnica de estudio de una enzima.

Algunas de las causas pueden contribuir a que se produzca esta disminución en la velocidad es que el producto se puede inhibir, el grado de saturación de la enzima con sustrato disminuye por el agotamiento del mismo a medida que la reacción avanza, la reacción inversa se hace más importante al aumentar la concentración del producto, la enzima puede inactivarse al pH o temperatura de reacción y varios de esos factores pueden interactuar simultáneamente. A causa de estos factores se hace difícil derivar una ecuación que responda a la curva, es por eso que se recurre a la medición de la velocidad inicial: sólo al comienzo de la reacción, cuando los factores mencionados no han tenido tiempo de actuar, las condiciones se conocen con precisión. Esto permite determinar qué efecto produce sobre la velocidad inicial la variación de solo un factor, manteniendo al resto constante. La concentración de sustrato sobre la velocidad inicial, nos dice que a medida que se incrementa la concentración del sustrato, la velocidad inicial aumenta hasta un valor máximo donde decimos que es la velocidad máxima. En este momento se dice que la enzima está saturada con sustrato [Pedrique, 2008].

## **2.9 Modelo de Michaelis-Menten**

La curva de transcurso de reacción de la mayor parte de las reacciones enzimáticas tiende a verse como la velocidad disminuye con el tiempo. La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas, algunas enzimas pueden unir varios sustratos diferentes y/o liberar diversos productos. El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchas enzimas, el complejo enzima sustrato (ES) se forman cuando la enzima y el sustrato se combinan, los productos de la reacción aparecen cuando el complejo se rompe liberando a la enzima. Entre la unión del sustrato a la enzima, y la aparición de la enzima libre y el producto (P), una serie de eventos complejos suceden, por lo menos se debe formar un complejo enzima sustrato ; este complejo debe pasar al estado de transición (ES\*); y el estado de transición debe avanzar a un complejo enzima producto (EP). Este último es finalmente competente para disociarse en producto y enzima libre, como se indica en la ecuación 1.



La ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 2), es una descripción cuantitativa de la relación entre la proporción de una reacción catalizada por una enzima, la concentración del sustrato [S] y dos constantes,  $V_{max}$  y  $K_m$ . Los símbolos utilizados en la ecuación de Michaelis-Menten se refieren a la velocidad de la reacción [V], velocidad máxima de la reacción ( $V_{max}$ ), concentración del sustrato [S] y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), que nos da una estimación de la disociación del complejo enzima-sustrato para dar enzima más sustrato, la cual no depende de la concentración de la enzima.

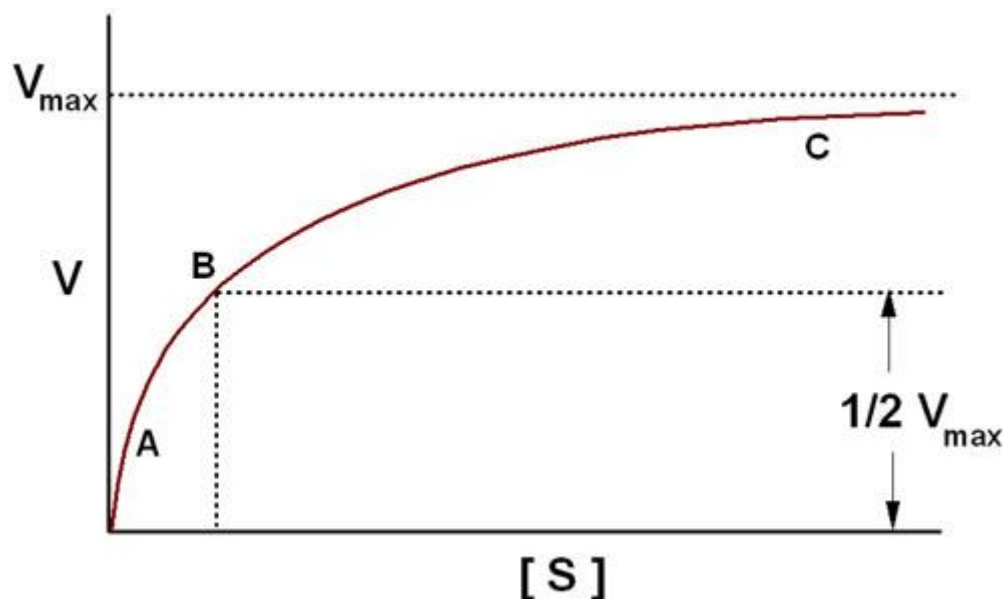
$$V = V_{MAX} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad [2]$$

La ecuación de Michaelis-Menten puede utilizarse para demostrar que a la concentración del sustrato que produce exactamente la mitad de la velocidad máxima de la reacción, la concentración del sustrato es numéricamente igual a  $K_m$ . Este hecho provee una herramienta bioanalítica simple pero útil que se ha utilizado para caracterizar enzimas normales y alteradas, como las que producen síntomas de enfermedades genéticas.

La  $K_m$  nos da una idea la afinidad que tiene el enzima por su sustrato, cuanto mayor es  $K_m$  menor es la afinidad, porque ocupa grandes cantidades de sustrato para saturar el 50% de la enzima (predominan las formas E y S libres), cuanto menores  $K_m$  mayor es la afinidad, ya que a bajas concentraciones del sustrato son suficientes para saturar el 50% de la enzima (predomina la forma ES). Para enzimas del tipo de Michaelis-Menten, cuando la velocidad observada de la reacción es la mitad de la máxima velocidad posible, la concentración del sustrato es numéricamente igual a la constante de Michaelis-Menten (Ecuación 3):

$$K_M = [S] \Rightarrow V = \frac{V_{MAX}}{2} \quad [3]$$

La ecuación de Michaelis-Menten tiene la misma forma que la ecuación para una hipérbola (Figura 6)



**Figura 6.** Efecto del incremento en la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente (themedicalbiochemistrypage.org)

Las características están marcadas por los puntos A, B, y C. A altas concentraciones de sustrato la velocidad representada por el punto C es casi igual a la  $V_{max}$ , y la diferencia en la velocidad de la reacción a concentraciones cercanas del sustrato es casi inexistente. Si la curva de Michaelis-Menten se extrapola a concentraciones de sustrato infinitamente altas, la proporción extrapolada es igual a  $V_{max}$ . Cuando la velocidad de la reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, se dice que la velocidades de orden cero. Si la reacción tiene dos sustratos, puede o no puede ser de orden cero en relación al segundo sustrato. Las diferencias muy pequeñas en la velocidad de la reacción a concentraciones de sustrato cercanas al punto C (cerca de  $V_{max}$ ) reflejan el hecho de que a estas concentraciones

casi todas las moléculas de la enzima están unidas al sustrato y la velocidad de cambio es virtualmente independiente del sustrato, por tanto de orden cero. A concentraciones más bajas, tales como en los puntos A y B, las velocidades más bajas de la reacción indican que en cualquier momento solamente una porción de las moléculas de la enzima están unidas al sustrato. De hecho, a la concentración del sustrato indicada por el punto B, exactamente la mitad de las moléculas están en un complejo ES y la velocidad de cambio es exactamente la mitad de la  $V_{max}$ . A concentraciones de sustrato cercanas al punto A la velocidad de cambio parece ser directamente proporcional a la concentración de sustrato, y la proporción de la reacción se dice ser de primer orden.



## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Metodología

Se buscaron microorganismos (mohos) para detectar aminotransferasas, con la reacción de transaminación se identificó la actividad óptica de S-AT y R-AT, se realizaron pruebas de identificación de estereoselectividad de  $\omega$ -AT, donde se detectó R-AT, que se midió directamente con la velocidad inicial de generación de acetofenona, después se procedió a purificar ya reproducir al microorganismo.

Se hicieron cultivos celulares para buscar el método más apropiado para la ruptura celular (dado que la enzima de interés es intracelular), una vez encontrado las células se ponen en contacto con la reacción de transaminación (la reacción de conversión de R-MBA a acetofenona) para después analizarlas por HPLC, evaluando su velocidad de reacción, determinando la temperatura y el pH de reacción, bajo estas condiciones se hacen pruebas para ver su afinidad o inhibición por los sustratos y productos de la reacción, todo esto mediante un análisis en HPLC, donde se detectó la concentración de la acetofenona.

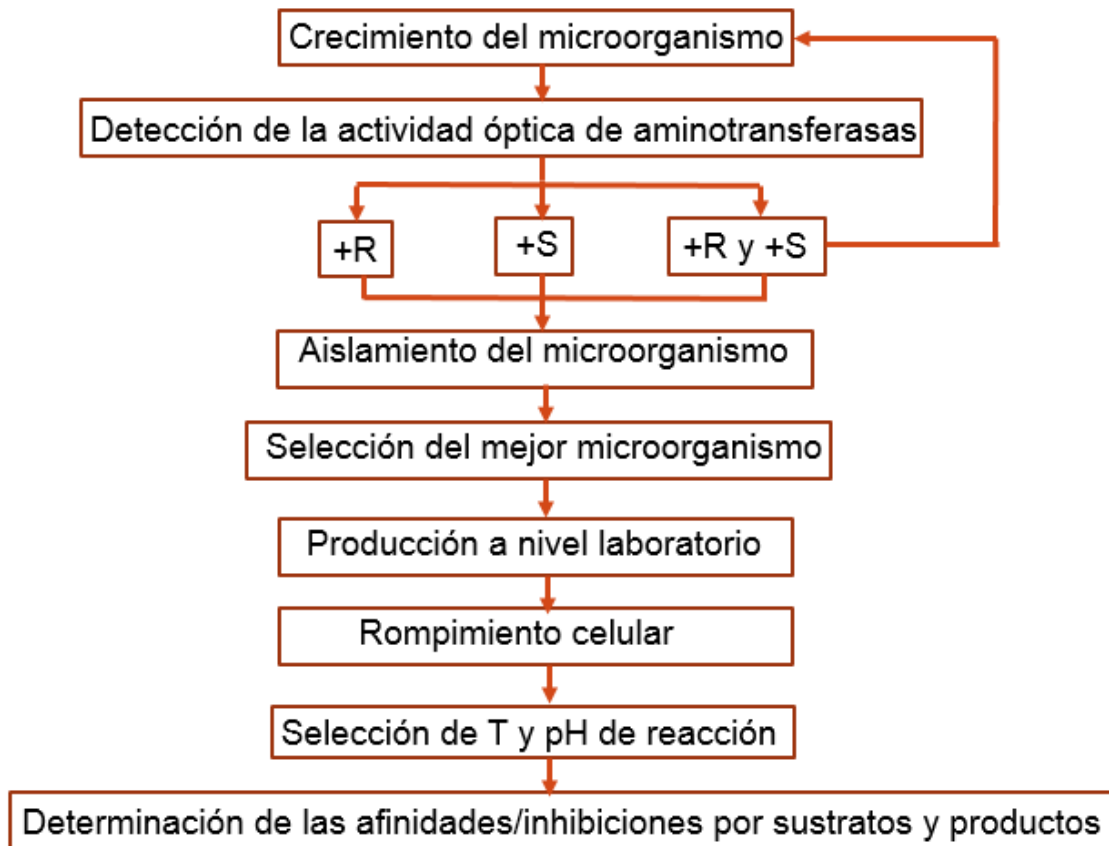


Figura 7. Metodología de la investigación.

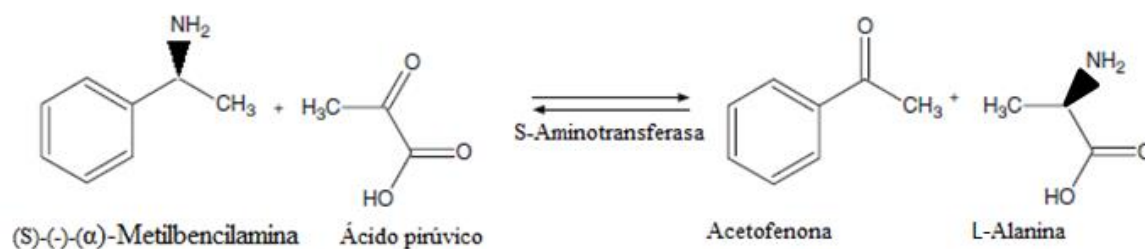
### 3.2 Preparación de la materia prima

Se buscaron microorganismos para la detección de aminotransferasas. Se tomaron muestras de mohos (entre ellos *Fusarium oxysporum*), y se guardaron muestras en recipientes herméticos; Se cultivaron los hongos a 35°C por 24 horas, utilizando una fuente de carbono de 10 g/L de glucosa, 1g/L de urea, 1g/L de fosfato dibásico de potasio y agregando los minerales trazas necesarios.

