



Universitat Autònoma
de Barcelona

SÍNTESIS ASIMÉTRICA QUIRAL DE 1-FENILETILAMINA CATALIZADA MEDIANTE LA CASCADA ENZIMÁTICA DE ω -TRANSAMINASA Y PIRUVATO DESCARBOXILASA

JAIME GORDÓN DURÁN

MÀSTER EN ENGINYERIA BIOLÒGICA I AMBIENTAL

**TUTORES: NATÀLIA ALCOVER, MARINA GUILLÉN,
GREGORIO ÁLVARO**

18 ENERO 2019

Síntesis asimétrica quiral de 1-feniletilamina catalizada mediante la cascada enzimática de ω -transaminasa y piruvato descarboxilasa

Jaime Gordón^{a*}, Natàlia Alcover^a, Marina Guillén^a, Gregorio Álvaro^a.

^a Grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada, Departamento de Ingeniería Química Biológica y Ambiental, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

* Autor correspondiente, Email: jaimegordon93@gmail.com

Resumen

CONTEXTO: Dentro del creciente interés industrial por los procesos multienzimáticos, se plantea la síntesis asimétrica de 1-feniletilamina (FEA), una amina quiral precursora de varios productos de interés en la industria, utilizando una cascada multienzimática en presencia de ω -transaminasa (ω -TA) y piruvato descarboxilasa (PDC).

RESULTADOS: Tras llevar a cabo la reacción de interés utilizando PDC y dos tipos de ω -TA diferentes, procedentes de los microorganismos *Chromobacterium violaceum* (CviTA) y *Vibrio fluvialis* (VflTA), la alternativa que mejores resultados mostró fue la reacción en la que intervinieron conjuntamente la PDC y la VflTA. En ella se obtuvo una concentración final de producto de 5,34 mM, la cual supuso una conversión del 59,95% y un rendimiento del 19,45%.

CONCLUSIÓN: El hecho de añadir PDC a la reacción de transaminación permitió desplazar el equilibrio químico hacia la formación de FEA y, por tanto, mejorar la reacción al obtenerse una mayor concentración de producto y rendimiento que cuando no se empleaba la cascada multienzimática. No obstante, debido a los problemas de solubilidad presentados en los ensayos y al obtenerse todavía valores bajos de rendimiento, aún quedan optimizaciones por realizarse en la reacción.

Palabras clave: ω -transaminasas, piruvato descarboxilasa, aminas quirales, síntesis asimétrica, cascada multienzimática.

1. Introducción

En los últimos años, la biocatálisis se ha convertido en una alternativa bien establecida frente a las líneas tradicionales que empleaban la vía química ^{1,2}. Dentro de este campo destacan los procesos multienzimáticos que, además de permitir la síntesis de un número mucho más amplio de compuestos diferentes que en una única etapa, permiten desplazar los equilibrios químicos en el sentido deseado ³. De esta forma, se puede conseguir un mayor control de los procesos y una menor producción de subproductos indeseados. Esta ventaja a la hora de llevar a cabo la secuenciación de varias etapas biocatalíticas permite la posibilidad de sintetizar diversos compuestos con alto valor añadido a nivel industrial ⁴. Es importante, a la hora de garantizar la viabilidad económica de un proceso multienzimático, conseguir una adecuada concentración efectiva del biocatalizador y una concentración del producto final que resulte rentable ¹.

La síntesis multienzimática de aminas quirales mediante la utilización conjunta de ω -transaminasas (ω -TA) y descarboxilasas es un ejemplo de sistema multienzimático en cascada de alto interés industrial, debido al abanico de aplicaciones que tienen las aminas quirales ⁵⁻⁸.

Pueden distinguirse dos tipos de transaminasas, en función de la posición relativa que ocupe el grupo amino: las α -TA, las cuales requieren que haya un grupo carboxílico en α respecto a la posición en la que se da la transferencia del grupo amino, y las ω -TA, en las cuales es necesario que al menos una de las sustancias entre las que se produce la transferencia del grupo amino (donador o receptor) no sea un α -aminoácido o un α -cetoácido ⁹. Las ω -TA son capaces de aminar una mayor variedad de compuestos como cetoácidos, aldehídos o cetonas ^{10,11}. Por ello, a nivel sintético, constituyen una alternativa más versátil. Además, estas enzimas no son dependientes de cofactores, por lo que no necesitan que se lleve a cabo reacciones externas para regenerar los cofactores. Otra de sus principales ventajas es su elevada estéreo-selectividad ^{2,4,6,11-14}, la cual permite evitar la formación de mezclas racémicas al tener

preferencia R o S, posibilitando la obtención de compuestos aminados ópticamente puros y haciendo que presenten un interés creciente en la industria química o farmacéutica ^{2,4,6,14,15}.

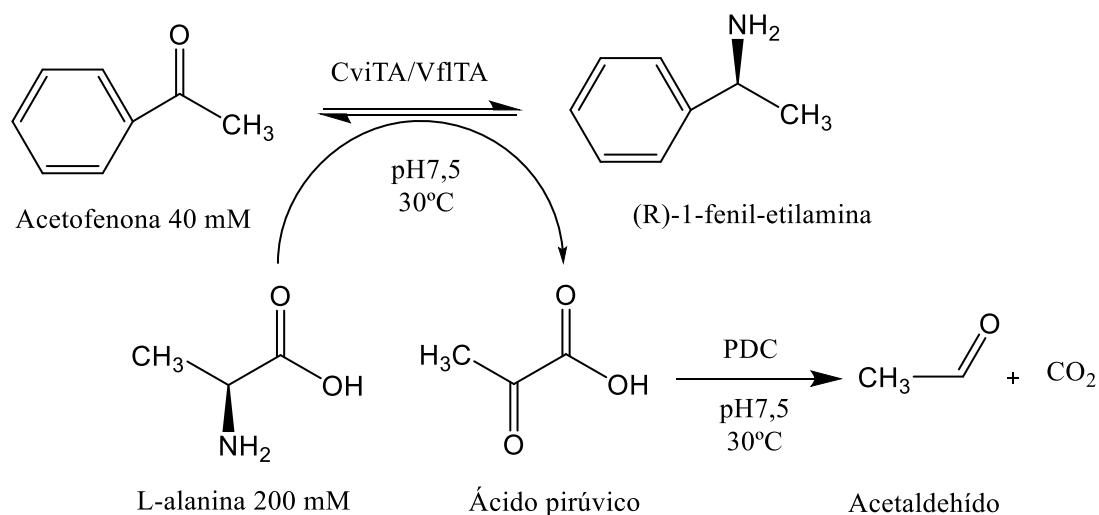
Existen dos vías posibles para la producción de aminas enantioméricamente puras: Resolución cinética de mezclas racémicas de aminas y síntesis asimétrica de aminas proquirales ^{2,4,6,11,13,16,17,18}. La resolución cinética tiene como principal ventaja que el equilibrio termodinámico está desplazado hacia la formación del producto, es decir, la amina ópticamente pura. El gran inconveniente es que el rendimiento teórico máximo que se puede obtener en esta síntesis es del 50% ^{6,11,16,17,19}. Otra desventaja de este método es la aparición de inhibición, provocada por la cetona que se forma y por el exceso de aceptor del grupo amino. La primera de estas inhibiciones puede reducirse eliminando la cetona del medio y la segunda requiere un sistema adicional de reciclado del piruvato a partir de la alanina formada, lo que aumenta la complejidad del proceso. La síntesis asimétrica, que es la opción escogida en este proyecto, permite la obtención de la amina quiral ópticamente pura objetivo con un rendimiento teórico del 100%, lo que confiere una gran ventaja sobre la resolución cinética ^{2,6,11,13,16-18}. El principal inconveniente que presenta este método es el desplazamiento del equilibrio termodinámico, principalmente cuando el sustrato empleado es alanina, debido a su baja constante de equilibrio ^{16,2}. Al encontrarse el equilibrio desplazado hacia los reactivos, debe buscarse la manera de invertir este sentido, siendo la eliminación del medio del coproducto generado la forma más común, en este caso piruvato formado a partir de la desaminación.

Para llevar a cabo la transformación del piruvato y conseguir desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de la amina de interés se pueden llevar a cabo diversos sistemas enzimáticos en conjunto con las ω -TA. Dos posibles alternativas son el uso de una aminoácido deshidrogenasa (AADH) o de lactato deshidrogenasa (LDH), que permiten respectivamente la degradación del piruvato regenerando la alanina ^{11,16} o eliminándola del medio mediante su transformación en lactato ^{1,6,11-13,16}. El problema principal que presentan estas opciones es la

inviabilidad económica, ya que ambas enzimas son dependientes del cofactor NAD(P)H y necesitan un proceso de reciclado de este. De cara a poder solucionar este problema, otra opción, propuesta en este proyecto, es eliminar el piruvato del medio de reacción mediante la piruvato descarboxilasa (PDC). Esta enzima hace posible que el piruvato se transforme en acetaldehído y CO_2 ^{1,2,6,11} y, además, no requiere una regeneración del cofactor, ya que no es dependiente de NAD(P)H. Por tanto, para el sistema multienzimático que se plantea, en el que se produce la síntesis asimétrica de aminas quirales a partir de cetonas proquirales, solo son necesarias las ω -TA y la PDC.

