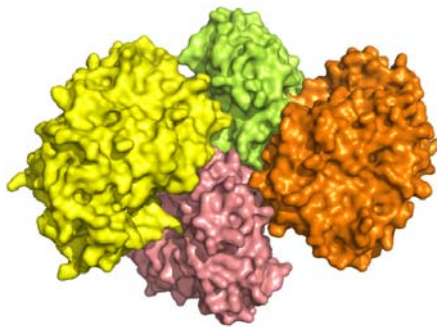


UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Máster en Química Avanzada Aplicada

**Cascada Quimioenzimática para la
producción de L-aminoácidos
ópticamente puros**



Alumna:

Rodríguez Alonso, M^a José

Tutores:

Martínez Rodríguez, Sergio

Las Heras-Vázquez, Francisco Javier

Fecha de la defensa: 26 de Julio de 2011

ÍNDICE

	Página
Índice.	i
Apéndice de tablas.	iii
Apéndice de figuras.	iii
1. Introducción.	1
1.1. Métodos biológicos para la obtención de productos.	2
1.2. Producción y utilización de α -aminoácidos.	4
1.2.1. Obtención de α -aminoácido a partir de mezclas racémicas de hidantoínas-5-monosustituidas.	6
2. Objetivos y Plan de Trabajo.	11
2.1. Objetivos.	12
2.2. Plan de trabajo.	12
3. Material y Métodos.	13
3.1. Plásmidos.	13
3.2. Expresión de los genes AtHyu, AtHyuA, BsLcar y GkNSAAR.	13
3.3. Purificación de las proteínas.	14
3.4. Ensayo enzimático.	14
3.5. Caracterización enzimática.	16
4. Resultados y Discusión.	17
4.1. Expresión y purificación de las enzimas.	17
4.2. Comparación de los diferentes sistemas multienzimáticos.	18
4.3. Efecto de los cationes en la actividad específica.	21
4.3.1. Efecto de cationes en la actividad de AtHyu.	21
4.3.2. Efecto de cationes en la actividad de BsLcar.	24
4.3.3. Efecto de cationes en la actividad de GkNSAAR.	25
4.4. Actividad específica de las enzimas.	26
4.4.1. Actividad específica de AtHyu.	26
4.4.2. Actividad específica de AtHyuA.	27
4.4.3. Actividad específica de BsLcar.	28

4.4.4. Actividad específica de GkNSAAR.	28
4.4.5. Cálculo de la proporción de cada enzima del sistema.	29
4.5. Influencia del pH y la temperatura en la actividad del sistema Multienzimático.	32
4.6. Estabilidad térmica del sistema.	33
4.7. Conversión de diferentes mezclas racémicas.	34
5. Conclusiones.	37
6. Bibliografía.	39

APÉNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones comerciales de aminoácidos ópticamente activos.	5
Tabla 2. Constantes cinéticas de GkNSAAR para diferentes sustratos.	8
Tabla 3. Constantes cinéticas de BsLcar para diferentes sustratos.	9
Tabla 4. Proporciones teóricas de las enzimas en el sistema multienzimático.	29
Tabla 5. Proporciones de las enzimas en los distintos ensayos realizados.	30
Tabla 6. Proporciones óptimas de las enzimas en el sistema multienzimático.	31

APÉNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del “Proceso de la Hidantoinasa”.	7
Figura 2. Capacidad de racemización de la enzima GkNSAAR.	9
Figura 3. Reacción de hidrólisis para la producción de L-aminoácidos.	11
Figura 4. Análisis SDS-PAGE de las cuatro proteínas purificadas.	17
Figura 5. Sistema doble formado por AtHyu y BsLcar.	18
Figura 6. Sistema triple formado por AtHyu, BsLcar y AtHyuA.	19
Figura 7. Sistema triple por formado por AtHyu, BsLcar y GkNSAAR.	20
Figura 8. Sistema cuádruple formado AtHyu, BsLcar, AtHyuA y GkNSAAR.	20
Figura 9. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu.	22
Figura 10. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu.	23
Figura 11. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu.	23
Figura 12. Curvas de desaparición de carbamil-ABA por acción de BsLcar.	24
Figura 13. Curvas de desaparición de carbamil-ABA por acción de GkNSAAR.	25
Figura 14. Ensayo de actividad específica de AtHyu.	26
Figura 15. Ensayo de actividad específica de AtHyuA.	27
Figura 16. Ensayo de actividad específica de BsLcar.	28
Figura 17. Ensayo de actividad específica de GkNSAAR.	29
Figura 18. Curvas de L-ABA en los ensayos de proporciones de las enzimas.	31
Figura 19. Gráfica de actividad relativa en función del pH.	32
Figura 20. Gráfica de actividad relativa en función de la temperatura.	33
Figura 21. Gráfica de estabilidad térmica del sistema multienzimático.	34
Figura 22. Conversión de D,L-etilhidantoína en L-ABA.	35
Figura 23. Conversión de D,L-propilhidantoína en L-Norvalina.	35

1. INTRODUCCIÓN.

La motivación por la investigación de procesos y métodos biocatalíticos está marcada por el interés en la síntesis de compuestos enantioméricamente puros (CEPs). Los factores responsables del auge del estudio de las enzimas responsables de la síntesis de CEPs son los siguientes:

- Existe un interés en continuo crecimiento por los CEPs en la Industria Química, Farmacéutica, Agrícola y Alimentaria.
- Se están alcanzando metas importantes para acotar enfermedades con los novedosos tratamientos que incorporan metodologías enzimáticas; ejemplos para esto son los tratamientos para el SIDA (inhibidores de la proteasa HIV) o el cáncer e inflamaciones reumáticas (matrices de inhibidores de metaloproteínas, MMPI).
- Se han realizado progresos en la selección y optimización de inhibidores en base a la analogía de su estructura con sustratos existentes en la naturaleza con actividad biológica [Bommarius y col., 1998].

La actividad específica de los CEPs normalmente depende de su quiralidad. Sólo uno de los isómeros es útil para un fin determinado, mientras que el otro se considera contaminación. Aunque los CEPs requeridos por las industrias pueden ser sintetizados químicamente, aún no existen métodos de síntesis quirales para muchos CEPs de interés, obteniendo en estos casos mezclas racémicas que deben ser resueltas hasta sus componentes ópticamente puros antes de ser utilizados. La resolución de estos compuestos puede realizarse mediante métodos químicos y/o biológicos, que incluyen la cristalización de sales estereoméricas, cristalización en disolventes ópticamente activos, cromatografía y métodos enzimáticos [Greenstein y Winitz, 1961; Breuer y col., 2004]. Todos estos procedimientos tienen muy limitada aplicación industrial debido a su bajo rendimiento, baja rentabilidad y fuerte efecto contaminante del medio ambiente.

Esta situación está cambiando con el desarrollo de métodos enzimáticos estereoespecíficos y la biocatálisis está comenzando a ser importante para síntesis

quirales, gracias a la enantioselectividad natural de las enzimas [Sharma y Vohra, 1999].

1.1. Métodos biológicos para la obtención de productos.

Desde un punto de vista puramente industrial, la biotecnología permite la obtención de productos como resultado de la biotransformación de una sustancia en otra, y los biocatalizadores se definen como material biológico que exhibe actividad catalítica. Esto puede incluir desde una enzima altamente purificada, a la totalidad de una célula metabólicamente viable. Entre estos dos extremos, están las enzimas impuras, homogenados crudos celulares, células no viables y sistemas enzimáticos acoplados. La elección de la forma más apropiada de biocatalizador, para su uso en un sistema dado, dependerá de las circunstancias individuales que requiera el proceso productivo [Walker y Gingold, 1997].

El uso de microorganismos completos presenta la ventaja de ser más barato, necesita menos tiempo de preparación, no implica purificación enzimática, en muchos casos es reutilizable, y además suele ser más estable ya que las proteínas se encuentran protegidas en su interior. En contraposición, el producto así obtenido necesita un proceso de purificación más amplio, y presenta un peligro de contaminación con subproductos secundarios.

Por su parte, el uso de extractos enzimáticos, o enzimas aisladas ha resultado ser un sistema más limpio y con menor formación de subproductos, aunque es más caro y presenta menor estabilidad por la vida media de las proteínas tras su uso.

Cuando se comparan las enzimas con los catalizadores químicos, las enzimas tienen varias ventajas, entre las que se incluyen: la especificidad de sustrato y reacción, la variedad de reacciones que catalizan, las suaves condiciones de reacción empleadas y la ausencia de producción de subproductos. Esto es especialmente importante cuando se usan reactantes lábiles, además evitan problemas de isomerización, racemización, epimerización y reagrupamientos, y el gasto energético es mínimo [Patel y col., 2003].

Los biocatalizadores se usan en la síntesis orgánica clásica por su capacidad para distinguir entre enantiómeros, grupos enantiotrópicos, las zonas de las moléculas que tienen centros proquirales, y porque tales reacciones específicas pueden llevarse a cabo en medio acuoso y condiciones de reacción no extremas. Los factores económicos también influyen en la elección del biocatalizador, ya que los procesos químicos utilizan grandes cantidades de energía y frecuentemente se basan en compuestos petroquímicos, mientras que los catalizadores biológicos no necesitan grandes cantidades de energía y usualmente se emplean fuentes biológicas renovables. Por tanto, el uso de catalizadores biológicos es una realidad en la Industria Alimentaria y Farmacéutica y puede ser el futuro en la Industria Química Pesada.

Hay una tendencia significativa de las más sofisticadas Industrias de Química fina a integrar biocatálisis en su tecnología. Ejemplos de tales compañías son: Lonza (Basel, Switzerland), Recordati International Biosynthetics, DSM (Heezlen, The Netherlands), Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland), ICI (London, UK) y Organon (Oss, The Netherlands). La estrategia en todas estas compañías es usar biocatalizadores para obtener el producto final. Para potenciar la biotecnología se requiere un mercado inteligente y perspicaz, aunque a menudo las compañías solamente prestan una atención superficial al potencial de los biocatalizadores. Por esta causa se han hecho esfuerzos desproporcionados para desarrollar biocatalizadores para nuevas moléculas farmacéuticas incluso antes de conocer su potencial de mercado.

Para ser útiles, y por tanto utilizables comercialmente, las enzimas deben hacer que el producto elaborado tenga alguna de las ventajas siguientes [Wiseman, 1995]:

- que su calidad sea superior a la del producto obtenido por síntesis tradicional,
- que sea más barato, lo que puede conseguirse indirectamente, disminuyendo los costes de operación y/o equipos requeridos en la manufactura del proceso, y,
- que se puedan obtener productos que no existían previamente o sólo en cantidades limitadas, debido a su reducida disponibilidad a partir de fuentes naturales.

1.2. Producción y utilización de α -aminoácidos.

La producción de α -aminoácidos a escala industrial data del 1908, cuando el químico agrícola K. Ikeda descubrió que el L-glutamato era responsable del sabor característico, muy apreciado en Japón, de las comidas cocinadas con algas secas (Konbu). Durante los 50 primeros años, el L-glutamato monosódico (MSG) se manufacturó mediante procesos químicos basados en su mayor parte en la hidrólisis ácida de proteínas. Esta hidrólisis era un proceso costoso, ya que el glutamato debía ser separado de todos los otros aminoácidos en el hidrolizado [Glazer y Nikaido, 1995]. Se fabricaron además cantidades significativas de MSG mediante síntesis química. Pero este proceso también era caro, ya que producía una mezcla de D- y L-glutamato que debía ser resuelta para eliminar el isómero D-, que no tiene sabor.

En 1957 se introdujo un cambio revolucionario, cuando científicos en Kyowa Hakko Co. descubrieron una bacteria del suelo que excretaba grandes cantidades de L-glutamato en el medio [Glazer y Nikaido 1995]. Pronto se aislaron bacterias similares por muchas otras compañías, apareciendo una nueva tecnología industrial: la obtención de aminoácidos por fermentación, consistente en la producción de aminoácidos mediante microorganismos. Excepto el etanol, algunos otros disolventes orgánicos y unas cuantas vitaminas, el glutamato fue el primer compuesto orgánico producido a escala industrial mediante una técnica de fermentación microbiana.

La producción de α -aminoácidos a escala industrial se ha incrementado notablemente en los últimos años debido a sus posibilidades de utilización en distintos campos que incluyen la Industria Farmacéutica y Alimentaria, así como su uso en investigaciones bioquímicas y microbiológicas. Se ha descrito su uso en la fabricación de sueros, como aditivos alimentarios, o como intermedios en la preparación de fármacos, cosméticos, pesticidas, curtidos sintéticos y reactivos quirales de aplicación en síntesis orgánica (Tabla 1). Tradicionalmente los aminoácidos proteínogénicos se aislaban a partir de la digestión de proteínas (en medio ácido, básico o por vía enzimática), y durante muchos años estos procedimientos fueron suficientes para obtener distintos aminoácidos (arginina, asparragina, cisteína, ácido glutámico, histidina, hidroxiprolina, prolina y tirosina); en la actualidad estos procesos han sido sustituidos por numerosos procedimientos de síntesis química que permiten obtener con

relativa facilidad la inmensa mayoría de los α -aminoácidos, tanto a escala industrial como de laboratorio [Bódalo y col., 2003].