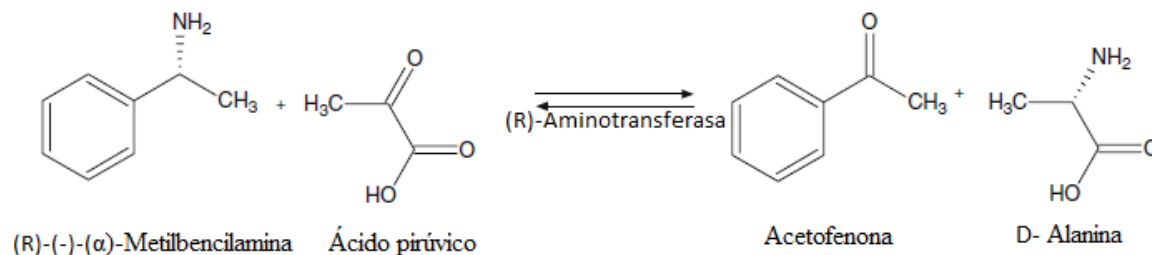
| Medio de cultivo            |   |
|-----------------------------|---|
| Componente                  | Concentración<br>g/L                                  |
| glucosa                     | 10.0  |
| urea                        | 1.0   |
| fosfato dibásico de potasio | 1.0   |
| minerales trazas            | Necesarios, (si se puede especificar cantidad, mejor) |

### 3.3 Reacciones de transaminación

Una sustancia ópticamente activa es la que rota el plano de la luz polarizada, dicha rotación del plano de la luz polarizada (actividad óptica) se mide por medio de un instrumento llamado polarímetro [Rius, 2009]. Las reacciones para la identificación de la actividad óptica de Aminotransferasas son las mostradas en la Figura 8 y Figura 9.



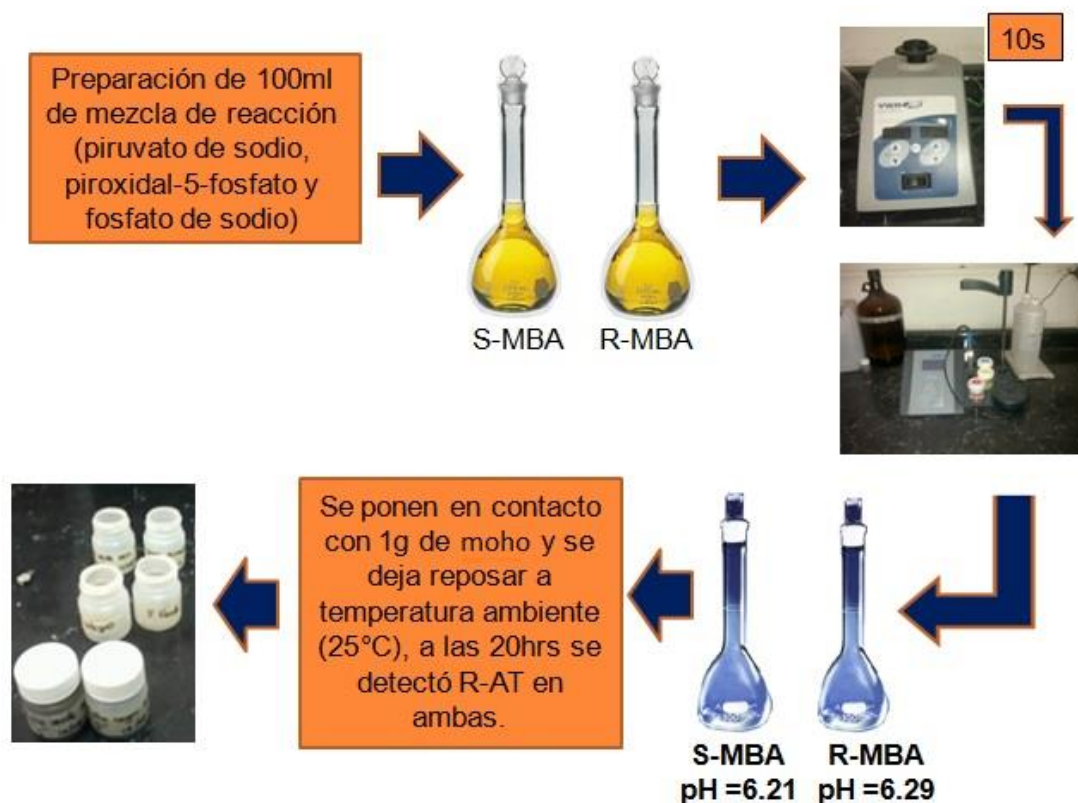
**Figura 8.** Reacción de identificación de S-aminotransferasas.



**Figura 9.** Reacción de identificación de R-aminotransferasas.

### 3.4 Pruebas de identificación de estereoselectividad

Para la identificación de ω-AT en la reacción de conversión de (R)-(-)-(α)-MBA y (S)-(-)-(α)-MBA a acetofenona, en la Figura 10 se llevó a cabo la síntesis en un reactor con camisa de 100mL, utilizando PS 100mM, PLP 1Mm, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, y 1.0 g del moho (*Fusarium oxysporum*). La reacción se inició con 182μL de (R)-(-)-(α)-MBA o (S)-(-)-(α)-MBA como donante del grupo amino, se tomaron muestras de 1mL, se tomaron temperaturas y pH de cada muestra, se dejó reposar a una temperatura de 25°C durante 20 horas después se tomaron muestras de ambos mohos por triplicado en tubos eppendorf de 1mL se agitaron por 10s y se centrifugaron a 10000 RPM por 10 min, luego se tomó el sobrenadante de los tubos Eppendorf y se volvió a centrifugar en un equipo Beckman modelo Microfugeen a las mismas condiciones, se filtraron con filtros milipor de 0.8μm (estas son membranas porosas de celulosa, estas retienen partículas, bacterias o células grandes, que son retenidas en la superficie del filtro, basados en el traslado de micro sólidos desde fluidos) con ayuda de unas jeringas para facilitar el paso del fluido, se juntaron las muestras filtradas de cada moho y se midió el aumento de la absorción entre 250-260nm, en un espectrofotómetro de barrido (UV-2450), que es a la absorción de la acetofenona producida. Se analizaron los mohos tanto en configuración "S" como en "R".

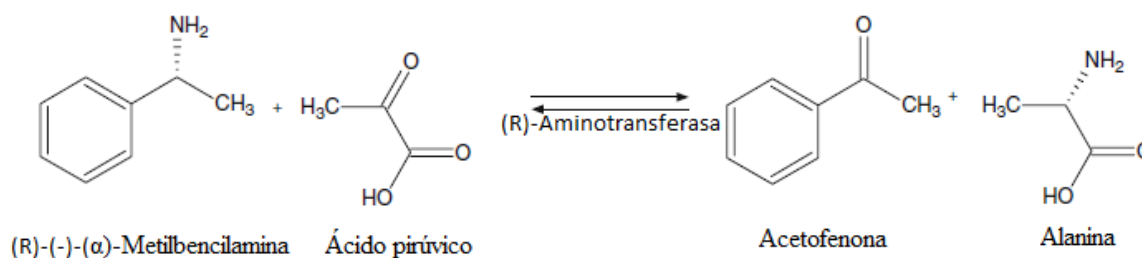


**Figura 10.** Reacción experimental para la detección de R-AT.

### 3.5 Mecanismo de reacción

La reacción de transaminación (Figura 11) con R-MBA (Aldrich) como una amina donadora y piruvato de sodio como aceptor del grupo amino, fue seguida por la medición de la concentración de acetofenona. La reacción de transaminación se llevó a cabo en una escala de 50 mL en un reactor con camisa de 100 mL (Wheaton). La temperatura del reactor se controló con la circulación de agua a la temperatura deseada. Se proporcionó agitación suave por un agitador magnético. La actividad de R-AT se midió directamente con la velocidad inicial de generación de acetofenona. La velocidad de reacción se determinó a través de la medición de las concentraciones de acetofenona a los 10, 20, 30 y 40 minutos. Fueron tomadas muestras de 200  $\mu\text{L}$  que se mezcló con 800  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 N. Estas diluciones fueron analizadas por

HPLC. La mezcla de reacción de los sistemas de prueba de la actividad de R-AT se compone además de R-MBA y SP, piridoxal-5-fosfato y fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).



**Figura 11.** Producción de acetofenona a partir de (R)-(-)-α-Metilbencilamina por transaminación.

### 3.6 Análisis de muestras

Medición de la concentración de acetofenona:

El método de análisis de las fracciones líquidas colectadas durante el pre tratamiento utilizada fue cromatografía líquida de alta eficacia. Las muestras colectadas durante la reacción de transaminación fueron centrifugadas y se analizaron utilizando un volumen de 200  $\mu\text{L}$ . Se analizó por HPLC (Varian Pro Star) utilizando un detector UV a 254 nm, con un flujo de 0.6 mL/min de agua durante 23 min a través de una columna Varian C-18 a 30°C. La composición de la fase de elución fue de 40% (v / v) Metanol y 60% (v / v) de la fase acuosa (agua). El tiempo de elución de acetofenona (Aldrich) fue de 19.8 minutos.

En la tabla 2 se muestra la preparación de una solución A de 3mM (0.003M) que contenía S-MBA (187 $\mu\text{L}$ ), R-MBA (187 $\mu\text{L}$ ) y Acetofenona (174 $\mu\text{L}$ ), en un volumen de 100mL, esto para obtener la curva de calibración de la Acetofenona.

**Tabla 2.** Preparación para obtener la curva de Acetofenona

| Vol. Solución A (mL) | Vol. Agua (mL) | Concentración (mM) |
|----------------------|----------------|--------------------|
| 2.0                  | 8.0            | 3.0                |
| 1.0                  | 9.0            | 1.5                |
| 0.5                  | 9.5            | 0.75               |
| 0.25                 | 9.75           | 0.375              |
| 0.125                | 9.875          | 0.1875             |
| 0.0625               | 9.9375         | 0.09375            |

Al tener la curva de calibración obtenemos el área a la que absorben (por ejemplo la acetofenona  $\approx 254$  nm).

### 3.7 Purificación del microorganismo

La mayoría de los microorganismos (m.o) no se encuentran aislados, si no integrados en poblaciones mixtas, para ver la propiedad de estos m.o es necesario trabajar con especies aisladas obteniendo cultivos axenicos o puros. Este cultivo es el que tiene un solo tipo de m.o y que procede generalmente de una célula. Para el aislamiento se preparó medio de cultivo para mohos, se partió de solución tween 80 (surfactante de polysorbato que se usa para estabilidad y su no-toxicidad) al 1%, preparando 200 mL (son 16 tubos de 9mL c/u) al 0.05%, en la ecuación 1 se determinó el volumen necesario para esas condiciones de solución tween.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(0.05\%)(200\text{mL})}{1\%} = 10 \text{ mL} \quad [4]$$

Para el medio de cultivo son 20 mL por caja Petri, 320 mL (16 cajas), 7 mL cada tubo de la solución.

Se utilizó medio de cultivo Agar dextrosa Sabourad:

65g → 1000mL

x → 350 mL

22.75 g de agar/350 mL (medio de cultivo)

Para la preparación del medio de cultivo para mohos se utilizaron: matraces erlen meyer, tubos de ensaye, cajas Petri, pipetas serológicas, solución tween 80 del 1% al 0.05%, matraces volumétricos, agar dextrosa sabouraud (65g/L), como se muestran algunos en la Figura 12 se esterilizó todo el material, junto con el medio de cultivo y solución tween.

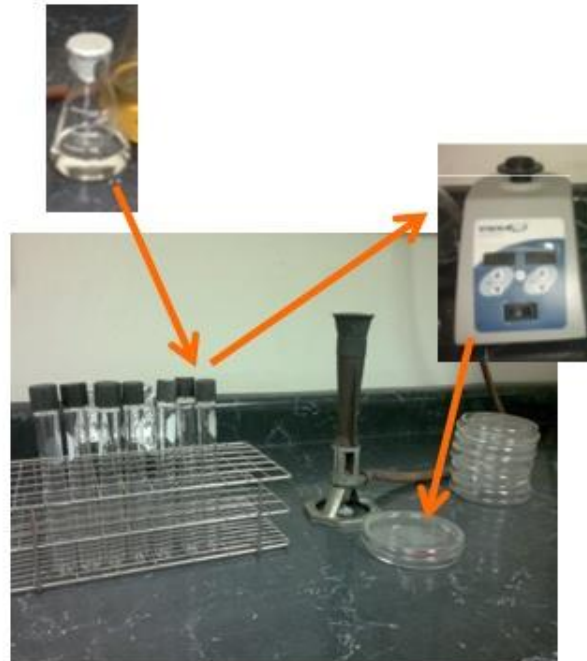


**Figura 12.** Materia prima para la preparación de medios de cultivos para los hongos.



Después que se esterilizó todo, se colocó el medio de cultivo a las cajas petri, con la ayuda de un mechero. como se muestra en la Figura 13 el cuarto de siembras se tomó del matraz del hongo verde con tween 0.05% ya agitado, 1mL y se colocó en el tubo de ensaye  $10^{-1}$ , de ahí a una placa petri marcada con  $10^{-1}$  también, luego se tomó 1 mL de la  $10^{-1}$  para  $10^{-2}$ , se agito en el vortex y se pasó 1 mL a su placa ( $10^{-2}$ ), de la  $10^{-2}$  se pasó al tubo  $10^{-3}$  y de ahí a su placa ( $10^{-3}$ ) y luego del tubo  $10^{-3}$  se pasó al tubo  $10^{-4}$  se agito y a su placa ( $10^{-4}$ ) y de ahí para adelante igual hasta el tubo y placa  $10^{-8}$ . Se esperó a que solidificaran como se muestra en la Figura 14. Se hizo lo mismo pero con otros tubos y placas (limpias) para el hongo negro, todo se trabajó sobre una mesa limpia con cloro, y mecheros, así como la bata, lentes y cubre bocas dado que los mohos se dispersan muy fácil en el medio mediante sus esporas.