El proceso en concreto que se quiere intensificar en este proyecto, de cara a mejorar las productividades, limitadas principalmente por la baja concentración de sustratos y productos^{2,4,6}, es la reacción obtención de 1-fenil-etil-amina (FEA) a partir de acetofenona (AF) y L-alanina. En esta síntesis, que está biocatalizada por las ω -TA, también se produce piruvato como coproducto, por lo que es necesaria la acción de la PDC para transformar el piruvato formado en acetaldehído y CO_2 . De esta forma, se consigue desplazar el equilibrio hacia la formación de FEA, ya que este sistema enzimático tiene una constante de equilibrio de $8,81 \times 10^{-4}$ y, al ser tan baja, la reacción está desplazada hacia el sustrato^{6,13}.

A continuación, en el esquema 1, se muestran las reacciones que tienen lugar en la síntesis asimétrica de 1-fenil-etilamina catalizada por ω -TA y la PDC, que es el sistema propuesto en este trabajo.



Esquema 1. Síntesis asimétrica de (R)-1-fenil-etilamina a partir de AF y L-alanina.

En esta síntesis hay una transferencia de un grupo amino y de electrones entre un aminoácido (donador), la L-alanina, y un cetoácido (receptor), la acetofenona. Este transporte es llevado a cabo por el cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP), del que son dependientes las TA (EC 2.6.1.x) ¹⁶. Una vez se produce la transaminación, como se ve en el esquema 1, la descarboxilasa cataliza la degradación del piruvato.

El objetivo que se plantea en este trabajo es el estudio de la reacción de síntesis de la amina quiral de interés, de cara realizar un análisis de su rendimiento y de comparar dos transaminasas de orígenes diferentes, *Chromobacterium violaceum* (CviTA) y de *Vibrio fluvialis* (VfiTA), a la hora de utilizar estas enzimas como biocatalizadores.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos y enzimas

Las ω -transaminasas utilizadas, procedentes de los microorganismos *Chromobacterium violaceum* y *Vibrio fluvialis* fueron amablemente donadas por DSM/Innosyn en forma de lisados celulares CFE (Cell Free Extracts). La PDC fue expresada y producida en el propio grupo de investigación por fermentación de la cepa de *E.coli* SG13009 [pREP4] [pQE-PDC]

en cultivos fed-batch. Una vez finalizada la fermentación, se recuperó la biomasa por centrifugación y esta se almacenó congelada a -20°C hasta su utilización.

Los reactivos utilizados para la realización de geles de electroforesis fueron suministrados por Thermo-Fischer y el resto de los compuestos químicos empleados se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

2.2. Método de Bradford

Para poder conocer la concentración de proteína total que se tiene en cada una de lisados celulares utilizados en el estudio, se ha llevado a cabo un análisis de estos mediante el método de Bradford, utilizando *Comassie (Bradford) Protein Assay Kit* (Thermo Scientific).

En primer lugar, se obtiene una recta patrón de BSA (Bovin Serum Albumin) en un rango de concentraciones entre 0 g/L y 1 g/L. A continuación, en una placa de 96 pocillos, se mezcla el reactivo de Bradford *Comassie* (comassie G-250 dye, metanol y ácido fosfórico disueltos en agua) con una proporción de 29,6:1 (v/v), por un lado, con las muestras patrón y, por otro, con las muestras de interés, para poder hacer una comparación de las absorbancias. En este caso, las muestras que se han medido han sido distintas diluciones en agua de PDC y de cada una de las TA. Tras un tiempo de incubación de 15 minutos, se mide la absorbancia en el lector a 595 nm, lo que permite conocer posteriormente la concentración de proteína a través de la recta patrón obtenida inicialmente.

2.3. Gel electroforesis

El contenido relativo de proteínas se determina mediante la electroforesis NuPAGE (Invitrogen) de los lisados celulares que contienen las TA y la PDC. Las muestras son tratadas con los siguientes componentes: tampón de muestra 4X, agua MiliQ, agente reductor de muestra 10X. A continuación, se deja incubar las muestras a 70°C y 300 rpm durante 10

minutos. Una vez preparada la cuba de electroforesis, llena de *running buffer* consistente en una mezcla de agua destilada y 1:20 (v/v) de *running buffer* 20X comercial, y con el gel en su interior, se pinchan las muestras en los pocillos y se hace correr el gel a 200 V durante 40 minutos. Por último, se procede al revelado del gel, en el que son necesarios dos periodos de incubación de 1 hora a temperatura ambiente en una placa Petri. El primero se realiza cubriendo el gel con solución fijadora (40% metanol + 10% ácido acético) y el segundo con *Coomassie* (comassie G-250 dye, metanol y ácido fosfórico disueltos en agua). Tras lavarse con agua destilada, se hace una foto mediante el programa informático Image Lab 6.0.1.

2.4. Ensayo de actividad PDC

2.4.1. Disrupción de la piruvato descarboxilasa (PDC)

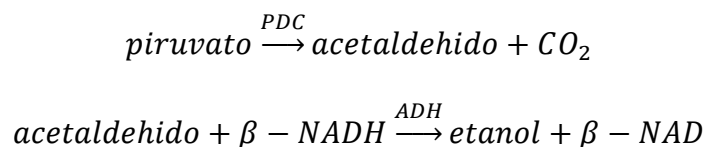
La PDC se almacena en congelador como biomasa húmeda, obtenida mediante fermentación a través de la cepa *E.coli* SG13009 [pREP4] [pQE-PDC]. Por ello, es necesario llevar a cabo una disrupción para extraer la PDC y poder dividirla en alícuotas.

La biomasa se resuspende a una concentración final de 0,2 g/mL, con tampón citrato 200 mM y pH 6 conteniendo TPP y MgCl₂, ambos a concentración 1 mM. Tras repartir la suspensión en alícuotas de 1,5 mL, conservadas en hielo, se realizan 4 rondas de 15 segundos en el sonicador a 50 W. Posteriormente, se centrifugan las muestras a 4°C durante 10-15 minutos a 14000 rpm, conservándose el sobrenadante.

2.4.2. Ensayo de actividad

La actividad de la PDC se ha determinado mediante la reacción conjunta de descarboxilación del piruvato con alcohol deshidrogenasa (ADH) y la posterior oxidación de NADH a 340 nm y 25°C. La PDC cataliza la transformación de piruvato a acetaldehído. Posteriormente, la ADH es capaz de transformar el acetaldehído en etanol consumiendo NADH

como cofactor (Esquema 2). Este consumo puede ser determinado espectrofotométricamente midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm.



Esquema 2. Reacciones en paralelo catalizadas por la PDC y la ADH en el ensayo de actividad de la PDC.

Para un volumen total de 1,5 mL, la mezcla de reacción contiene en tampón citrato 200 mM y pH 6: ácido cítrico 180 mM, piruvato de sodio 33,3 mM, tiamina pirofosfato (TPP) 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, ADH 3,3 U/mL, procedente de *Saccharomyces Cerevisiae* (Sigma Aldrich) y NADH 0,11 mM.

Una unidad de actividad de PDC corresponde a la cantidad de PDC que convierte 1 μmol de piruvato a acetaldehído por minuto a 25°C. Para obtener la actividad de las enzimas de interés se debe pasar la absorbancia medida a unidades de actividad en U/mL mediante la siguiente expresión (ecuación 1):

$$\frac{U}{mL} = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{340nm}}{min} \right) \cdot Vt \cdot Df \cdot Lp}{\epsilon \cdot Ve} \quad (1)$$

Donde: Vt=volumen total (1,5mL), Df=Factor de dilución, Lp=paso de luz (1 cm), Ve=volumen de muestra (0,05 mL), ε=coeficiente de extinción molar a 340 nm (6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

2.5. Ensayo de actividad TA

El ensayo de actividad de las transaminasas se ha basado en la medida de la formación de acetofenona (AF) a partir de metilbenzilamina (α -MBA/FEA) y ácido pirúvico, como aceptor del grupo amino, catalizada por las amino transaminasas a 300 nm y 30°C (Esquema 3).



Esquema 3. Reacción catalizada por las TA en el ensayo de actividad de las TA.

La determinación de la actividad de las TA se realiza espectrofotométricamente mediante el aumento de la absorbancia a 300 nm provocado por la formación de acetofenona.

La mezcla de reacción, de 1 mL de volumen total, en la que se llevó a cabo el ensayo se ha realizado en tampón fosfato 100 mM y pH 7,5, conteniendo: fosfatos 90 mM, Piridoxal 5'-fosfato (PLP) 0,9 mM, piruvato de sodio 0,5 mM y FEA 22,5 mM.

Una unidad de actividad de TA se corresponde con la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de acetofenona por minuto a 30°C. Para transformar la absorbancia medida en el ensayo a unidades de actividad, U/mL, se utiliza la ecuación 1, con la diferencia de que en este caso las medidas de absorbancia se han tomado a 300 nm, el volumen total de ensayo es de 1,5 mL y el coeficiente de extinción molar de la acetofenona a 300 nm es 0,28 mM/cm.

Todas las medidas de absorbancia, tanto en el ensayo de actividad de las TA como en el de la PDC, se midieron usando un espectrofotómetro SPECORD® 200 PLUS (Jena Analytisc).