Aminoácido	Isómero	Uso
<i>Fenilglicina</i>	D	Fármaco (ampicilina)
<i>p-hidroxifenilglicina</i>	D	Fármaco (amoxicilina)
<i>Valina</i>	D	Agroquímico (fluvalinato)
<i>Glutamina</i>	D	Fármaco (micobacilina)
<i>Cisteína</i>	D	Fármacos (malformina, D-carbocisteinato de L-lisina)
<i>Leucina</i>	D	Fármaco (circulina)
<i>Ornitina</i>	D	Fármaco (bacitracina)
<i>Fenilalanina</i>	D	Fármaco (fungisporina, polimixina, tirocidina)
<i>Valina</i>	D	Fármaco (actinomicina, valinomicina)
<i>Serina</i>	D	Fármaco (D-cicloserina)
<i>Ácido aspártico</i>	D	Fármaco (bacitracina)
<i>Homo-fenilalanina</i>	L	Fármaco (enalapril)
<i>Dihidroxifenilalanina</i>	L	Fármaco (DOPA)
<i>Lisina</i>	L	Alimentación animal, mucolítico
<i>Cisteína</i>	L	Antioxidante en panadería
<i>Valina</i>	L	Inhibidor de la transcriptasa reversa (valaciclovir)
<i>Metionina</i>	L	Aditivo en alimentación, diurético (docarpamina)
<i>Leucina</i>	L	Fármacos (inmunoestimulante, antialérgico)
<i>Lisina</i>	L	Aditivo en alimentación
<i>Glutamato</i>	L	Potenciador del sabor
<i>Fenilalanina</i>	L	Edulcorante artificial (aspartame)
<i>Ácido aspártico</i>	L	Edulcorante artificial (aspartame)

Tabla 1. Aplicaciones comerciales de aminoácidos ópticamente activos.

Según los datos publicados por la Compañía de Comunicación de Mercados (Business Communication Company) [Spiegel, 2009], se espera un crecimiento en el Mercado Global de aminoácidos del 2,5-3% de 2009 al 2013. Así, la producción de aminoácidos proteínogénicos pasaría de 1.100 millones de dólares en 2008 a los 1.300 millones en 2013 (un incremento del 2,9%), los aminoácidos utilizados para aromatizantes y saborizantes pasarían de 510,4 millones dólares en 2008 a 588,2 millones en 2013 (incremento del 2,9%) y por último el segmento de alimentación animal pasaría de 472,4 millones de dólares en 2008 a 526,4 millones en 2013 (un incremento del 2,2%).

1.2.1. Obtención de α -aminoácidos a partir de mezclas racémicas de hidantoínas-5-monosustituidas.

La producción de D- o L-aminoácidos ópticamente puros mediante catalizadores enzimáticos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoínas monosustituidas en el carbono 5 (C5) es un procedimiento más barato y técnicamente más sencillo que los métodos de síntesis química y quimioenzimática, además de ser menos contaminante [Clemente-Jiménez y col., 2008]. Dicho proceso ha recibido el nombre de “Proceso de la Hidantoinasa”. En esta transformación enzimática, en primer lugar, el anillo de las hidantoínas D,L-5-sustituidas sintetizadas químicamente es hidrolizado por la enzima hidantoinasa. Posteriormente, la hidrólisis del *N*-carbamil aminoácido producido es llevada a cabo por la enzima *N*-carbamil-aminoácido amidohidrolasa (carbamilasa). En esta reacción se produce NH₃, CO₂ y el aminoácido correspondiente (Figura 1). A la misma vez que la hidantoinasa hidroliza selectivamente un isómero u otro de la hidantoína, comienza la racemización química o enzimática del otro isómero no hidrolizado. La producción de un enantiómero u otro del aminoácido depende de la estereoespecificidad de las enzimas con las que se trabaja.

El grupo en el que he desarrollado este Proyecto Fin de Máster ha alcanzado una gran experiencia en la utilización de este Proceso y lo ha aplicado a la producción de D-aminoácidos ópticamente puros a partir de mezclas racémicas de hidantoínas 5-monosustituidas [Martínez-Rodríguez y col., 2002; Martínez-Gómez y col., 2007]. Las

investigaciones han eliminado las restricciones a la racemización espontánea de la mayoría de D,L-hidantoínas monosustituidas en C5 que limitaban su uso industrial, a pesar del valor económico de sus derivados. De tal modo que el sistema multienzimático desarrollado puede racemizar rápida y eficientemente estos compuestos por la acción catalítica de la enzima hidantoín-racemasa. De este modo, la utilización conjunta de las enzimas hidantoín-racemasa, D,L-hidantoínasa y D-carbamilasa, permite la transformación total del sustrato D,L-hidantoína monosustituida en C5, en D-aminoácido.

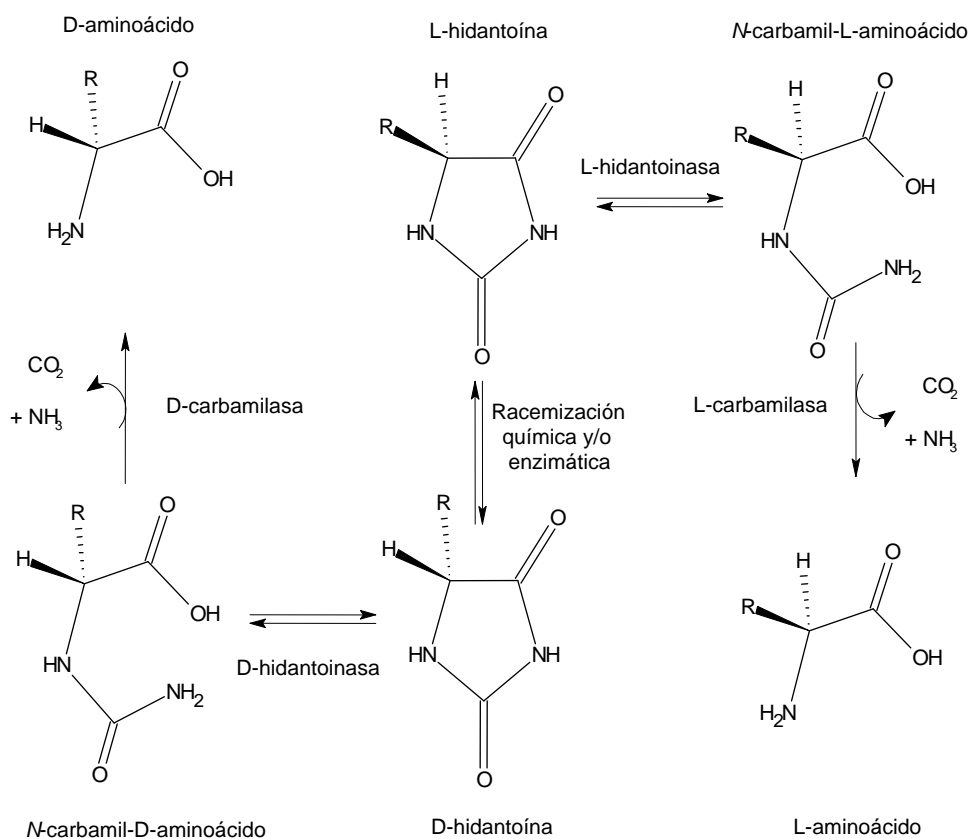


Figura 1. Esquema del “Proceso de la Hidantoínasa”. Reacción de hidrólisis de derivados de D,L-hidantoínas monosustituidas en C5, hasta D- o L-aminoácidos vía el intermedio N-carbamil correspondiente.

Consolidado el “Proceso de la Hidantoínasa” para la producción de α -D-aminoácidos ópticamente puros, se ha intentado desarrollar un sistema análogo para la producción de α -L-aminoácidos ópticamente puros. Sin embargo, si bien se han encontrado N-carbamil-aminoácido amidohidrolasas L-enantioespecíficas (L-

carbamilasas), las D,L-hidantoinasas caracterizadas por este y otros grupos han hidrolizado ambos isómeros, pero en mayor proporción el D-, mostrando ser D-enantioselectivas. Esto supone que aunque la producción de L-aminoácidos mediante este sistema es posible, la cinética de conversión desde la mezcla de precursores hasta el producto es muy lenta. Es por esto que en este Trabajo Fin de Máster se ha buscado otra estrategia para obtener α -L-aminoácidos ópticamente puros.

Recientemente, el grupo en el que me he incorporado ha aislado y caracterizado una N-succinil aminoácido racemasa (NSAAR) de *Geobacillus kaustophilus* CECT4264 (GkNSAAR) [Pozo-Dengra y col., 2009]. Esta enzima ha mostrado una alta promiscuidad de sustrato y es capaz de racemizar diferentes N-aminoácidos N-sustituidos (Tabla 2, Figura 2). Asimismo, se ha aislado y caracterizado una L-carbamilasa de *Geobacillus stearothermophilus* CECT43 (BsLcar) [Martínez-Rodríguez y col., 2008; Pozo-Dengra y col., 2010] (Tabla 3).

Sustrato	K_m (mM)	$U k_{cat}$ (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot M^{-1}$)
<i>N-Acetil-L-metionina</i>	8 ± 1	22 ± 1	$(2,8 \pm 0,5) \times 10^3$
<i>N-Acetil-D-metionina</i>	7 ± 0	20 ± 1	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^3$
<i>N-Acetil-L-fenilalanina</i>	43 ± 4	16 ± 1	370 ± 67
<i>N-Acetil-D-fenilalanina</i>	23 ± 3	10 ± 0	467 ± 67
<i>N-Acetil-L-alanina</i>	41 ± 3	$2 \pm 0,0$	39 ± 4
<i>N-Acetil-D-alanina</i>	17 ± 2	$0,8 \pm 0,0$	47 ± 6
<i>N-Acetil-L-triptófano</i>	$2 \pm 0,3$	$0,15 \pm 0,00$	60 ± 9
<i>N-Acetil-D-triptófano</i>	$2 \pm 0,2$	$0,09 \pm 0,00$	61 ± 9
<i>N-Acetil-L-asparagina</i>	27 ± 2	$0,06 \pm 0,00$	$2 \pm 0,2$
<i>N-Acetil-D-asparagina</i>	18 ± 2	$0,07 \pm 0,00$	$4 \pm 0,3$
<i>N-Carbamil-L-metionina</i>	$5 \pm 0,9$	$2 \pm 0,0$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^3$
<i>N-Carbamil-D-metionina</i>	$2 \pm 0,1$	$2 \pm 0,0$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^3$
<i>N-Succinil-L-alanina</i>	$0,12 \pm 0,01$	43 ± 8	$(35,20 \pm 4,22) \times 10^4$
<i>N-Succinil-D-alanina</i>	$0,13 \pm 0,01$	15 ± 1	$(11,93 \pm 0,53) \times 10^4$
<i>N-Succinil-L-fenilalanina</i>	$0,13 \pm 0,02$	$5 \pm 0,0$	$(3,51 \pm 0,05) \times 10^4$
<i>N-Succinil-D-fenilalanina</i>	$0,04 \pm 0,00$	$2 \pm 0,1$	$(3,81 \pm 0,53) \times 10^4$

Tabla 2. Constantes cinéticas de GkNSAAR para diferentes sustratos: N-acetil-, N-carbamil- y N-succinil-aminoácidos.

Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
<i>N</i> -Carbamil- <i>L</i> -metionina	2,90 ± 0,46	5,32 ± 0,04	1834,48 ± 277,19
<i>N</i> - Carbamil - <i>L</i> -alanina	4,19 ± 0,54	48,96 ± 2,22	11684,96 ± 976,11
<i>N</i> - Carbamil - <i>L</i> -valina	3,29 ± 0,62	0,84 ± 0,04	255,32 ± 35,96
<i>N</i> - Carbamil - <i>L</i> -fenilalanina	5,82 ± 0,45	0,16 ± 0,00	27,49 ± 2,13
<i>N</i> - Carbamil - <i>L</i> -tirosina	12,99 ± 2,43	0,18 ± 0,00	13,86 ± 2,59
<i>N</i> -Acetil- <i>L</i> -metionina	12,66 ± 1,99	2,26 ± 0,14	178,52 ± 17,00
<i>N</i> -Acetil- <i>L</i> -alanina	36,12 ± 4,23	27,86 ± 1,60	771,32 ± 46,03
<i>N</i> -Acetil- <i>L</i> -valina	13,92 ± 1,14	0,08 ± 0,00	5,96 ± 0,49
<i>N</i> - Acetil- <i>L</i> -fenilalanina	12,90 ± 2,50	0,01± 0,00	0,39 ± 0,08
<i>N</i> - Acetil- <i>L</i> -tirosina	115,99 ± 7,25	0,08 ± 0,00	0,69 ± 0,10
<i>N</i> -Formil- <i>L</i> -metionina	9,77 ± 0,95	839,06 ± 32,34	85881,27 ± 5040,66
<i>N</i> - Formil- <i>L</i> -alanina	5,00 ± 0,94	293,48 ± 20,36	58696,00 ± 6962,85
<i>N</i> - Formil- <i>L</i> -valina	6,75 ± 0,81	27,26 ± 0,99	4038,52 ± 337,96
<i>N</i> - Formil- <i>L</i> -fenilalanina	13,82 ± 1,43	12,12 ± 0,56	876,99 ± 50,22
<i>N</i> - Formil- <i>L</i> -tirosina	23,78 ± 2,70	1,46 ± 0,08	61,40 ± 3,61

Tabla 3. Constantes cinéticas de BsLcar para diferentes L-sustratos: *N*-acetil-, *N*-carbamil- y *N*-formil-aminoácidos.

