T
535

90913

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITA

Casa abierta al tiempo

ESTUDIO TENDIENTE A LA PREPARACIÓN QUÍMICO-ENZIMÁTICA DE LA D-HOMOFENILALANINA

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

M. en C. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

Comité Tutoral:

COTUTOR: Dr. HÉCTOR LUNA CONTLA
COTUTORA: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ
ASESOR: Dr. MARIO LUIS CALCAGNO MONTANS
ASESOR: Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES

Junio 2005

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en C. José Ignacio Regla Contreras
el día 23 de Junio del año de 2005

JURADO DEL EXAMEN:

Cotutor: Dr. Héctor Luna Contla _____

Cotutor: Dra. Herminia Inés Pérez Méndez _____

Asesor: Dr. Mario Luis Calcagno Montano _____

Sinodal: Dr. Ángel Guzmán Sánchez _____

Sinodal: Dr. Enrique García Hernández _____

DEDICATORIA

En especial a Paty, Moisés y David

A todos mis seres queridos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros de mi Comité Tutoral, quienes además de contribuir con su amplia experiencia y conocimientos al desarrollo de este proyecto, me brindaron su invaluable amistad.

Agradezco el gran apoyo institucional que me otorgó la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y la Dirección de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza para la realización de estos estudios.

CONTENIDO

1. Resumen 1
1. Abstract 2
2. Introducción 3
3. Objetivos 6
4. Antecedentes 7
   4.1. Antihipertensivos inhibidores de la ECA 7
   4.2. Homofenilalanina 8
   4.3. Biotransformaciones 12
   4.4. Aminoacilasas 14
      4.4.1. Aplicaciones de las aminoacilasas 15
      4.4.2. Polvos acetónicos de riñón de mamífero 17
   4.5. Nitrilos 18
   4.6. Enzimas transformantes de nitrilos 19
      4.6.1. Nitrilasas 22
      4.6.2. Nitrilo hidratasas 24
   4.7. Ejemplos de biotransformación de nitrilos 27
5. Parte experimental 36
   5.1. Síntesis química 37
   5.2. Parte biocatalítica 46
      5.2.1. Polvos acetónicos de riñón de mamífero 46
         5.2.1.1. Procedimiento general para la preparación de polvos acetónicos de riñón de mamíferos 46
         5.2.1.2. Resolución enzimática de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina 46
         5.2.1.3. Derivatización y análisis cromatográfico de los productos de la resolución enzimática 47
         5.2.1.4. Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en el polvo acetónico de riñón de bovino 48
      5.2.2. Microorganismos degradantes de nitrilos 49
         5.2.2.1. Aislamiento de microorganismos degradantes de nitrilos. 51
         5.2.2.2. Selección de los microorganismos capaces de emplear benzonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno 52
         5.2.2.3. Extracción de ADN de *R. pyridinivorans* V51B 52
         5.2.2.4. Amplificación del ADN del gen que codifica para el rRNA 16S 53
         5.2.2.5. Biotransformación de benzonitrilo con *R. pyridinivorans* V51B en MMSL 54
         5.2.2.6. Procedimiento general de obtención de biomasa de *R. pyridinivorans* V51B 55

5.2.2.7. Biotransformación de benzonitrilo con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B 56

5.2.2.8. Biotransformación de fenilacetonitrilo con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B 56

5.2.2.9. Obtención del extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B 56

5.2.2.10. Determinación de la actividad específica de la nitrilasa en el extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B 57

5.2.2.11. Biotransformación de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**) con células íntegras de V51B 58

5.2.2.12. Biotransformación de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**) con extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B 59

5.2.2.13. Biotransformación de otros nitrilos con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B 59

5.2.2.14. Evaluación de la capacidad del extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B para transformar diferentes nitrilos 60

5.2.2.15. Método analítico para el seguimiento de las biotransformaciones por HPLC 50

6. Resultados y Discusión 62

6.1. Síntesis química 63

6.2. Parte biocatalítica 66

6.2.1. Resolución enzimática de *N*-acetil-DL-homofenilalanina (**4**) empleando polvos acetónicos de riñón de mamíferos. 67

6.2.1.1. Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en la fracción soluble de los polvos acetónicos de riñón de bovino 70

6.2.2. Biotransformación con microorganismos transformantes de nitrilos 72

6.2.2.1. Determinación de la actividad específica de nitrilasa en el extracto intracelular de V51B 75

6.2.2.2. Identificación de la cepa V51B 76

7. Conclusiones y Perspectivas 81

8. Índice de estructuras 83

9. Anexos 84

1. RESUMEN

Los aminoácidos no naturales son materias primas muy versátiles para la síntesis de fármacos debido principalmente a su quiralidad. La introducción de aminoácidos no naturales en algunos fármacos mejora su acción farmacológica y resistencia a la proteólisis.

En este trabajo se evaluaron dos rutas biocatalíticas para la preparación de la D-homofenilalanina (**1**), materia prima para la preparación de varios fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), partiendo en ambas estrategias del cinamaldehído comercial. Las estrategias evaluadas fueron:

a) La resolución enzimática de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**), explorando la capacidad catalítica de las aminoacilasas contenidas en los polvos acetónicos de riñón (PAR) de cinco especies de mamíferos: borrego, cerdo, perro, rata y res. Se observó que los PAR de rata y perro fueron inactivos y los de cerdo y res mostraron los mejores rendimientos y excesos enantioméricos de L-homofenilalanina (**7**) y de D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**), precursor de **1**.

b) La hidrólisis enzimática del DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**), para producir uno de los enantiómeros de la homofenilalanina, empleando células íntegras de microorganismos con capacidad de metabolizar nitrilos. Para lograr este objetivo se buscaron, en muestras de suelo, microorganismos con capacidad degradante de nitrilos, mediante cultivos en un medio selectivo con benzonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno. Se logró el aislamiento de un microorganismo, identificado como *Rhodococcus pyridinivorans* por comparación de la secuencia del gen que codifica para el RNA ribosómico 16 S, el cual demostró capacidad degradante de algunos nitrilos, pero resultó incapaz de utilizar como sustrato al DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**).

1. ABSTRACT

Unnatural amino acids are versatile chiral building blocks for drug synthesis, mainly because of their chirality. Their incorporation usually improves drug activity and, being unnatural, they can confer resistance to proteolysis of the obtained drugs.

In this study, two different biocatalytical approaches to D-homophenylalanine (**1**), were evaluated. This amino acid is a precursor for the manufacture of inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). Both biosynthetic strategies start from commercial cinnamaldehyde and involve two different biocatalytical strategies:

a) The enzymatic resolution of DL-*N*-acetyl-homophenylalanine (**4**), by exploring the catalytic activity of kidney aminoacylases. Kidney acetone powder (KAP) from five mammalian species: sheep, pig, dog, rat and cattle, were tested. KAP from rat and dog were inactive and those from pig and cattle showed the best yields and the highest enantiomeric excesses for L-homophenylalanine (**7**) and D-*N*-acetyl-homophenylalanine (**6**),

b) The enzyme hydrolysis of DL-2-amino-4-phenylbutyronitrile (**5**), to produce one of the enantiomers of homophenylalanine, using whole cells of a nitrile-degrading microorganism. In order to achieve this goal, we screened for microorganisms able to use nitriles in several soil samples, by using a selective medium containing benzonitrile as the single carbon and nitrogen source. A strain was isolated, and identified as *Rhodococcus pyridinivorans* by sequencing its 16S rRNA gene. This strain is able to metabolize some nitriles, however, it can not utilize DL-2-amino-4-phenylbutyronitrile (**5**) as a substrate.

2. INTRODUCCIÓN

En la última década se ha logrado un rápido avance en el desarrollo de fármacos ligantes selectivos de los receptores de péptidos y que son activos por vía oral. El diseño de estructuras adecuadas que mantengan el balance crucial entre sus propiedades farmacológicas (unión al receptor) y sus propiedades farmacéuticas (permeabilidad de membrana y estabilidad metabólica), es el principal desafío de los científicos involucrados en la química medicinal.

Algunos aminoácidos no naturales han sido reconocidos como fragmentos estructurales que confieren un incremento en la actividad biológica y en la resistencia a la proteólisis en nuevos fármacos ligantes de receptores de péptidos. Un ejemplo de este tipo de medicamentos lo constituyen un importante grupo de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), en los cuales la incorporación de un fragmento de L-homofenilalanina en su estructura les confiere una gran afinidad por el sitio activo de la enzima y una gran estabilidad metabólica, lo que ha permitido que este tipo de medicamentos permanezca en uso como una valiosa herramienta en el tratamiento de la hipertensión.[1] Asimismo, los aminoácidos no naturales han atraído el interés de muchos investigadores, debido a su versatilidad cuando se les emplea en la preparación de compuestos quirales para síntesis asimétrica.[2, 3]

En el presente proyecto se evaluaron dos rutas químico-enzimáticas para la preparación de ambos enantiómeros de la homofenilalanina (**1** y **7**, Figura 2.1), aminoácidos no naturales empleados como materia de partida para la síntesis de fármacos antihipertensivos del tipo de los inhibidores de la ECA, partiendo, en ambas estrategias, del comercial.

---

[1] Petrillo, E. W.; Ondetti, M. A. *Med. Res. Rev.* **1982**, 2, 1.
[2] Bommarius, A. S.; Schwarm, M.; Stingl, K.; Kottenhahn, M.; Huthmacher, K.; Drauz, K. *Tetrahedron:Asymmetry* **1995**, *6*, 2851.
[3] Patchett,A A ; Harris, E.; Tristram, E. W.; Wyvratt, M. J.; Wu, M. T.; Taub, D.; Peterson, E. R ; Ikeler, T. J.; ten Broeke, J.; Payne, L. G.; Ondeyka, D. L.; Thorsatt, E. D.; Greenlee, W. J.; Lob, N. S.; Hoff, R. D.; Joahua, H.; Ruyle, W. V ; Rothrock, J. W.; Aster, S. D.; Maycock, A. L.; Robinson, F. M.; Hirschmann, R.; Sweet, C. S.; Ulm, E.H.; Gross, D. M.; Stone, C. A. *Nature (London)* **1980**, *288*, 280.

Figura 2.1. Estructuras de D-homofenilalanina (**1**) y L-homofenilalanina (**7**).

Las estrategias biocatalíticas evaluadas fueron:

I. La resolución enzimática de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**), evaluando la capacidad catalítica de las aminoacilasas contenidas en los polvos acetónicos de riñón de diferentes especies de mamíferos para la hidrólisis selectiva del enantiómero L (Figura 2.2), con posterior hidrólisis química de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) para producir la D-homofenilalanina (**1**) (Figura 2.3).

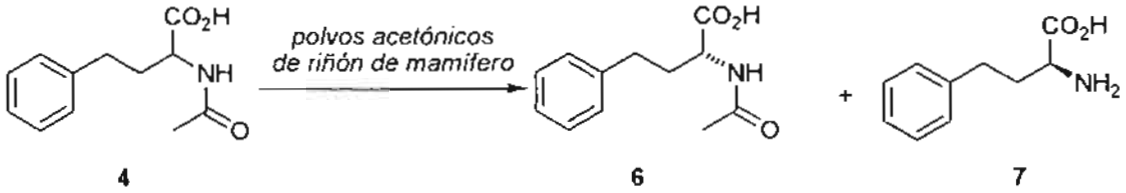


Figura 2.2. Resolución enzimática de *N*-acetil-DL-homofenilalanina (**4**)

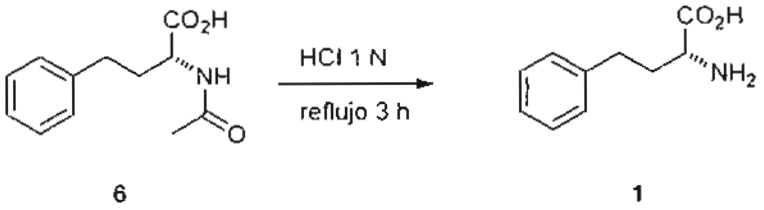


Figura 2.3. Hidrólisis química de D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**)

II. La hidrólisis enzimática del DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**), empleando células íntegras y extracto intracelular de microorganismos aislados a partir de muestras de suelos, con capacidad de transformar nitrilos. Esto produciría, según el tipo de enzimas presentes en el microorganismo, una

combinación de productos enantiopuros, provenientes ya sea de la hidrólisis del enantiómero L, o bien de la hidrólisis del enantiómero L y la hidratación del enantiómero D, resultando así una mezcla de dos compuestos de fácil separación a diferentes valores de pH. Por ejemplo, en el mejor de los casos, la bioconversión de **5** (Figura 2.4) produciría L-homofenilalanina (**7**) y D-homofenilalaninamida (**8**) la cual, por hidrólisis ácida, produciría la D-homofenilalanina (**1**).

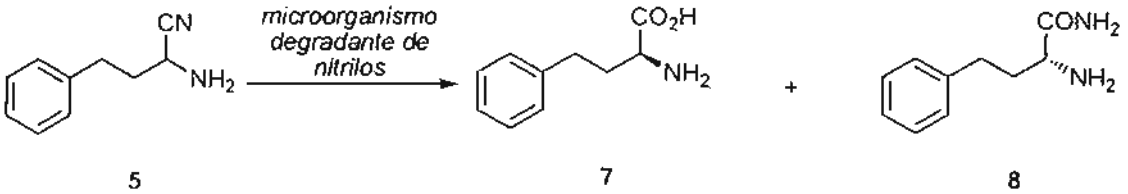
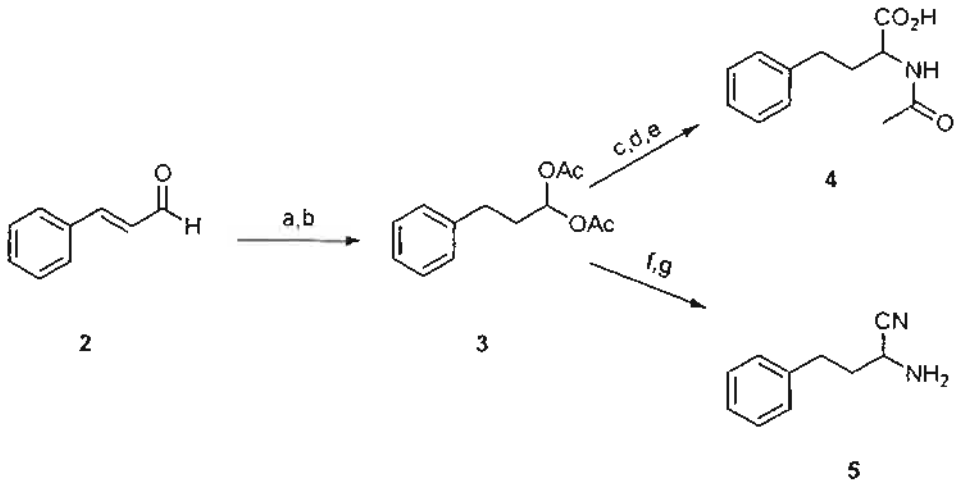


Figura 2.4. Hidrólisis enzimática de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**).