2.6. Ensayo de estabilidad PDC/TA

El ensayo de estabilidad de las diferentes enzimas consistió en medir sus actividades a lo largo del tiempo y así poder comprobar si se produce o no desactivación, simulando las condiciones de la reacción de interés y añadiendo los cofactores que necesita cada enzima. Se dejó la mezcla incubando a 30°C y 1000 rpm durante 24 horas y se extrajeron las muestras periódicamente para su análisis.

En el caso de la PDC, en un volumen total de 3 mL, la mezcla de reacción contenía: tampón fosfato 150 mM pH 7,5, TPP 0,1 mM (cofactor), MgCl_2 0,1 mM (cofactor), agua y 1:20 (v/v) de PDC.

En el caso de las TA, para un volumen total de 3 mL, la mezcla de reacción contenía: tampón fosfato 150 mM pH 7,5, PLP 1mM (cofactor), agua y 1:20 (v/v) de TA (CviTA o VfITA).

Tras realizar los ensayos de estabilidad en las condiciones anteriores, también se llevaron a cabo en presencia del sustrato de reacción, que en este caso es acetofenona 30 mM.

2.7. Análisis de sustrato/producto por HPLC

Las concentraciones de los compuestos de interés, AF y FEA, han sido medidas mediante un análisis por HPLC en un equipo UltiMate 3000 (Dionex) equipado con un detector de longitud de onda variable. La separación se ha producido en una columna de fase reversa CORTECS C18+ 2,7 μm 4,6x150 mm (Waters Milford, MA, USA).

Tras acidificar las muestras mediante su dilución en tampón fosfato 150 mM con 0,6 M HCl, para desactivar las enzimas y detener la reacción, se inyectaron en el equipo 15 μL con un flujo de 0,7 mL/min y una temperatura de 30°C. Las muestras se eluyeron un gradiente desde 30 a 50 % de solvente B, consistente en MeCN/H₂O 4:1 (v/v) al solvente A, consistente en

0,095% (v/v) de ácido trifluoroacético en H₂O sobre 13 minutos. Los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 254 nm.

El análisis cuantitativo del sustrato y el producto que intervinieron en la reacción se realizó tras un calibrado previo mediante estándares de concentración conocida, 0,05-2 mM para la AF y 0,05-5 mM para la FEA. El error cometido en las medidas se estimó mediante la desviación estándar calculada procedente de los duplicados que se tomaron de cada una de las concentraciones de AF y FEA obtenidas en cada caso.

2.8. Estabilidad sustrato/producto en el tiempo

Para evaluar la estabilidad de sustrato y producto, acetofenona y 1-feniletilamina respectivamente, se tomaron muestras periódicamente de la mezcla de reacción que contenía todos los componentes a excepción de las enzimas y se incubó en un agitador Multitherm shaker (Benchmark Scientific) a 30°C y 1000 rpm. Este ensayo sirvió como blanco para el análisis de las reacciones. Dichas muestras se analizaron en el HPLC siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.7. Las muestras contenían 30 mM de acetofenona/1-feniletilamina en tampón fosfato 150 mM pH 7,5, con L-alanina 200 mM, TPP 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM y PLP 1 mM.

2.9. Reacciones

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 3 mL, conteniendo los compuestos que se citan a continuación: tampón fosfato 150 mM y pH 7,5, L-alanina 200 mM, AF 30 mM (sustrato cetónico), TPP 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, PLP 1 mM, agua, PDC 1:4 (v/v) y TA 1:20 (v/v). Las reacciones se incubaron en un agitador Multitherm shaker (Benchmark Scientific) a unas condiciones de 30°C y 1000 rpm durante 24 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

A la hora de tomar las muestras, se diluyó la mezcla de reacción en tampón ácido, descrito en el apartado 2.7, en una proporción 1/20 para poder obtener la concentración de AF y FEA correctamente a partir del análisis por HPLC. Asimismo, se extrajeron muestras adicionales para el análisis de las actividades de las distintas enzimas.

3. Resultados experimentales

3.1. Caracterización de los cell-free extracts

Para realizar la caracterización de las distintas enzimas utilizadas en este estudio, se llevó a cabo un ensayo de actividad, un análisis de estas mediante el método de Bradford y un gel de electroforesis de los lisados que contenían las TA y la PDC.

3.1.1. Piruvato descarboxilasa (PDC)

Para determinar la actividad de los lisados, se llevó a cabo el ensayo descrito anteriormente, a distintas diluciones de PDC, obteniéndose finalmente una actividad enzimática de 61,65 U/mL.

La concentración total de proteína total obtenida en el caso de la PDC, mediante el análisis por el método de Bradford de muestras a cuatro diluciones distintas de enzima, fue de 10,86 g/L.

En cuanto al gel de electroforesis, también se realizó el ensayo a varias diluciones y se obtuvo el % de enzima de cada muestra automáticamente a través del programa Image Lab 6.0.1. La imagen obtenida del gel realizado para la PDC se muestra en la figura 1.

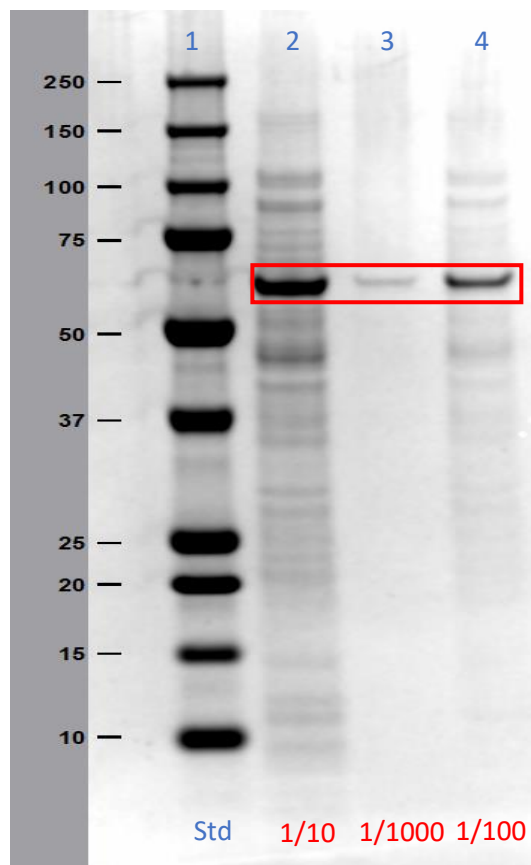


Figura 1. Gel de electroforesis de las muestras de PDC a las distintas diluciones que se han realizado (líneas 2-4). 15 µL de enzima introducidos. Línea 1: marcador.

A la izquierda de la imagen pueden observarse las masas moleculares en kDa de cada una de las bandas del marcador que se utilizaron en el ensayo y, comparándolas con las muestras que de PDC, puede verse que la masa molecular de esta es de unos 62 kDa. Sabiendo que la PDC es una enzima formada por dos dímeros unidos débilmente formando un tetramero con una masa molecular estimada de 62 kDa cada subunidad ²⁰, puede afirmarse que las bandas marcadas en rojo corresponden a la PDC.

A continuación (tabla 1), se muestra una tabla resumen de los datos más representativos obtenidos en la caracterización de la PDC, así como la concentración total de PDC y la actividad específica, que se han calculado a partir de los datos experimentales.

Tabla 1. Resultados de la caracterización de la PDC, obtenidos a través del ensayo de actividad, método de Bradford y gel de electroforesis.

Actividad (U/mL lisado)	Proteína total (mg/mL lisado)	PDC (%)	PDC (mg/mL lisado)	Actividad específica (U/mg PDC)
61,65	10,86	49,50	5,37	11,47

Según los resultados que se obtuvieron en la caracterización final de la PDC, se observó que, de la proteína total que se tenía en el lisado celular en forma soluble, el 49,5% correspondía a la PDC, lo que, mediante un cálculo teórico, permite llegar a una actividad específica de la enzima de 11,47 U/mg PDC.

3.1.2. Transaminasas CviTA y VfiTA

En el caso de las TA, el procedimiento que se llevó a cabo para su caracterización fue similar al utilizado para la PDC, obteniéndose una actividad enzimática de 8,37 U/mL y 6,05 U/mL para la CviTA y la VfiTA respectivamente, aunque es importante destacar que la medida de actividad de las TA es algo imprecisa debido a que presentaron sobreactivación a lo largo del tiempo. Esta sobreactivación ha estado reportada en varias ocasiones, pero no se propuso ningún motivo.

En cuanto a la concentración total de proteína, proporcionada por el método de Bradford, la CviTA presentó 67,34 mg/mL, mientras que para la VfiTA se detectó un valor algo menor, 51,20 mg/mL.

La imagen obtenida del gel realizado para las transaminasas se muestra a continuación en la figura 2.