Se metieron a la incubadora a  $28^{\circ}\text{C}$  todas las cajas Petri y en 7 días se observó buen crecimiento. Se aisló de las más diluidas ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) en la campana de flujo laminar, con la ayuda de un aza y un mechero en cajas petri nuevas con agar. Se colocó el hongo aislado en el centro de una nueva caja petri (con agar) y se metieron a incubar a  $T \approx 28^{\circ}\text{C}$ . Repitiéndose lo anterior hasta obtener crecimiento de ambos hongos en cada placa.

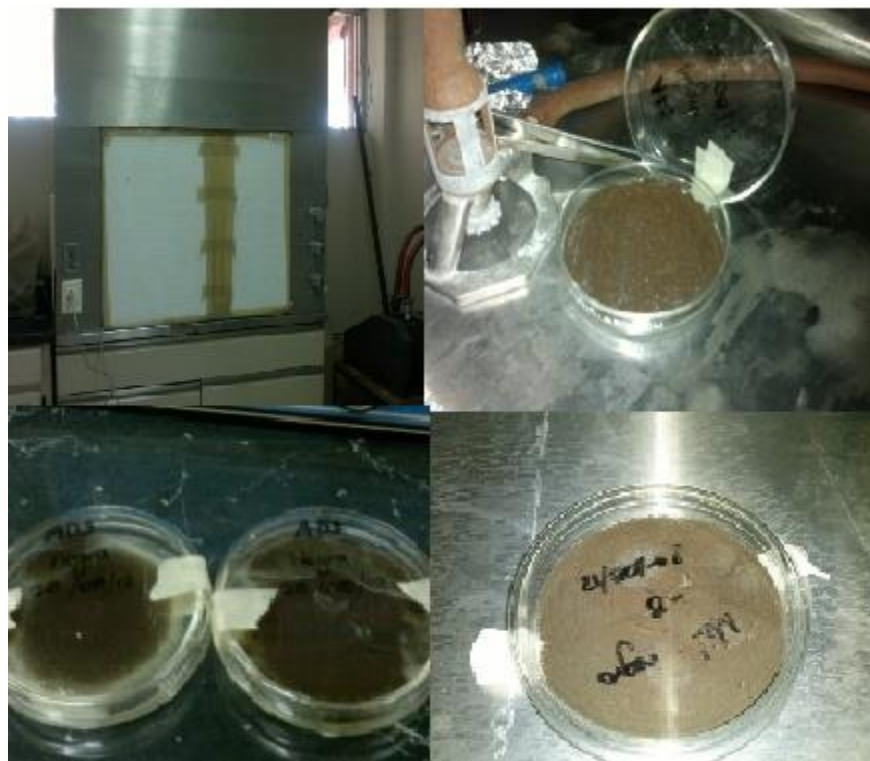


**Figura 13.** Proceso de aislamiento.



**Figura 14.** Proceso de solidificación.

En la Figura 14 se observa el crecimiento de los microorganismos después de 7 días en la incubadora, se obtuvo muy buen crecimiento y se aislaron de las más diluidas ( $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ).



**Figura15.** Crecimiento de los microorganismos.

Después de obtener los hongos aislados, se esterilizó todo lo demás para aislar un microorganismo de un proceso infeccioso, es necesario inocularlo en un sistema estéril con calor húmedo en una autoclave con vapor fluyente a  $120^{\circ}\text{C}$  por 30 min.

### 3.7.1 Preservación de los hongos (etapa latente)

Al preservarlos mantendremos su pureza, viabilidad y estabilidad del cultivo. Para evitar la degeneración y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y

retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación en las características deseables de una cepa, se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como la carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo; acumulación de secreciones tóxicas propios del metabolismo del hongo; alteración del pH en el medio [Alarcón, 2006].

En la Ecuación 5 se determinó el volumen de glicerol necesario para preparar una solución de glicerol al 10%, en un matraz de 50 mL, se agito bien y se colocó 1 mL a cada tubo eppendorf.

$$V_1 = \frac{(10\%)(50\text{mL})}{100\%} = 5\text{mL} \quad [5]$$

Después de tener los 25 tubos eppendorf en una gradilla cubierta con aluminio, se esterizaron (los tubos destapados con el mL de glicerol). Se dejó enfriar y con la ayuda de un mechero se taparon los tubos para añadirles (con la ayuda del cortador) el hongo tanto negro como el verde. Se dejaron enfriar bien los viales (en el refrigerador) y ya crecidos se tapan bien y se guardaron en el congelador para conservarlos.

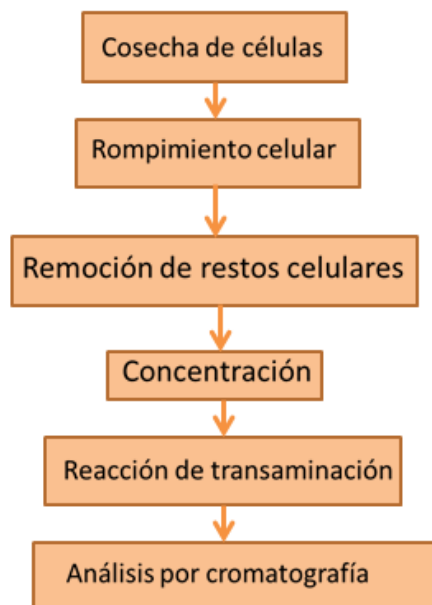
Para la identificación del hongo se utilizó una técnica basada en un análisis molecular, clonación, purificación del producto de PCR, cuantificación de ADN y secuenciación, realizada por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). La técnica utilizada fue PCR con oligos ITS 1 e ITS 4 (ISBM01), el equipo utilizado fue una cámara de electroforesis marca ThermoScientific, termocirculador marca Appliedbiosystems, foto documentador de geles marca Bio-Rad. Para la secuenciación las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer, el equipo utilizado fue el secuenciador automatizado 3130 Series Genetic Analyzer, Termocirculador Verety para PCR punto final, Espectrofotómetro NANODRP 1000 (Thermo Scientific) y Concentrador centrifugo (Eppendorf).

### 3.8 Rompimiento celular

Para la cosecha de células se preparó una solución de 500 mL que contenía 0.5 g de urea, 0.5 g de fosfato de potasio, 5.0 g de azúcar, se esterilizó y después se hizo la inoculación con el moho (*Fusarium oxysporum*). Para obtener la masa celular en su peso húmedo, se filtró en vacío el cultivo celular con un papel filtro (Whatman) de 150mm (filtros cuantitativos que están diseñados para el análisis de gravimetría y para la preparación de muestras para el análisis con instrumentos), se tomaron las células retenidas y se taro en un tubo centrifuga, y se determinó el peso del sedimento (1.55g/500mL). Dado que la enzima de nuestro interés está en el interior de la célula, se prosiguió a un rompimiento de pared celular del moho (*Fusarium oxysporum*), y mediante el rompimiento celular se podrán liberar los productos intracelulares y poder así tener libre la enzima que se busca. Para la elección del método de rotura se toma en cuenta la susceptibilidad de la célula, la estabilidad de la enzima, la velocidad del método, la facilidad de separación de los restos celulares y el costo del proceso.

Se probaron varios métodos de rotura celular del hongo, sin embargo el que nos dio buenos resultados fue utilizando un método físico como es el congelamiento y descongelamiento, utilizando Nitrógeno líquido, el cual al congelarse forma cristales muy fríos que rompen células cuando esta se descongela rápidamente a 37°C, este método es eficiente para tejidos animales, vegetales y masas microbianas, que se pueden congelar con Nitrógeno líquido y molerlos en un mortero común.

Se pusieron en contacto 1.2 g de células libres en un mortero en la campana de flujo laminar, se cubrieron con Nitrógeno líquido utilizando todas las medidas necesarias para su uso, se evaporó el Nitrógeno y se cristalizaron las células, después se molieron bien en el mortero para después ponerse en contacto con la reacción de transaminación en las condiciones necesarias, para después ser analizadas por HPLC, como lo muestra el diagrama de la Figura 16.



**Figura 16.** Diagrama del rompimiento celular.

### 3.9 Determinación del efecto de la temperatura

La temperatura óptima es cuando el microorganismo registra la máxima velocidad de crecimiento y las reacciones enzimáticas ocurren a la máxima velocidad posible. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento es complejo, cada reacción química individual es afectada por la temperatura, por lo que un incremento de ésta resulta en una mayor velocidad de reacción. La temperatura mínima es la que el microorganismo ya no se detecta crecimiento a valores más bajos de temperatura, la actividad metabólica es mínima, las membranas se hacen más rígidas y los procesos de transporte son limitados o inexistentes y en la temperatura máxima es en la que el crecimiento no existe y se hace insostenible todo proceso bioquímico por la desnaturalización de proteína y enzimas, [Madigan et al., 2004].

El efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de células que contienen R-AT a 32.5 ° C (cámara de temperatura constante) se llevó a cabo con 1.2 g de enzima libre a 50 mL de

solución a un pH de 6.28. En la Ecuación 6 vemos el modelo que describe el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción.

$$V = V_0 + \frac{A}{w \sqrt{\frac{w}{2}}} e^{(-2 \frac{(T - T_c)^2}{w^2})} \quad [6]$$

Donde  $v$  es la velocidad de formación de acetyofenona en  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $v_0$  es un parámetro de ajuste con unidades de  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $w$  esta en  $^\circ\text{C}$  y representa la amplitud del pico de actividad donde se muestran las actividades enzimáticas de mayor magnitud,  $T$  es la temperatura en  $^\circ\text{C}$  a la cual fue realizado el experimento,  $T_c$  corresponde a la temperatura en  $^\circ\text{C}$  en la cual el pico de actividad presenta su máximo,  $A$  es un parámetro de ajuste del modelo para describir el pico de actividad que tiene unidades de  $\mu\text{M}^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### 3.10 Determinación del efecto del pH

Independientemente del pH que pueda soportar un microorganismo, es importante conocer cuál es el pH óptimo para el crecimiento. Durante el crecimiento los microorganismos modifican el pH del medio de cultivo, normalmente haciéndolo disminuir; por tal motivo es frecuente incluir en el medio sustancias que actúen como tampón (buffer) a fin de evitar que el pH se aleje del óptimo. Cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima y en consecuencia su inactivación. Muchas enzimas tienen máxima actividad cerca de la neutralidad en un rango de pH de 6 a 8 [Hernandez Gil, 2002].

Las velocidades iniciales de muchas reacciones enzimáticas exhiben curvas en forma de campana como función del pH. Estas reflejan ionizaciones de ciertos restos de aminoácidos que deben estar en un estado de ionización específico para la actividad enzimática [Voet, 2004].

El efecto del pH sobre la velocidad inicial de células que contienen R-AT a un pH de 6.28 (cámara de pH constante) se llevó a cabo con 1.2 g de enzima libre a 50 mL de solución a una temperatura de 32.5°C. Por último, se midió la actividad de R-AT a través de la velocidad inicial de reacción. En la Ecuación 7 vemos el modelo que describe el efecto del pH en la velocidad de reacción.

$$v = \frac{V_m[S]}{K'_m \left[ 1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1} \right] + [S]} \quad [7]$$

Donde  $v$  es la velocidad de formación de acetofenona en  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $V_m$  es un parámetro de ajuste con unidades de  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $S$  es la concentración del sustrato en  $\mu\text{M}$ ,  $K'_m$  es una constante aparente de Michaelis Menten en unidades de mM que es función del pH,  $H^+$  es la concentración molar de iones hidronio, y finalmente los valores  $K_1$  y  $K_2$  son parámetros de ajuste del modelo con unidades de concentración molar de iones hidronio.