El precursor común de ambas rutas de síntesis fue el cinamaldehído (**2**), como se ilustra en el Figura 2.5.



a= Ac_2O, APTS; b= H_2, Pd/C, c= KCN, $(NH_4)_2CO_3$, d = NaOH, 130 °C; e= Ac_2O, 0-5 °C; f= KOH; g= NaCN, NH_4Cl.

Figura 2.5. Síntesis química de los compuestos **4** y **5**, precursores racémicos de los enantiómeros de homofenilalanina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Desarrollar un proceso químico-enzimático para la preparación de la D-homofenilalanina (**1**) a partir de cinamaldehído (**2**).

3.2. Objetivos particulares:

- Desarrollar métodos eficientes para la síntesis química de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) y de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**).
- Evaluar la actividad de aminoacilasa en polvos acetónicos de riñón de diferentes especies de mamíferos con la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**).
- Buscar actividad transformante de nitrilos en microorganismos provenientes de muestras de suelos y en el caso de encontrar esta actividad, aislar y caracterizar los microorganismos responsables de la biotransformación.
- Desarrollar un proceso biocatalítico aplicado a la hidrólisis enzimática enantioselectiva del DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**).
- Evaluar la eficiencia de ambas estrategias sintéticas, para su potencial aplicación industrial.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

4. ANTECEDENTES

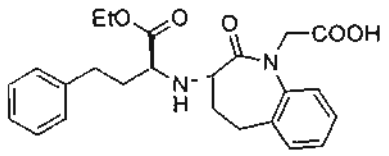
4.1. Antihipertensivos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina

La hipertensión, que se define como una elevación de la presión sanguínea por encima de 140/90 mmHg, es uno de los factores de riesgo más significativos en el desarrollo y la progresión de las enfermedades cardiovasculares. En México se han documentado unos quince millones de casos, siendo la enfermedad cardiovascular más común.[4]

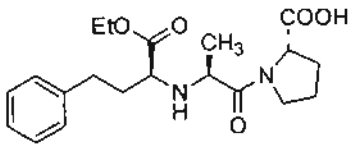
Entre los fármacos utilizados en la terapia de la hipertensión se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Estos fármacos inhiben a la enzima peptidil dipeptidasa, la cual hidroliza la angiotensina I formando la angiotensina II e inactiva a la bradiquinina, un potente vasodilatador. Así, la actividad hipotensora de los inhibidores de la ECA parece ser consecuencia de una acción inhibidora sobre el sistema renina-angiotensina y una acción estimulante sobre el sistema calicreína-cinina.[5]

En 1977, Cushman y Ondethi[6] sintetizaron el captopril, primer inhibidor sintético de la ECA y activo por vía oral. Posteriormente, han aparecido una multitud de fármacos con capacidad de inhibir la ECA y con mayores ventajas terapéuticas, p. ej., una vida media más prolongada, lo que permite utilizarlos en una sola dosis diaria. Entre estos fármacos destacan los llamados enalapril, lisinopril, quinapril, benazepril, fosinopril, cilazapril, ramipril y spirapril.[7] En la Fig. 4.1 se muestra la estructura de algunos de estos fármacos. La mayoría de ellos, contienen en su estructura un fragmento aminoéster de la L-homofenilalanina (**7**).

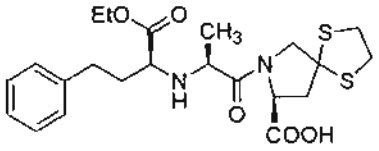
[4] Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud **2003**, *7*, 105.
[5] Watthey, J. W.; Stanton L.; Mahesh D.; Babiarz E.; Finn M. *J. Med. Chem.* ***1985***, 28, 1511.
[6] Ondethi, M.A.; Rubin, B.; Cushman, D.W. *Science* **1977**, 196, 441.
[7] Watthey, J. W.; Jeffrey W. H. US Pat. 4,410,520, **1983.**



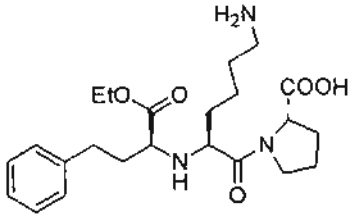
Benazepril



Enalapril



Spirapril



Lisinopril

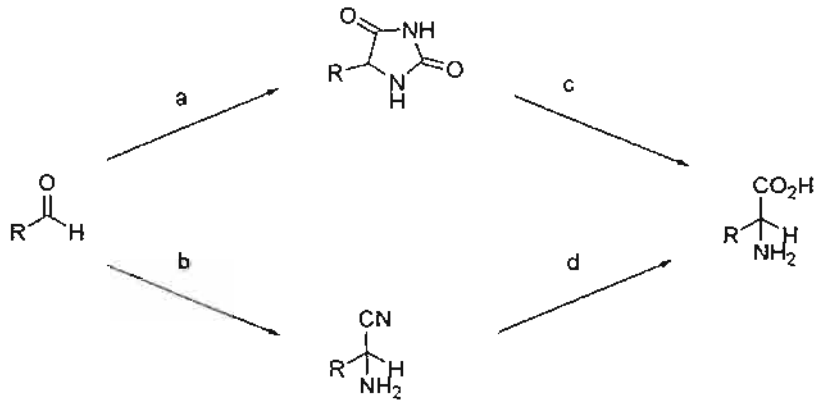
Figura 4.1. Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina.

La patente de la mayoría de estos fármacos ha vencido recientemente o está próxima a vencer, por lo que la investigación en esta área puede redituar beneficios para la industria farmacéutica en la manufactura de genéricos.

4.2. Homofenilalanina

Hasta 1950 todos los aminoácidos eran producidos por extracción o por síntesis química y resolución de las mezclas racémicas sintéticas. Los principales métodos químicos para la producción industrial de aminoácidos son los procesos que involucran las reacciones de Strecker o Bucherer-Bergs.[8] Estos procesos tienen la ventaja de que emplean aldehídos como materia prima, los cuales son fácilmente producidos mediante el proceso oxo. En ambos casos, el aminoácido es producido por la hidrólisis del producto intermediario, ya sea en condiciones alcalinas, en el proceso Bucherer-Bergs, o ácidas para el proceso Strecker (Figura 4.2).

[8] W. Bauer, "Amino acids" en: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 3a. Ed., (John Wiley and Sons, New York, 1991); vol. 2, pp. 376-407.



a= Bucherer Bergs: $NH_4(CO_3)_2$ / NaCN; b= Strecker: NH_3 / HCN;
c= NaOH/H_2O, 130 °C; d= H_3O^+, reflujo.

Figura 4.2. Principales alternativas para la síntesis química de aminoácidos

Cuando se forman compuestos quirales en reacciones químicas ordinarias, se obtiene una mezcla racémica de isómeros D y L. La resolución química de aminoácidos, a través de la formación de sales diastereoméricas, suele ser un proceso costoso y laborioso, además de requerir el reciclaje del isómero no deseado. Existen alternativas biocatalíticas que ofrecen ventajas importantes desde el punto de vista económico y ecológico. Así, por ejemplo, un α-aminoácido puede ser esterificado y sometido a la acción de lipasas para obtener el L-aminoácido y su correspondiente éster enantiomérico.[9] De manera similar, puede realizarse una resolución enzimática de *N*-acil-aminoácidos por la acción de aminoacilasas.[10]

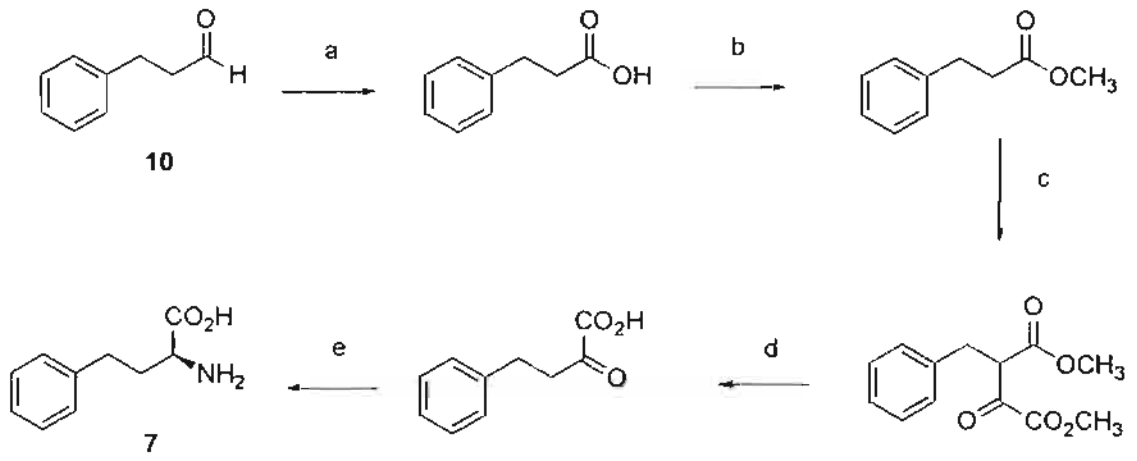
Se han descrito muchos aminoácidos que no forman parte de las proteínas, pero aparecen como metabolitos, como en el caso de los antibióticos y en algunas otras sustancias de origen microbiano, además de tener aplicaciones farmacológicas y como saborizantes. Estos aminoácidos son también versátiles precursores quirales en la síntesis de compuestos con actividad biológica. Tal es el caso de la

[9] Liese, A.; Kragl, U.; Kierkels, H.; Schulze, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 673.
[10] Chenault, H.K.; Dahmer, J.; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6345.

homofenilalanina, que puede ser empleada, en ambas formas enantioméricas, como precursor en la síntesis de antihipertensivos inhibidores de la ECA.[11,12]

Se han reportado varios procesos de síntesis química o químico-enzimática para la preparación de ambos enantiómeros de la homofenilalanina. Algunos ejemplos representativos son los siguientes:

a) Transaminación del ácido 4-fenil-2-oxobutanoico con ácido L-aspártico, L-glutámico o L-lisina en presencia de transaminasas, en una síntesis de varios pasos para generar la L-homofenilalanina (**7**) a partir del hidrocinamaldehído (**10**)[13] (Figura 4.3).



a= H_2O_2; b= MeOH/ H^+ c= MeONa, oxalato de dimetilo; d= HCl; e= ac. L-aspártico, amino transferasa

Figura 4.3. Síntesis químico-enzimática de L-homofenilalanina (**7**)

b) Resolución de ésteres de DL-homofenilalanina (**12**) con lipasas o acilasas.[14] (Figura 4.4).

[11] Ching-Yao Chang ; Teng-Kuei Yang. Tetrahedron: *Asymmetry* **2003**, 14, 2239.
[12] Boyer, S. K.; Pfund, R. A.; Portmann, R. E.; Sedelmeier, G. H.; Wetter, H. F. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 337.
[13] (a) Rozzell, J.D. U.S Pat. 4,525,454, **1985**. (b) Senuma et al., *Appl Biochem. Biotech.* **1989**, *22*. 141. (c) Chen et al., U.S. Pat. 6,146,859, **2000**. d) Lo, H.H.; Hsu, S.K.; Lin, W.D.; Chan, N.L.; Hsu, W H. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 411. e) Cho, B. K.; Seo, J H.; Kang,T. W.; Kim, B.G. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 226.
[14] (a) Kijima T. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1994**, *59*, 61. (b) Houng, J-Y.; Hsieh,Ch-L. U.S Pat. 5,552,317, **1996**.

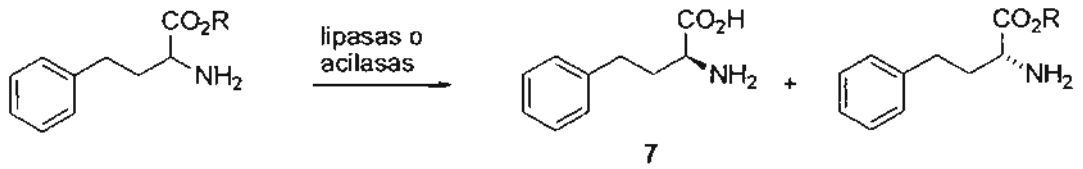


Figura 4.4. Resolución enzimática de ésteres de DL-homofenilalanina

c) Resolución química de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina con (*S*)-feniletilamina,[15] con posterior hidrólisis (Figura 4.5).

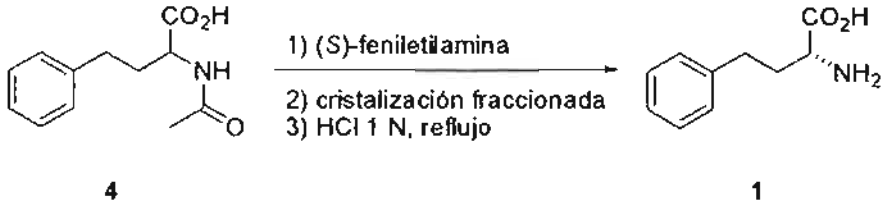


Figura 4.5. Resolución química de DL-*N*-acetil-homofenilalanina

d) Bioconversión de DL-5-feniletilhidantoina (**11**) con microorganismos.[16,17,18] (Figura 4.6).