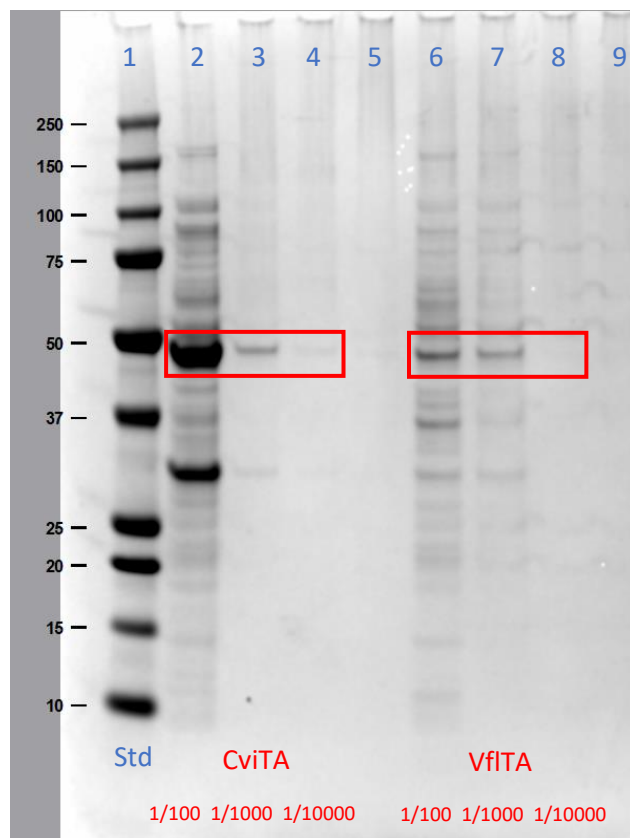


Figura 2. Gel de electroforesis de las muestras de CviTA (líneas 2-4) y VfiTA (líneas 6-8) a las distintas diluciones que se han realizado. 15 μ L de enzima introducidos. Línea 1: marcador. Líneas 5 y 9: Carriles de separación sin muestra.

En el caso de las TA, como se puede apreciar en la imagen anterior, las muestras a diluciones más altas no se aprecian con claridad, pero, observando las realizadas a 1/100 y 1/1000, puede indicarse que la masa molecular de ambas transaminasas está alrededor de 48 kDa, resultado muy cercano a otros valores de masas moleculares que se han reportado de 47,5 kDa para VfiTA ²¹ o 50 kDa para CviTA ²².

En la tabla 2, al igual que se hizo en el caso de la PDC, se muestran los datos para la caracterización de ambas transaminasas.

Tabla 2. Resultados de la caracterización de las TA, obtenidos a través del ensayo de actividad, método de Bradford y gel de electroforesis.

Tipo TA	Actividad (U/mL lisado)	Proteína total (mg/mL lisado)	TA (%)	TA (mg/mL lisado)	Actividad específica (U/mg TA)
CviTA	8,37	67,34	52,6	35,42	0,24
VfiTA	6,05	51,20	36,1	18,48	0,33

Puede observarse que se obtuvo una mayor actividad inicialmente en el lisado celular para la CviTA. Además, el porcentaje de transaminasa que se registró en relación con la proteína total también fue un 16,5% mayor en dicha enzima. Sin embargo, al tener una concentración de proteína total de 51,2 mg/ml en el caso de la VfiTA, la concentración de enzima en el lisado celular fue casi un 50% menor que la de la CviTA, lo que conlleva una actividad específica más alta, 0,33 U/mg TA, que es el parámetro de mayor interés a la hora de llevar a cabo la reacción.

3.2. Ensayos de estabilidad de las enzimas en presencia del substrato de reacción

3.2.1. PDC

En este apartado se presenta el resultado del ensayo de estabilidad de la PDC, cuyo objetivo fue determinar si la enzima mantiene su actividad a lo largo del tiempo en las condiciones de reacción, lo que es necesario de cara a desplazar el equilibrio de la reacción (esquema 2) hacia la formación de la amina deseada ⁶. Este ensayo se llevó a cabo solo en presencia de la enzima y, también, añadiendo acetofenona, que es el substrato cetónico que se emplea en la reacción estudiada. En la figura 3 se muestran los resultados que se obtuvieron en ambos casos.

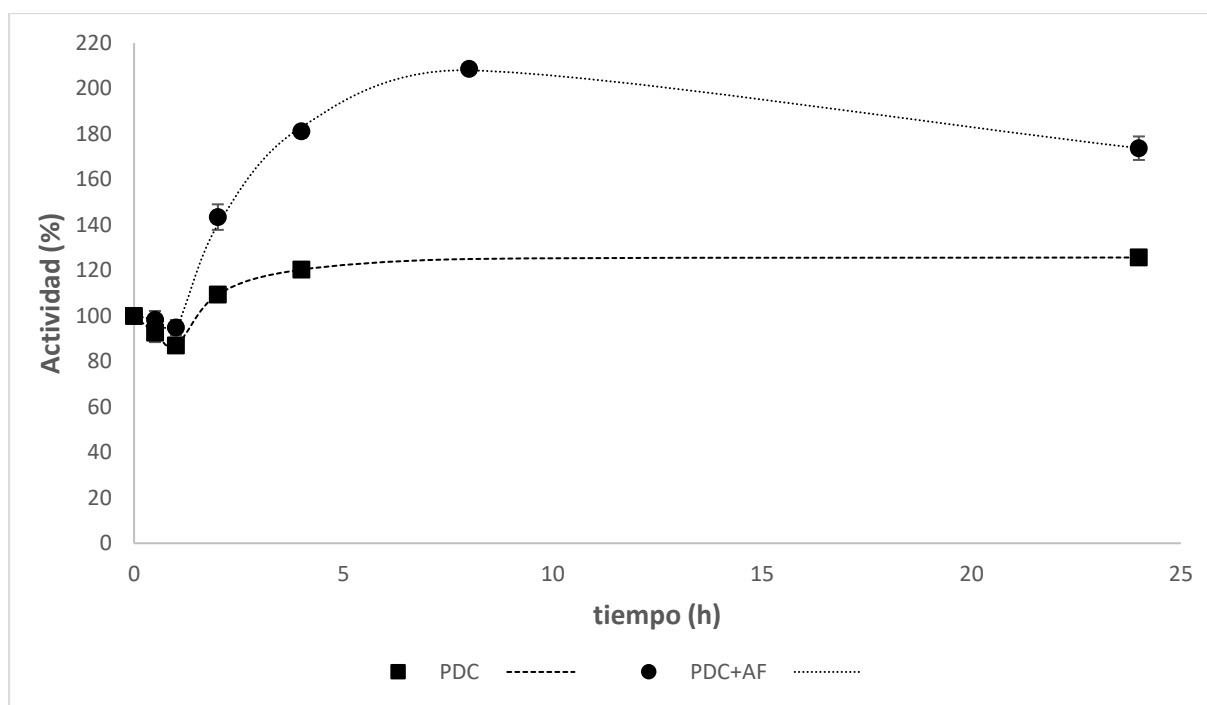


Figura 3. Estabilidad de la PDC en presencia o ausencia de AF 30 mM. La enzima se incubó a 30°C, pH 7,5.

Puede apreciarse como, en ambos casos, se produjo, tras un ligero descenso de actividad durante la primera hora, una sobreactivación de la PDC que, en presencia de la AF, se prolongó hasta las 8 horas de ensayo y, en ausencia de esta, se estabilizó la actividad a las 4 horas. También se observa cómo, en la última medida tomada en el ensayo realizado con sustrato, se produjo una desactivación del 35% respecto al valor máximo registrado.

Según estos resultados, puede llevarse a cabo la reacción en presencia de la AF, que es el sustrato cetónico que se seleccionó para realizar la síntesis asimétrica de FEA. La mayor actividad de la PDC presentada en presencia de AF indica que las condiciones de reacción seleccionadas no afectan negativamente a la actividad enzimática de la PDC y, por tanto, el piruvato formado en la reacción biocatalizada por las TA puede transformarse en acetaldehído y CO₂, desplazando así el equilibrio.

3.2.2. Transaminasas

Al igual que en el caso de la PDC, de cara a comprobar si las condiciones de operación son adecuadas para mantener el nivel de actividad enzimática de las TAs a la hora de llevar a cabo la producción de FEA.

A continuación, en la figura 7 y la figura 8, se muestran la estabilidad de la CviTA y la VfiTA respectivamente, tanto en el caso en el que el experimento se llevó a cabo únicamente en presencia de la enzima, como cuando se realizó en presencia del substrato de interés en la reacción.