### 3.11 Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia

Se utilizó un HPLC marca Varian Pro Star que fue utilizado para el análisis de las muestras, con sistema de bombeo y con los detectores IR y UV-VIS (dado que son sustancias que absorben esta radiación). También se utilizó un horno calentador marca Eppendorf® Modelo CH-30. Para la realización de esta investigación el sistema de HPLC utilizado trabajó con una columna HI-PLEX H Marca Varian C1890A 250x4.6mm, que contiene una fuerte resina de intercambio catiónico (las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidos, las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente y son retenidas), que consiste de estireno sulfonado entrecruzado con co-polímero de divinil benceno; el diámetro de partícula de esta columna es de 7-11  $\mu\text{m}$ , la fase móvil fue 40:60 Etanol-Agua Marca Fermont H5052 para HPLC. Después de poner en contacto la enzima libre con la reacción con R-AT, se detiene la reacción con HCl en tubos eppendorf para ser analizados en el HPLC, se analizaron concentraciones de acetofenona de 0 a 0.375mM con relación a su área para obtener su curva de calibración y poder medir las concentraciones de sustancias en la muestra en comparación con las



concentraciones conocidas, se analizó la acetofenona en un tiempo de 30min y a los 19.8 minutos se observa un pico (acetofenona) entonces fue seleccionado 23 minutos como tiempo de análisis de muestras..

### **3.12 Determinación de afinidades/inhibiciones por reactivos y productos**

En las condiciones de concentración de la enzima, concentración del PLP, temperatura (32.5°C) y pH (6.28) que favorecen la transaminación fue determinado las afinidades o inhibiciones por (R)-(-)-( $\alpha$ )-metilbencilamina, piruvato de sodio, alanina y acetofenona.

#### **Afinidad/Inhibición por sustratos:**

Se analizó la afinidad/inhibición del PS a diferentes concentraciones en varios experimentos a 15 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM, 120 mM y 140 mM, todos los demás serán constantes (PLP 1 mM, R-MBA 15 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM) en 50mL de reacción, cuidando las condiciones del pH (6.28) y Temperatura (32.5°C) óptimos. El segundo experimento fue con la R-MBA a diferentes concentraciones en varios experimentos a 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM, todos los demás estarán constantes (PLP 1 mM, PS 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM).

#### **Afinidad/Inhibición por productos:**

Se analizó la afinidad/inhibición de la acetofenona, manteniendo la concentración de alanina a 5 veces su concentración máxima, se corrieron experimentos usando 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 veces la concentración máxima de acetofenona (43.574283 $\mu$ M), en 50mL de reacción. Después se analizó la afinidad/inhibición de la alanina, se mantuvo constante la concentración de acetofenona a 5 veces la concentración máxima, utilizando 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 veces la concentración máxima de la alanina (es igual a la concentración de la acetofenona), en 50mL de reacción.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la identificación y caracterización de la  $\omega$ -Aminotransferasa, donde se hizo reaccionar R-(-)- $\alpha$ -Metilbencilamina como donante del grupo amino con una aminotransferasa selectiva de R, para obtener acetofenona, donde la actividad de R-AT fue medido por la producción de acetofenona. Se obtuvo la determinación de parámetros aparentes de temperatura y pH de reacción obtenidos mediante los modelos matemáticos que mejor se ajustaron a los datos experimentales, también se presentan las afinidades que se mostraron por los reactivos y productos de la reacción.

#### 4.1 Identificación de $\omega$ -Aminotransferasa

Se buscaron microorganismos estereoespecíficos, se encontró que un hongo purificado e identificado (*Fusarium oxysporum*) mostro estereoespecificidad por R-MBA. Se identificó  $\omega$ -AT con la producción de acetofenona en la reacción de conversión de R-MBA, detectándose un aumento de absorción debido a la acetofenona formada. Los demás sustratos no contribuyen de forma significativa a la absorción de forma que la velocidad de reacción puede determinarse mediante la medida de absorción de la acetofenona.

Tabla 3. Identificación de  $\omega$ -AT

| Microorganismo           | ConFiguracion R | ConFiguracion S |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Saccharomyces cerevisiae | ✓               | ✓               |
| M.O aislado verde        | ✓               | x               |
| M.O aislado negro        | ✓               | x               |

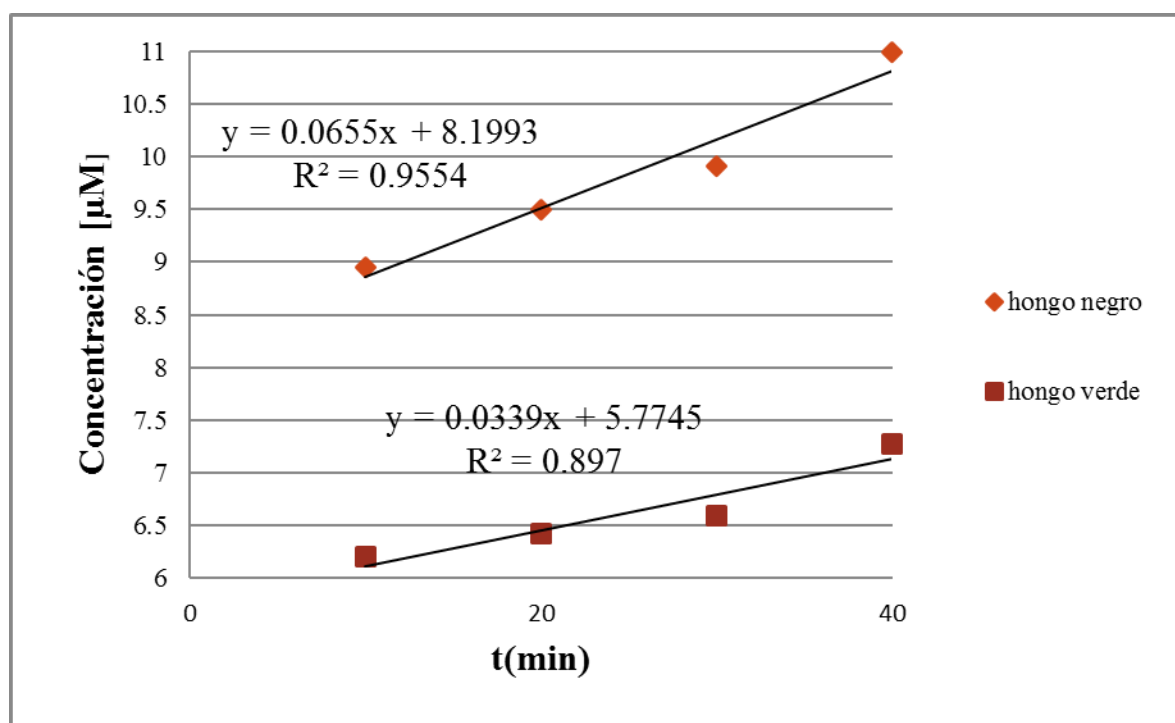
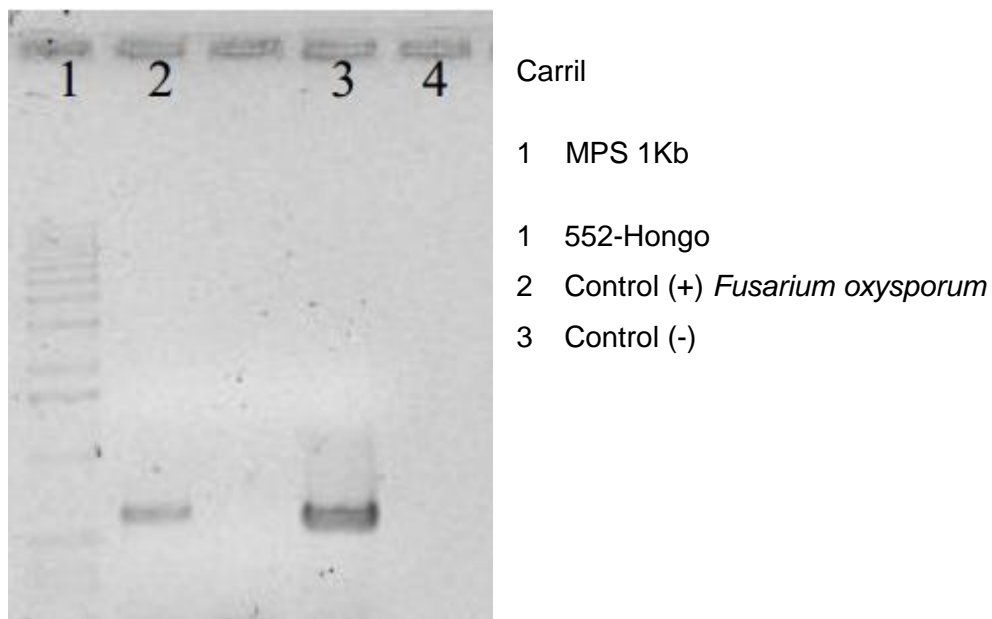


Figura 17. Selección del mejor microorganismo.

## 4.2 Identificación del hongo

Dado que los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y poder identificarlos, se mandó identificar el hongo negro que es el que mostro mayor actividad, se mandaron muestras ya aisladas para identificarlo al IPICYT, donde se obtuvo un producto de PCR para analizarlo por secuenciación donde la prueba PCR dió positivo para ese tipo de hongo.

En la Figura 18 se muestra la gel de agarosa al 1.0% mostrando los resultados de la prueba de PCR para la detección de hongos, dando positivo para el hongo tipo *Fusarium oxysporum*.



**Figura 18.** Prueba de PCR para la detección de hongos

### 4.3 Efecto del rompimiento celular

Con el rompimiento de pared celular se pudo liberar nuestra enzima de interés y mejorar así la velocidad de producción, se realizaron varios experimentos y al final el que mostro el mejor resultado fue el rompimiento de pared celular con Nitrógeno líquido, con el cual obtuvimos los siguientes resultados, en la tabla 3 se muestran resultados de la primera velocidad de acetofenona detectada a 28°C y un pH de 6.29

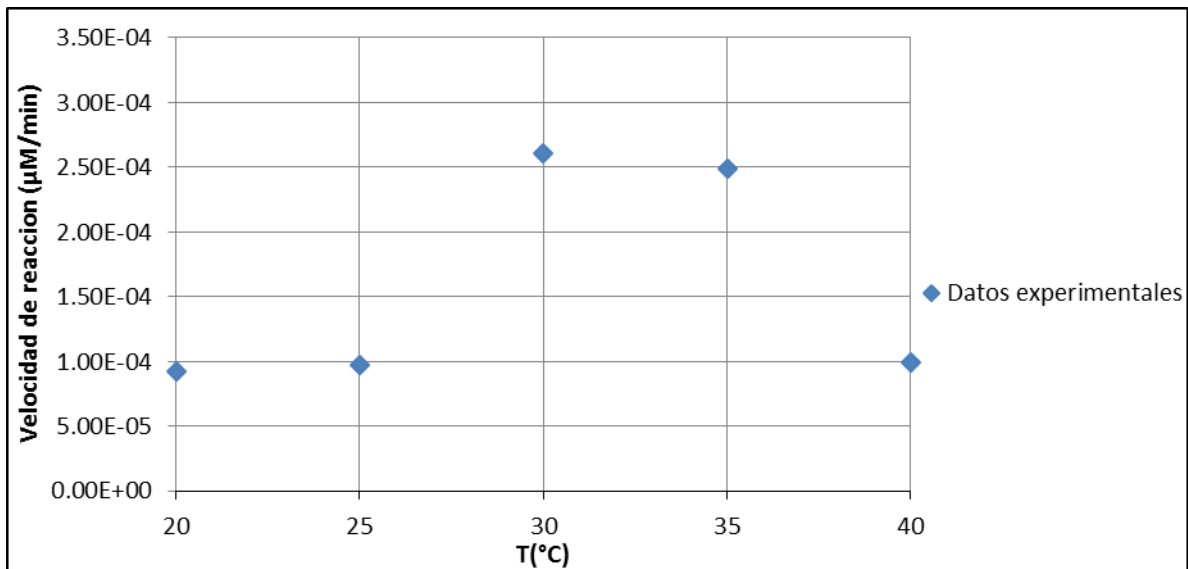
**Tabla 4.** Velocidad de la Acetofenona después de la ruptura con Nitrogenito líquido.

| tiempo (min) | Área   | µM                      |
|--------------|--------|-------------------------|
| 10           | 123053 | 34.3                    |
| 20           | 133899 | 37.3                    |
| 30           | 151676 | 42.2                    |
| 40           | 156434 | 43.6                    |
| 50           | 163467 | 45.5                    |
| Velocidad    |        | <b>0.288 µmol/L*min</b> |

En la siguiente sección se muestran resultados utilizando células rotas de *Fusarium Oxysporum* con Nitrógeno líquido, pero variando su temperatura y pH de reacción para tener una mayor velocidad de producción.

#### 4.4 Selección de la temperatura y pH de reacción

Se realizaron varios experimentos con diferentes temperaturas y pH, hasta encontrar los valores adecuados para la reacción. En Figura 19 se muestran las velocidades iniciales de formación de acetofenona obtenidas a diversas temperaturas; información con las cuales fueron estimadas las velocidades iniciales de reacción a cada temperatura.