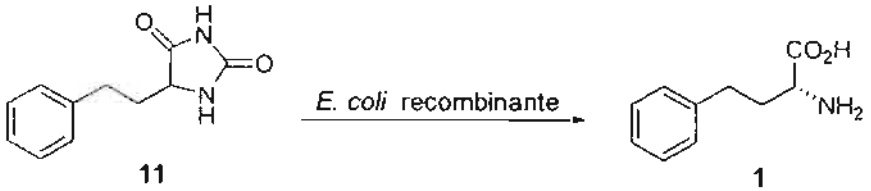


Figura 4.6. Síntesis biocatalítica de D-homofenilalanina (**1**).

[15] Miyazawa, Y.; Oishi, N.; Maehara, K. J. Pat 63,063,646 (Appl. 86-205850). (C.A. 110:24304).
[16] Syldatk, C. *et al*, *Biotech. Letters*, **1992**, 14(2), 105.
[17] Martinez-Rodriguez, S.; Las Heras-Vazquez, F. J.; Clemente-Jimenez, J. M.; Mingorance-Cazorla, L; Rodriguez-Vico, F. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1201.
[18] Iwasaki, G.; Kimura, R.; Numao, N.; Kondo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37(2)*, 280.

4.3. Biotransformaciones

Las biotransformaciones, entendidas como el empleo de biocatalizadores en forma de enzimas aisladas, preparados enzimáticos, organelos celulares o células enteras de microorganismos para la transformación de compuestos orgánicos no naturales se han empleado desde hace más de cien años. Éstas son una valiosa herramienta para la producción de compuestos orgánicos de alto valor agregado o que se consumen en gran volumen y por tanto juegan un papel valioso como apoyo a la síntesis orgánica. Se intenta su aplicación cuando algún paso clave en la síntesis no puede realizarse por métodos tradicionales o por razones de costo o ambientales, pues en muchos casos permiten preparar productos de alto valor agregado y alta pureza enantiomérica mediante procesos eficientes y ambientalmente limpios. Su estudio se ha hecho particularmente importante en las últimas dos décadas, debido a la creciente necesidad de compuestos orgánicos enantiopuros para las industrias farmacéutica, agroquímica y de alimentos.[19] Ejemplos de productos obtenidos en gran escala mediante biotransformaciones son el ácido cítrico,[20] la acrilamida,[21] el ácido glutámico[22] y una gran variedad de aminoácidos y antibióticos.[23] Además, las enzimas y los microorganismos se emplean en procesos de biorremediación.[24]

Los compuestos obtenidos mediante biotransformaciones con células enteras de microorganismos pueden clasificarse en aquellos cuya producción está asociada con el crecimiento del microorganismo (metabolitos primarios) y aquellos que se producen cuando el crecimiento ha cesado (metabolitos secundarios). A su vez, los metabolitos primarios pueden subdividirse en aquellos que se producen en cantidades suficientes sólo para el crecimiento celular, tales como vitaminas y aminoácidos, y aquellos que se producen en cantidades mayores, debido a que son productos finales del metabolismo normal, como por ejemplo el etanol y los ácidos

[19] Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 4th ed., (Springer-Verlag, Berlin, **2000**).
[20] Schwelger, L. B. U.S. pat. 2,970,084, **1961**.
[21] (a) Yamada *et al*, U.S. pat. 4,637,982, **1987** ; (b) Watanabe *et al.*, U.S. pat. 5,179,014, **1993**; (c) Yamada et al. U.S. pat. 5,334,519, **1994**.
[22] Shildneck, P.R. US pat 2,306,646, **1942**.
[23] *Antibiotics*. J. W. Corcoran, F. E. Hahn, Eds. (Springer-Verlag, New York, 1975).
[24] Parales, R. E ; Bruce, N. C ; Schmid, A.; Wackett, L. P. *Appl. Env. Microbiol.*, **2002**, *68(10)*, 4699.

láctico, glutámico y cítrico. Estos productos se emplean en la industria de alimentos o como materias primas para la manufactura de otros productos químicos.[25]

En comparación con los catalizadores químicos, las enzimas tienen una mayor especificidad con respecto a los sustratos y productos (estructura y estereoquímica). Además, debido a esta especificidad, no suele ser necesaria una alta pureza del sustrato. En contraste con las reacciones químicas, la biocatálisis se realiza bajo condiciones de reacción muy suaves; por ejemplo, medio acuoso, temperaturas por debajo de los 40 °C, valores de pH cercanos a la neutralidad y presión atmosférica, además de que, por lo general, no involucran el uso de reactivos tóxicos. Por otro lado, existe la disponibilidad de gran variedad de enzimas y microorganismos y la posibilidad de modificación de las propiedades catalíticas de éstos por ingeniería genética o evolución dirigida.

Sin embargo, el empleo de biocatalizadores también conlleva algunas desventajas, como son, por lo general, la necesidad de emplear altas diluciones y costosos cofactores; su poca estabilidad térmica y su incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos; las reacciones son a veces lentas y con riesgo de inhibición y el aislamiento del producto es generalmente tedioso.

En vista de que la biotecnología no puede reemplazar todas las rutas sintéticas químicas, es frecuente combinar ambas estrategias, la química y la enzimática, incluyendo biotransformaciones con microorganismos.

Para aplicaciones de gran escala empleando un biocatalizador, la inmovilización de células microbianas tiene varias ventajas: incrementa la capacidad de reciclaje, la facilidad de separación y su uso en procesos continuos. Así, la inclusión de las células en una matriz polimérica permite el atrapar células vivas o metabólicamente activas, manteniendo una alta difusión de productos y sustratos; los métodos de inmovilización son relativamente simples y el polímero de soporte suele ser de bajo

[25] Fessner, W. D. (Ed.) *Biocatalysis. From Discovery to Application.* (Springer-Verlag, Berlin, 2000).

costo y no tóxico. Ejemplos de matrices típicas para inmovilización son el alginato de sodio, la carragenina, la agarosa y los polímeros porosos rígidos.[26]

4.4. Aminoacilasas

Las aminoacilasas (EC 3.5.1.x) pertenecen a una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis estereoespecífica de α-aminoácidos *N*-acilados. La aminoacilasa de riñón fue descubierta en 1881, al observarse la capacidad que tienen los homogeneizados crudos de riñón para hidrolizar el hipurato a benzoato y glicina.[27] Smorodinzew[28] introdujo el concepto de aminoacilasa, al demostrar que la "hipuricasa" hidrolizaba una amplia variedad de α-aminoácidos *N*-acilados. En los mamíferos, la más abundante de las aminoacilasas es la aminoacilasa I.[29]

La aminoacilasa de riñón de cerdo es una metaloproteína compuesta por dos subunidades idénticas, cada una de las cuales consiste en una cadena de 406 aminoácidos que contiene un ión de zinc por subunidad, acetilalanina en el nitrógeno terminal y dos sitios activos, cada uno contiene un tiolato esencial y un enlace disulfuro.[30,31] El centro metálico no participa en la catálisis.[32] Los mejores sustratos para la aminoacilasa I son *N*-acilaminoácidos alifáticos de cadena no ramificada y que poseen una fracción de acilo pequeña. El cloruro de cobalto ha sido empleado como activador de la aminoacilasa y para restablecer la actividad de la misma.[33] Se ha reportado también actividad de aminoacilasa en diferentes microorganismos, como *Alcaligenes* sp.,[34] *Aspergillus oryzae*,[35] *Pseudomonas maltophila* B1,[36]

[26] (a) Chibata, *et al. Methods Enzymol.*, **1987**, *135*, 189; (b) Lantero, J.; Oreste, J. U.S. pat. 4,355,105, **1982**.
[27] Schmiedeberg, O. *Arch. Exp. Pathol. Pharmak.* **1881**, *14*, 379.
[28] Smorodinzew, I. A. *Physiol. Chem.* **1922**, *124*, 123.
[29] Lindner, H.; Höpfner, S.; Tafter-Naumann, M.; Miko, M.; Konrad, L.; Rohm, K. *Biochimie* **2000**, *82*, 129.
[30] Kordel, W.; Schneider, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *445(2)* 446.
[31] Mitta, M.; Ohnogi, H.; Yamamoto, A.; Kato, I.; Sakiyama F.; Tsunasawa, S. *J. Biochem.* **1992** *112*, 737.
[32] Heese, D.; Berger, S.; Rohm, K.H. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 175.
[33] a) Story, S. V.; Grunden, A. M.;Adams, M. W. *J. Bacteriol.* **2001**, *183(14)*, 4259. b) Szewczuk, A. *Arch Immunol. Exp. Ther.* **1971**, *19*, 389.
[34] Yang, Y.B.; Hu, H.L.; Chang, M.C., Li, H.; Tsai, Y.C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, 58, 204.
[35] Tamura, T.; Oki, Y.; Yoshida, A.; Kuriyama, T.; Kawakami, H.; Inoue, H.; Inagaki, K.; Tanaka, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *379*, 261.
[36] Wakayama, M.; Shiiba, E.; Sakai, K.; Moriguchi, M. *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *85*, 278.

Mycobacteria sp.,[37] *Lactobacillus arabinosus*,[38] *Streptomyces* spp.[39] y en otros microorganismos.[40]

4.4.1. Aplicaciones de las aminoacilasas

La compañía japonesa Tanabe produce triptófano, metionina, fenilalanina y valina empleando un proceso continuo de resolución de los correspondientes *N*-acetil aminoácidos con aminoacilasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada en columnas de DEAE-SEPHADEX[41] (resina derivada de dextrano entrecruzada con epiclorhidrina, a la cual se han introducido cadenas que contienen grupos iónicos, como el dietilaminoetilo).

Degussa emplea un proceso enzimático que consiste en un sistema que combina L-aminoacilasa y *N*-acilamino racemasa (Figura 4.7), produciendo anualmente varios cientos de toneladas de L-metionina.[42]

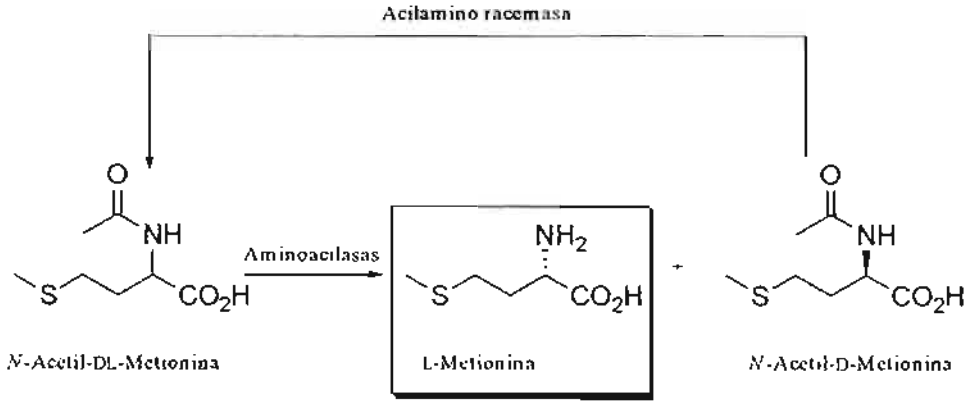
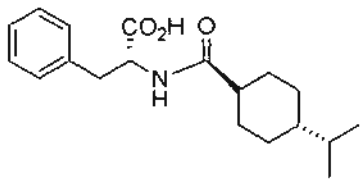


Figura 4.7. Proceso Degussa para la obtención de L-metionina.

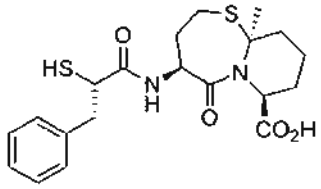
En los últimos años se han introducido al mercado varios fármacos que incorporan

[37] Matsumoto, J.; Nagai, S. *J. Biochem.* **1972**, *72*, 269.
[38] Park, R.W.; Fox, S.W. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3193.
[39] Sugie, M.; Suzuki, H. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1089.
[40] a) Sakanyan, V.; Desmarez, L.; Legrain, C.; Charlier, D.; Mett, I.; Kochikyan, A., Savchenko, A.; Boyen, A., Falmagne, P.; Pierard, A.; Glansdorff, N. *Appl. Environ. Microbiol* **1993**, *59*, 3878. b) Wakayama, M.; Moriguchi, M. *J. Molec. Catal.* **2001**, *12*, 15.
[41] OCDE. *The application of Biotechnology to Industrial Sustainability* **2001**, 63.
[42] a) May, O.; Stefan, V.; Bommarius, A.; Drauz, K. *Org. Process Res. Dev.* *2002*, *6*, 452. b) Bommarius *et al.* U.S. pat 6,656,710, **2003**.

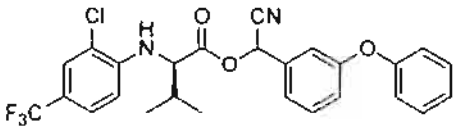
en su estructura fragmentos de D-aminoácidos (Figura 4.8); debido a esto, se ha dado gran importancia a la obtención de D-aminoacilasa de microorganismos, así como a su empleo en la obtención del isómero D de diversos aminoácidos, como metionina, triptófano, fenilalanina, alanina y leucina.[43, 44]



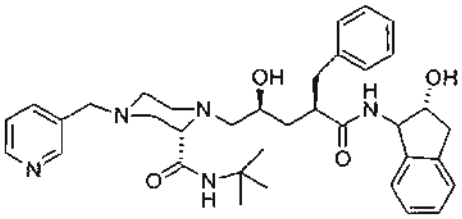
Nateglumida (antidiabético)



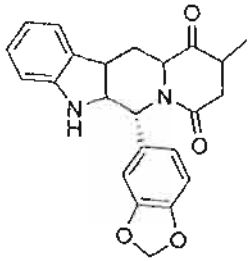
Omaprilat (antihipertensivo)



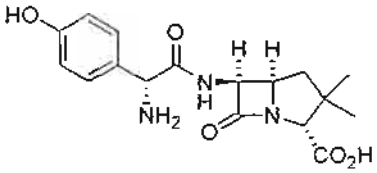
Fluvalinato (insecticida)



Indinavir (anti HIV)



Tadalafil (disfunción eréctil)



Amoxicilina (antibiótico)

Figura 4.8. Ejemplos de fármacos que incorporan en su estructura un fragmento de un D-aminoácido.