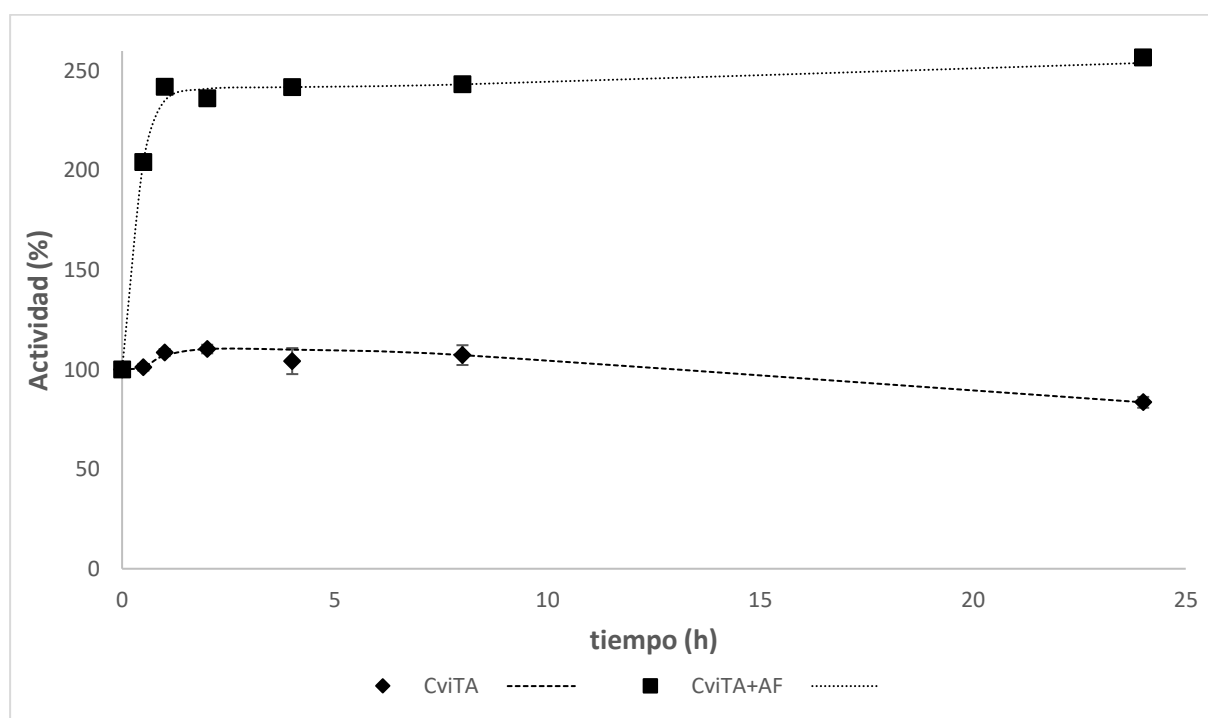


Figura 4. Estabilidad de la CviTA en presencia o ausencia de AF 30 mM. La enzima se incubó a 30°C, pH 7,5 y 1000 rpm.

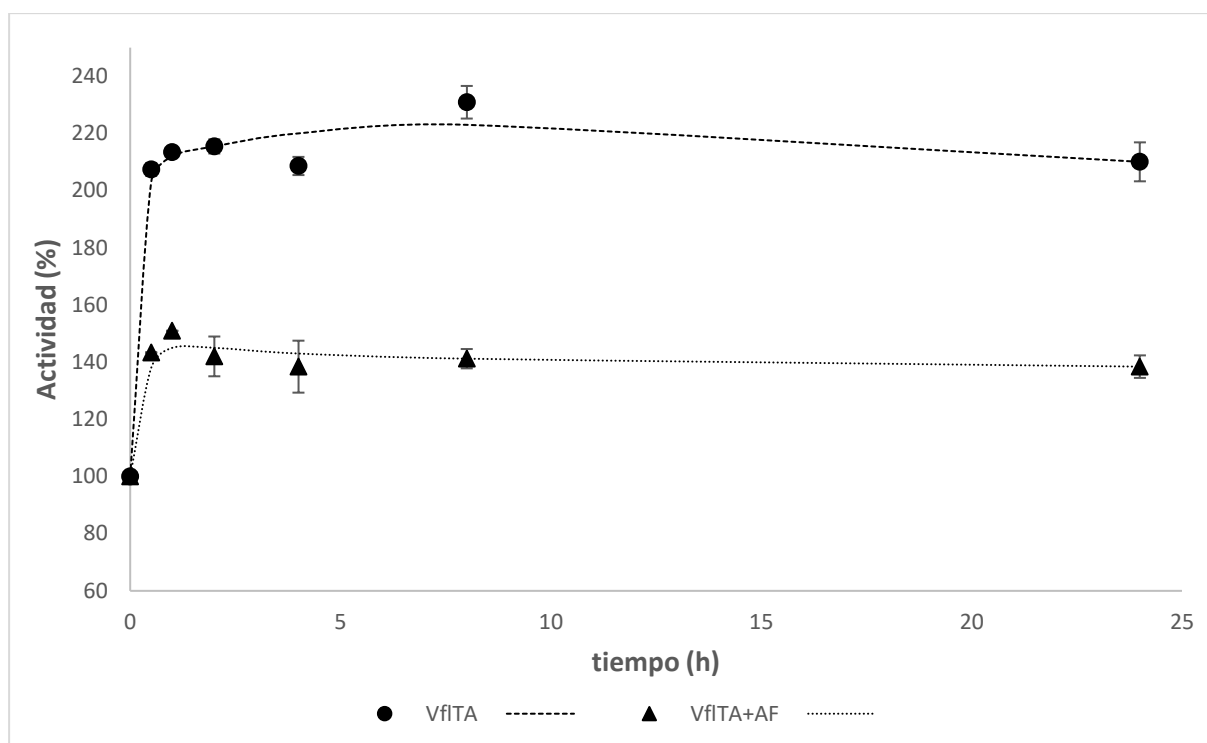


Figura 5. Estabilidad de la VfItA en presencia o ausencia de AF 30 mM. La enzima se incubó a 30°C, pH 7,5 y 1000 rpm.

Durante la primera hora de estudio, se observó una sobreactivación de las TA. En el caso del ensayo realizado de la CviTA junto con AF, fue del 157% y, en el llevado a cabo con VfItA fue del 110%, utilizando solo la TA, y del 50%, en conjunto con la AF. Teóricamente, la actividad debería ir descendiendo o manteniéndose desde su valor inicial, pero, basándose en otros resultados consultados en bibliografía se ha observado que estas enzimas pueden presentar este comportamiento ²³. En cuanto a la desactivación de las enzimas, solo en el caso en el que se tenía CviTA en ausencia de AF se aprecia una desactivación significativa del 25% después de 24 horas de incubación.

Hay que considerar que la medida de actividad de cada una de las enzimas se realizó a unas condiciones concretas de pH, temperatura y agitación y estos resultados son específicos para esas condiciones, las cuales se estimaron como las óptimas para realizar los ensayos. Por

ello comportamientos poco habituales, como la sobreactivación observada en todos los casos, pueden no presentarse o acentuarse con otras condiciones diferentes ²⁴.

Atendiendo a los resultados experimentales que se obtuvieron, al no observarse desactivación cuando se introdujo AF en ninguna de las dos TA, se deduce que las condiciones a las que se llevó a cabo el ensayo son adecuadas para la CviTA y la VfiTA.

3.3. Síntesis de 1-feniletilamina (FEA) a través de la reacción en cascada de TA y PDC

3.3.1. Estabilidad de sustrato/producto a lo largo del tiempo

Antes de llevar a cabo las reacciones, se estudió la evolución de la concentración de sustrato y producto a lo largo del tiempo para comprobar si se mantienen constantes en el caso de que no estén presentes las enzimas en la mezcla de reacción. Los resultados de este experimento sirvieron de blanco para los ensayos en los que se llevaron a cabo las reacciones.

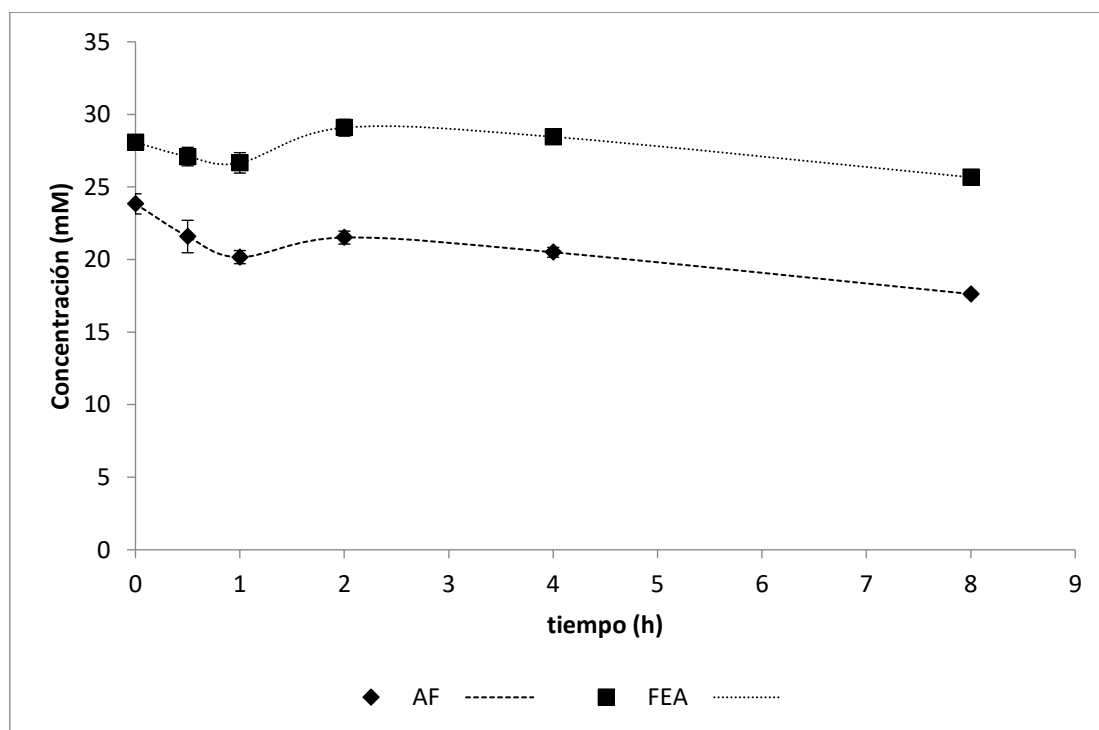


Figura 6. Estabilidad de la concentración de sustrato y producto a 30 mM en las condiciones de reacción: L-alanina 200 mM a 30°C, tampón fosfato 150 mM pH 7,5 y 1000 rpm.