**Figura 19.** Efecto de la temperatura en la velocidad de producción de acetofenona

Para estimar la temperatura adecuada para la reacción, se utilizó el siguiente modelo:

$$v = v_0 + \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{\left(-2\frac{(T-T_c)^2}{w^2}\right)} \quad [8]$$

Donde  $v$  es la velocidad de formación de acetyfenona en  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $v_0$  es un parámetro de ajuste con unidades de  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $w$  esta en  $^{\circ}\text{C}$  y representa la amplitud del pico de actividad donde se muestran las actividades enzimáticas de mayor magnitud,  $T$  es la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$  a la cual fue realizado el experimento,  $T_c$  corresponde a la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$  en la cual el pico de actividad presenta su máximo,  $A$  es un parámetro de ajuste del modelo para describir el pico de actividad que tiene unidades de  $\mu\text{M}^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Al ajustar el modelo a los datos experimentales, fue obtenida la siguiente información:

$$v_0 = 9.28 \times 10^{-5} \mu\text{M}/\text{min}$$

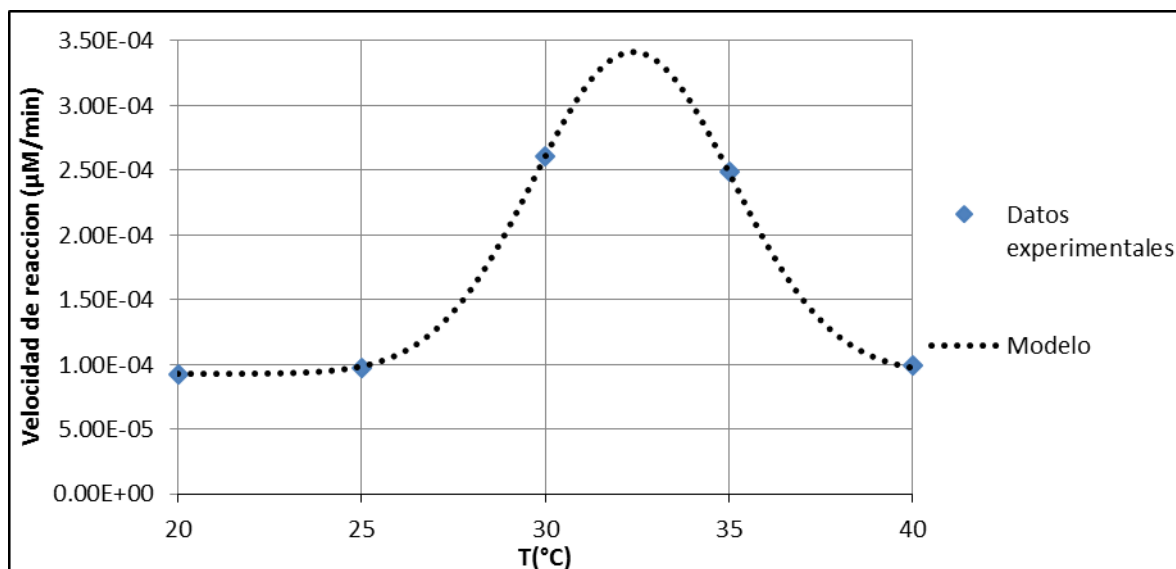
$$T_c = 32.39411^{\circ}\text{C}$$

$$w = 5.39489^{\circ}\text{C}$$

$$A = 0.00168 \mu\text{M}^{\circ}\text{C}/\text{min}$$

$$R^2 = 0.99952$$

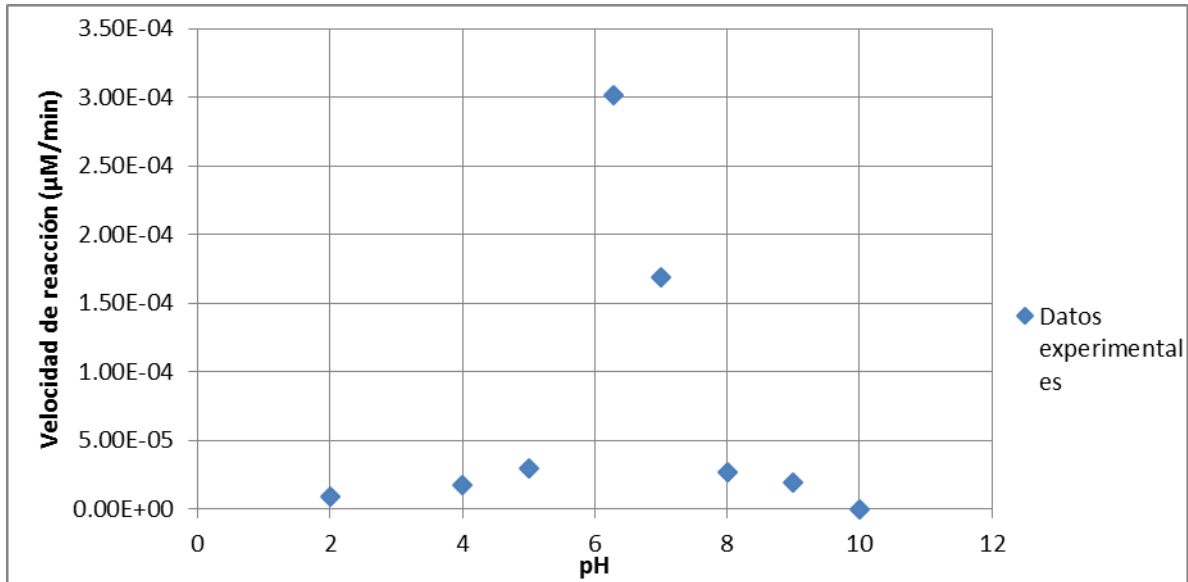
El ajuste muestra que  $T_c \approx 32.4^{\circ}\text{C}$ , el cual es considerado como la temperatura adecuada para realizar la reacción; así mismo muestra que  $R^2 = 0.99952$ .



**Figura 20.** Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción, en la obtención de la temperatura óptima.

Se realizaron varios experimentos con diferentes temperaturas y pH, hasta encontrar los valores adecuados para la reacción. En la Figura 21 se muestran las velocidades iniciales de formación de acetofenona obtenidas a diversos valores de pH.





**Figura 21.** Efecto del pH en la velocidad de producción de acetofenona

Para estimar el pH adecuado para la reacción, se utilizó el siguiente modelo:

$$v = \frac{V_m[S]}{K'_m \left[ 1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1} \right] + [S]} \quad [9]$$

Donde  $v$  es la velocidad de formación de acetofenona en  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $V_m$  es un parámetro de ajuste con unidades de  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $S$  es la concentración del sustrato en  $\mu\text{M}$ ,  $K'_m$  es una constante aparente de Michaelis-Menten en unidades de  $\text{mM}$  que es función del pH,  $H^+$  es la concentración molar de iones hidronio, y finalmente los valores  $K_1$  y  $K_2$  son parámetros de ajuste del modelo con unidades de concentración molar de iones hidronio.

Al ajustar el modelo a los datos experimentales, fue obtenida la siguiente información:

$$V_{\max} = 3.01 \times 10^{-4} \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K'_m = 14.18785147 \text{mM}$$

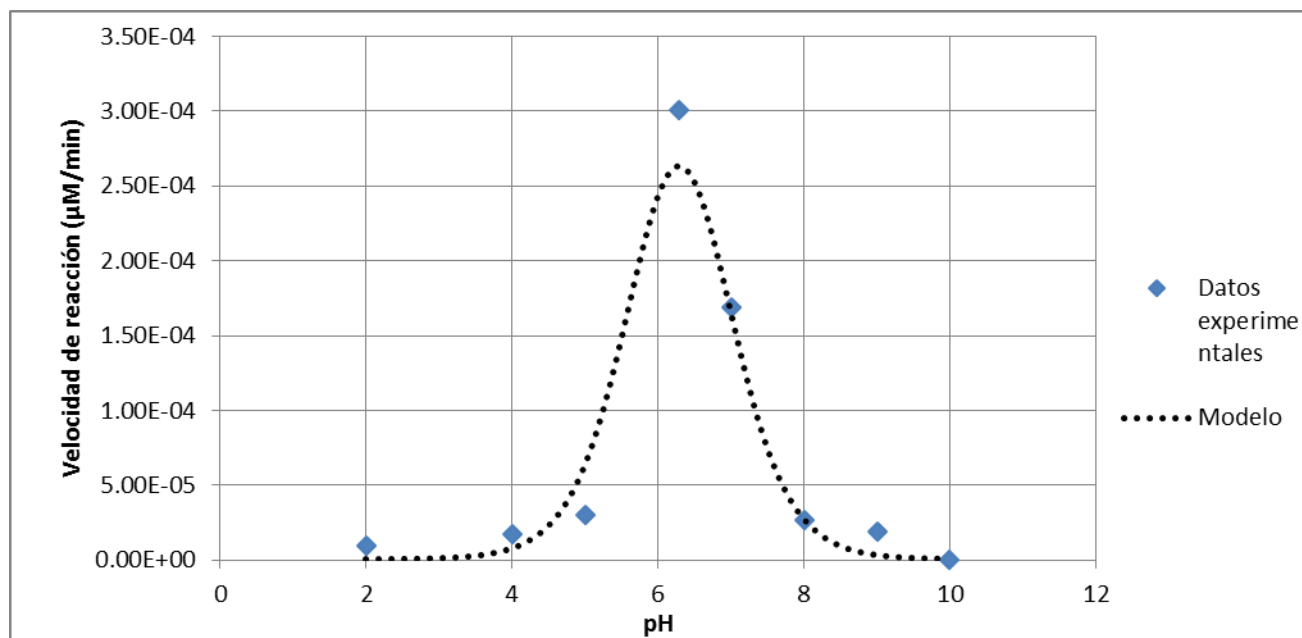
$$k_2 = 2.98 \times 10^{-7} \text{mM}$$

$$k_1 = 8.78 \times 10^{-7} \text{mM}$$

$$S = 15.28789645 \mu\text{M}$$

$$R^2 = 0.98573$$

Se encontró que el pH óptimo era de 6.28, por inspección del gráfico correspondiente dado que es el punto donde experimentalmente fue obtenida la mayor velocidad de reacción.

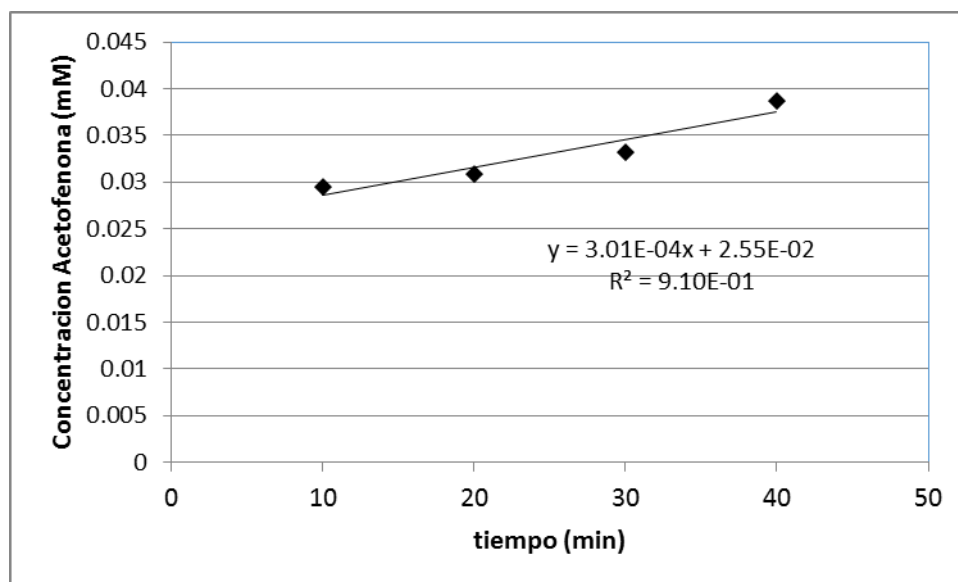


**Figura 22.** Efecto del pH en la velocidad de producción de acetofenona

La mayor actividad de la enzima se mostró a una temperatura de 32.5°C disminuyendo su actividad en temperaturas superiores a los 40°C y por debajo de los 25°C, el pH óptimo fue de 6.28, declinando su actividad a un pH superior de 7 y por debajo de 4, con la temperatura y pH óptimos presentando una velocidad de 0.301µM/min.

#### 4.5 Máxima velocidad de producción de acetofenona

La cantidad de enzimas presentes en un fluido biológico es muy difícil de determinar en miligramos o moles, una forma es midiendo la velocidad de reacción catalizada por la misma empleando un sustrato específico. La velocidad de reacción puede expresarse como la cantidad de reactivo que se transforman en producto por unidad de tiempo, dicha velocidad es el cambio en la concentración de reactivos o productos inmediatamente después de que la reacción se inicia, es decir aun cuando la reacción es lineal. La actividad de R-AT se midió directamente con la velocidad inicial de la generación de la acetofenona (Figura 23), la cual se obtuvo a los 19.8 minutos por HPLC, dando una velocidad de producción de 0.301µM/min, en sus condiciones óptimas de 32.5°C y pH de 6.28.