[43] Tokuyama, S., U.S. pat. 6,030,823, 2000.
[44] Mitsuhashi, K.; Yamamoto, H.; Matsuyama, A.; Tokuyama, S. U.S. pat. 6,514,742, 2003.

Además de catalizar la hidrólisis estereoespecífica de los *N*-acil-α-aminoácidos, las aminoacilasas han encontrado aplicación en la transesterificación enantioselectiva de alcoholes secundarios[45] (Figura 4.9).

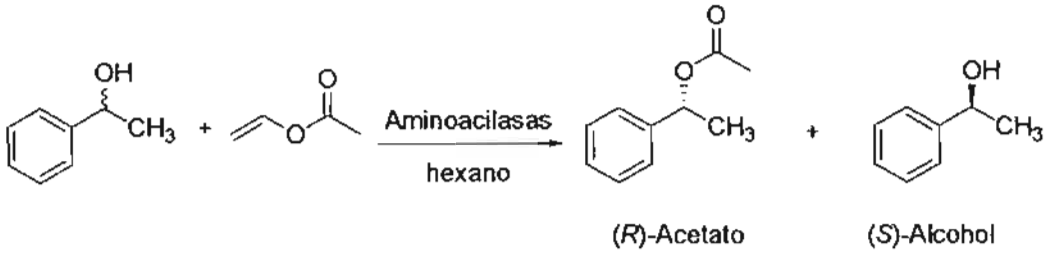


Figura 4.9. Empleo de aminoacilasas en reacciones de transesterificación de alcoholes secundarios.

Recientemente[46] se ha descrito una nueva aplicación de las aminoacilasas, la resolución de *N*-acil-β-aminoácidos (Figura 4.10).

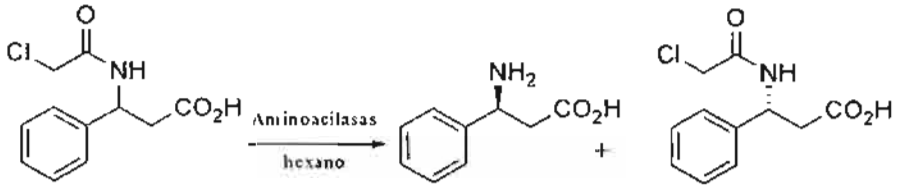


Figura 4.10. Primera resolución enzimática de *N*-acetil-β-aminoácidos promovida por aminoacilasas.

4.4.2. Polvos acetónicos de riñón de mamífero

Los polvos acetónicos de riñón de mamífero se han mencionado en la literatura desde 1931;[47,48] a partir de ellos se han estudiado, aislado e identificado diversas enzimas como, por ejemplo, aminopeptidasas,[49] nucleasas[50] y maleato

[45] Bakker, M.; Spruijt, A. S.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Tetrahedron: *Asymmetry* **2000**, *11*, 1801.
[46] Harald, G ; Harald, T.; Stefan, B.; Karlheinz, D.; Christiane, S ; Sylvie, G.; Helge, W. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1977
[47] Fabisch, W. *Biochemische Zeitschrift* **1931**, *234*, 84. CA 25:35704
[48] Abreu, L. A.; Abreu, R. R. *Nature* (London, U. K.), **1959**, *184*(26), 2016. b) Mazumder, R.; Sanadi, D.R.; Rodwell, V. W. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2546.
[49] Campbell, B. J.; Lin, Yuan-Chuan; Bird, M. E. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*(11), 3632.
[50] Watanabe, T. *Anal Biochem.* **1978**, *88*(1), 62.

deshidrogenasas.[51] Se ha detectado actividad de aminoacilasa en hígado y riñón de diferentes especies, incluyendo el hombre.[52] Lindner reportó que la aminoacilasa I se encuentra en la corteza de riñón de cerdo en concentraciones de hasta 1.5 mg por gramo de tejido fresco.[53]

4.5. Nitrilos

Los nitrilos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza como cianoglucósidos, cianolípidos, ricinina, etc. Es el caso de la 3-cianoalanina, que es hidratada a la L-asparagina, o el 3-indolacetonitrilo, el cual es transformado en el ácido 3-indolacético, una auxina que controla la elongación celular en plantas. En las plantas, los nitrilos tienen función como metabolitos secundarios y constituyentes de un sistema químico de defensa que protege a las plantas de los herbívoros depredadores (p. ej. los glucósidos cianogenéticos).[54]

Por otro lado, los nitrilos son compuestos orgánicos de gran importancia como intermediarios en la síntesis de una gran variedad de polímeros, derivados principalmente de acrilonitrilo y adiponitrilo; otros nitrilos se emplean como disolventes, pesticidas, farmoquímicos, intermediarios en la síntesis de fármacos y como sintones quirales. También se emplean como intermediarios importantes en la manufactura de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos.[55]

La hidrólisis química de los nitrilos suele requerir condiciones drásticas de reacción, lo que involucra elevados consumos energéticos, la formación de productos no deseados y la generación de grandes cantidades de residuos inorgánicos; además, no es una reacción estereoselectiva. En este contexto, la hidrólisis biocatalítica de

[51] Dupourque, D., Kun, E. *Eur. J. Biochem.* **1968**, *6*(1), 151.
[52] Uttamsingh, V.; Keller, D.A.; Anders, M.W. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 801.
[53] Lindner, H.; Höpfner, S.; Tafler-Naumann, M.; Miko, M., Konrad, L.; Rohm, K. *Biochimie* **2000**, *82*, 129.
[54] Conn, E.E. en: Ebell, E.A.; Charlwood, B.V. (Eds.) *Secondary Plant Products.* In: Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 8, (Springer, Berlin, 1980).
[55] a) March., J., *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure.* 5th Ed., (Wiley: New York, 2001) 1179. b) Larock, R. C., *Comprehensive Organic Transformations.* 2nd Ed. (Wiley-VCH, New York, 1999)

nitrilos, que suele ser quimio y regioselectiva, además de estereoselectiva, representa una alternativa valiosa a la hidrólisis química convencional, al poder realizarse a temperatura ambiente y a valores de pH cercanos a la neutralidad y sin la producción de residuos contaminantes.[56]

La mayoría de los nitrilos son altamente tóxicos, mutagénicos, cancerígenos o inhibidores de la cadena respiratoria por su alta afinidad por la citocromo *c* oxidasa.[57] La degradación microbiana ha sido considerada como la mejor manera de eliminar los nitrilos tóxicos del medio ambiente; su aceptación se debe a su naturaleza benigna con el ambiente.[58] Algunos microorganismos pueden utilizar a los nitrilos como fuente de carbono, de nitrógeno, o ambos.

4.6. Enzimas transformantes de nitrilos

Las enzimas responsables de la biotransformación de nitrilos en plantas y microorganismos se dividen en dos grupos principales, las nitrilasas (EC 3.5.5.x) y las nitrilo hidratasas (EC 4.2.1.x).[59]

Las nitrilasas hidrolizan los nitrilos en un solo paso (sin la formación de una amida intermediaria) hasta el ácido carboxílico y amoniaco como únicos productos; las nitrilo hidratasas hidrolizan los nitrilos a las correspondientes amidas. Existen en la naturaleza enzimas que realizan otras transformaciones sobre los nitrilos, como son la oxidación (oxigenasas)[60] y la reducción (nitrogenasas).[56] Otras enzimas que se encargan de metabolizar los productos de estas degradaciones son amidasas, cianuro hidratasas, cianuro dihidratasas y cianasas (Figura 4.11).

[56] Banerjee, A.; Sharma, R.; Banerjee, U.C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 33.
[57] Solomonson, L.P.; Spehar, A.M. *Cyanide as a metabolic inhibitor* en: Vennesland, B.; Conn, E.E.; Knowles, C.J.; Westly, J.; Wissing, F. (Eds.) Cyanide in Biology (Academic Press, London, 1981).
[58] Kobayashi, M.; Goda M.; Shimizu, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, *253*, 662.
[59] Nagasawa, T.; Ryuno, K.; Yamada, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *139*, 1305.
[60] Sawyer, D.T., Sugimoto, H.; Calderwood, T.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 8025.

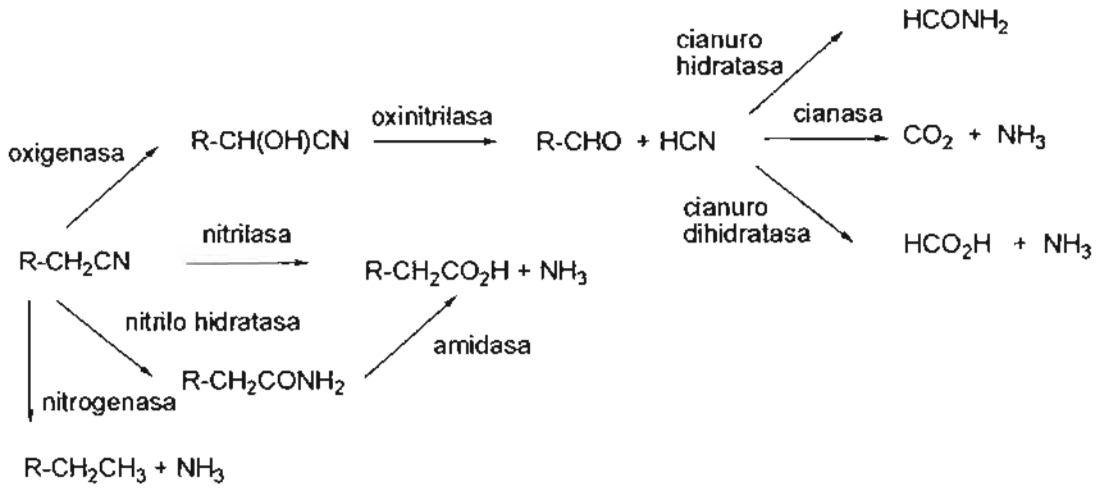


Figura 4.11. Rutas metabólicas de compuestos que contienen el grupo ciano.[56]

La degradación microbiana ha sido considerada como la mejor estrategia para eliminar los nitrilos altamente tóxicos del medio ambiente, provenientes de residuos industriales, pesticidas o herbicidas residuales, los cuales, sometidos a la acción de las nitrilo hidratasas o las nitrilasas, se transforman en sustancias inocuas o que pueden ser posteriormente degradadas por microorganismos comunes de los suelos.[61,62]

En años recientes, el uso de estas enzimas transformantes de nitrilos se ha incrementado de manera importante. Existen varios procesos industriales que emplean microorganismos que poseen algunas de estas enzimas, como son *Rhodococcus* N-774, *Pseudomonas chlororaphis* B23 y *R. rhodochrous* J1 para la producción de acrilamida y la síntesis de nicotinamida y ácido nicotínico a partir de la 3-cianopiridina.[63]

En 2003, Mylerová y Martinková[64] realizaron una amplia compilación de los microorganismos con actividad transformante de nitrilos, la cual se transcribe en la Tabla 4.1.

[61] Kobayashi, M.; Shimizu, S. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 95.
[62] Dias, J. C.; Rezende, R. P.; Linardi, V. R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 757.
[63] Mathew, C.; Nagasawa, T; Kobayashi, M.; Yamada, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1030.
[64] Mylerová, V.; Martinková L. *Current Organic Chemistry* **2003**, *7*, 1.

Tabla 4.1. Microorganismos transformantes de nitrilos. [64]

Microorganismo	Actividad enzimática	Sustratos
Procariotes		
Acidovorax facilis ATCC 55746	nitrilasa	alquilnitrilos, benzonitrilo
Agrobacterium sp. DSM 6336	nitrilasa	nitrilos heterocíclicos
Agrobacterium tumefaciens D3 (DSM 9674)	nitrilo hidratasa	arilnitrilos,alquilnitrilos
Agrobacterium tumefaciens B-261	nitrilo hidratasa	indol-3-acetonitrilo
Alcaligenes faecalis DSM 6335	nitrilasa	nitrilos heterocíclicos
Bacillus cereus	nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
Bacillus sp. BR449	nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
Bacillus sp. RAPc8 a, b	nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos
Bacillus pallidus Dac521	Nitrilasa, nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
Bacillus smithii SC-J05-1 a, b	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Brevibacterium imperialis CBS 489-74	nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
Comamonas testosteroni ATCC 55744	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Comamonas testosteroni	nitrilasa	alquilnitrilos
Gordona terrae FERM BP-4535	nitrilasa	alquilnitrilos
Pseudomonas sp. S1	nitrilasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, KCN
Pseudomonas chlororaphis B23 (FERM BP-187)	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Pseudomonas fluorescens DSM 7155	nitrilasa	alquilnitrilos
Pseudomonas putida NRRL-B-18668	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Pseudomonas putida	nitrilo hidratasa	acetonitrilo, NaCN,
Pseudonocardia thermophila JCM3095	nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
Rhodococcus sp. 409 (NOVO SP 409)	nitrilo hidratasa	arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos, cicloalquilnitrilos
Rhodococcus sp. C3II (DSM 9685)	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos
Rhodococcus sp. R312 (CBS 717.73)	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, benzonitrilo
Rhodococcus sp. YH3-3	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
Rhodococcus erythropolis	nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
Rhodococcus erythropolis BL1	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Rhodococcus erythropolis FZB 53	nitrilo hidratasa	nitrilos esteroidales
Rhodococcus erythropolis MP50 (DSM 9675)	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos,
Rhodococcus equi A4	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, cicloalquilnitrilos, arilnitrilos
Rhodococcus rhodochrous LL100-21	nitrilo hidratasa, nitrilasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, 3-cianopiridina