Como puede observarse en la figura 6, la concentración de AF descendió paulatinamente a lo largo del tiempo, lo que puede ser debido a su evaporación por excesiva presencia de aire en el falcon donde se realizó el análisis. Esto puede producir que no toda la desaparición de AF que ocurrió en las reacciones se tradujese en una aparición de producto, como se mostrará posteriormente. En el caso de la concentración de FEA, se ve que los valores se mantuvieron relativamente constantes, por lo que se puede afirmar que se trata de un compuesto menos volátil en las condiciones de estudio.

3.3.2. Reacciones realizadas con la transaminasa de *Chromobacterium violacium* (CviTA)

Se llevaron a cabo dos reacciones catalizadas por la CviTA, una siendo esta la única enzima presente y otra empleando una cascada multienzimática junto con PDC. En ambas la AF se introdujo en condiciones saturantes y, junto con la L-alanina 200 mM, conformaron los sustratos empleados en los ensayos. En la figura 7 se muestran las concentraciones de AF y FEA a lo largo del tiempo en las reacciones llevadas a cabo con CviTA.

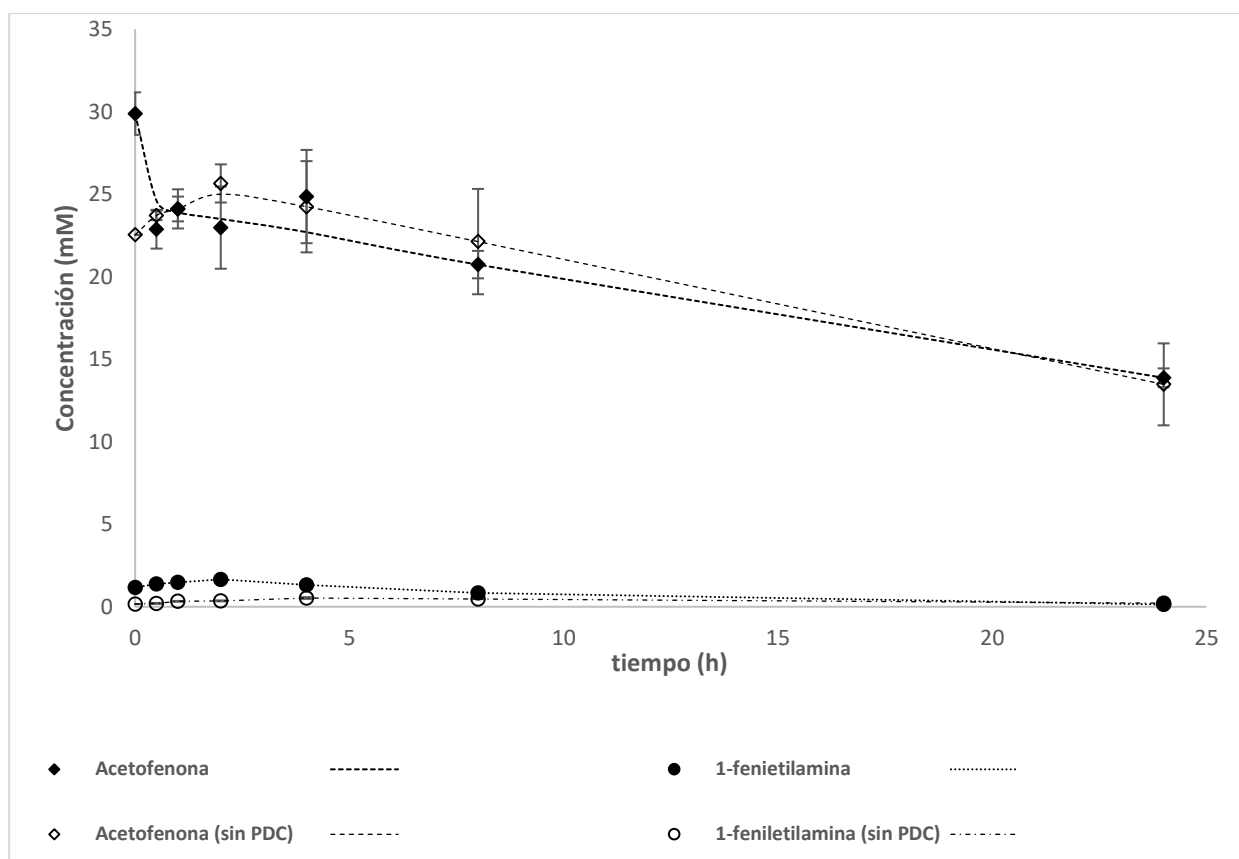


Figura 7. Evolución de la concentración de AF y FEA en la reacción catalizada por la CviTA, tanto en presencia (cascada multienzimática) como en ausencia de PDC con AF 30 mM y L-alanina 200 mM a 30°C, tampón fosfato 150 mM pH 7,5 y 1000 rpm.

Puede observarse como, en el caso en el que la reacción se produjo en presencia de CviTA y PDC hubo un descenso pronunciado en la concentración de AF al comienzo de la reacción que se fue suavizando a medida que transcurrieron las horas de ensayo. Esto no se apreció en ausencia de PDC, donde se vio un ligero aumento de la concentración de AF, probablemente debido a alguna desviación experimental en las primeras medidas, seguido de una desaparición relativamente constante de dicho sustrato. En las dos reacciones se alcanzó una concentración final similar de AF, que supuso un descenso del 50% en el ensayo utilizando cascada multienzimática y del 22% cuando no había PDC.

En cuanto a la concentración de FEA, apenas se detectó formación de producto, por lo que el descenso de concentración de AF no se correspondió con la obtención final de FEA. Esto

puede estar propiciado por una evaporación del sustrato en la reacción o a la baja solubilidad de la AF, que se ha mencionado anteriormente. Únicamente se apreció un ligero aumento de la concentración de producto, que no fue realmente significativo, durante las primeras cuatro horas en el caso en el que la reacción se llevó a cabo en presencia de las dos enzimas, aunque, tras alcanzar un máximo de 1,66 mM, volvió a descender, lo que puede ser consecuencia de cierta evaporación o a la formación de reacciones laterales indeseadas debido a que se usan lisados celulares, en lugar de enzima pura. Esto puede relacionarse con la desactivación enzimática, ya que a partir de las 4 horas la CviTA perdió prácticamente la totalidad de su actividad y la de la PDC se redujo un 50%, como puede observarse en la figura 8.

Por tanto, en base a la baja concentración de FEA obtenida, la CviTA no es la opción más adecuada para la síntesis de la amina de interés, ya que la concentración y rendimiento obtenidos está muy por debajo de otros resultados reportados con anterioridad en este tipo de síntesis ^{6,13}.

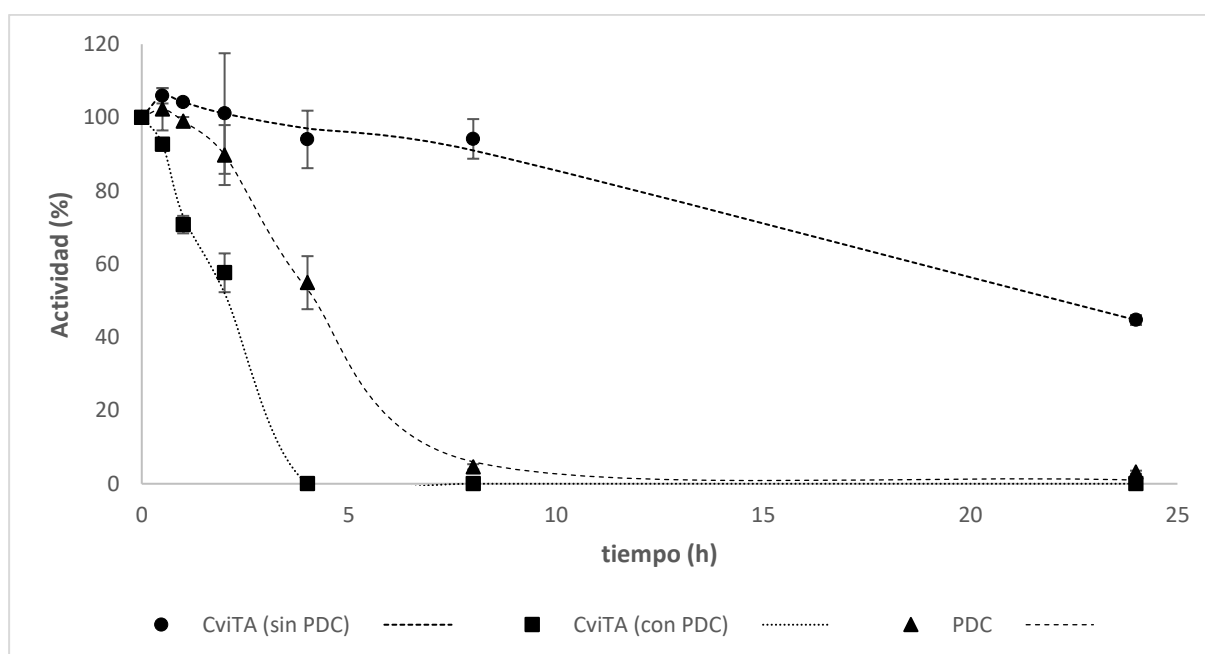


Figura 8. Evolución de la actividad de las enzimas presentes en la reacción catalizada por la CviTA con AF 30 mM y L-alanina 200 mM a 30°C, tampón fosfato 150 mM pH 7,5 y 1000 rpm.