**Figura 23.** Velocidad de producción de Acetofenona a 32.5°C y pH de 6.28

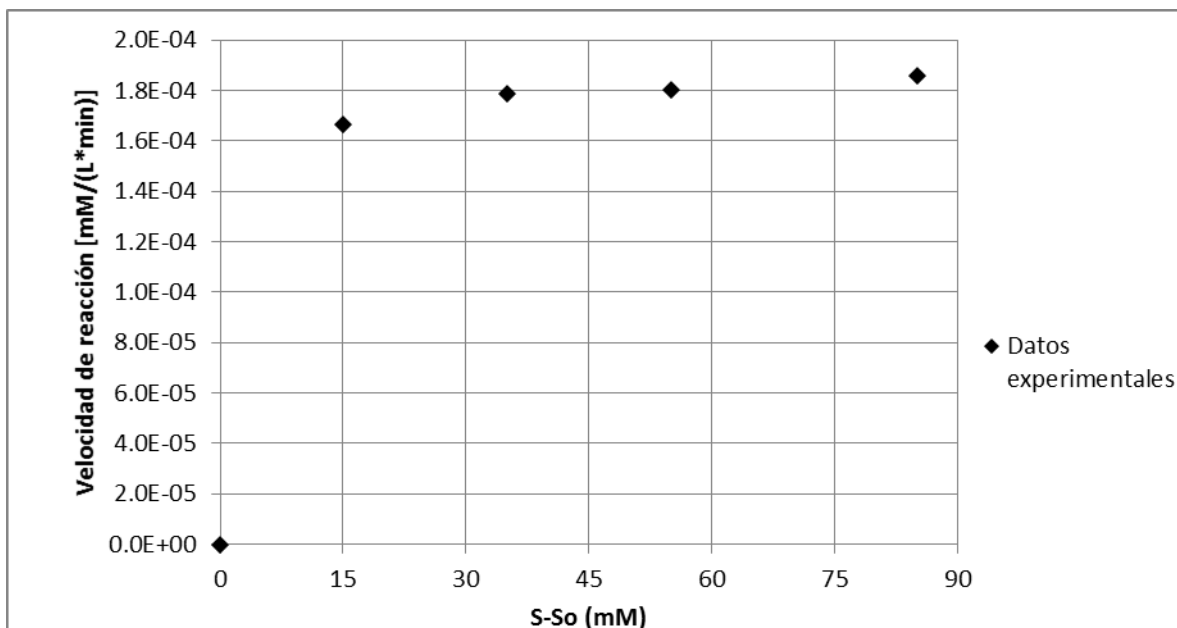
#### 4.6 Efecto de las afinidades/inhibiciones de los reactivos y productos

Como las enzimas no se consumen en las reacciones, los cambios ocurren en la concentración del sustrato o bien del producto, la espectrofotometría permite detectar los cambios en la absorbancia de la luz por parte del sustrato o del producto midiendo en forma continua la velocidad de la reacción. En este experimento no se encontró inhibición por parte de ningún sustrato o producto de la reacción, dado que no se observa una disminución progresiva de la actividad a mayores concentraciones del sustrato o producto.

##### Resultados de las afinidades/inhibiciones por los sustratos:

##### AFINIDAD POR PIRUVATO DE SODIO

Las afinidades de piruvato de sodio fueron determinadas a 32.5°C y pH de 6.28 usando concentraciones en el rango de 0 a 100 mM. Los resultados son mostrados en la siguiente gráfica.



**Figura 24.** Efecto del PS en la velocidad de reacción.

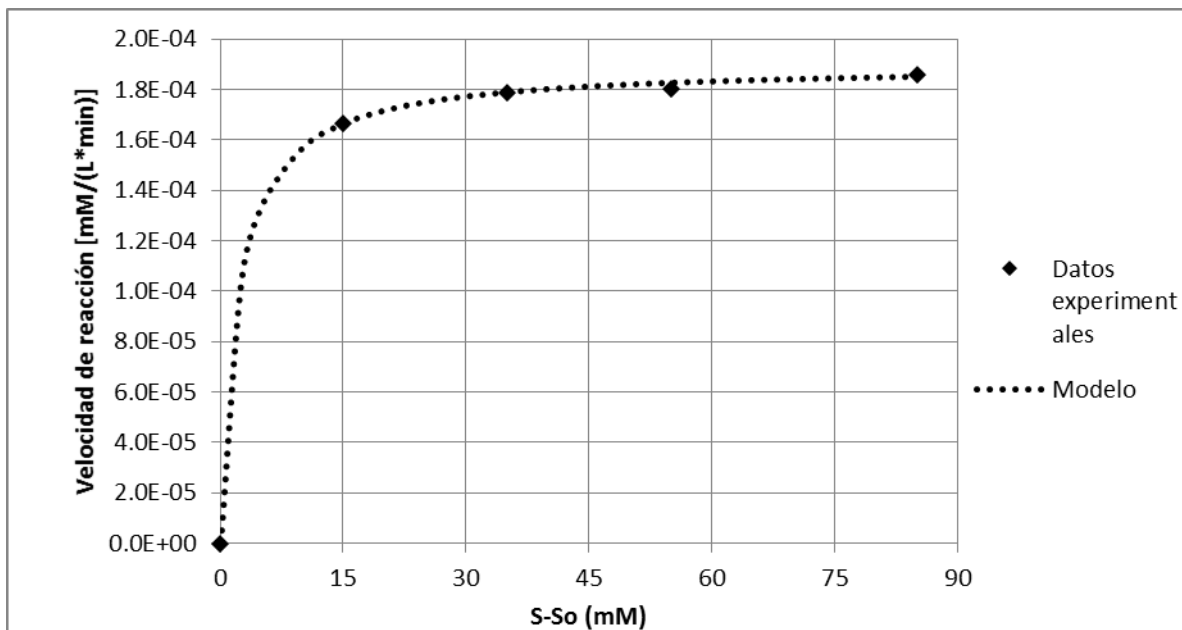
Los datos experimentales de la Figura 24 fueron analizados mediante la Ecuación 10.

$$V = V_{max} \left( \frac{(S - S_0)}{k_m + (S - S_0)} \right) \quad [10]$$

Donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $S$  la concentración de piruvato de sodio y  $S_0$  corresponde a la concentración de piruvato de sodio donde la velocidad fue cero experimentalmente, en este caso 15 mM. A partir de los datos experimentales, se calculan los parámetros de la Ec. 10, obteniendo la velocidad máxima es de 0.189  $\mu\text{M}/\text{min}$  y el valor de  $K_m$  2.093 mM.

$$V_{max} = 0.189 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_m = 2.093 \text{ mM}$$

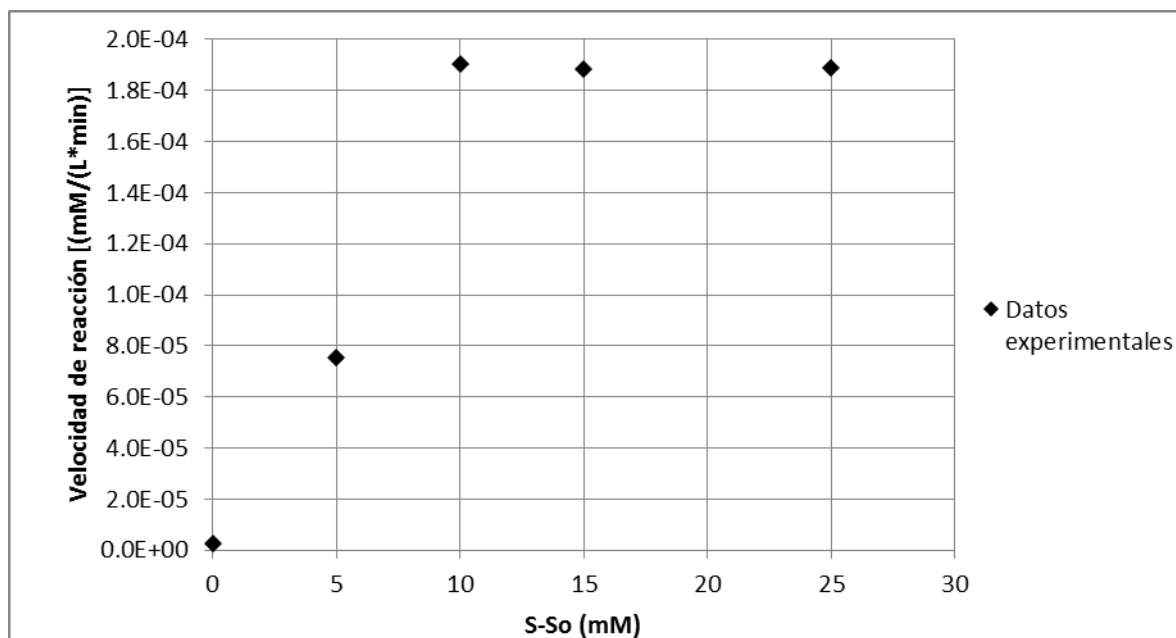


**Figura 25.** Efecto del PS en la velocidad de reacción.

A concentraciones de catalizador (enzima) constante, la velocidad de catálisis no muestra un comportamiento lineal en la gráfica, al aumentar la concentración de sustrato. Inicialmente se observa un comportamiento lineal, al transcurrir la velocidad de reacción se ve una curva asintótica a medida que la concentración del sustrato aumenta donde se alcanza la velocidad máxima (ya que todas las moléculas de la enzima están unidas al sustrato). Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una determinada concentración de sustrato, la velocidad de la reacción aumenta linealmente con el aumento de la concentración del sustrato, como se puede ver en la Figura 25. Sin embargo, cuando aumentamos la concentración del sustrato, la enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima ( $V_{max}$ ), que para el PS dio  $0.189\mu\text{M}/\text{min}$  y para la R-MBA  $0.216\mu\text{M}/\text{min}$ , que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de la concentración del sustrato. No se mostró inhibición por ningún sustrato, sus  $K_m$  nos dio  $2.093\text{ mM}$  para PS y  $2.15\text{ mM}$  para la R-MBA, esto nos da una idea de la afinidad que tienen, dado que dio un valor muy pequeño podemos decir que tiene buena afinidad por los sustratos, predominando la forma de complejo enzima sustrato mostrando una dependencia hiperbólica de la velocidad respecto a la concentración de sustrato, distinguiéndose 3 partes distintas en la curva. En la primera parte, a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad es proporcional a la concentración de sustrato, de tal manera que si se duplica la concentración de sustrato, se duplica la velocidad (reacción de primer orden). La segunda parte de la curva, a concentraciones intermedias de sustrato, la velocidad se incrementa menos que en la primera parte con el incremento de la concentración, iniciando alrededor de la  $\frac{1}{2}$  de la  $V_{max}$ . La última parte de la curva, a altas concentraciones de sustrato, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato (reacción de orden cero), así la velocidad alcanzada es cercana a la máxima.

#### AFINIDAD POR R-MBA

Las afinidades de R-MBA fueron determinadas a  $32.5^\circ\text{C}$  y pH de 6.28 usando concentraciones en el rango de 0 a 30 mM. Los resultados son mostrados en la siguiente gráfica.



**Figura 26.** Efecto de la (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina en la velocidad de reacción.

A partir de los datos experimentales, se calculan los parámetros de la Ec. 10, donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $S$  la concentración de R-MBA y  $S_o$  corresponde a la concentración de R-MBA donde la velocidad fue cero experimentalmente, en este caso 5 mM. Obteniendo una velocidad máxima de 0.216  $\mu\text{M}/\text{min}$  y el valor de  $K_m$  es 2.15 mM.

$$V_{max} = 0.216 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_m = 2.15 \text{ mM}$$