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

Rhodococcus rhodochrous IFO 15564	nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216,	dos nitrilasas, nitrilo hidratasa	arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
Rhodococcus rhodochrous AJ270	nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
Rhodococcus rhodochrous J-1 (FERM BP-1478)	nitrilo hidratasa, nitrilasa	alquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, arilnitrilos
Rhodococcus ruber	nitrilasa	acrilonitrilo
Eucariotes		
Arabidopsis thaliana	nitrilasa	alquilnitrilos,
Candida guilliermondii CCT 7207	nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
Candida famata	nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
Cryptococcus sp. UFMG-Y28	nitrilo hidratasa	acetonitrilo, propionitrilo
Cryptococcus flavus UFMG-Y61	nitrilo hidratasa	isobutironitrilo
Rhodotorula glutinis UFMG-Y5	nitrilo hidratasa	metacrilonitrilo

4.6.1. Nitrilasas

Las nitrilasas (EC 3.5.5.7) son un tipo de enzimas pertenecientes a un conjunto de mercapto-enzimas relacionadas estructuralmente, al que se ha llamado la "superfamilia de las nitrilasas".[65] Las enzimas pertenecientes a esta superfamilia son responsables de una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno en plantas, animales y hongos. Se han descubierto genes de nitrilasa en humanos, moscas y nemátodos.[66] En las plantas, las nitrilasas producen auxinas, biotina, β-alanina y otros productos naturales. Muchas bacterias y arqueas, particularmente aquellas con una relación ecológica con plantas y animales, contienen representantes de la superfamilia de las nitrilasas y utilizan estas enzimas en reacciones químicamente similares a las hidrólisis de los nitrilos o las amidas. Los miembros de la superfamilia de las nitrilasas se clasifican en trece ramas, de las

[65] Pace, H., Brenner, C., *Genome Biology*, **2001**, 2 (1) reviews 0001.1-0001.9. http://genomebiology.com/2001/2/1/reviews/0001 (consultado 08/11/2004)
[66] Pekarsky *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 8744.

cuales sólo una presenta realmente actividad de nitrilasa, mientras que las doce restantes, presentan actividad de amidasa o de condensación.[67]

Las nitrilasas son generalmente enzimas inducibles compuestas de uno o dos tipos de subunidades de diferente tamaño y secuencia. Se ha empleado acetonitrilo, benzonitrilo e isovaleronitrilo para incrementar la producción de nitrilasa en diferentes microorganismos.[68]

En muchos casos se ha observado que diferentes subunidades de nitrilasas se asocian entre sí para convertir a la enzima en su forma activa. Las nitrilasas no requieren de la presencia de un cofactor metálico o de un grupo prostético; sólo contienen residuos de cisteína en el sitio activo, que son catalíticamente esenciales.[69]

Un mecanismo probable para la reacción catalizada por nitrilasas ha sido propuesto por Kobayashi.[70] Como se muestra en la Figura 4.12, un ataque nucleofílico por un grupo tiol de una cisteína sobre el carbono del grupo ciano, seguido de la protonación del nitrógeno, produciría un imino tioéster intermediario, con posterior ataque por dos moléculas de agua y protonación del átomo de nitrógeno que se libera como NH_3. En algunos casos el intermediario tetraédrico formado puede descomponerse en forma anormal para producir la amida en lugar del ácido carboxílico. Se ha reportado que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 cataliza la hidrólisis de amidas a amoniaco, lo cual sugiere que un intermediario tetraédrico común está involucrado para ambos sustratos.[71]

[67] Brenner, C. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2002**, *12*, 775.
[68] a) Goldhust, A.; Bohak, Z. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1989**, *11*, 581. b) Collins, P.; Knowles, C. *Microbiol.* **1983**, *129*, 248. c) Nagasawa, T.; Cobayashi, M., Yamada, H. *Arch. Microbiol.* **1988**, *150*, 89.
[69] Kobayashi, M.; Yamaka, M.; Nagasawa, T.; Yamada, H. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9000.
[70] Kobayashi, M., Goda, M.; Shimizu, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 662.
[71] Kobayashi, M.; Goda, M.; Shimizu, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 549.

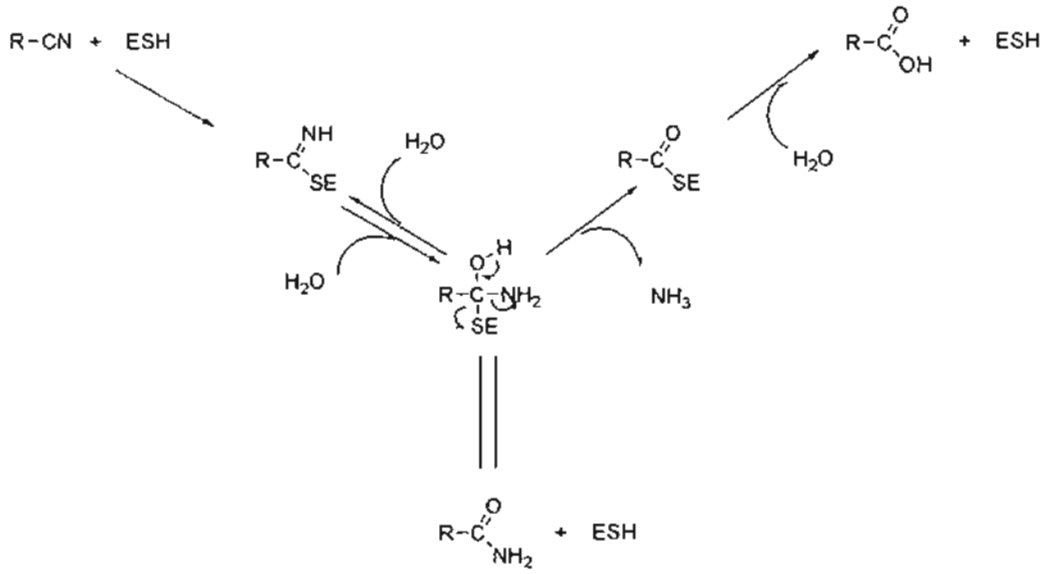


Figura 4.12. Mecanismo de la reacción catalizada por nitrilasas[69]

Sugai y colaboradores[72] señalaron que la detección de amidas durante la biotransformación de nitrilos mediante *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564 es evidencia de que la hidrólisis procede en dos pasos, la hidratación promovida por la nitrilo hidratasa y la posterior hidrólisis del intermediario por amidasa.

4.6.2. Nitrilo hidratasas

La enzimas nitrilo hidratasas (NHasas) (EC 3.5.1.4) juegan un importante papel en el proceso de utilización de los nitrilos por los microorganismos a través de hidratación para formar amidas. En las plantas cianogénicas, son responsables de la biosíntesis de la L-asparagina mediante la hidratación de la β-cianoalanina, la cual proviene de la reacción del ácido cianhídrico con la cisteína, con la participación de la β-cianoalanina sintetasa.[73] El interés en estas enzimas ha crecido desde su aplicación

[72] Matoshi, K.; Sano, A.; Imai, N.; Yamasaki, T.; Yokohama, M.; Sugai, T.; Ohta, H. *Tetrahedron:Asymmetry* **1998**, *9*, 1097.
[73] a) Blumenthal-Goldschmidt, S.; Butle, G.W., Conn, E.E. *Nature* **1963**, *197*, 718. b) Oaks, A.; Johnson, F.J. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3465.

en la producción industrial de amidas como la acrilamida y la nicotinamida mediante la hidratación de los correspondientes nitrilos.[74,75]

Por otro lado, una combinación de nitrilo hidratasa y amidasa puede transformar nitrilos alifáticos en las sales de amonio de los correspondientes ácidos carboxílicos. Entre los géneros de bacterias que poseen ambas actividades enzimáticas se encuentran *Rhodococcus, Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Bacteridium, Brevibacterium, Corynebacterium* y *Micrococcus*.[76]

Las NHasas están constituidas por dos subunidades, α y β. Son heterodímeros (con un centro metálico) y su disociación en los correspondientes monómeros implica la pérdida de la actividad. Estas enzimas contienen generalmente en su sitio activo, ya sea un átomo de hierro 3^+ no hemo (Fe-NHasas), o un átomo de cobalto 3^+ no corrinoide (Co-NHasas), dependiendo del microorganismo.[77] Una de las NHasas mejor caracterizadas proviene de *Rhodococcus* sp. N-771 y fue purificada en su forma inactiva por Nagamune y colaboradores.[78] La actividad de la NHasa de *Rhodococcus* sp. N-771 desaparece casi completamente cuando las células se incuban en forma aeróbica durante 16 horas en la oscuridad y es completamente reactivada mediante irradiación con luz.[79]

En los últimos años se han empleado NHasas silvestres y mutantes, provenientes de diversos microorganismos como biocatalizadores para la producción industrial de acrilamida en escala de kilogramos a toneladas[80] en la síntesis enantioselectiva de otras amidas[81,82] y en la biorremediación de suelos o aguas contaminados con nitrilos.[83]

---

[74] Watanabe *et al.*, U.S. pat. 5,179,014, **1993**.
[75] Nagasawa, T.; Yamada, H. *Pure and Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1241.
[76] Cowan *et al.*, *Extremophiles* **1998**, *2*, 207.
[77] Mascharak, P.K. *Coordin. Chem. Rev.* **2002**, *225*, 201.
[78] Nagamune, T.; Kurata, H.; Hirata, M.; Honda, J.; Koike, H., Keuchi, M.; Inoue, Y.; Hirata, A.; Endo, I. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168(2)*, 437.
[79] Endo, I.; Odaka, M.; Yohda, M. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 244.
[80] Yamada *et al*, U.S. pat. 4,637,982, **1987**.
[81] Padmakumar, R.; Oriel, P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77*, 671.
[82] Matoishi, K.; Sana, A.; Imai, N.; Yamazaki, T.; Yokoyama, M.; Sugai T.; Ohta, H. Tetrahedron: *Asymmetry* **1998**, *9*, 1097.
[83] Kobayashi, M.; Shimizu, S. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 733.

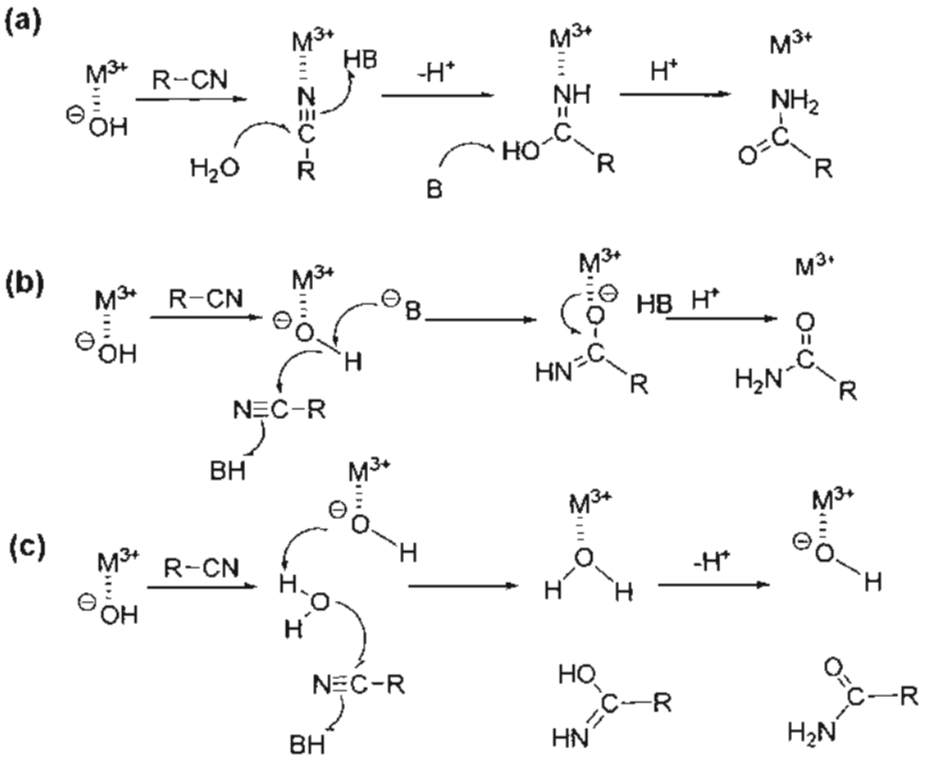


Figura 4.13. Mecanismos propuestos para la reacción de hidratación de nitrilos catalizada por NHasas.

El mecanismo de la catálisis por NHasas no ha sido demostrado. Schneider y colaboradores[84] sugieren tres posibles mecanismos de catálisis, que son ilustrados en la Figura 4.13. El papel del ión metálico de la enzima en la hidratación parece ser el de un ácido de Lewis. Los mecanismos alternativos suponen que el agua o el ión hidroxilo, coordinados al metal (Fe^{3+} o Co^{3+}), atacan al carbono del nitrilo, o que el ión metálico activa a una molécula de agua, la cual a su vez puede actuar como nucleófilo sobre el carbono del nitrilo coordinado al metal.

[84] Huang, W.; Jia, J.; Cummings, J.; Nelson, M.; Shneider, G.; Lindqvist, Y. *Structure*, **1997**, *5*, 691.

4.7. Ejemplos de biotransformación de nitrilos

4.7.1. Nitrilos Simples

En contraste con la situación de las nitrilasas y amidasas, hasta hace algunos años se ponía en duda la enantioselectividad de las reacciones catalizadas por nitrilo hidratasas. En 1997, Fallon y colaboradores[85] reportaron enantioselectividad de una actividad de nitrilo hidratasa en células íntegras de *Pseudomonas putida* NRRL-18668. La nitrilo hidratasa de *Agrobacterium tumefaciens* purificada por Bauer y colaboradores[86] produce la hidratación enantioselectiva de 2-arilpropionitrilos.