Puede apreciarse como, cuando se llevó a cabo la reacción mediante la cascada multienzimática con la CviTA y la PDC, la TA se desactivó a mucha mayor velocidad que cuando actuó individualmente, ya que, en el primer caso tardó solo 4 horas en perder toda su actividad y, en el segundo, tras finalizar la experimentación a las 24 horas, todavía mantenía un 50%.

En cuanto a la PDC, la desactivación que se produjo también fue bastante pronunciada, ya que a las 8 horas de ensayo la actividad se redujo casi un 100%.

Al producirse una desactivación tan rápida de la TA, dejó de formarse FEA a las 2 horas de reacción y, conforme se fue desactivando la PDC la reacción fue estando cada vez más desplazada hacia los sustratos, ya que no pudo controlarse bien el equilibrio debido a la formación de piruvato. Como consecuencia de la progresiva disminución de la actividad de PDC y a que no se produjo más FEA, se dio el descenso en la concentración de producto que se vio en la figura 8, ya que la reacción está fuertemente inhibida por la formación de piruvato^{1,4,6,13,23}.

3.3.3. Reacciones realizadas con la transaminasa de *Vibrio fluvialis* (VfITA)

Al igual que en el caso de la CviTA, se llevaron a cabo las dos situaciones de reacción mencionadas, en presencia y ausencia de PDC, bajo las mismas condiciones de operación y concentraciones iniciales de sustrato, cuyos resultados aparecen reflejados en la figura 9.

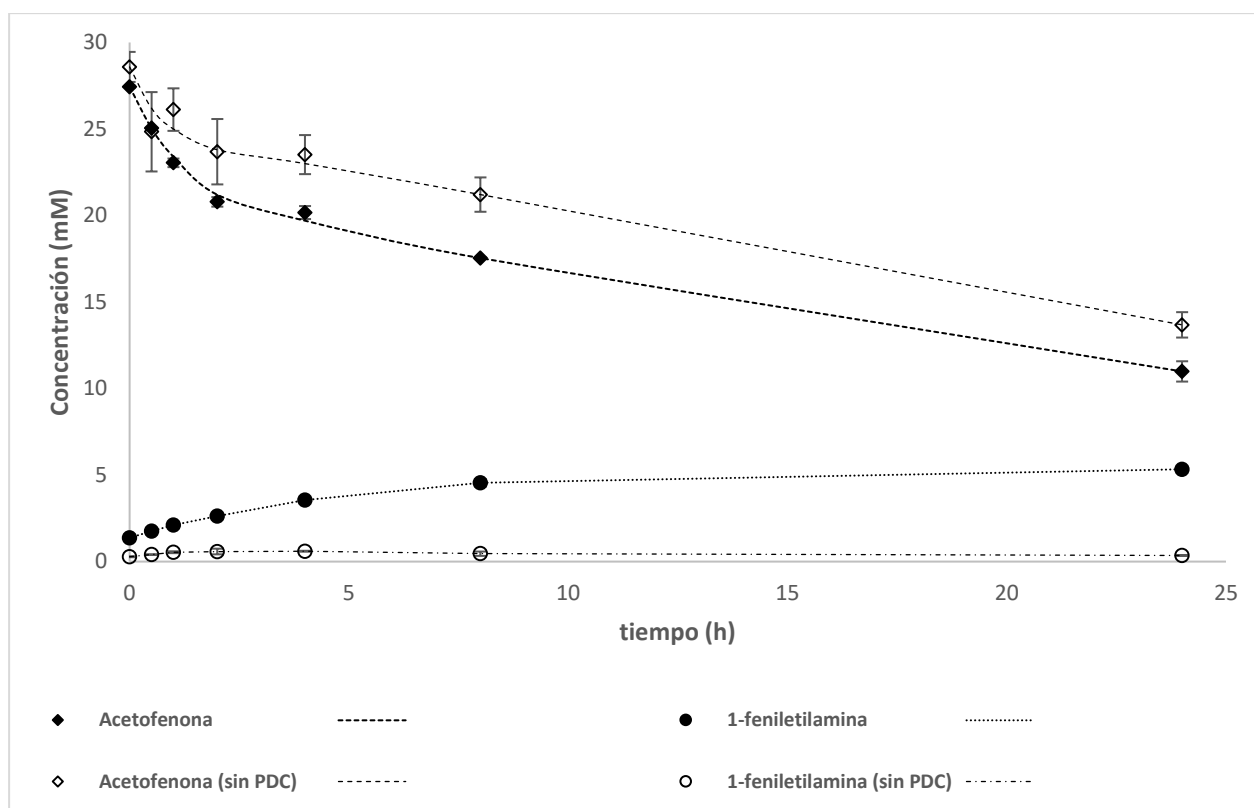


Figura 9. Evolución de la concentración de AF y FEA en la reacción catalizada por la VflTA, tanto en presencia (cascada multienzimática) como en ausencia de PDC con AF 30 mM y L-alanina 200 mM a 30°C, tampón fosfato 150 mM pH 7,5 y 1000 rpm.

En este caso, se observa que la concentración de FEA obtenida al final de la reacción fue considerablemente superior (5,34 mM) a la que se obtuvo utilizando cascada multienzimática de CviTA y PDC. Aun así, no todo el consumo de AF se tradujo en formación de producto, por lo que se deduce que también en estas reacciones se produjo evaporación del sustrato.

La concentración de AF consumida en presencia de PDC fue del 60%, ligeramente superior a cuando solo se utilizó VflTA, cabiendo resaltar que, en ese caso, apenas se produjo FEA tras ese consumo. La mayor formación de producto cuando se utiliza VflTA también puede relacionarse con una desactivación enzimática mucho más lenta que la producida en las reacciones catalizadas por CviTA, cuya tendencia puede observarse en la figura 10.

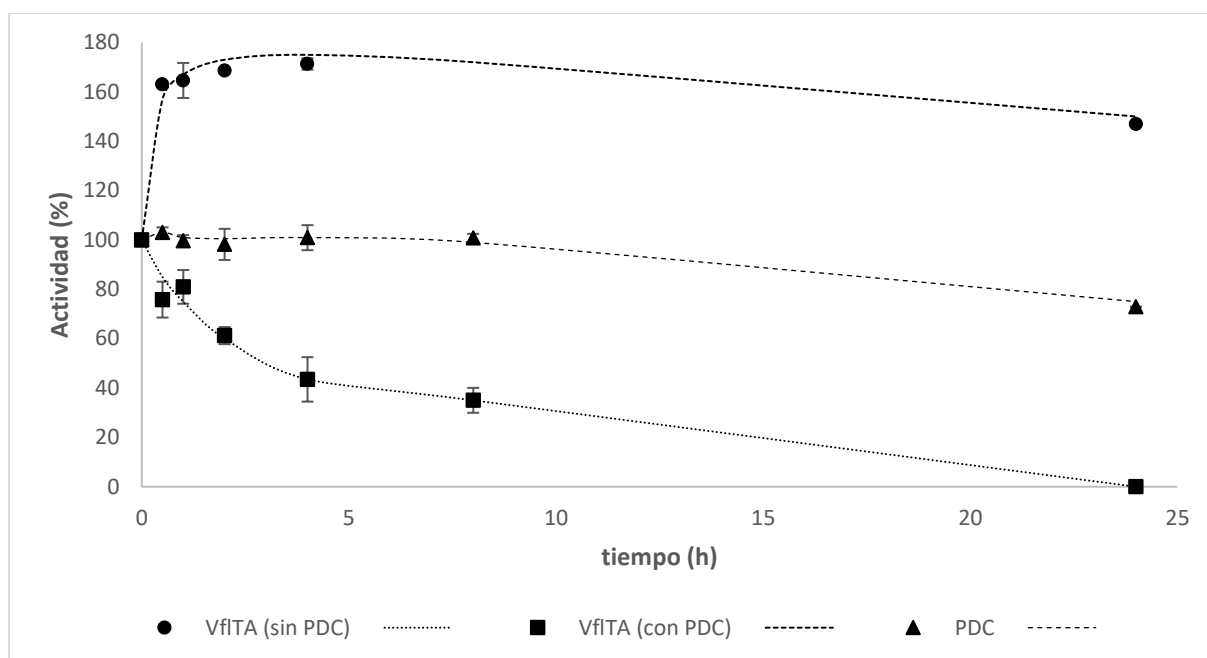


Figura 10. Evolución de la actividad de las enzimas presentes en la reacción catalizada por la VfITA con AF 30 mM y L-alanina 200 mM a 30°C, tampón fosfato 150 mM pH 7,5 y 1000 rpm.