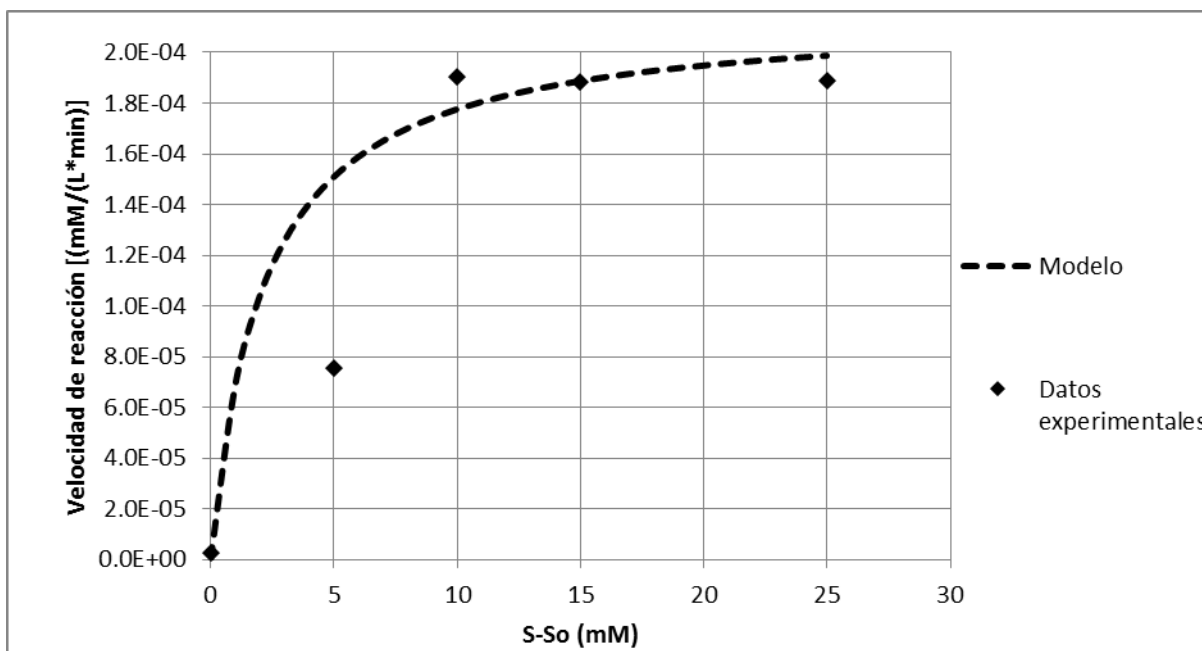


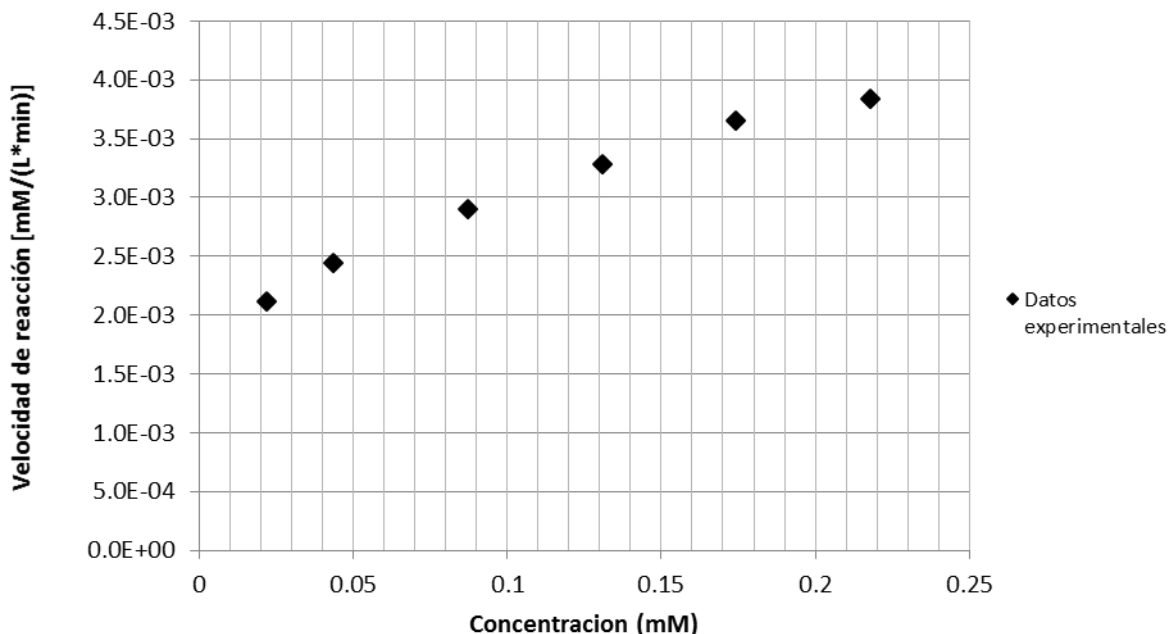
Figura 27. Efecto de la (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina en la velocidad de reacción.

### Resultados de las afinidades/inhibiciones por los productos:

#### AFINIDAD POR ACETOFENONA

Las afinidades por acetofenona fueron determinadas a 32.5°C y pH de 6.28 usando concentraciones en el rango de 0 a 0.25 mM. Los resultados son mostrados en la siguiente gráfica.





**Figura 28.** Efecto de la Acetofenona en la velocidad de reacción.

En la Figura 28 se muestra la velocidad de producción de acetofenona, cuando inicialmente está presente una cierta concentración de esta sustancia.

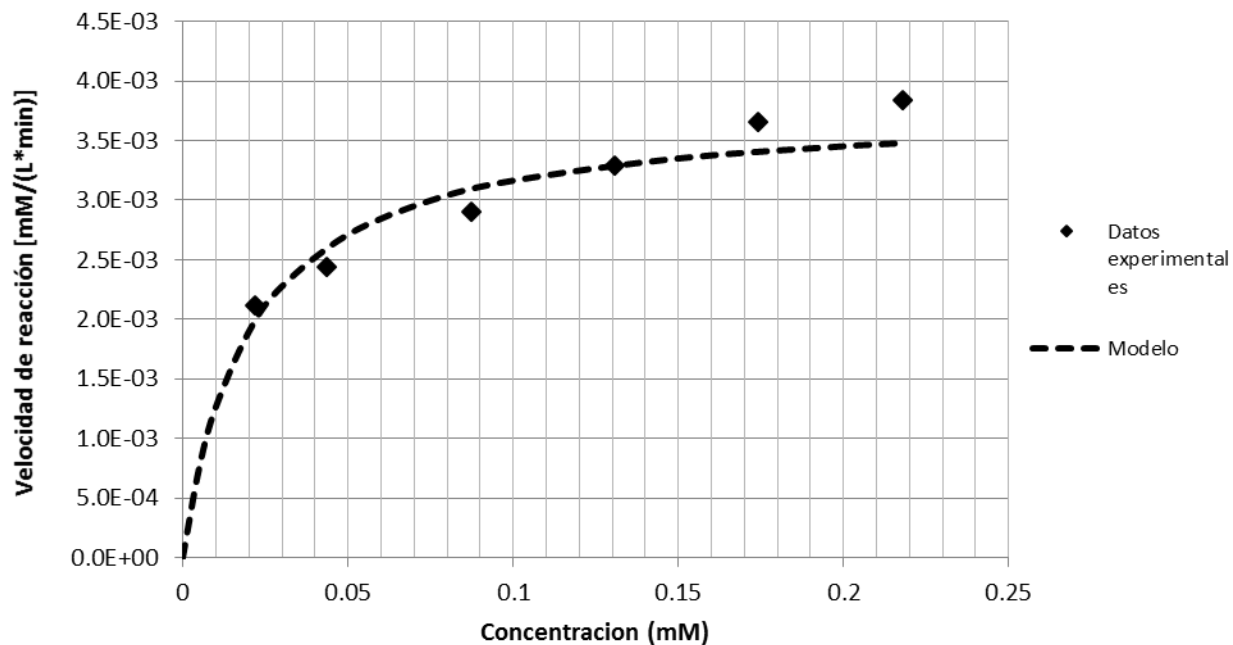
Los datos experimentales de la Figura 28 fueron analizados mediante la Ecuación 11

$$V = V_{max} \left( \frac{S}{(k_m + S)} \right) \quad [11]$$

Donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $S$  la concentración de acetofenona. Al ajustar el modelo se obtiene que la velocidad máxima es de  $3.79 \mu\text{M}/\text{min}$  y el valor de  $K_m$  es  $0.02\text{mM}$  lo que muestra una alta afinidad por ella

$$V_{max}=3.79 \mu\text{M}/\text{min}$$

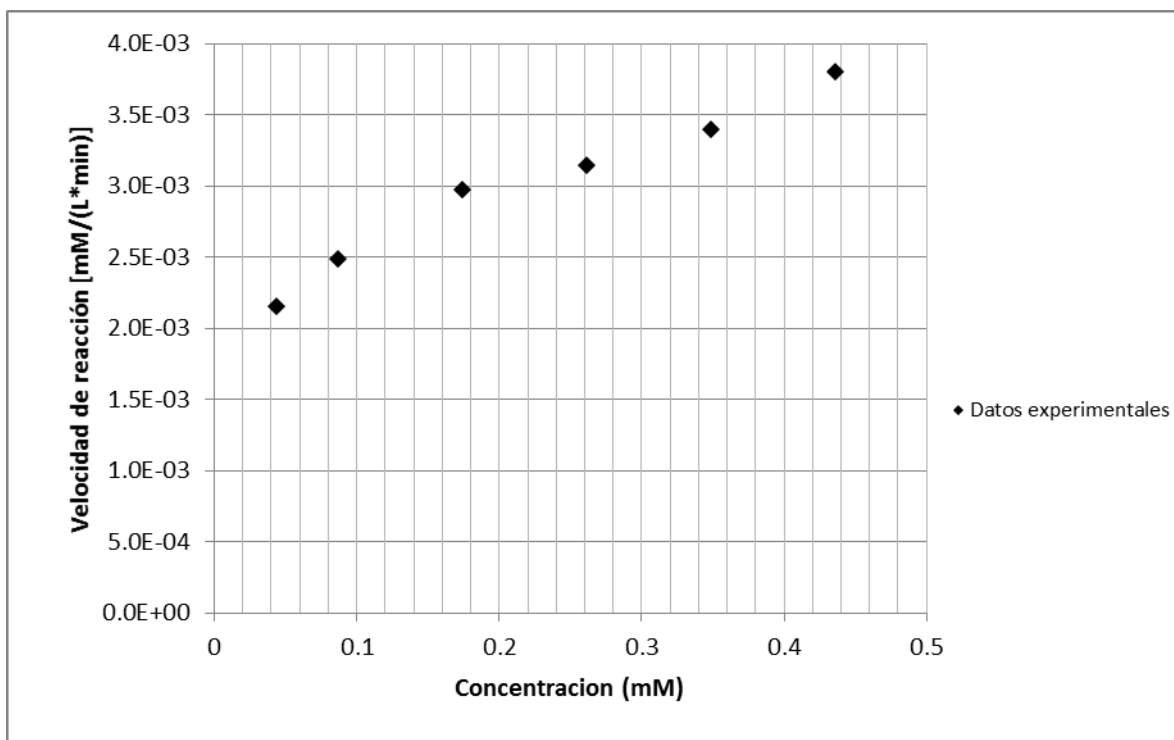
$$K_m=0.02 \text{ mM}$$



**Figura 29.** Efecto de la Acetofenona en la velocidad de reacción.

### AFINIDAD POR ALANINA

Las afinidades por ALANINA fueron determinadas a 32.5°C y pH de 6.28 usando concentraciones en el rango de 0 a 0.5 mM. Los resultados son mostrados en la siguiente gráfica. Los resultados son mostrados en la Figura 30.

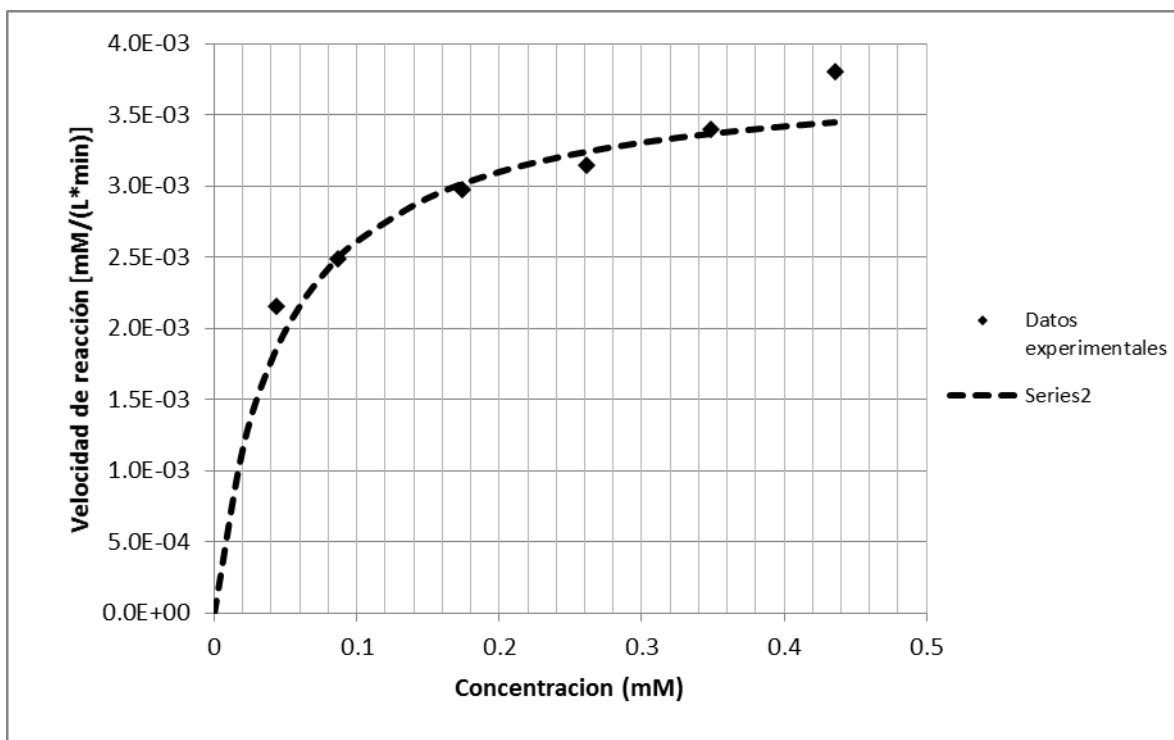


**Figura 30.** Efecto de la Alanina en la velocidad de reacción.

En la Figura 30 se muestra el gráfico de la actividad de la alanina, donde al ir aumentando su concentración aumenta exponencialmente con ella su velocidad de producción. Los datos experimentales de la Figura 30 fueron analizados mediante la Ecuación 11. Donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $S$  la concentración de alanina. Al ajustar el modelo se obtiene que la velocidad máxima es de  $3.81 \mu\text{M}/\text{min}$  y el valor de  $K_m$  es  $0.046 \text{ mM}$ .

$$V_{max}=3.81 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_m=0.046\text{mM}$$



**Figura 31.** Efecto de la Alanina en la velocidad de reacción.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

En esta investigación se identificó una enzima aminotransferasa con actividad estereoselectiva; con la cual fue posible convertir R-MBA a acetofenona.