Más recientemente,[87] se ha descrito la síntesis de (*S*)-Naproxeno con un 99% de exceso enantiomérico mediante la hidrólisis enantioselectiva de arilacetonitrilos empleando células de *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497 (Figura 4.14).

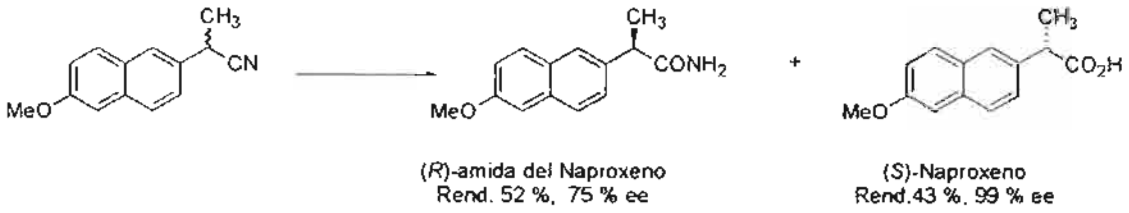


Figura 4.14. Síntesis de (*S*)-Naproxeno.[87]

Varios autores[88,89] han estudiado la hidrólisis del nitrilo del Ketoprofeno con diferentes microorganismos (Figura 4.15), obteniendo excesos enantioméricos mayores de 90 % de de la (*S*)-amida y hasta 49 % de conversión del sustrato. Al emplear la nitrilo hidratasa purificada, se encontraron valores mayores de exceso enantiomérico que al emplear las células íntegras en presencia de un inhibidor de la actividad de amidasa.

[85] Fallon, R.D.; Stieglitz, B.; Turner, I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 156.
[86] Bauer, R.; Knackmuss, H.-J.; Stolz, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 89.
[87] Wu, Z.; Li, Z. Tetrahedron: *Asymmetry* **2001**, *12(23)*, 3305.
[88] Bauer, R.; Knackmuss, H. J. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 89.
[89] Stolz, A. *et al. J. Mol. Cat B. Enzym.* **1998**, *5*, 137.

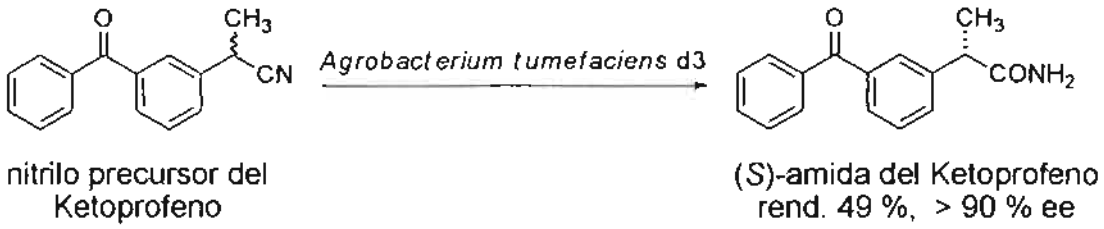


Figura 4.15. Síntesis biocatalítica del Ketoprofeno.

DiCosimo y colaboradores[90] reportaron recientemente la hidrólisis estereoespecífica de (*E,Z*)-2-metil-2-butenonitrilo, para generar el ácido (*E*)-2-metil-2-butenoico, sin conversión del isómero *Z*, empleando la actividad nitrilo hidratasa y amidasa de *Acidovorax facilis* 72W y de varias cepas de *Comamonas testosteroni* (Figura 4.16).

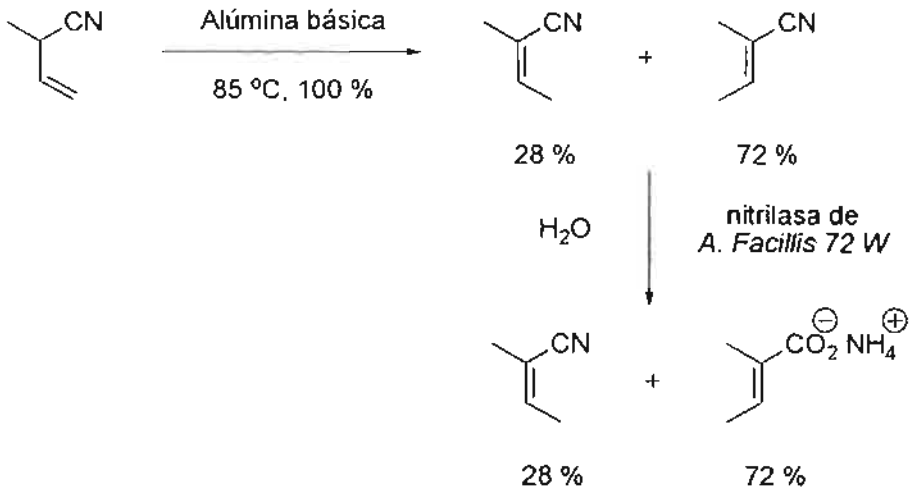


Figura 4.16. Hidrólisis estereoespecífica de (*E,Z*)-2-metil-2-butenonitrilo.

[90] DiCosimo, R.; Hann, E.C.; Sigmund, A.E.; Fager, S.K.; Cooling, F.B.; Gavagan, J.E.; Bramucci, M.G.; Chauhan, S.P. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 577.

4.7.2. Cianohidrinas

Chauhan y colaboradores[91] desarrollaron un proceso eficiente para la biotransformación de la cianohidrina de la acetona empleando la actividad nitrilasa presente en células de *Acidovorax facilis* 72W, en una relación sustrato biomasa de 1 a 7, para producir el ácido 2-hidroxiisobutírico, el cual es un intermediario útil en la manufactura del ácido metacrílico (Figura 4.17) y para la manufactura de una gran diversidad de polímeros. Aunque *Acidovorax facilis* 72W, además de la actividad nitrilasa, posee actividades de nitrilo hidratasa y amidasa, los autores describen la inactivación de la nitrilohidratasa mediante calentamiento a temperaturas de entre 35 y 70 °C, con lo que evitan la formación de la 2-hidroxi-*iso*-butiramida, un producto no deseado.

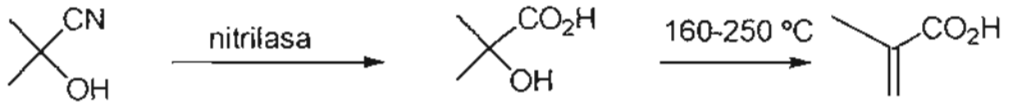


Figura 4.17. Síntesis de ácido metacrílico

En el mismo trabajo se describe la sobreexpresión de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W en *Escherichia coli* SS1001 para producir células transformadas carentes de la actividad nitrilo hidratasa.

La síntesis químico-enzimática del ácido (*R*)-2-naftilmetoxiacético ha sido reportada empleando la actividad nitrilo hidratasa de *Rhodococcus rhodochrous* sobre el acetato de la (*R*)-cianohidrina.[92]

El ácido mandélico, importante agente resolutor y materia inicial para la síntesis de cefalosporinas y penilicilinas, se obtiene a partir del mandelonitrilo. Las cianohidrinas se racemizan en medio alcalino con pérdida reversible de HCN, lo cual permite una resolución cinética dinámica, en la cual una enzima hidroliza selectivamente un enantiómero de la cianohidrina, generando el (*R*)-hidroxiácido con alto rendimiento

[91] Chauhan, S.; DiCosimo, R.; Fallon, R.; Gavagan, J.; Manzer, L. E.; Payne, M. S. U.S. pat. 6,582,943, **2003**.
[92] Kimura, M.; Kuboki, A.; Sugai T. Tetrahedron:*Asymmetry* **2002**, *13*, 1059.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

químico y alta pureza enantiomérica[93] (Figura 4.18). Se ha patentado este proceso para la síntesis de ácido (*R*)-mandélico y análogos empleando *Rhodococcus* sp. HT29-7 en medio acuoso neutro o ligeramente básico.[94]

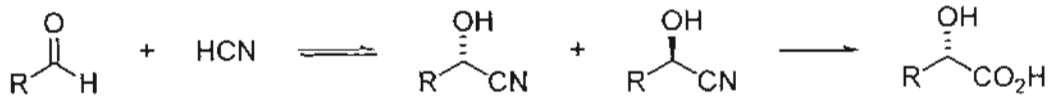


Figura 4.18. Proceso para la obtención de (*R*)-α-hidroxiácidos

Recientemente, Kaul y colaboradores[95] describieron un procedimiento de enriquecimiento de cultivos con el cual aislaron nuevas cepas bacterianas utilizables para la producción biocatalítica de ácido (*R*)-mandélico. (Figura 4.19).

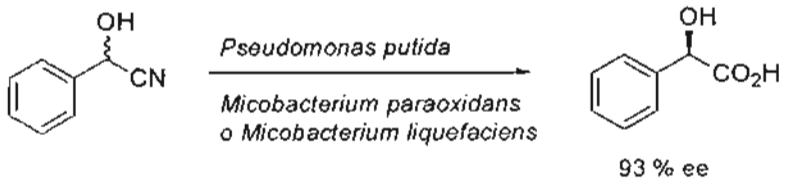


Figura 4.19. Biotransformación de mandelonitrilo racémico en ácido *(R)*-mandélico

4.7.3. Aminonitrilos

Se han reportado pocos ejemplos de biotransformaciones que utilicen la actividad nitrilasa para hidrolizar α-aminonitrilos. Las nitrilasas de *Rhodococcus rhodochrous* PA-34,[96] de *Aspergillus furmigatus*[97] y de *Acinetobacter* sp.[98] transformaron varios α-aminonitrilos alifáticos en L-aminoácidos con buenos rendimientos y excesos enantioméricos.

La biotransformación de DL-arilglicinonitrilos para producir D-arilglicinamidas y L-arilglicinas, combinando los efectos de una amidasa L-enantioselectiva y una nitrilo hidratasa de baja enantioselectividad ha sido reportada por Wegman y

[93] DeSantis *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024.
[94] Endo *et al.* U.S. pat. 5,296,373, **1994**.
[95] Kaul, P.; Banerjee, A.; Mayilrajb S.; Banerjeea, U. C. Tetrahedron:*Asymmetry* **2004**,*15*, 207.
[96] Bhalla, T. C., Miura, A.; Wakamoto, A.; Ohba, Y.; Furuhashi, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, 37, 184.
[97] Choi, S. Y.; Goo, Y. M. *Arch. Pharm. Res.* **1986**, 9, 45.
[98] Macdam, A. M.; Knowles, C. J. *Biotechnol. Lett.* **1985**, 7, 865.

colaboradores,[99] empleando células inmovilizadas de *Rhodococcus* sp. (NOVO SP 361) a bajas temperaturas (5 °C). Esta misma biotransformación (Figura 4.20) con células de *Rhodococcus* sp. AJ270 ha sido descrita por Wang y Shuang.[100,101] La D-fenilglicina es materia prima clave en la síntesis industrial de antibióticos β-lactámicos.

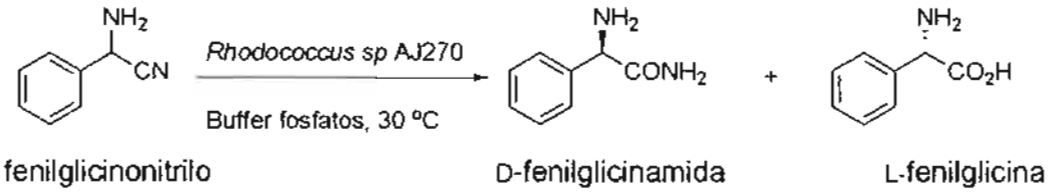


Figura 4.20. Síntesis de L-fenilglicina.

4.7.4. Nitrilos Insaturados

La producción biocatalítica a bajas temperaturas (0-15 °C) de acrilamida, empleada en grandes volúmenes en la producción de polímeros, fue patentada desde principios de los años ochenta.[102] Más recientemente,[103] se han descrito procesos biocatalíticos para la preparación de acrilamida y otras amidas empleando la actividad nitrilo hidratasa de bacterias termofílicas, como el *Bacillus* sp. BR449, estable a 60 °C. (Figura 4.21).

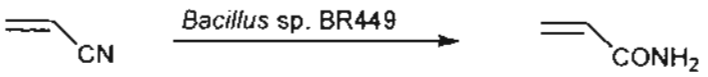


Figura 4.21. Síntesis de acrilamida empleando la actividad nitrilo hidratasa de *Bacillus* sp.

[99] Wegman, M. A.; Heinemann, U.; Stolz, A.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 318.
[100] Wang, M. X. and Shuang-Jun, L. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6925.
[101] Wang, M. X. and Shuang-Jun L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6542.
[102] Watanabe *et al.* U.S. pat. 4,248,968, **1981**.
[103] a) Takashima, Y.; Mukumoto, F.; Mitsuda, S. U.S. pat. 5,563,053, **1996**. b) Oriel *et al.*, U.S. pat. 6,242,242, **2001**. c) Almatawah, O. A.; Cowan, D. A. *Enzyme Microb. Tech.* **1999**, *25*, 718.

Recientemente, DiCosimo y colaboradores[104] describieron la invención de un proceso para la hidrólisis enzimática de acrilonitrilo y metacrilonitrilo a los ácidos correspondientes (Figura 4.22), con buen rendimiento y especificidad, empleando altas concentraciones de sustrato en medio acuoso, aprovechando la combinación de las actividades de nitrilo hidratasa y amidasa presentes en las células intactas de *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D.

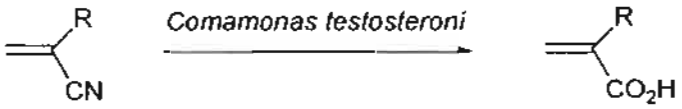


Figura 4.22. Transformación de acrilonitrilo y metacrilonitrilo en los correspondientes ácidos carboxílicos mediante la acción de nitrilo hidratasa y amidasa de *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D.