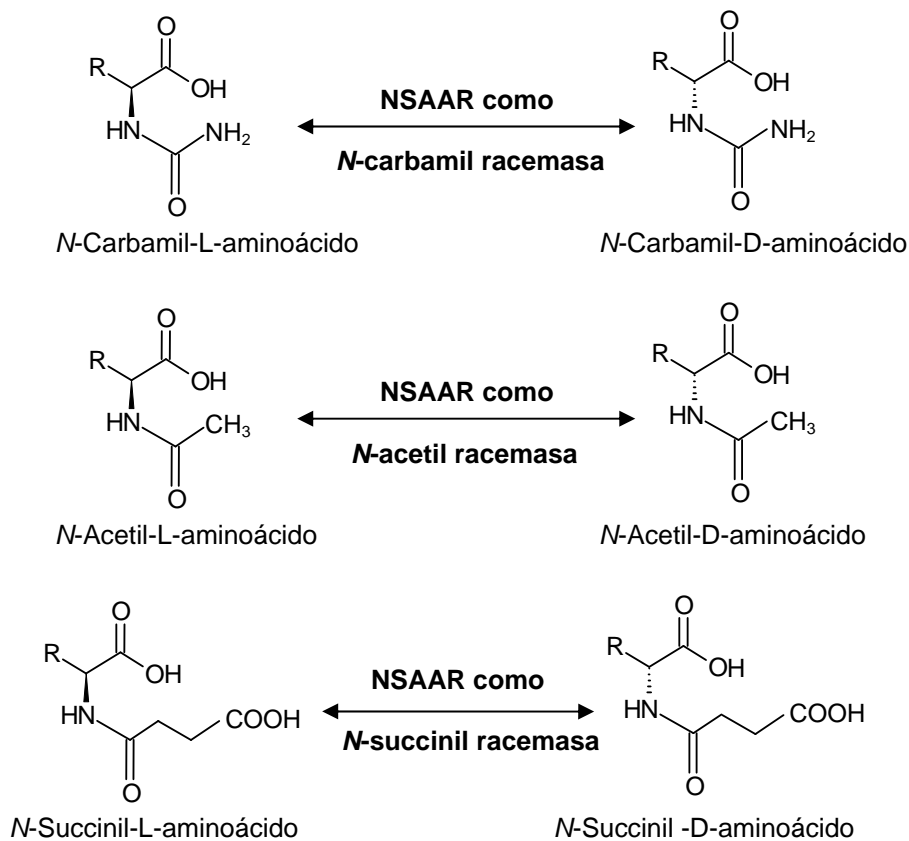


Figura 2. Capacidad de racemización de la enzima GkNSAAR como *N*-carbamil y *N*-acetil racemasa, además de la de *N*-succinil racemasa.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Basándonos en el “Proceso de la Hidantoinasa” se ha construido un sistema multienzimático para la producción de L-aminoácidos ópticamente puros a partir de mezclas racémicas de hidantoínas monosustituidas en C5. La variación de este nuevo Proceso radica en incluir junto a las enzimas D,L-hidantoinasa de *Agrobacterium tumefaciens* BQL9 (AtHyu) [Clemente-Jiménez y col., 2003], hidantoin racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (AtHyuA) [Las Heras-Vázquez y col., 2003], y L-carbamilasa de *Bacillus stearothermophilus* CECT43 (BsLcar) [Martínez-Rodríguez y col., 2008], la enzima N-succinil aminoácido racemasa de *Geobacillus kaustophilus* CECT4264 (GkNSAAR) con capacidad para racemizar N-carbamil aminoácidos [Pozo-Dengra y col., 2009] (Figura 3).

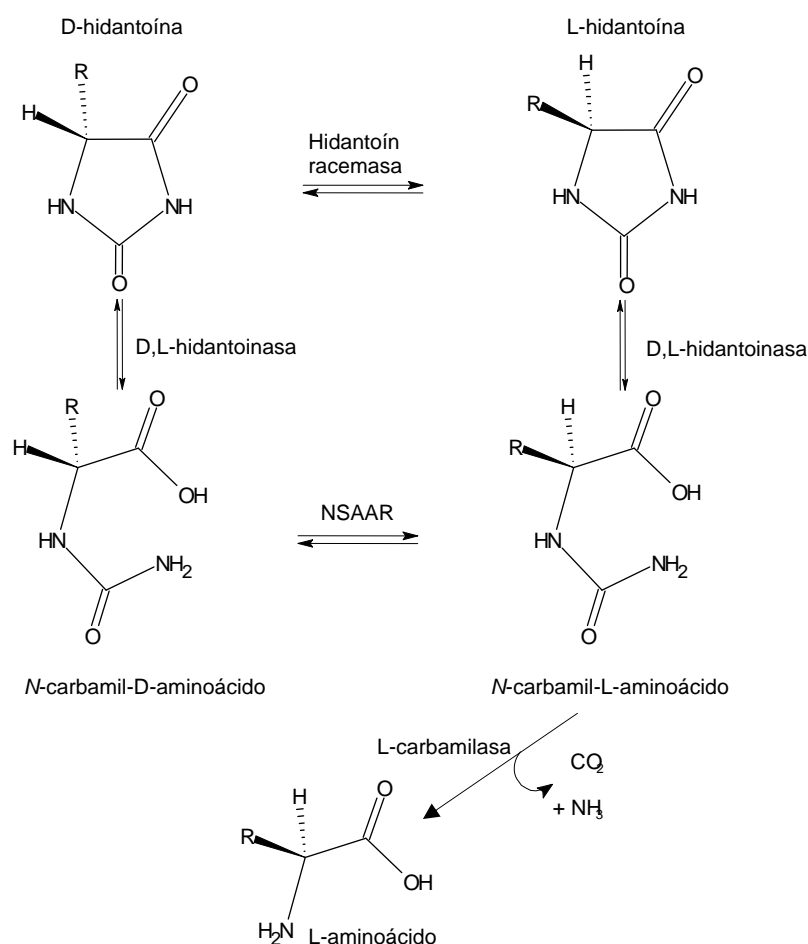


Figura 3. Esquema de la reacción de hidrólisis, basado en el “Proceso de la Hidantoinasa” para la producción de L-aminoácidos a partir de mezclas racémicas de hidantoínas monosustituidas en C5.

2.1. Objetivos.

Los objetivos del trabajo son los siguientes:

1. Demostración de la mayor eficiencia de obtención de L-aminoácidos ópticamente puros por un sistema multienzimático formado por 4 enzimas.
2. Optimización del sistema cuádruple.

2.2. Plan de trabajo.

Para cumplir con los objetivos, desarrollamos el siguiente plan de trabajo:

1. Sobreexpresión de los genes en el hospedador *Escherichia coli* BL21 y purificación de las cuatro enzimas mediante cromatografía de afinidad.
2. Estudio de la conversión en L-aminoácidos ópticamente puros mediante diferentes sistemas multienzimáticos.
3. Estudio del efecto y selección de cationes divalentes en la actividad de las enzimas.
4. Determinación de la actividad específica de cada enzima, para estimar la relación de las mismas en el sistema.
5. Determinación de las condiciones óptimas de conversión, estableciendo el pH y la temperatura de la reacción, así como la termoestabilidad del sistema.
6. Estudio de la conversión de diferentes mezclas racémicas de hidantoínas monosustituidas en C5 en L-aminoácidos ópticamente puros.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Plásmidos.

Los genes de interés están contenidos en los plásmidos citados a continuación:

- pJMC44: D,L-hidantoinasa de *Agrobacterium tumefaciens* BQL9 (AtHyu).
- pSER12: Hidantoín racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (AtHyuA).
- pJAVI80: L-carbamilasa de *Bacillus stearothermophilus* CECT43 (BsLcar).
- pJPD25: N-succinil aminoácido racemasa de *Geobacillus kaustophilus* CECT4264 (GkNSAAR).

3.2. Expresión de los genes AtHyu, AtHyuA, BsLcar y GkNSAAR.

La cepa hospedadora *Escherichia coli* BL21 conteniendo el plásmido correspondiente fue crecida en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. Se transfirió una única colonia a un matraz de 100 mL con 10 mL de medio LB con ampicilina a la concentración mencionada anteriormente. Este cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante toda la noche. Se inocularon 800 mL de LB (matraz de 2 L), con la concentración adecuada de ampicilina, con 8 mL del precultivo crecido durante la noche. Después de 4 h de agitación vigorosa a 37 °C, en el caso de pJMC44 y de 3h para el resto, la DO₆₀₀ del cultivo resultante fue 0,2-0,4. Para la inducción de la expresión de cada uno de los genes se añadió ramnosa a una concentración final de 0,2% y continuó la incubación a 32 °C durante 6 h más. Las células se precipitaron por centrifugación (Beckman J-26xP5, Rotor JLA-8.100, 6.000 xg, 4 °C, 30 min), y fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

En el caso de BL21 pJMC44 fue necesario inducir en presencia de Co²⁺, a una concentración final de 0,5 mM. Y se añadió CoCl₂ tanto en el precultivo como en la inducción.

3.3. Purificación de las proteínas.

Las células precipitadas se resuspendieron en 50 mL de tampón de lavado (NaCl 300 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 7). Se rompieron las paredes celulares por sonicación en hielo, usando un Procesador de Ultrasonidos UP 200 S (Dr. Hielscher GMBH, Germany), durante 6 periodos de 60 segundos, en modo de pulso 0,5 y una potencia de sonicado del 60%. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (Beckman JA2-21, Rotor JA-20, 10.000 xg, 4 °C, 20 min). El sobrenadante filtrado se pasó por una columna con resina de afinidad de cobalto TALON™ (CLONTECH Laboratories, Inc.), y posteriormente se lavó cuatro veces con tampón de lavado. Después del lavado se eluyó la enzima con tampón de elución (NaCl 100 mM, imidazol 150 mM, Tris 2 mM, pH 8). La pureza de la proteína se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La enzima purificada se concentró usando un concentrador de corte de 10.000 Da (VIVASPIN20, Sartorius) y se dializó en tampón borato-HCl 100 mM pH 8 en cuatro cambios a 4 °C. La concentración de la proteína se determinó mediante el coeficiente de extinción molar, midiendo la absorbancia a 280 nm [Gill y von Hippel, 1989].

3.4. Ensayo enzimático.

Se determinó la actividad específica de cada una de las enzimas. La reacción enzimática de AtHyu (5,9 μ M, 300 μ g/mL) se llevó a cabo usando como sustrato D-etilhidantoína (20 mM), CoCl₂ (1 mM), en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, en un volumen de reacción de 500 μ L. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 30 minutos. AtHyuA (22,5 μ M, 600 μ g/mL) se ensayó con una reacción acoplada, usando L-etilhidantoína (20 mM) como sustrato, AtHyu (5,9 μ M, 300 μ g/mL), CoCl₂ (1 mM), en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, en un volumen de reacción de 500 μ L, incubando la mezcla de reacción a 50 °C durante 90 minutos. La actividad específica de BsLcar (4,8 μ M, 216 μ g/mL) se determinó con D,L-carbamil-ABA (20 mM), carbamil del ácido aminobutírico, como sustrato CoCl₂ (1 mM), en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, en un volumen de reacción de 500 μ L, incubando 30 minutos a 50 °C. Por último, la reacción enzimática de GkNSAAR (23,4 μ M, 1017 μ g/mL), se llevó a cabo también

mediante una reacción acoplada, con D,L-carbamil-ABA (20 mM) como sustrato, BsLcar (4,8 μ M, 216 μ g/mL), CoCl₂ (1 mM), en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, en un volumen de reacción de 500 μ L, incubando 90 minutos a 50 °C. En todos los casos se tomaron alícuotas, a diferentes tiempos, de 25 μ L, parando la reacción con 475 μ L de H₃PO₄ al 1% y tras centrifugar (10.000 rpm, 10 min, a T^a ambiente) se analizó el sobrenadante por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La reacción enzimática del sistema se llevó a cabo con las cuatro enzimas, AtHyu (0,4 μ M, 20 μ g/mL), AtHyuA (20 μ M, 525 μ g/mL), BsLcar (1,1 μ M, 50 μ g/mL) y GkNSAAR (30 μ M, 1375 μ g/mL) junto con D,L-etilhidantoína (10 mM) como sustrato, CoCl₂ (1 mM), en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, en un volumen de reacción de 500 μ L. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 4 h, tomándose, a diferentes tiempos, alícuotas de 25 μ L, en las que se paró dicha reacción por adición de 475 μ L de H₃PO₄ al 1%. Después de centrifugar, el sobrenadante resultante se analizó por HPLC.

Se utilizó un sistema HPLC con detector UV (HPLC Breeze, Waters Cromatografía) con una columna C18 de fase reversa (Zorbax, Agilent) para separar y detectar la etilhidantoína y el carbamil-ABA en los ensayos descritos. La fase móvil utilizada fue H₃PO₄ 20 mM pH 3,2:MeOH (90:10 v/v), a un flujo de 0,4 mL/min. La medida se realizó fijando el detector UV a 192 nm.

Los estudios de especificidad de sustrato se desarrollaron con la hidantoína precursora del aminoácido no natural norvalina (D,L-propilhidantoína). La reacción enzimática se llevó a cabo con el ensayo estándar de actividad a 60 °C, con 10 mM de sustrato. La fase móvil utilizada para detectar la propilhidantoína y el carbamil de la norvalina fue H₃PO₄ 20 mM pH 3,2:MeOH (80:20 v/v), a un flujo de 0,4 mL/min, monitorizando la señal a 203 nm.