Fue posible lograr el objetivo general de identificar y caracterizar  $\omega$ -Aminotransferasas con estereoespecificidad selectiva en organismos del reino fungí, con células de *Fusarium oxysporum*, dado que al poner en contacto el hongo con R-MBA o S-MBA, dio positivo en R-MBA.

Fue identificado el proceso de transaminación donde la identificación de la actividad óptica de AT fue seguida por la medición de la concentración de Acetofenona, produciendo una velocidad de (valor máximo de la velocidad de acetofenona obtenido)  $0.288 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$

La estereoselectividad de  $\omega$ -AT fue con R-AT ya que fue donde se mostró actividad,

La R-AT detectada presentó la mayor actividad a  $32.5^\circ\text{C}$  y pH de 6.28; esas condiciones se obtuvo una velocidad de reacción de  $0.301 \mu\text{M}/\text{min}$ .

En la determinación de las afinidades por los sustratos y productos no se mostraron inhibiciones ni por sustratos ni por productos.

El proceso de transaminación siguió una cinética de Michaelis-Menten, donde se mostraron afinidades tanto para sustratos como para productos, donde la mayor afinidad la mostró la acetofenona, así mismo en los experimentos realizados no fue mostrado inhibición por sustratos o productos.

## 5.2 Recomendaciones

- Purificar y caracterizar la enzima
- Utilizar otro sistema con otra amina donadora como la isopropilamina
- Probar la R-AT con otra cetona proquiral
- Aislar el gen que codifica esta enzima

## CAPÍTULO 6

### APENDICE

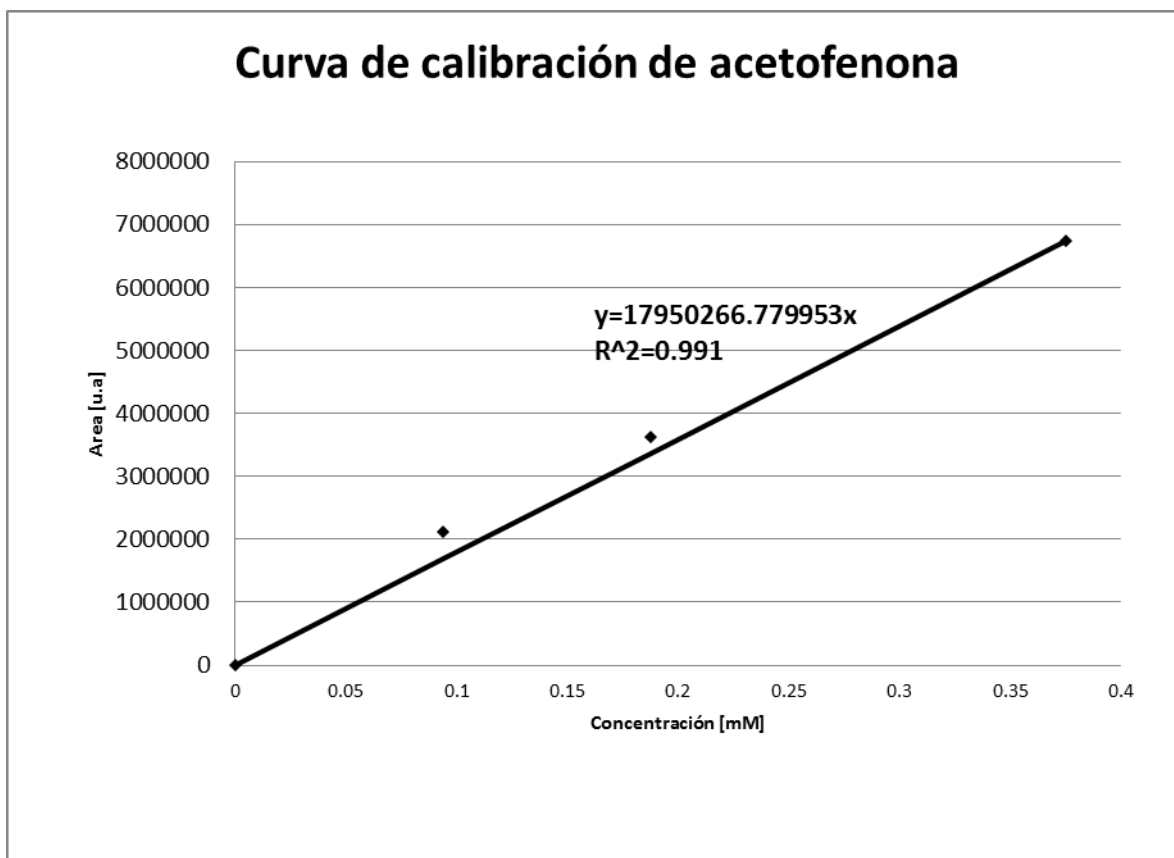
La curva de calibración que se realizó con estándares, donde se analizaron en el HPLC para obtener el área de pico para construir una curva de calibración, permitiéndonos cuantificar la acetofenona presente en la fracción líquida durante la reacción de transaminación a diferentes tiempos de reacción. Las condiciones de operación del análisis en HPLC fueron:

HPLC marca Varian Pro Star, columna: Varian Hi-PlexHVarian C1890A 250x4.6mm (resina de intercambio catiónico), con una fase móvil de: 40:60 Etanol-Agua marca: Fermont H5052 para HPLC, con un flujo de: 0.6mL/min, Temperatura de la columna: 32.5°C, Detector UV-Visible  $\lambda=254\text{nm}$  y un Tiempo de análisis de 23 minutos.

#### A. Datos de curva de calibración:

**Tabla 5.** Datos de curva de calibración de la Acetofenona.

| Acetofenona mM | Área Exp |
|----------------|----------|
| 0.375          | 6731350  |
| 0.1875         | 3629303  |
| 0.09375        | 2120088  |
| 0              | 0        |





---

## CAPÍTULO 7

### BIBLIOGRAFIA

Behrens, Geoffrey A.; Hummel, Anke; Padhi, Santosh K.; Schaetzle, Sebastian; Bornscheuer, Uwe T. "Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis". *Advanced Synthesis and Catalysis* (2011), 353(13), 2191-2215.

H.Scott Fogler, elementos de ingeniería de las reacciones químicas (1995), 3ra Edición, Prentice Hall Editorial.

Enders and Hoffmann. *Chemie in unsererzeit* (1985). vol.19.177-190.

Gerlach, Matthias; Pütz, Claudia; Enders, D. and Gaube, Gero. "Procedimiento de síntesis de compuestos quirales". Patente Europea. Numero: 2234908. (2005.07.01).

Iglesias, Luis E.; Sánchez, Victor M.; Rebolledo, Francisca; Gotor, Vicente. "Candida Antarctica B lipase catalyzed resolution of ( $\pm$ )-1-(heteroaryl) ethylamines". *Tetrahedron: Asymmetry* (1997), 8(16), 2675-2677.

Iraqi I; Vissers S; Cartiaux M; "Urrestarazua Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily". *Molecular and general genetics: MGG* (1998), 257(2), 238-48.

Jaeger, K. E.; Liebeton, K.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Reetz, M. T. "Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols". *Applied Microbiology and Biotechnology* (1996), 46(2), 99-105.

Koszelewski, Dominik; Pressnitz, Desiree; Clay, Dorina; Kroutil, Wolfgang. "Deracemization of Mexiletine Biocatalyzed by  $\omega$ -Transaminases". *Organic Letters* (2009). 11(21), 4810-4812.

Koszelewski, Clay, Dorina; Grischek, Dominik; Gross, Barbara; Lavandera, Ivan; Wolfgang, Kroutil. "Testing of microorganisms for  $\omega$ -transaminase activity". *Tetrahedron: Asymmetry* (2010(a)), 21(16), 2005-2009.

Koszelewski, Dominik; Goeritzer, Madeleine; Clay, Dorina; Seisser, Birgit; Kroutil, Wolfgang. "Synthesis of Optically Active Amines Employing Recombinant  $\omega$ -Transaminases in E. coli Cells". *ChemCatChem* (2010(b)), 2(1), 73-77.

Martin, Abraham R.; DiSanto, Rocco; Plotnikov, Irina; Kamat, Sanjay; Shonnard, David; Pannuri, Sachin. "Improved activity and thermostability of (S)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine". *Biochemical Engineering Journal* (2007(a)), 37(3), 246-255.

Martin, Abraham R.; Shonnard, David; Pannuri, Sachin; Kamat, Sanjay. "Characterization of free and immobilized (S)-aminotransferase for acetophenone production". *Applied Microbiology and Biotechnology* (2007(b)), 76(4), 843-851.

Matcham, G., Bhatia, M., Lang, W., Lewis, C., Nelson, R., Wang, A., Wu, W. (1999) Enzyme and reaction engineering in biocatalysis. Synthesis of (S)-methoxyisopropylamine ((S)-1-methoxypropan-2-amine). *Chimia*, 53(12), 584-589

Murray, Robert K. *Bioquímica de Harper* (2001). 15va Edición. Editorial El Manual Moderno. México.

Pannuri, Sachin; Kamat, Sanjay; Venkatesh; Garcia, Abraham Rogelio Martin. "Methods for engineering *Arthrobacter citreus*  $\omega$ -transaminase variants with improved thermostability for use in enantiomeric enrichment and stereoselective synthesis". *PCT Int. Appl.* (2006), 54. CODEN: PIXXD2 WO 2006063336 A2 20060615 CAN 145:42156 AN 2006:566797

Sheldon, R. A. "Chirotechnology: designing economic chiral syntheses". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (1996), 67(1), 1-14.

Shin, Jong-Shik; Kim, Byung-Gee. "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(2), 348-358.

Michael Shuler and Fikret Kargi. "Bioprocess Engineering Basic Concepts". Second Edition. 2003

Stirling DI. "The use of aminotransferases for the production of chiral amino acids and amines". (1992) In: Collins AN, Sheldrake GN, Crosby J (eds) Chirality in industry. *Wiley, Chichester, UK*, 209-222.

Juaristi, E. Premio Nobel de Química 2001: La importancia de la síntesis asimétrica, *Educ. quím.* 13, 6-7, 2002.

Morrison and Boyd, *química orgánica* (1998), 5ta edición, PEARSON, 123-154.

Hernandez Gil Ruben, *facultad de ciencias forestales y ambientales* (2002), Universidad de los Andes, Mérida Venezuela.

Donald Voet (2004), *Bioquímica* (2004), 3ra edición, editorial panamericana, 78-513.

Thomas M. Devlin, *Bioquímica* (2004), 4ta edición, editorial Reverte, S.S, 143,144.

Luz Marina Jaramillo, *Química orgánica general* (2002).

GrunenthalZeglerstrasse, *Procedimiento de síntesis de compuestos quirales* (2005), patente europea N° 2234908.

Magaly Pedrique de Aulacio and Norma de Castro, *cátedra de Microbiología*, Universidad de Veracruz (2005).

Carlos Rius Alonso ([riusal@unam.mx](mailto:riusal@unam.mx)). *Química orgánica* (2009), UNAM.

Michael T. Madigan, John M. Martinko y Jack Parker. *Brock Biología de los microorganismos* (2004), 10a edición. PEARSON.

Silvia Contreras ([silviac@ula.ve](mailto:silviac@ula.ve)). Reacciones Química (2004), Universidad de los Andes ([escueladequimica@hotmail.com](mailto:escueladequimica@hotmail.com))

Alexopoulos, C., Kang, K., Lilegdon, W. R. and Goldsman, D. Proceedings of the Winter Simulation Conference (1995), IEEE, Piscataway, New Jersey.

Zurisadai Carranza Díaz, “selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizogenos del estado de hidalgo más componentes en medio de cultivo sólido” 2006, Universidad autónoma del estado de Hidalgo.

Dilia IrneyAngelAlarcon, “Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la pontificia universidad javenciana”, Bogotá D.C., Colombia, Agosto del 2006, Pontificia Universidad Javenciana, facultad de ciencias Microbiología industrial.