4.7.5. β-hidroxinitrilos

Es conocido que la hidrólisis química de β-hidroxinitrilos, tanto catalizada con ácidos como con bases, produce principalmente el producto de deshidratación,[105] por lo que la hidrólisis enzimática de este tipo de compuestos es una alternativa muy útil para la síntesis de β-hidroxiácidos. Bramucci y colaboradores[106] describen un proceso para la preparación del ácido 3-hidroxivalérico a partir de 3-hidroxivaleronitrilo con conversiones hasta del 100%, empleando la actividad nitrilo hidratasa y amidasa de diferentes bacterias (Figura 4.23). El ácido 3- hidroxivalérico tiene aplicación como un sustituto de la ε-caprolactona en la preparación de copolímeros ramificados.

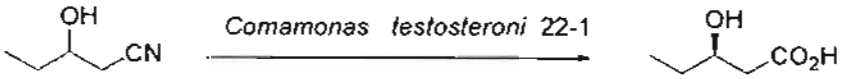


Figura 4.23. Obtención de ácido 3-hidroxivalérico.

Las cepas microbianas con actividad nitrilo hidratasa y amidasa descritas en esta patente son las siguientes: *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746); *Comamonas*

[104] DiCosimo, R.; Fallon, R.; Gavagan, J.; Manzer, L. U.S. pat. 6,670,158, 2003.
[105] Ford, J. H. *Org. Synth.*, Coll. vol. III: 34-36 (1955).
[106] Bramucci, *et al.*, U.S pat. 6,562,603, 2003.

testosteroni 22-1 (ATCC PTA-1853); *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D (ATCC 55744); *Dietzia* sp. ADL1 (ATCC PTA-1854); *Syctalidium* spp. 3LD-122P (ATCC PTA-1855); *Rhodococcus* sp. 25-1 (ATCC PTA-1856); *Pseudomonas putida* 5B-MGN-2P (NRRL-B-18668). También reportan la biotransformación empleando células microbianas con actividad nitrilasa, en las cuales las actividades nitrilo hidratasa y amidasa se han inhibido por calentamiento.

4.7.6. Dinitrilos

La hidrólisis regioselectiva de α,ω-dinitrilos a los correspondientes ácidos ω-cianocarboxílicos ha sido también reportada.[107,108] El 2-metilglutaronitrilo es ejemplo de un α,γ-dinitrilo alifático que puede ser transformado regioselectivamente en la sal de amonio del ácido 4-cianopentanoico mediante un biocatalizador (Figura 4.24). Esta transformación ha sido descrita en varias patentes[109,110] con biocatalizadores que poseen actividad de nitrilasa o una combinación de nitrilo hidratasa y amidasa. Algunas estrategias para destruir selectivamente la actividad nitrilo hidratasa no deseada de *Acidovorax facilis* 72W son el tratamiento de las células con calor (alrededor de 50 °C)[109] o inmovilización en alginato, seguida por entrecruzamiento con glutaraldehído y polietilenimina.[111]

Cuando el dinitrilo está sustituido asimétricamente en el átomo de carbono ω, la nitrilasa produce la sal de amonio del ácido ω-cianocarboxílico, con regioselectividad mayor a 98% (Figura 4.24). El ácido 4-cianopentanoico es un material inicial para la manufactura de la 1,5-dimetilpiperidona, cuyas aplicaciones industriales son múltiples.

---

[107] Gavagan *et al. J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4792.
[108] Hann, E. C.; Sigmund, A. E.; Hennessey, S. M.; Gavagan, J. E.; Short, D. R.; Chauhan, S.; Fallon, R. D.; DiCosimo, R. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 492.
[109] DiCosimo, R. *et al.* U.S. pat. 5,814,508, **1998**.
[110] DiCosimo, R. *et al.* U.S. pat. 6,066,490, **2000**.
[111] a) DiCosimo, R. *et al.*, U.S. pat 6,551,804, **2003**. b) DiCosimo, R. *et al. J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 295. c) Hann, E. C.; Sigmund, A. E.; Hennessey, S. M.; Gavagan, J.E.; Short, D. R.; Ben-Bassat, A.; Chauhan, S.; Fallon, R. D.; Payne, M. S.; DiCosimo, R *Org. Process Res. Dev* **2002**, *6*, 492.

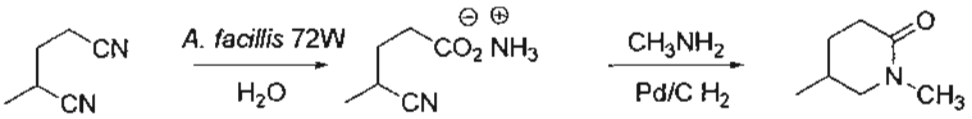


Figura 4.24. Síntesis de ácido 4-cianopentanoico, precursor químico de la 1,5-dimetilpiperidona.

4.7.7. Malonamidas

Recientemente, Wu y Li[112] describen la síntesis práctica de ácidos malonámicos α,α-disustituidos ópticamente activos (Figura 4.25), mediante la hidrólisis enantioselectiva de una variedad de malonamidas α,α-disustituidas empleando la actividad de una amidasa altamente enantioselectiva de *Rhodococus* sp. CGMCC0497, con altos rendimientos del isómero *R*, como se registra en la Tabla 4.2. Los productos obtenidos pueden ser posteriormente transformados en aminoácidos α,α-disustituidos enantioméricamente puros.

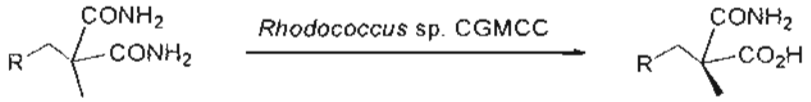


Figura 4.25. Asimetrización de ácidos malonámicos α,α-disustituidos.

Tabla 4.2. Hidrólisis enantioselectiva de algunas α-metilmalonamidas α-sustituidas con *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497.[109]

R	T (°C)	Rendimiento (%)	ee (%)
C_6H_5	30	94	97
C_6H_5	20	94	97
o-ClC_6H_4	30	94	97
m-ClC_6H_4	30	94	95
p-ClC_6H_4	30	94	>99
$C_6H_5CH_2$	20	92	>99
C_3H_7	30	94	81

[112] Wu, Zhong-Liu y Li, Zu-Yi. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2479.

4.7.8. Cianoésteres

Para la preparación de monoésteres de ácidos carboxílicos a partir de los correspondientes cianoésteres, Chauhan[113] reportó la aplicación de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72 W (Figura 4.26).

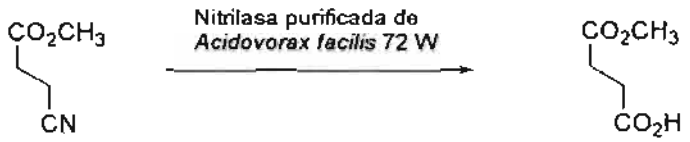


Figura 4.26. Síntesis del hemisuccinato de metilo

[113] Chauhan *et al.*, U.S. pat 6,455,730, 2002.

5. PARTE EXPERIMENTAL

El seguimiento de las biotransformaciones se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un equipo Waters 600E, con integrador 746 y detector de UV 486, con una columna Symmetry C_{18} 3.5 μm de 4.6 x 75 mm. Los cultivos bacteriológicos se realizaron en un agitador orbital marca Forma Scientific; para el aislamiento de la biomasa, se empleó una centrífuga Beckman Avanti J-25-I; para la ruptura de las células se empleó un aparato de ultrasonido Ultrasonic Processor modelo CV 26; la amplificación del DNA se realizó en aparato termociclador MJ Research modelo PTC-200. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Johns IL 684 y no están corregidos. Las rotaciones específicas fueron determinadas en un polarímetro Perkin-Ermer 341, utilizando una celda de 1 dm de longitud; para la medición se utilizó la linea D del sodio (589 nm) a la temperatura del compartimiento de muestra del aparato (aprox. 20 °C). Las rotaciones específicas se informan junto con el disolvente empleado en la determinación, así como la concentración de muestra en g/100 mL. Los excesos enantioméricos (ee) fueron determinados por HPLC en una columna quiral CHIRALCEL OD. Los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C se obtuvieron en espectrómetros JEOL Eclipse+40 a 400 MHz, Varian Gemini 400 MHz y Bruker a 300 MHz. Se utilizaron como disolventes $CDCl_3$, DMSO-d_6 y D_2O; TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm a partir del TMS. Para indicar la multiplicidad de las señales en RMN ^{1}H, se utilizan las abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (t) triple, (c) cuádruple, (q) quíntuple, (sept) séptuple, (m) múltiple. Las señales complejas se indican utilizando dos o más de estas abreviaturas. Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrofotómetro Perkin Elmer Paragon 1000.

El seguimiento de las reacciones químicas se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF), empleando placas de gel de sílice sobre aluminio ALUGRAM® SIL G/V_{254}.

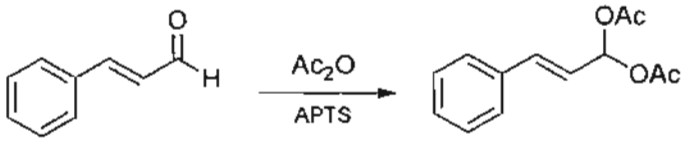
Las células se cosecharon en una centrífuga Beckman-Coulter modelo J25 con un rotor JLA-10.500.

Las materias primas empleadas para síntesis fueron adquiridas de Aldrich Chemical Co., de grado analítico. Los disolventes para reacciones químicas fueron adquiridos en Organización Alvi, S.A. de C.V., y fueron destilados antes de usarlos. Los reactivos para PCR fueron grado biología molecular, adquiridos de Stratagene. Los disolventes para HPLC fueron adquiridos de Tecsiquim, S. A. de C. V.

El medio mínimo salino sólido 1 (MMSS-1) tuvo la siguiente composición por litro: 0.3 g de KH_2PO_4; 0.7 g de K_2HPO_4; 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01 g de $FeSO_4$; 10 g de glucosa, 1 mL de una mezcla 1:1 de valeronitrilo-benzonitrilo y 15 g de agar. El medio mínimo salino sólido 2 (MMSS-2) tuvo la siguiente composición por litro: 0.3 g de KH_2PO_4; 0.7 g de K_2HPO_4; 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01 g de $FeSO_4$; 1 mL de una mezcla 1:1 de valeronitrilo/benzonitrilo y 15 g de agar. El medio mínimo salino líquido (MMSL) tuvo la siguiente composición por litro: 0.3 g de KH_2PO_4; 0.7 g de K_2HPO_4; 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01 g de $FeSO_4$ y 1.01 g de benzonitrilo. El medio nutritivo líquido Luria Bertrani (LB) fue preparado con 10 g L^{-1} de hidrolizado de caseína, 5 g L^{-1} de extracto de levadura, 9 g L^{-1} de cloruro de sodio y 1 g L^{-1} de Na_2HPO_4. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C durante 20 min y la adición de los nitrilos se realizó a 45 °C, después de la esterilización.

La solución amortiguadora de pH 7.7 para sonicación se preparó empleando la siguiente composición: 7.4 g/L de EDTA, 11.18 g L^{-1} de KCl y 12.11 g L^{-1} de TRIS, ajustado a pH 7.7. La solución amortiguadora de RNAsa de pH 8.0 contenía 1 unidad/mL de RNAsa en solución de TRIS 10 mM. La solución Ringer se preparó con 8.6 g L^{-1} de NaCl, 0.3 g L^{-1} de KCl, 0.33 g L^{-1} de $CaCl_2$.

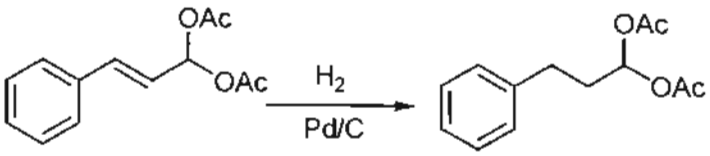
5.1. Síntesis química



2 **9**

Diacetato de cinamaldehído (9). En un matraz de tres bocas de 500 mL, equipado con agitación mecánica, embudo de adición y termómetro, se disolvieron 40 g (303 mmoles) de cinamaldehído comercial y 200 mg (1.05 mmoles) de ácido *p*-toluensulfónico (APTS); se ajustó la temperatura a 35 °C y se adicionaron 30 mL (317 mmoles) de anhídrido acético durante 25 min, manteniendo la temperatura entre 35 y 45 °C. Terminada la adición se mantuvo a 35 °C durante 6 horas y a temperatura ambiente durante 16 horas; se adicionaron 40 mL de hexano y se agitó entre - 5 y 1 °C durante 1 hora, se filtró, se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo 7:3 (3 X 20 ml) y se secó a temperatura ambiente hasta peso constante, con lo que se obtuvieron 55.71 g (79.6 %) del diacetato de cinamaldehído (**9**) con punto de fusión de 97-84 °C (Lit.[114] 84-86 °C).

^{1}H RMN: ($CDCl_3$, 400 MHz) (δ): 2.14 (s, 6H), 6.20 (dd, 1H, *J* = 14.4/6.4 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* =16 Hz), 7.25-7.42 (m, 6H).



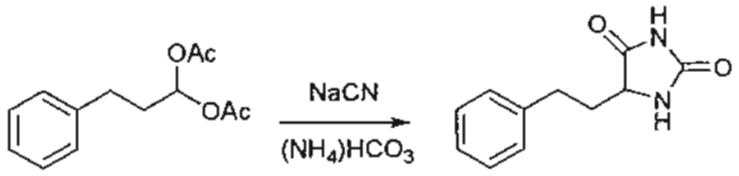
9 **3**

Diacetato de hidrocinamaldehído (3). En una botella de hidrogenación de 500 mL se disolvieron 45 g (192.3 mmoles) del diacetato de cinamaldehído (**9**) en 90 mL de

[114] Kochhar, K. S.; Bal, B. S.; Deshpande, R. P.; Rajadhyaksha, S. N.; Pinnick, H. W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1765.

acetato de etilo y 480 mg de Pd/C al 10 %. Se hidrogenó a 4 kg/cm^2 hasta reacción completa, verificando el fin de la reacción por CCF; sistema hexano-metil terbutil éter 95:5. Se filtró el catalizador y el filtrado se evaporó hasta sequedad en rotavapor; el residuo se destiló a presión reducida, colectando la fracción de punto de ebullición de 100-115 °C a 0.005 mm Hg. (Lit.[114] 185-190/0.7 mm Hg) 41.7 g (91.9 %).