3.5. Caracterización enzimática.

La temperatura y el pH óptimos del sistema se determinaron según el ensayo estándar descrito en el apartado 3.4. (Ensayo enzimático), realizando cada experimento por duplicado. La temperatura óptima se determinó llevando a cabo la reacción a diferentes temperaturas entre 20-80 °C, en intervalos de 10 °C, y de 5 °C en las proximidades de la temperatura óptima. Para determinar el pH óptimo se usaron los tampones citrato (pH 3,0-6,0), cacodilato (pH 6,0-7,0), trietanolamina (pH 7,0-8,6), borato-HCl (pH 8,1-9,0) y glicina-NaOH (pH 8,6-10,6).

La estabilidad térmica del sistema se determinó después de 4 y 24 h de preincubación de las cuatro enzimas en tampón borato-HCl 100 mM pH 8, a 50, 55 y 60 °C, seguido del ensayo de actividad a 60 °C, realizando cada experimento por duplicado.

Para estudiar el efecto de diferentes cationes en la actividad de las metaloenzimas que forman el sistema multienzimático, se realizaron distintos experimentos en presencia de los mismos. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron según se describe en el apartado 3.4. (Ensayo enzimático), añadiendo o no Co^{2+} en la reacción.

- AtH_y se indujo en presencia de CoCl_2 , ZnCl_2 y MnCl_2 (0,5 mM). Además, esta enzima, inducida en ausencia de catión, se incubó con CoCl_2 , ZnCl_2 y MnCl_2 (1 mM) durante 4 y 24 horas a 4 °C.
- BsL_{car} se indujo en presencia de CoCl_2 (0,2 mM).
- GkNSAAR se indujo en presencia de CoCl_2 (0,2 mM).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Expresión y purificación de las enzimas.

La clonación y expresión de las diferentes enzimas que forman los sistemas multienzimáticos que vamos a estudiar fueron previamente realizados por nuestro grupo [Clemente-Jiménez y col., 2003; Las Heras-Vázquez y col., 2003; Martínez-Rodríguez y col., 2008; Pozo-Dengra y col., 2009]. Asimismo la purificación de AtHyuA, BsLcar y GkNSAAR ha sido descrita en las publicaciones antes mencionadas. Sin embargo, AtHyu fue caracterizada en el año 2003 como extracto celular dentro de la cepa BL21 de *E. coli*, purificándose por primera vez en este Trabajo Fin de Máster. La purificación de las cuatro enzimas se ha realizado tal y como se describe en el apartado 3.3. (Purificación de las proteínas).

Después de ser purificadas mediante cromatografía de afinidad, las proteínas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), presentando todas ellas una pureza superior al 90% (Figura 4).

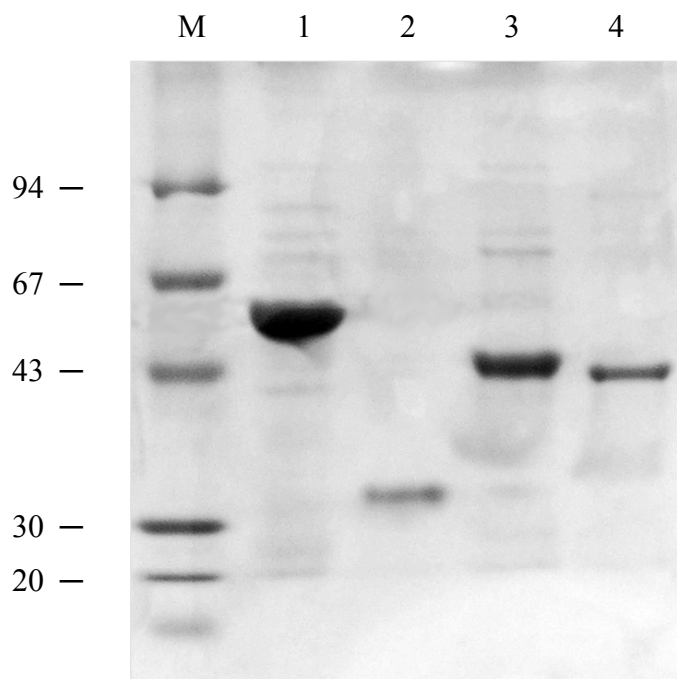


Figura 4. Análisis SDS-PAGE de las cuatro proteínas purificadas. Calle M, marcador de masa molecular; Calle 1, AtHyu (20 μ g); Calle 2, AtHyuA (20 μ g); Calle 3, BsLcar (20 μ g); Calle 4, GkNSAAR (20 μ g).

4.2. Comparación de los diferentes sistemas multienzimáticos.

Para comprobar si el sistema multienzimático formado por las 4 enzimas es más eficiente que los formados por 2 ó 3 de ellas, se realizaron distintos ensayos enzimáticos incluyendo en cada caso las enzimas correspondientes, usando en todos los casos como sustrato D,L-5-etilhidantoína

En el sistema doble formado por las enzimas AtHyu y BsLcar no hay conversión hasta L-aminoácido. El 50% del sustrato inicial se hidroliza para dar D-carbamil. Esto se debe a que aunque AtHyu es enantioselectiva, presenta una mayor preferencia por el isómero D-, siendo muy lenta la hidrólisis del isómero L-. Al ser BsLcar enantioespecífica para el L-carbamil-ABA, no reconoce el enantiómero D-, y no se produce L-aminoácido (Figura 5).

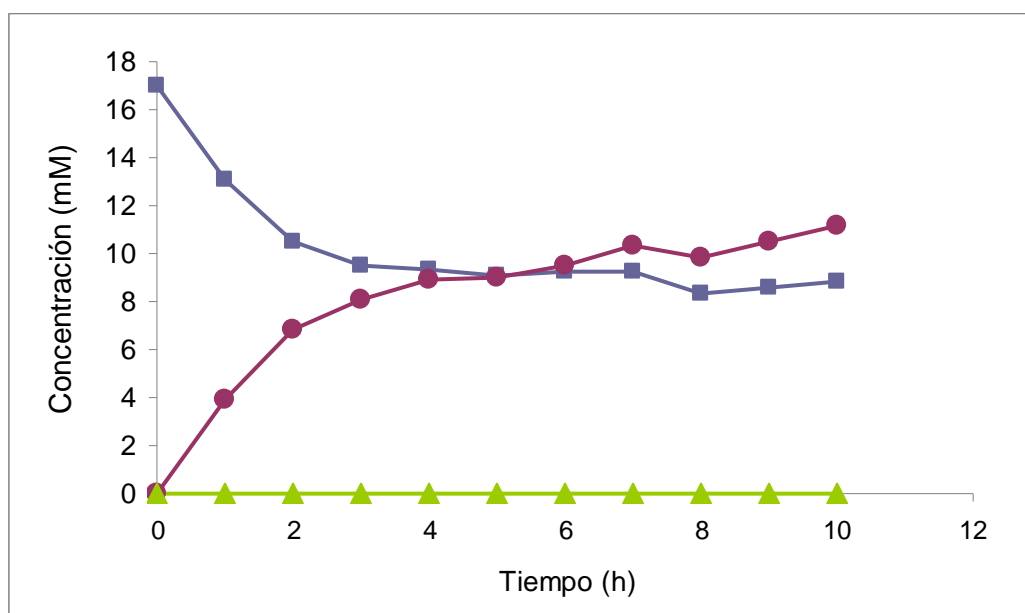


Figura 5. Sistema doble formado por AtHyu y BsLcar. (■) Etilhidantoína, (●) Carbamil-ABA, (▲) ABA.

Con el sistema triple formado por AtHyu, BsLcar y AtHyuA tampoco se produce L-aminoácido. En este caso, prácticamente el 90% del sustrato inicial se hidroliza para dar D-carbamil-ABA, porque aunque AtHyu solo es capaz de hidrolizar el enantiómero D-, AtHyuA racemiza el enantiómero L- hasta el D-. De nuevo, el D-carbamil-ABA no puede ser transformado en L-aminoácido por la BsLcar (Figura 6).

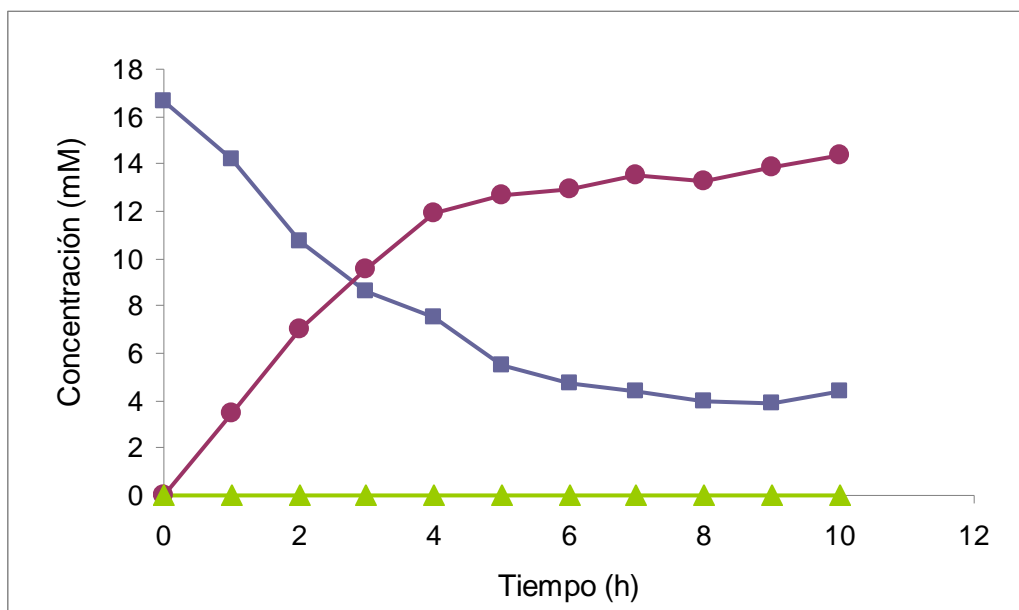


Figura 6. Sistema triple formado por AtHyu, BsLcar y AtHyuA. (■) Etilhidantoína, (●) Carbamil-ABA, (▲) ABA.

En el sistema triple formado por AtHyu, BsLcar y GkNSAAR con actividad carbamil racemasa, se obtiene una conversión del sustrato inicial hasta L-aminoácido del 50%. La presencia de una enzima con actividad carbamil racemasa, que permita la conversión de D-carbamil hasta L-carbamil para que éste último pueda ser hidrolizado hasta L-aminoácido por BsLcar, es la responsable de que con este sistema sí se produzca aminoácido. El consumo de solo el 50% del sustrato inicial evidencia la necesidad de una hidantoín racemasa que catalice el paso de L-etilhidantoína, no hidrolizada por AtHyu, hasta D-etilhidantoína. (Figura 7).

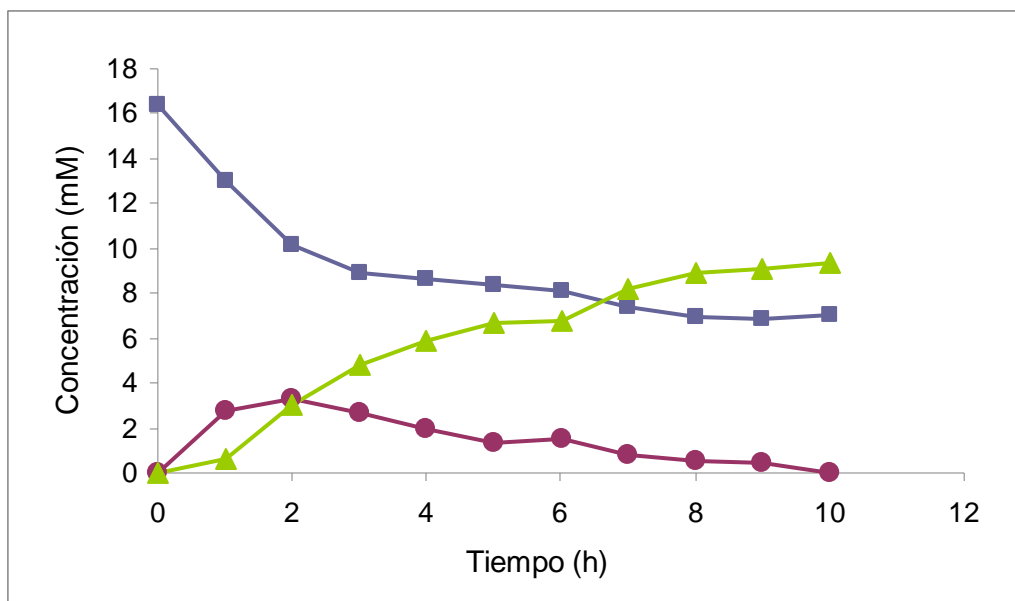


Figura 7. Sistema triple formado por AtHyu, BsLcar y GkNSAAR. (■) Etilhidantoína, (●) Carbamil-ABA, (▲) ABA.

Por último, con el sistema cuádruple formado por AtHyu, BsLcar, AtHyuA y GkNSAAR, el 100% del sustrato racémico inicial se hidroliza para dar L-aminoácido (Figura 8).