Se detectaron comportamientos enzimáticos diferentes en el ensayo con esta TA. A diferencia de cuando se utilizaba CviTA en la cascada multienzimática y se perdía toda la actividad a las 4 horas, la VfITA en presencia de PDC conservó casi un 50% de actividad para ese momento del ensayo y no se desactivó por completo hasta el final de la reacción a las 24 horas.

La PDC mantuvo su nivel de actividad durante todo el ensayo, en lugar de sufrir una fuerte desactivación desde el inicio de la reacción, como sucedía anteriormente. Esto también ocurrió con la VfITA en ausencia de PDC, pero cabe destacar que, en la primera fase de la reacción, se observó una notable sobreactivación del 70%.

La desactivación más lenta de la TA y la buena estabilidad de la PDC hacen que, en el caso de la VfITA, el equilibrio de la reacción esté desplazado hacia la formación de la amina quiral, que es lo que interesa, y, por tanto, no se observe una caída de la concentración de FEA

debida a la formación de piruvato. Por ello, el uso de VflTA resultó una opción más ventajosa que la CviTA.

En la tabla 3 aparecen los resultados de conversión, rendimiento y selectividad de cada una de las reacciones que se han llevado a cabo, la cual es de utilidad a la hora de compararlas y poder deducir cual es la más adecuada.

Tabla 3. Resultados de conversión, rendimiento y selectividad, calculados a partir de las concentraciones de AF y FEA, obtenidos en las distintas reacciones que se han llevado a cabo.

Reacción	AF inicial (mM)	AF final (mM)	FEA final (mM)	Conversión	Rendimiento	Selectividad
CviTA+PDC	29,89	13,88	0,14	53,57%	0,46%	0,86%
VflTA+PDC	27,44	10,99	5,34	59,95%	19,45%	32,44%
CviTA	22,54	13,48	0,21	40,20%	0,94%	2,33%
VflTA	28,59	13,68	0,35	52,14%	1,24%	2,37%

Puede verse que, aunque se tuvieran concentraciones iniciales y finales de AF similares en todos los casos, solo se apreció un aumento significativo de FEA en la reacción de VflTA en presencia de PDC, lo que hace que fuese el caso en el que se obtuvo un mayor rendimiento y una mayor selectividad. Por tanto, a las condiciones de operación que se llevaron a cabo los ensayos, esta sería la opción más adecuada de cara a la producción de FEA. Puede apreciarse la importancia de la presencia de la PDC, como se comentó anteriormente, lo que facilita que se desplace el equilibrio hacia la formación de la amina de interés ^{1,4,6,13,23} y se obtenga una conversión de 59,95% y un rendimiento del 19,45% como valores máximos en el caso de la cascada multienzimática de VflTA y PDC, resultados del mismo orden que otros experimentos de síntesis asimétrica de aminas proquirales que se han registrado anteriormente ^{6,12,13,25}, ya que este tipo de reacciones de transaminación suelen registrar valores no muy elevados de conversión, rendimiento y productividad ^{1,16}.

4. Conclusiones

Entre las dos alternativas de transaminasas utilizadas se observó que la que mejor resultado dio en la realización de la reacción de síntesis de FEA fue la VflTA, ya que la CviTA sufrió una desactivación demasiado rápida que impidió obtener una concentración de producto significativa. Es importante destacar la presencia de la PDC que, en la estrategia enzimática llevada a cabo junto con la VflTA, permitió desplazar el equilibrio químico de la reacción hacia la formación del producto de interés, evitando así la inhibición por formación de piruvato como coproducto, y obtención de los mejores resultados en cuanto a concentración de FEA obtenida, 5,35 mM, conversión, 59,95%, y rendimiento, 19,45%.

Los problemas de solubilidad de la AF que aparecieron en todos los ensayos causaron que no todo el consumo de sustrato se tradujese en formación de la amina deseada, reduciendo la productividad y el rendimiento obtenidos respecto al máximo teórico. Por ello, una posibilidad sería intentar modificar las condiciones de reacción, de cara a poder obtener una concentración de FEA mayor.

Referencias

1. Tufvesson P, Lima-ramos J, Jensen JS, Al-haque N, Neto W, and Woodley JM, Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines Using Transaminases, *Biotechnol Bioeng* **108**: 1479–1493 (2011).
2. Fuchs M, Farnberger JE, and Kroutil W, European Journal of Organic Chemistry: 6955-6982 (2015).
3. Findrik Z and Vasic-Racki D, Overview on Reactions with Multi-enzyme Systems, *Chem Biochem Eng Q* **23**: 545–553 (2009).
4. Cárdenas-Fernández M, Neto W, López C, Álvaro G, Tufvesson P, and M.Woodley J, Immobilization of Escherichia Coli Containing ω -Transaminase Activity in LentiKats®,

Biotechnol **28**: 693–698 (2012).

5. Petri A, Colonna V, and Piccolo O, Asymmetric synthesis of a high added value chiral amine using immobilized ω -transaminases, *Beilstein J Org Chem* **15**: 60–66 (2019).
6. Höhne M, Kühl S, Robins K, and Bornscheuer UT, Efficient Asymmetric Synthesis of Chiral Amines by Combining Transaminase and Pyruvate Decarboxylase, *ChemBioChem* **9**: 363–365 (2008).
7. Nugent TC, Chiral Amine Synthesis Methods, Developments and Applications, WILEY-VCH (2010).
8. Iwasaki A, Yamada Y, Kizaki N, Ikenaka Y, and Hasegawa J, Microbial synthesis of chiral amines by (R)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168, *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 499–505 (2006).
9. Yeh W-K, Yang H-C, and McCarthy JR, Enzyme Technologies: Metagenomics, Evolution, Biocatalysis and Biosynthesis, Wiley (2010).
10. Shin J and Kim B, Exploring the Active Site of Amine : Pyruvate Aminotransferase on the Basis of the Substrate Structure - Reactivity Relationship : How the Enzyme Controls Substrate Specificity and, *ACS Catal* **67**: 2848–2853 (2002).
11. Mathew S and Yun H, ω -Transaminases for the Production of Optically Pure Amines and Unnatural Amino Acids, *ACS Catal* **2**: 993–1001 (2012).
12. Koszelewski D, Lavandera I, Clay D, Rozzell D, and Kroutil W, Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing ω -Transaminases, *Adv Synth Catal* **350**: 2761–2766 (2008).
13. Shin J-S and Kim B-G, Asymmetric synthesis of chiral amines with ω -transaminase, *Biotechnol Bioeng* **65**: 206–211 (1999).
14. Tufvesson P, Jensen JS, Kroutil W, and Woodley JM, Experimental Determination of Thermodynamic Equilibrium in Biocatalytic Transamination, *Biotechnol Bioeng* **109**: 2159–

2162 (2012).

15. Pollard DJ and Woodley JM, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates : the future is now, *Trends Biotechnol* **25** (2010).

16. Koszelewski D, Tauber K, Faber K, and Kroutil W, α -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines, *Trends Biotechnol* **28**: 324–332, Elsevier Ltd (2010).

17. Neto W, Schürmann M, Panella L, Vogel A, and Woodley JM, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Immobilisation of ω -transaminase for industrial application: Screening and characterisation of commercial ready to use enzyme carriers, *J Mol Catal B Enzym* **117**: 54–61, Elsevier B.V. (2015).

18. Shin J and Kim B, Kinetic Resolution of α -Methylbenzylamine with ω -Transaminase Screened from Soil Microorganisms : Application of a Biphasic System to Overcome Product Inhibition, *Biotechnol Bioeng* **55**: 348–357 (1997).

19. Schätzle S, Identification , characterization and application of novel (R) -selective amine transaminases (2011).

20. Candy JM, Duggleby RG, and Mattick JS, Expression of active yeast pyruvate decarboxylase in Escherichia coli, *J Gen Microbiol* **137**: 2811–2815 (1991).

21. Kaulmann U, Smithies K, Smith MEB, Hailes HC, and Ward JM, Substrate spectrum of ω -transaminase from Chromobacterium violaceum DSM30191 and its potential for biocatalysis, *Enzyme Microb Technol* **41**: 628–637 (2007).

22. Humble MS, Cassimjee KE, Håkansson M, Kimbung YR, Walse B, Abedi V, *et al.*, Crystal structures of the Chromobacterium violaceum ω -transaminase reveal major structural rearrangements upon binding of coenzyme PLP, *FEBS J* **279**: 779–792 (2012).

23. Mallin H, Höhne M, and Bornscheuer UT, Immobilization of (R) - and (S) -amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor, *J Biotechnol* **191**: 32–37, Elsevier B.V. (2014).

24. Chen S, Campillo-brocal JC, Berglund P, and Humble MS, Characterization of the stability of *Vibrio fluvialis* JS17 amine transaminase, *J Biotechnol* **282**: 10–17, Elsevier (2018).
25. Schätzle S, Steffen-Munsberg F, Thontowi A, Höhne M, Robins K, and Bornscheuer UT, Enzymatic Asymmetric Synthesis of Enantiomerically Pure Aliphatic, Aromatic and Arylaliphatic Amines with (R)-Selective Amine Transaminases, *Adv Synth Catal* **353**: 2439–2445 (2011).