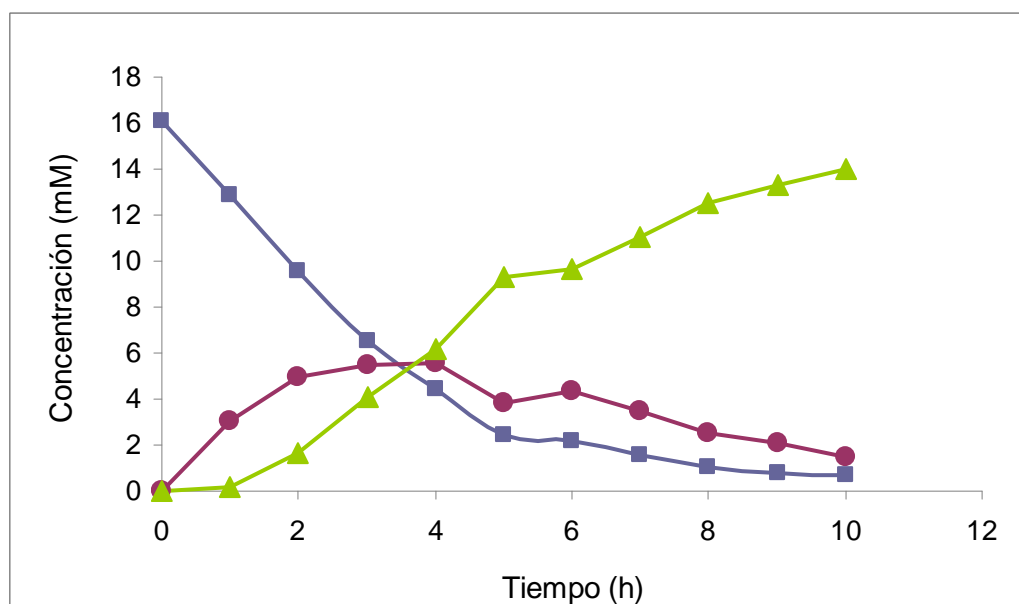


Figura 8. Sistema cuádruple formado AtHyu, BsLcar, AtHyuA y GkNSAAR. (■) Etilhidantoína, (●) Carbamil-ABA, (▲) ABA.

Estos resultados demuestran la necesidad de las cuatro enzimas para la producción de L-aminoácidos a partir de mezclas racémicas de hidantoínas 5-monosustituídas, con una conversión del 100%.

4.3. Efecto de los cationes en la actividad específica.

A excepción de AtHyuA, las otras tres enzimas que forman el sistema multienzimático han sido descritas como metaloenzimas [Clemente-Jiménez y col., 2003; Pozo-Dengra y col., 2010; Pozo-Dengra y col., 2009].

Para las enzimas BsLcar y GkNSAAR se ha demostrado que el mejor cofactor es el catión Co^{2+} [Pozo-Dengra y col., 2010; Pozo-Dengra y col., 2009], y además GkNSAAR lo necesita en la reacción [Pozo-Dengra y col., 2009]. Sin embargo, no hay estudio de cofactores para AtHyu purificada.

Para estudiar el efecto de diferentes cationes en la actividad de las metaloenzimas que forman el sistema multienzimático, se midió su actividad específica en presencia de estos. La enzima AtHyu se indujo en presencia de CoCl_2 , ZnCl_2 y MnCl_2 (0,5 mM). Esta misma enzima, inducida en ausencia de catión, se incubó con CoCl_2 , ZnCl_2 y MnCl_2 (1 mM) durante 4 y 24 horas a 4 °C. La enzima BsLcar se indujo en presencia de CoCl_2 (0,2 mM), y GkNSAAR se indujo en presencia de CoCl_2 (0,2 mM). Todos los ensayos enzimáticos se realizaron según se describe en el apartado 3.4. (Ensayo enzimático) en presencia o ausencia de CoCl_2 .

4.3.1. Efecto de cationes en la actividad de AtHyu.

Estudios previos realizados a extractos de *E. coli* con la proteína AtHyu recombinante, han mostrado una mayor actividad en presencia de cationes divalentes [Clemente-Jiménez y col., 2003]. Por tal motivo, en este Trabajo Fin de Máster se ha evaluado la necesidad de adicionar Co^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} (0,5 mM) durante la inducción de AtHyu. Por otro lado, para esta misma enzima inducida en ausencia de catión, se ha estudiado el aumento de la actividad tras incubarla con los tres cationes antes

mencionados (1 mM) durante 4 y 24 horas a 4 °C, así como la necesidad de añadir Co^{2+} en la reacción.

En la figura 9 se muestran las curvas de desaparición de D-etilhidantoína durante el ensayo de la actividad específica de AtHyu, cuando es inducida en presencia o ausencia de cationes. Si la enzima ha sido inducida en ausencia de catión prácticamente no se consume sustrato en los primeros minutos de reacción. Cuando es inducida en presencia de Zn^{2+} o Mn^{2+} hay una mayor desaparición de D-etilhidantoína, pero es en el caso de la inducción en presencia de Co^{2+} donde se observa una desaparición total de sustrato en sólo 15 minutos. A raíz de estos resultados, se considera al Co^{2+} como el mejor cofactor para AtHyu.

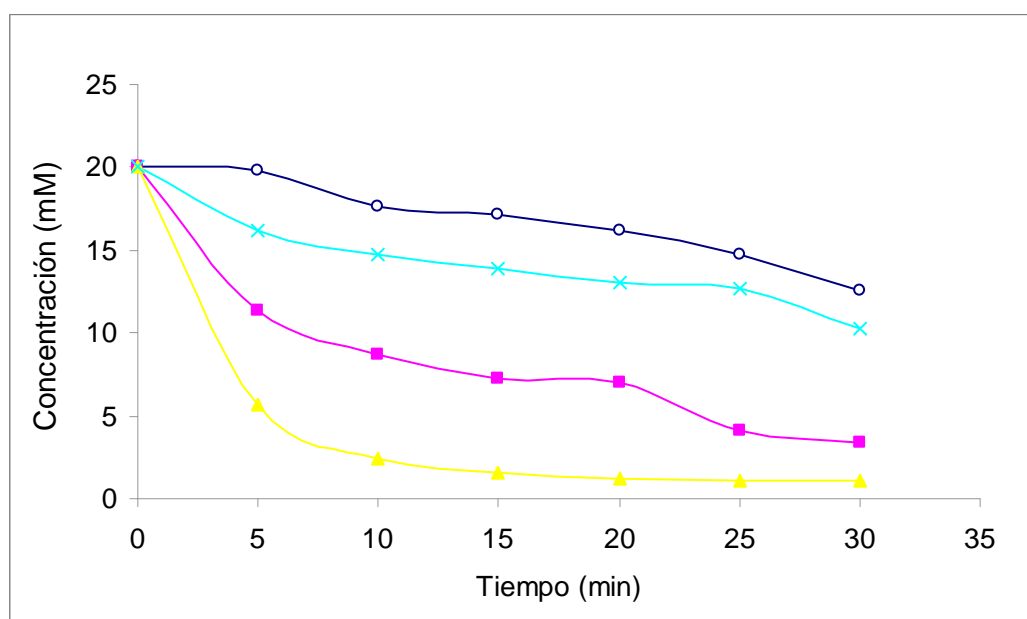


Figura 9. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu sin añadir Co^{2+} en la reacción. (○) AtHyu inducida en ausencia de catión; (x) AtHyu inducida en presencia de Mn^{2+} ; (■) AtHyu inducida en presencia de Zn^{2+} ; (▲) AtHyu inducida en presencia de Co^{2+} .

Los ensayos de actividad de AtHyu incubada con los cationes Co^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , mostraron resultados idénticos al caso de la enzima inducida en ausencia de catión, siendo todos negativos en actividad (Figura 10).

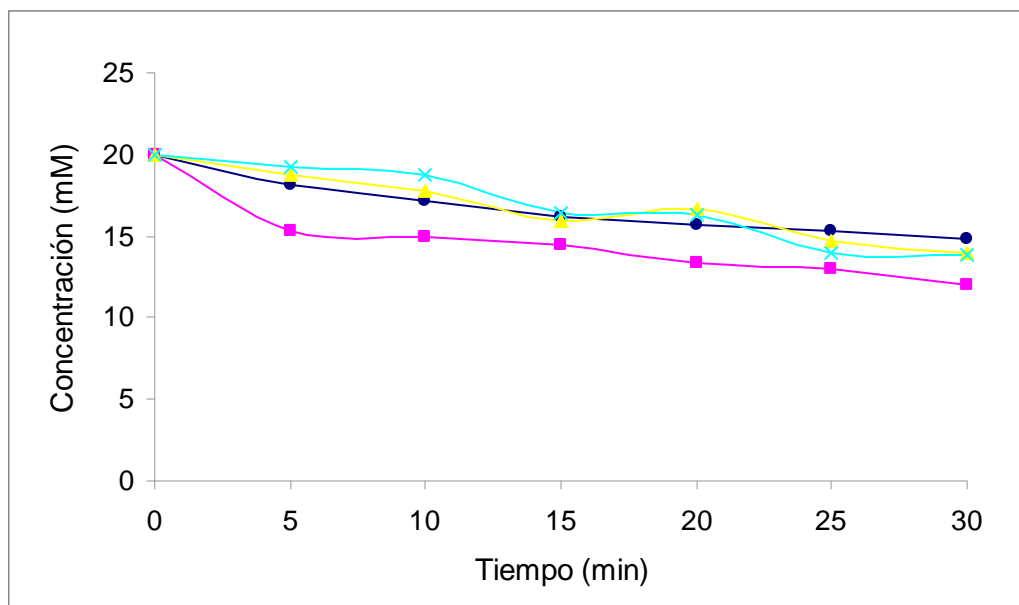


Figura 10. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu sin añadir Co^{2+} en la reacción. (●) AtHyu incubada con agua (x) AtHyu incubada con Mn^{2+} ; (■) AtHyu incubada con Zn^{2+} ; (▲) AtHyu incubada con Co^{2+} .

Por último, y debido a que GkNSAAR necesita Co^{2+} en la reacción, se estudió si añadiendo Co^{2+} en la reacción de AtHyu, ésta modificaba su actividad, observándose que no era así (Figura 11).

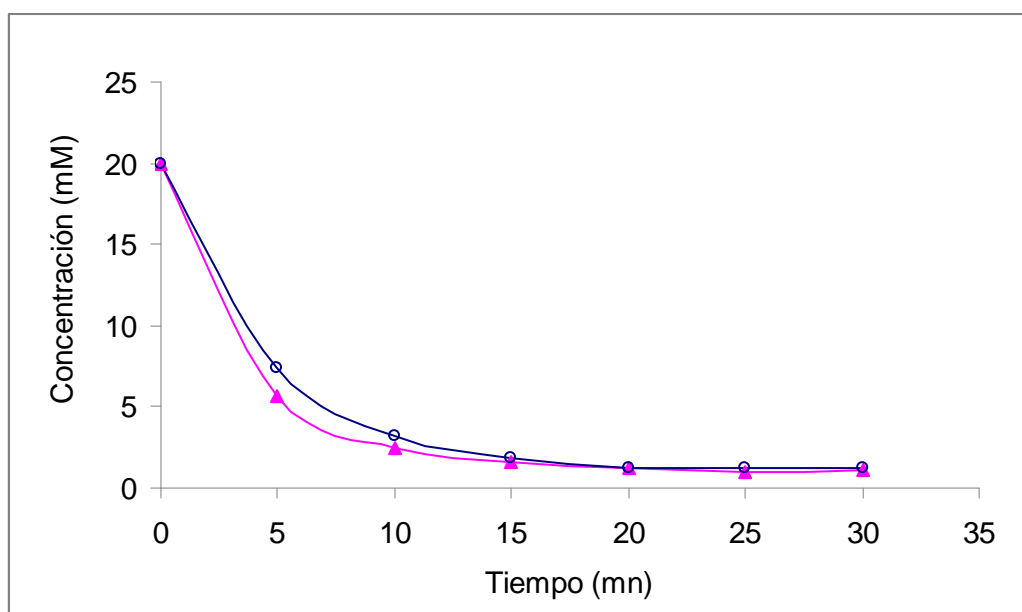


Figura 11. Curvas de desaparición de D-etilhidantoína por acción de AtHyu. (▲) AtHyu inducida en presencia de Co^{2+} , añadiendo Co^{2+} en la reacción; (○) AtHyu en ausencia de Co^{2+} , añadiendo Co^{2+} en la reacción.

En conclusión, AtHyu necesita ser inducida en presencia de catión, presentando la mayor actividad cuando es Co^{2+} .

4.3.2. Efecto de cationes en la actividad de BsLcar.

Está descrito que BsLcar necesita Co^{2+} para su actividad enzimática [Pozo-Dengra y col., 2010]. En este Trabajo Fin de Máster se ha evaluado la presencia de Co^{2+} tanto en la inducción, como en la reacción. Así, se realizaron estudios de la actividad de BsLcar inducida en presencia y ausencia de Co^{2+} (0,5 mM), en reacciones adicionando o no este catión (1 mM) también en la reacción.

En la figura 12 se observan las curvas de desaparición de D,L-carbamil-ABA para los distintos ensayos estudiados. Los resultados mostraron por un lado, que la enzima no presenta actividad en ausencia de Co^{2+} , y que no influye añadirlo durante la inducción o en la reacción, en cualquier caso la actividad específica es la misma. Por este motivo se decidió inducir en ausencia del catión y añadir Co^{2+} sólo en la reacción (1 mM).

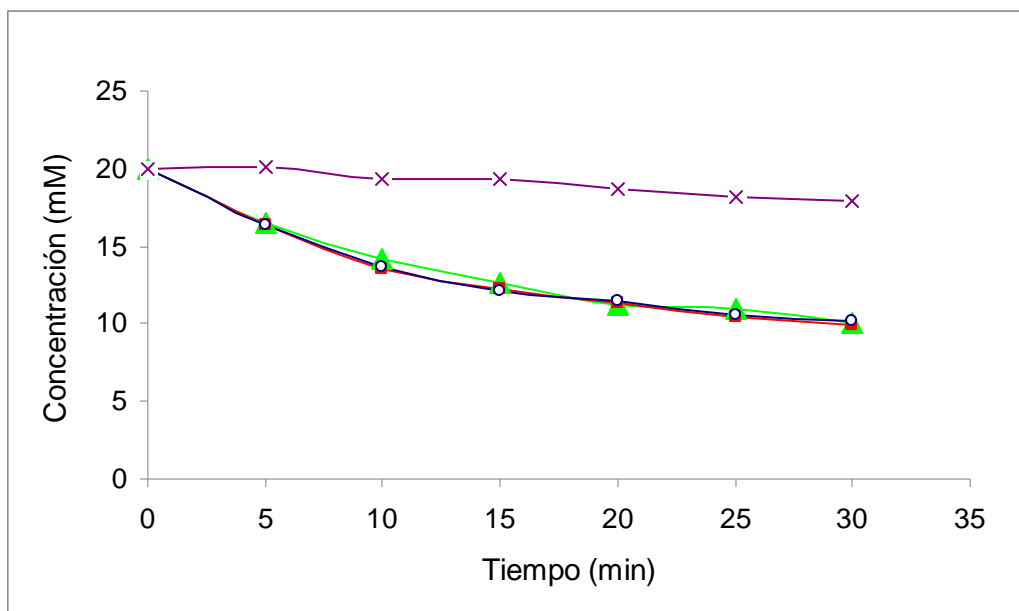


Figura 12. Curvas de desaparición de D,L-carbamil-ABA por acción de BsLcar. (x) BsLcar inducida en ausencia de catión, sin añadir Co^{2+} en la reacción; (▲) BsLcar inducida en ausencia de catión, añadiendo Co^{2+} en la reacción; (■) BsLcar inducida en presencia de Co^{2+} , sin añadir Co^{2+} en la reacción; (○) BsLcar inducida en presencia de Co^{2+} , añadiendo Co^{2+} en la reacción.

4.3.3. Efecto de cationes en la actividad de GkNSAAR.

GkNSAAR es una metaloenzima que requiere en la reacción la presencia de Co^{2+} para su actividad enzimática [Pozo-Dengra y col., 2009]. En este Trabajo Fin de Máster se ha estudiado el efecto de añadir o no este catión durante la inducción, siempre y cuando el Co^{2+} esté presente en la reacción.

Se observa que las curvas de desaparición de D,L-carbamil-ABA para los dos ensayos estudiados son prácticamente idénticas, obteniéndose en ambos casos el mismo valor de actividad específica para la enzima GkNSAAR (Figura 13). Por tanto, se decidió añadir el Co^{2+} (1 mM) en la reacción y no durante la inducción, lo cual ofrece una ventaja adicional y es que la enzima puede ser concentrada mucho más que si el catión se añade durante la inducción, ya que si la enzima es inducida con Co^{2+} al concentrarla precipita.

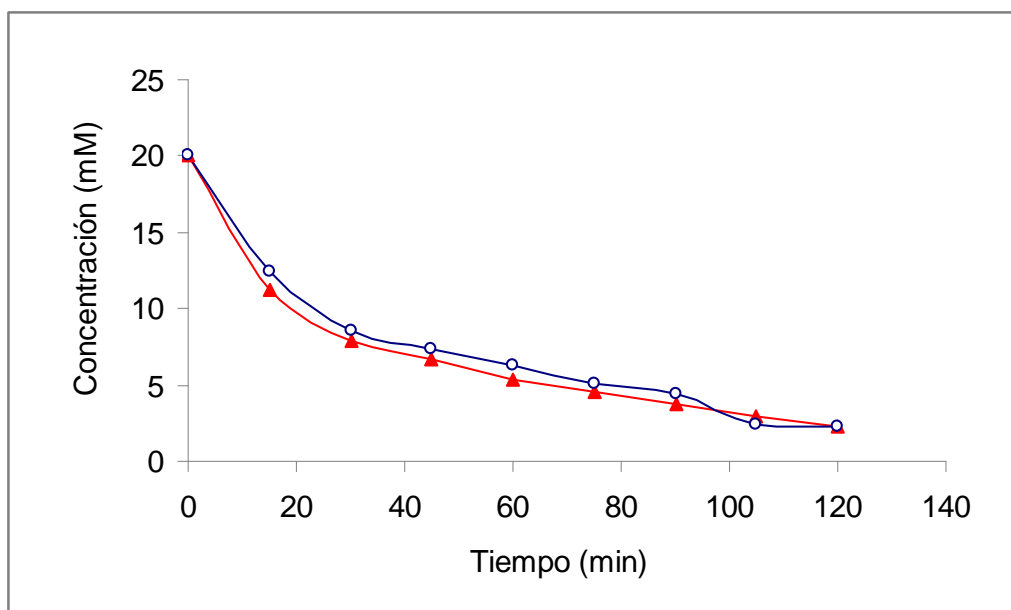


Figura 13. Curvas de desaparición de carbamil-ABA por acción de GkNSAAR. (▲) GkNSAAR inducida en ausencia catión, añadiendo Co^{2+} en la reacción; (○) GkNSAAR inducida en presencia de Co^{2+} , añadiendo Co^{2+} en la reacción.

4.4. Actividad específica de las enzimas.

Con el fin de determinar la proporción necesaria de cada una de las cuatro enzimas que forman el sistema multienzimático se evaluó su actividad específica. Ésta se calculó representando la desaparición de sustrato, en su fase exponencial, por minuto de reacción.

4.4.1. Actividad específica de AtHyu.

La actividad específica de AtHyu ($5,9 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{g/mL}$) se calculó midiendo la desaparición de D-etilhidantoína (20 mM) durante los primeros 5 minutos del ensayo enzimático de esta enzima a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 14), según se describe en el apartado 3.4.

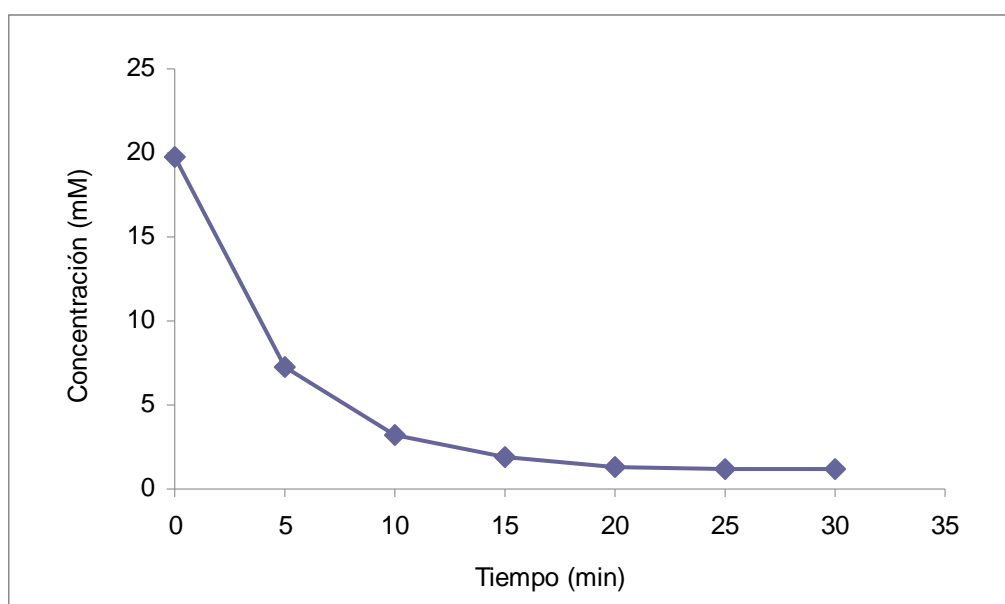


Figura 14. Desaparición de D-etilhidantoína en el ensayo de actividad específica de AtHyu.

Los resultados reflejan una actividad específica para AtHyu de $8,2 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

4.4.2. Actividad específica de AtHyuA.

Para el cálculo de la actividad específica de AtHyuA ($22,5\mu\text{M}$, $600\mu\text{g/mL}$) se realizó el ensayo enzimático con L-etilhidantoína (20 mM) como sustrato en presencia de un exceso de AtHyu ($5,9\mu\text{M}$, $300\mu\text{g/mL}$), a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Ésta última no puede hidrolizar el sustrato si no ha sido racemizado previamente por AtHyuA. Mediante esta reacción acoplada se calculó la actividad específica de AtHyuA midiendo la desaparición de sustrato en el intervalo de tiempo entre 30 y 75 minutos (Figura 15).

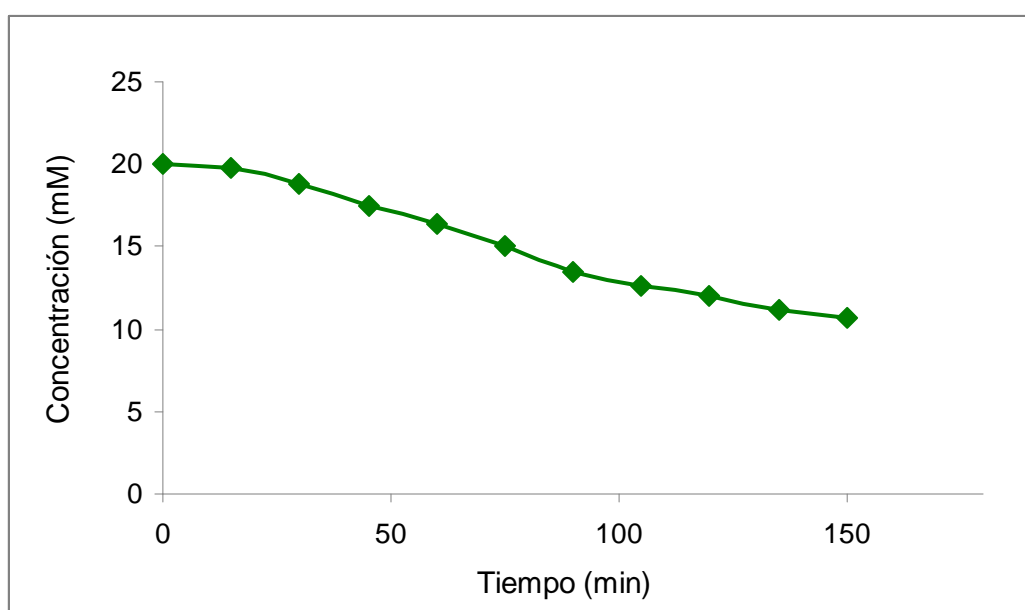


Figura 15. Desaparición de L-etilhidantoína en el ensayo de actividad específica de AtHyuA.

Estos estudios determinaron una actividad específica para AtHyuA de $0,156\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, muy inferior a la de AtHyu.

4.4.3. Actividad específica de BsLcar.

La actividad específica de BsLcar ($4,8 \mu\text{M}$, $216 \mu\text{g/mL}$) se calculó midiendo la desaparición de D,L-carbamil-ABA (20 mM) durante los primeros 10 minutos de la reacción enzimática a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 16).

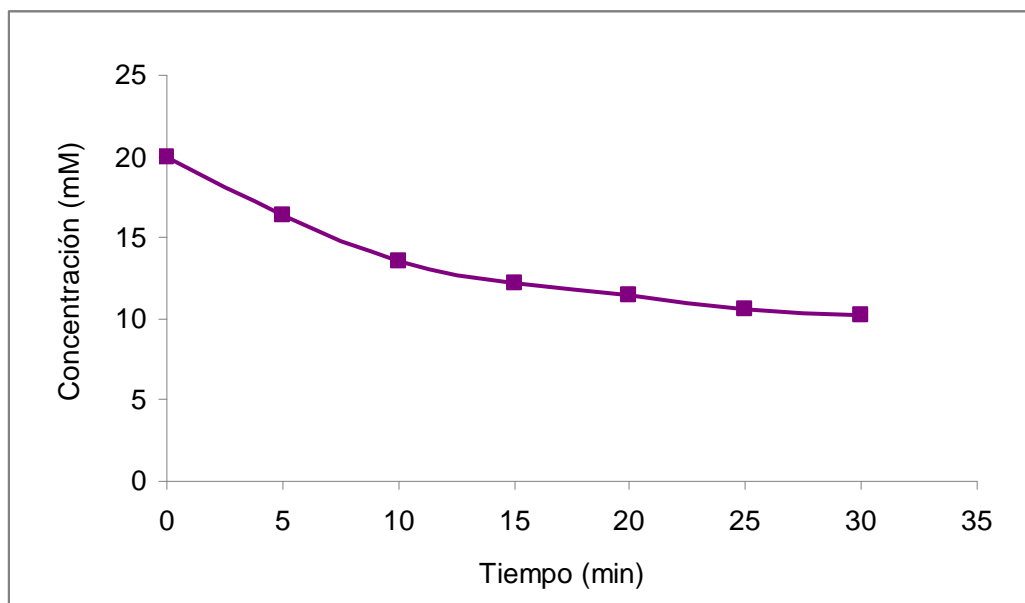


Figura 16. Desaparición de D,L-carbamil-ABA en el ensayo de actividad específica de BsLcar.

El valor obtenido para la actividad específica de BsLcar fue de $3,3 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$.

4.4.4. Actividad específica de GkNSAAR.

El ensayo enzimático de la enzima GkNSAAR ($23,4 \mu\text{M}$, $1017 \mu\text{g/mL}$) se realizó con D,L-carbamil-ABA (20 mM) como sustrato en presencia de un exceso de BsLcar ($4,8 \mu\text{M}$, $216 \mu\text{g/mL}$). Para que ocurra una transformación de la mezcla racémica en L-aminoácido es necesaria la actividad racemasa de GkNSAAR, tras hidrolizar el enantiómero L- la enzima BsLcar. Para determinar su actividad específica se midió la desaparición de sustrato en el intervalo de tiempo entre 30 y 75 minutos,

cuando ya se había hidrolizado el L-carbamil-ABA de la mezcla racémica original (Figura 17).

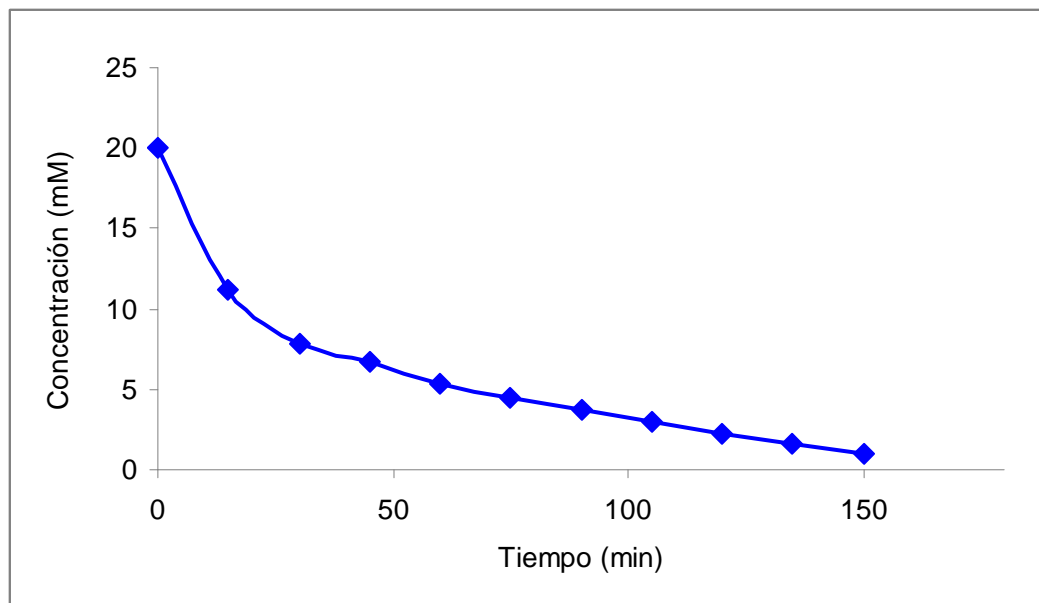


Figura 17. Desaparición de D,L-carbamil-ABA en el ensayo de actividad específica de GkNSAAR.

La actividad específica calculada para GkNSAAR fue de 0,059 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

4.4.5. Cálculo de la proporción de cada enzima del sistema.

Según los datos de actividad específica de las cuatro enzimas los ratios entre ellas deberían ser los mostrados en la tabla 4.

Enzima	Proporción
AtHyu	1
BsLcar	2,5
AtHyuA	52
GkNSAAR	139

Tabla 4. Proporciones teóricas de las enzimas en el sistema multienzimático.

Para intentar optimizar la proporción de proteína necesaria en el sistema multienzimático según las actividades específicas de cada una, se realizaron distintos ensayos modificando las proporciones.

Debido a la gran cantidad de GkNSAAR y AtHyuA que se debería usar si hiciéramos los ensayos partiendo de las proporciones indicadas anteriormente, referidas a AtHyu, se hacen tomando como referencia la actividad específica de BsLcar. Las distintas proporciones estudiadas para cada caso se detallan en la Tabla 5.

Ensayo	AtHyu	BsLcar	AtHyuA	GkNSAAR
1	0,4	1	21	55
2	0,4	1	21	110
3	0,4	2	21	55
4	0,4	1	10,5	55
5	0,4	2	10,5	110
6	0,4	1	21	27,5
7	0,4	6	21	27,5
8	1,6	1	21	27,5
9	0,4	1	10,5	27,5

Tabla 5. Proporciones de las enzimas en los distintos ensayos realizados para la optimización de las mismas. El ensayo 1 corresponde a las proporciones referidas a BsLcar.

En la gráfica 18 se representan las curvas de conversión en L-ABA en los distintos ensayos estudiados. Los mejores resultados se obtuvieron en los ensayos 2, 3, 5 y 6, seleccionándose como la mejor relación la del ensayo 4, ya que utiliza la menor cantidad de enzimas posible.

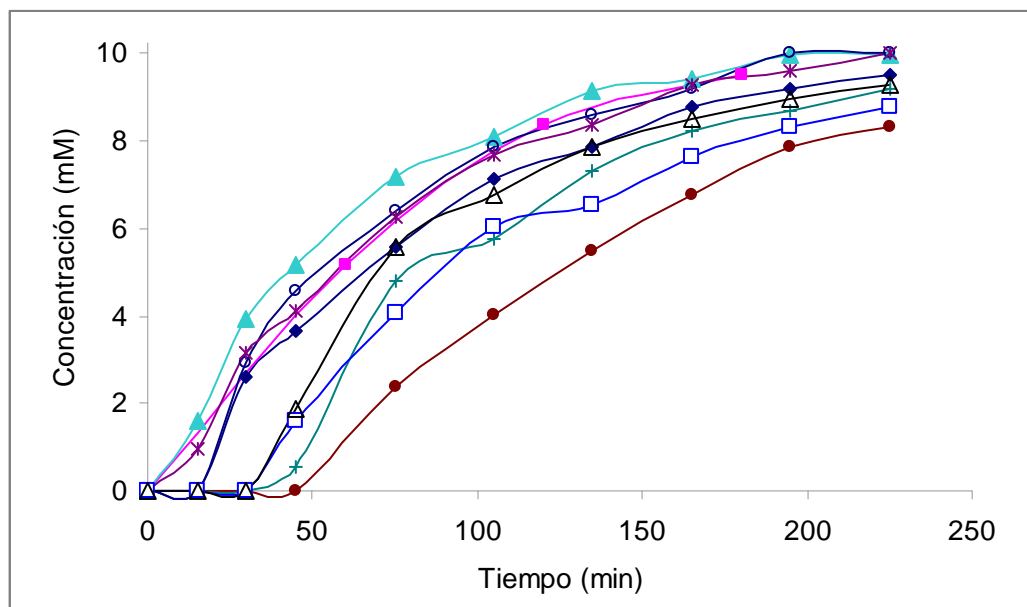


Figura 18. Curvas de aparición de L-ABA en los ensayos estudiados con diferentes proporciones de las enzimas del sistema multienzimático. (◆) Ensayo 1; (■) Ensayo 2; (▲) Ensayo 3; (○) Ensayo 4; (*) Ensayo 5; (●) Ensayo 6; (+) Ensayo 7; (□) Ensayo 8; (△) Ensayo 9.

Enzima	Proporción
AtHyu	0,4
BsLcar	1
AtHyuA	10,5
GkNSAAR	55

Tabla 6. Proporciones óptimas experimentales de las enzimas en el sistema multienzimático.

4.5. Influencia del pH y la temperatura en la actividad del sistema multienzimático.

La actividad del sistema se ensayó en varios tampones desde pH 3,0 a 10,6 (citrato, cacodilato, trietanolamina, borato-HCl y glicina-NaOH). A pH entre 3 y 6 en tampón citrato la actividad no se pudo medir debido a la precipitación de las enzimas en estas condiciones. La actividad máxima se obtuvo en tampón borato-HCl pH 8. A valores de pH inferiores a 7 y superiores a 8,5 en tampón cacodilato y glicina-NaOH, respectivamente, la actividad del sistema fue prácticamente nula. No así en tampón Borato-HCl a pH 8,5 y 9, donde la actividad relativa está próxima al 70%. (Figura 19).

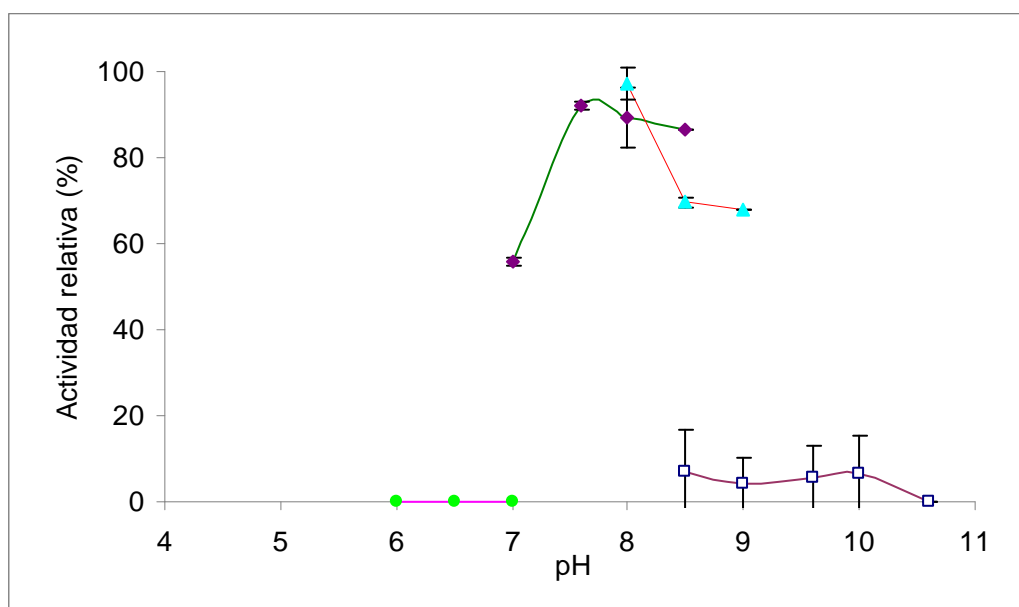


Figura 19. Gráfica de actividad relativa del sistema en función del pH. (●) Cacodilato; (◆) Trietanolamina; (▲) Borato-HCl; (○) Glicina-NaOH.

La temperatura óptima de reacción fue estudiada desde 20 a 80 °C, en intervalos de 10 °C, y de 5 °C en las proximidades de la temperatura óptima. La máxima actividad del sistema se obtuvo entre 50 y 65 °C, aunque un poco mayor para 60.

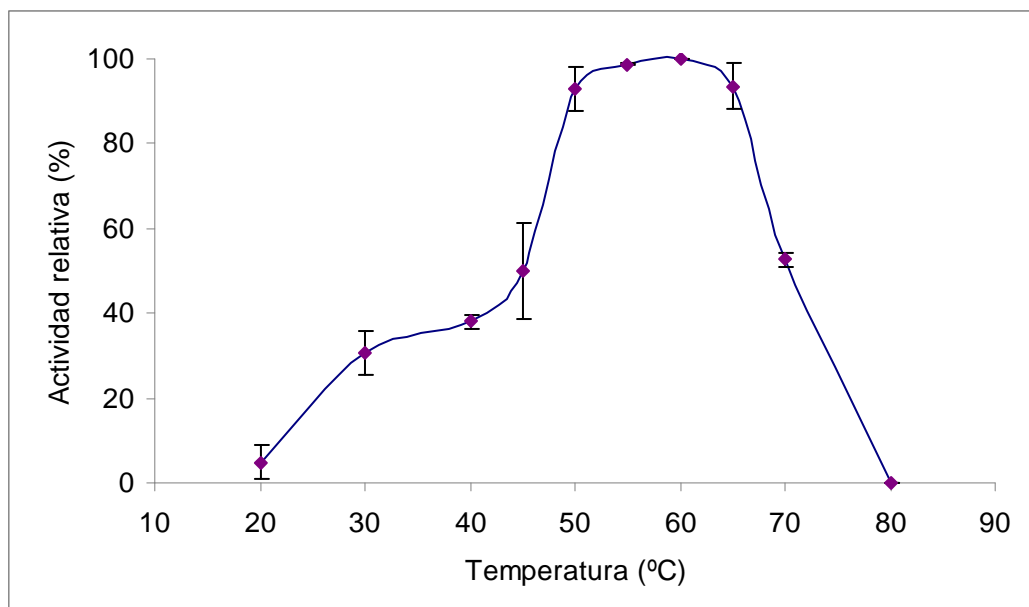


Figura 20. Gráfica de actividad relativa del sistema en función de la temperatura.

4.6. Estabilidad térmica del sistema.

La estabilidad térmica del sistema multienzimático se determinó mediante preincubación de las cuatro enzimas en tampón borato-HCl 100 mM pH 8 a 50, 55 y 60 °C, durante 4 y 24 h, midiendo a continuación la actividad residual con el ensayo enzimático a 60 °C.

Tal y como aparece reflejado en la figura 21, a 50 °C la actividad del sistema multienzimático permanece prácticamente inalterada a las 24 horas de incubación, siendo aproximadamente de 95%. Sin embargo, a las temperaturas de incubación de 55 y 60 °C, durante el mismo tiempo, la actividad del sistema disminuyó hasta 75 y 60%, respectivamente.

Estos resultados nos indican que para reacciones con una duración inferior a 8 horas, la temperatura óptima es de 60 °C. Sin embargo, para tiempos mayores éste valor baja a 50 °C, por disminuir considerablemente la estabilidad del sistema a temperaturas superiores a ésta.

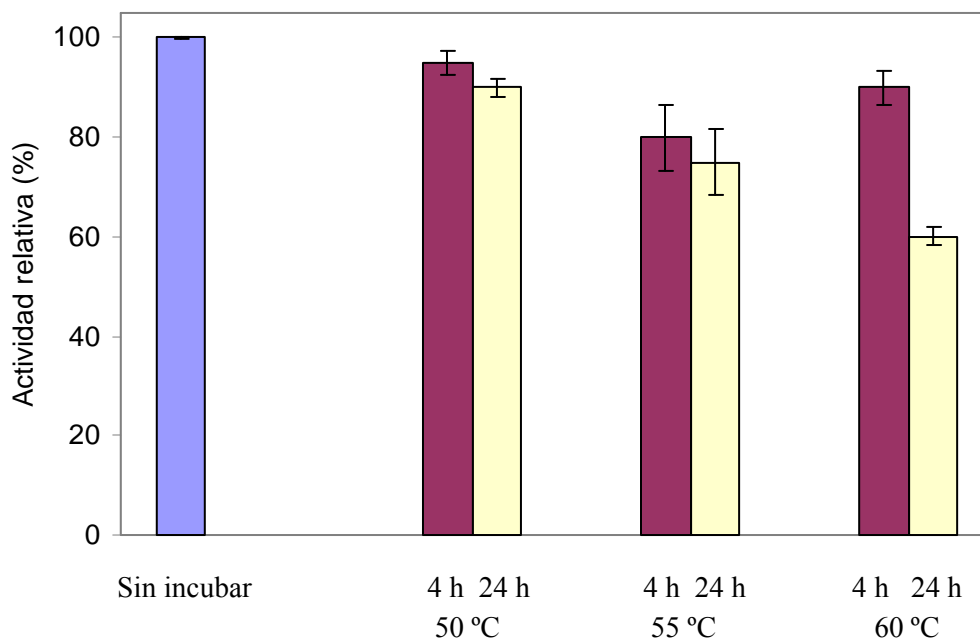


Figura 21. Gráfica de estabilidad térmica del sistema multienzimático.

4.7. Conversión de diferentes mezclas racémicas.

Se examinó la capacidad del sistema multienzimático para convertir mezclas racémicas de hidantoínas 5-monosustituidas en L-aminoácidos ópticamente puros. Los estudios de especificidad de sustrato se desarrollaron con la hidantoína del ácido aminobutírico (D,L-etilhidandotína), y con la del aminoácido norvalina (D,L-propilhidantoína), en las condiciones óptimas del sistema, pH 8 y 60 °C de temperatura.

Los resultados mostraron que el 100% del sustrato, en ambos casos, se consume para dar L-aminoácido. La conversión de D,L-propilhidantoína en L-norvalina (Figura 23) tiene lugar en un tiempo inferior (175 minutos) respecto a la D,L-etilhidandotína en L-ABA (225 minutos) (Figura 22).

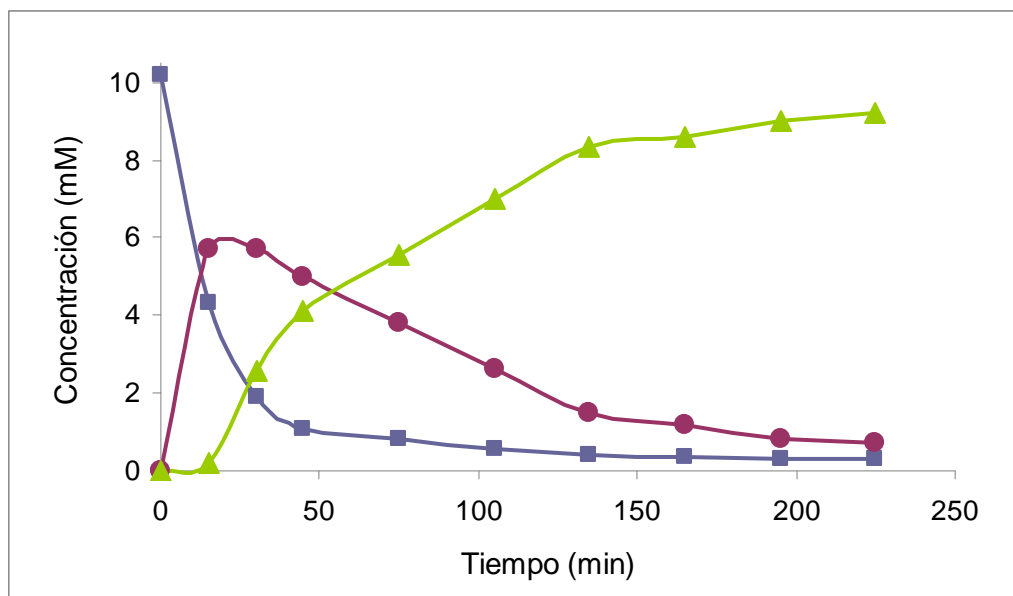


Figura 22. Conversión de D,L-5-etilhidantoína en L-ABA. (■) D,L-etilhidantoína (●) D,L-Carbamil-ABA (▲) L-ABA.

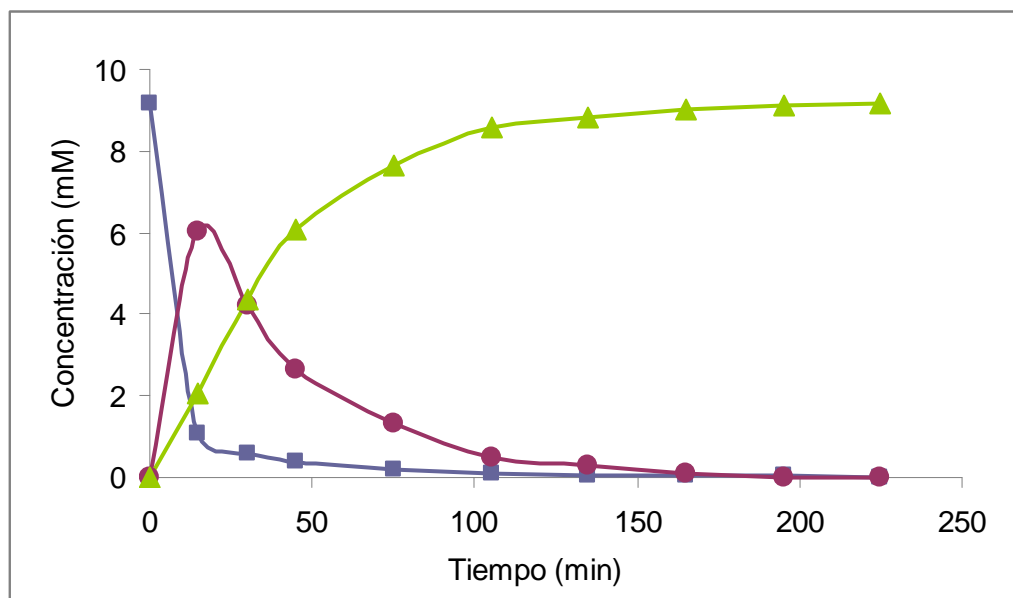


Figura 23. Conversión de D,L-5-propilhidantoína en L-Norvalina. (■) D,L-propilhidantoína (●) D,L-Carbamil de la norvalina (▲) L-Norvalina.

Indicar que en la actualidad se continúa estudiando la capacidad del sistema multienzimático para convertir diferentes hidantoínas sustituidas en el C5 para dar L-aminoácidos ópticamente puros.

5. CONCLUSIONES.

1. Se ha construido un sistema, basado en el “Proceso de la Hidantoinasa”, formado por cuatro enzimas para la producción de L-aminoácidos ópticamente puros a partir de mezclas racémicas de hidantoínas monosustituidas en C5. Estas enzimas son D,L-hidantoinasa, hidantoín racemasa, L-carbamilasa y *N*-succinil aminoácido racemasa con actividad carbamil racemasa.
2. Se ha estudiado por primera vez el efecto de cationes divalentes en la actividad de AtHyu purificada. Determinándose que esta enzima necesita Co^{2+} como cofactor y que debe estar presente desde la inducción.
3. Se han calculado las proporciones óptimas de las cuatro enzimas, en el sistema multienzimático, en función de sus actividades específicas.
4. Se han determinado las condiciones óptimas para la actividad enzimática del sistema, siendo éstas pH 8,0 y 60 °C, para reacciones con una duración inferior a 8 horas, y 50 °C para tiempos reacciones de hasta 24 horas.
5. Se ha obtenido una conversión del 100% de D,L-etilhidantoina y D,L-propilhidantoina, hasta ácido L-aminobutírico y L-norvalina, en 225 y 175 minutos, respectivamente,

6. BIBLIOGRAFÍA.

Bódalo, A., Gómez, J.L., Gómez, E., Máximo, F.M., Montiel, M.C. Revisión de los distintos métodos de síntesis química de α -aminoácidos. (2003) QUIBAL 50 3:149-160.

Bommarius, A.S., Schwarm, M., Drauz, K. Biocatalysis to amino acid-basic chiral pharmaceuticals-examples and perspectives. J. Mol. Catal. B-Enzym. (1998) 5:1-11.

Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., KeBeler, M., Stürmer, R., Zelinski, T. Industrial methods for the production of optically active intermediates. Angew. Chem. Int. Ed. (2004) 43: 788-824.

Clemente-Jiménez, J.M., Martínez-Rodríguez, S., Mingorance-Cazorla, L., De la Escalera-Hueso, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. Catalytic analysis of a recombinant D-hydantoinase from *Agrobacterium tumefaciens*. Biotechnol. Lett. (2003) 25:1067-1073.

Clemente-Jiménez, J.M., Martínez-Rodríguez, S., Rodríguez-Vico, F., Las Heras-Vázquez, F.J. Optically pure alpha-amino acids production by "Hydantoinase Process". Recent Pat Biotechnol. (2008) 2:35-46.

Gill, S.C., von Hippel, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* (1989) 182:319-326.

Glazer, A.N., Nikaido, H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. (1995) Ed. W.H. Freeman & Company. Nueva York. ISBN: 07-167-2608-4.

Greenstein, J.P., Winitz, M. Chemistry of the amino acids. (1961) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Las Heras-Vázquez, F.J., Martínez-Rodríguez, S., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M., Rodríguez-Vico, F. Overexpression and characterization of hydantoin

racemae from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2003) 303:541-547.

Martínez-Gómez, A.I., Martínez-Rodríguez, S., Clemente-Jiménez, J.M., Pozo-Dengra, J., Rodríguez-Vico, F., Las Heras-Vázquez, F.J. Recombinant polycistronic structure of hydantoinase process genes in *Escherichia coli* for the production of optically pure D-amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* (2007) 73:1525-31.

Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vazquez, F.J., Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Rodríguez-Vico, F. Complete conversion of D,L-5-monosubstituted hydantoins with a low velocity of chemical racemization into D-amino acids using whole cells of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress.* (2002) 18:1201-1206.

Martínez-Rodríguez, S., García-Pino, A., Las Heras-Vázquez, F.J., Clemente-Jiménez, J.M., Rodríguez-Vico, F., Loris, R., García-Ruiz, J.M., Gavira, J.A. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the recombinant L-N-carbamoylase from *Geobacillus stearothermophilus* CECT43. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* (2008) 64:1135-1138.

Patel, R., Hanson, R., Goswami, A., Nanduri, V., Banerjee, A., Donovan, M.J., Goldberg, S., Johnston, R., Brzozowski, D., Tully, T., Howell, J., Cazzulino, D., Ko, R. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2003) 30:252-259.

Pozo-Dengra, J., Martínez-Gómez, A.I., Martínez-Rodríguez, S., Clemente-Jiménez, J.M., Rodríguez-Vico, F., Las Heras-Vázquez, F.J. Racemization study on different N-acetylamino acids by a recombinant N-succinylamino acid racemase from *Geobacillus kaustophilus* CECT4264. *Process Biochem.* (2009) 44:835-841.

Pozo-Dengra, J., Martínez-Gómez, A.I., Martínez-Rodríguez, S., Clemente-Jiménez, J.M., Rodríguez-Vico, F., Las Heras-Vázquez, F.J. Evaluation of substrate promiscuity of an L-carbamoyl amino acid amidohydrolase from *Geobacillus stearothermophilus* CECT43. *Biotechnol Prog.* (2010) 26:954-959.

Sharma, R., Vohra, R.M. Microbial transformations: production of D-amino acids using hydantoinase. *Curr. Sci. India.* (1999) 77: 127-136.

Spiegel, C. BIO007H Commercial Amino Acids. 2009.

<http://www.bccresearch.com/report/BIO007H.html>

Walker, J.M., Gingold, E.B. En: *Biología molecular y biotecnología.* (1997) Editorial Acribia, Zaragoza. ISBN: 84-200-0829-X.

Wiseman, A., *Manual de biotecnología de los enzimas.* (1995) Editorial Acribia, Zaragoza. ISBN 84-200-0705-6.