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) (δ): 2.06 (s, 6H), 2.08-2.13 (m, 2H), 2.69-2-73 (m, 2H), 6.83 (t, 1H, *J* = 9.2), 7.17-7.30 (m, 5H).



3 **11**

5-Feniletilhidantoína (11). Se taró una probeta de 500 mL con 320 mL de hidróxido de amonio al 13.48 % y se pasó una corriente de CO_2 a una temperatura entre 0 y 5 °C hasta que el peso se incrementó en 27.9 g. Esta solución se adicionó a un reactor de acero inoxidable que contenía 100 g del diacetato de hidrocinamaldehído (**3**) disueltos con 100 mL de metanol. El reactor se cerró y se calentó con agitación magnética durante 2 horas entre 80 y 82 °C. Se transfirió la mezcla de reacción a un matraz de 3 bocas con agitación mecánica y se destiló a presión atmosférica, colectando aproximadamente 210 mL de destilado. El residuo se enfrió a 25 °C y se ajustó el pH a 4.0 con ácido clorhídrico 10 N. La suspensión se enfrió entre 0 y 5 °C durante 1 hora, el sólido se filtró, se lavó con agua y se secó a 60 °C hasta peso constante. Se obtuvieron 63.07 g (73.3 %) de la 5-feniletilhidantoína (**11**) p.f. 159-161 °C (lit.[115] 163-165 °C).

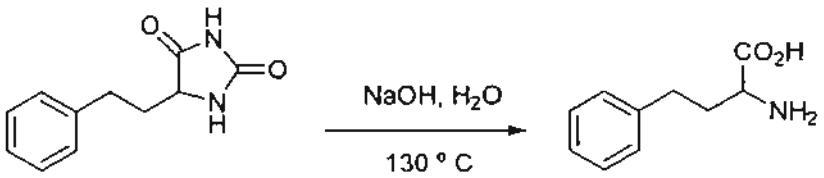
RMN ^{1}H (DMSO-*d6*, 300 MHz) (δ): 1.89-2.12 (m, 2H), 2.73 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz), 3.32 (s, 1H), 4.10 (dd, 1H, *J* = 4.68, 7.21 Hz), 7.16-7.32 (m, 5H).

RMN ^{13}C (DMSO-*d6*, 75 MHz) (δ): 30.87, 33.80, 58.20, 126.24, 128.48, 128.56, 141.02, 158.97, 177.09.

[115] Iwasaki, G.; Kimura, R.; Numao, N.; Kondo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37(2)*, 280.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

IR ν_{max} (KBr), (cm^{-1}) 3287, 3168, 3027, 2939, 1778, 1716.



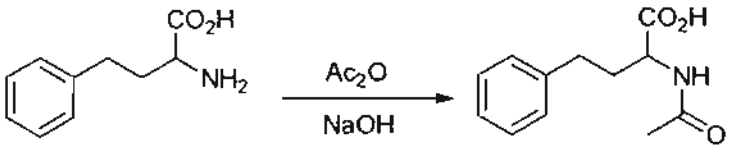
11 **12**

DL-homofenilalanina (12). En un reactor de acero inoxidable de 1L se cargaron 81.73 g (0.402 mol) de 5-feniletilhidantoína (**11**), 400 mL de agua y 48.31 g (1.207 mol) de hidróxido de sodio. La mezcla se calentó con agitación a 130-132 °C durante 4 horas. Se verificó la terminación de la reacción por CCF, sistema butanol-ácido acético-agua (60:20:20). La mezcla de reacción se transfirió a un matraz redondo de 2 L, se adicionó 1 g de carbón activado y se calentó a ebullición durante 5 minutos; se filtró sobre celita y se lavó con agua. Se ajustó el pH a 6.31 con ácido clorhídrico concentrado, se enfrió entre 0 y 5 °C durante una hora, se filtró, se lavó con agua y se secó a 60 °C con vacío hasta peso constante. Se obtuvieron 53.63 g (74.33%) de DL-homofenilalanina (**12**) con p.f. 279-280 °C (lit.[116] 280-282 °C).

RMN ^{1}**H** (D_2O, 300 MHz) (δ): 1.93-2.15 (m, 2H), 2.50-2.67 (m, 2H), 3.89 (t, 1H, J = 6.34 Hz), 7.11-7 19 (m, 5H).

RMN ^{13}**C** (D_2O, 75 MHz) (δ): 30.58, 31.72, 52.57, 126.90, 128.75, 129.08, 140.26, 171.99.

IR ν_{max} (Nujol), (cm^{-1}) 1578, 1518, 1455, 1407, 742, 694, 491.



12 **4**

DL-*N*-acetil-homofenilalanina (4). En un matraz de tres bocas de 500 mL provisto de agitación mecánica, se adicionaron 12.5 g (69.7 mmol) de la DL-homofenilalanina (**12**), 115 mL de agua y 2.79 g (69.7 mmol) de hidróxido de sodio. La mezcla de

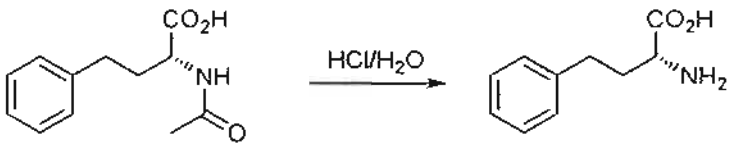
[116] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 294357.

reacción se enfrió a 0-10 °C y se adicionaron 9.26 g (90.6 mmol) de anhídrido acético manteniendo el pH entre 11-12 con hidróxido de sodio al 50% y la temperatura por debajo de 10 °C. Se mantuvo a la misma temperatura durante 1h más, verificando la terminación de la reacción por CCF (isopropanol-hidróxido de amonio 70:30). El pH de la reacción se ajustó a 2 con ácido clorhídrico 10 N, se enfrió a 0-5 °C durante una hora, se filtró y se lavó con la mínima cantidad de agua para obtener 13.8 g (89.5%) de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**), con p.f. 145-147 °C (lit.[117] 147-148°C).

RMN ^{1}**H** (DMSO-*d6*, 300 MHz) (δ): 1.91-2.20 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 4.35 (dd, 1H, *J* = 4.69, 9.19 Hz,), 7.15-7.31 (m, 5H).

RMN ^{13}**C** (DMSO-*d6*, 75 MHz) (δ): 21.33, 32.11, 33.50, 52.29, 126.14, 128.49, 128.49, 141.23, 172.44, 174.46.

IR ν_{max} (KBr), (cm^{-1}): 3336, 1911, 1696, 1612, 1551, 1122, 974, 698.



6 1

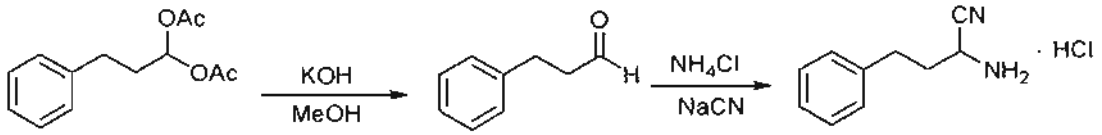
D-homofenilalanina (1). Una suspensión de 396 mg (1.79 mmoles) de D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) en 10 mL de ácido clorhídrico 1 N se calentó a reflujo durante tres horas, verificando la completa hidrólisis mediante CCF (acetato de etilo-ácido acético 99:1). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 6.4 con hidróxido de sodio al 50%, se enfrió a 0 – 5 °C durante 1 hora y se filtró el sólido blanco precipitado, el cual se lavó con agua y se secó a 60 °C hasta peso constante. Se obtuvieron 248 mg (77.4%) del producto blanco, identificado por medio de su rotación específica: $[\alpha]_D^{25}$ = - 45.4° (c=1, HCl 3 N) [Lit.[118] $[\alpha]_D^{25}$ = - 45.0° (1, HCl 3 N)].

RMN ^{1}**H** (D_2O/NaOD, 400 MHz) (δ): 1.69-1.85 (m, 2H), 2.54 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 3.15 (t, 1H, *J* = 6 Hz).

RMN ^{13}**C** (D_2O/NaOD, 100.6 MHz) (δ): 31.78, 37.19, 56.02, 126.12, 128.56, 128.73, 141.23, 142.35, 183.20.

IR ν_{max} (KBr), (cm^{-1}): 3435, 3022, 2927, 2600, 1583, 1515, 1408.

[117] Andraco, J.; Smith, D.; Hartung, W. H. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 337.
[118] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 294365.



3 10 5

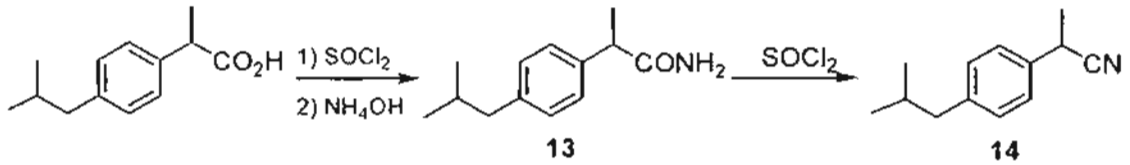
Clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (5). Se disolvieron 22 g (93.18 mmoles) del diacetato de hidrocinamaldehído (**3**) en 25 mL de metanol, se enfrió entre 0 y 5 °C y se adicionaron 99.7 mL de una solución 0.93 N de hidróxido de potasio en metanol durante 30 minutos, manteniendo la temperatura entre 0 y 3 °C. Al finalizar la adición se verificó la terminación de la reacción por CCF (hexano-metil terbutil éter 95:5), observando completa hidrólisis, por lo que se concentró hasta sequedad en rotavapor, el residuo se suspendió en 40 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (2 X 20 mL). Los extractos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron al vacío en rotavapor hasta eliminación completa del disolvente. Se comparó por CCF (hexano-AcOEt 7:3) con una muestra de hidrocinamaldehído (Aldrich) y se observó una sola mancha, sin contaminación de 3-fenil-1-propananol. Se obtuvieron 11.5 g de hidrocinamaldehído (**10**) como un líquido incoloro, con n_D^{20}= 1.5240 (lit.[119] 1.5230). Este compuesto, sin purificar, se adicionó lentamente sobre una solución fría preparada a partir de 11.6 mL de hidróxido de amonio al 28 % en 18.6 mL de agua, 1.68 g (34.27 mmoles) de cianuro de sodio y 3.07 g (57.39 mmoles) de cloruro de amonio, manteniendo la temperatura interna entre 0 y 5 °C. Después de la adición, se dejó subir la temperatura hasta ambiente y se agitó durante 3 horas. Se extrajo con éter (3 X 10 mL), y la fase orgánica se extrajo con ácido clorhídrico 3 N (3 X 5 mL), se mezclaron los extractos ácidos y se lavaron con 10 mL de éter, se concentró la solución acuosa hasta sequedad en rotavapor, se adicionaron 20 mL de isopropanol al residuo y se concentró nuevamente. Se repitió la adición y destilación de isopropanol, obteniendo 7.63 g de un sólido casi blanco que se suspendió en acetato de etilo, se filtró, se secó a 40 °C hasta peso constante,

[119] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 393193.

obteniendo 5.35 g (31.8 %) del clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**).

^{1}**H RMN** (D_2O, 400 MHz) (δ): 2.31-2.32 (m, 2H), 2.82-2.96 (m, 2H), 4.41-4.45 (m, 1H), 7.31-7.39 (m, 5H).

^{13}**C RMN** (D_2O, 100 MHz) (δ): 30.75, 32.00, 41.29, 115.86, 127.19, 128.76, 129.19, 139.15.



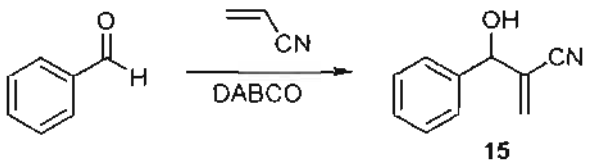
DL-2-(4-isobutilfenil)propionitrilo) (14). En un matraz de 250 mL, equipado con refrigerante y trampa con hidróxido de sodio al 20 % para la absorción de gases ácidos, se colocaron 43.74 g (212 mmoles) de DL-Ibuprofeno y 19.33 mL (271 mmoles) de cloruro de tionilo; la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se calentó a temperatura de reflujo por dos horas; se dejó a 25 °C durante 16 horas. El exceso de cloruro de tionilo se destiló a presión reducida y el residuo líquido se adicionó lentamente y con agitación mecánica sobre una mezcla de 120 mL de hidróxido de amonio al 28 % y 100 g de hielo. Esta mezcla se agitó durante media hora a una temperatura de 0 a 5 °C, se filtró, se lavó con agua (2 X 30 mL) y se secó a 60 °C hasta peso constante, con lo que se obtuvieron 37.49 g (86.12%) de DL-2-(4-isobutilfenil)propionamida (**13**), con punto de fusión 112-114 °C (Lit.[120] 107-109 °C).

En un matraz de 250 mL, equipado con refrigerante y trampa para gases, se suspendieron 20.5 g de **13** en 30 mL de tolueno, se adicionaron 10.6 mL (150 mmoles) de cloruro de tionilo y se calentó a reflujo durante 1 hora (CCF; hexano-acetato de etilo 70:30). Se adicionaron 50 mL de agua, se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con 20 mL de solución de bicarbonato de sodio al 5 %, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor. El residuo se destiló a presión reducida, colectando como fracción principal 15 g (80.2 %) de un líquido con

[120] Snell, D.; Colby, J. *Enzyme Microb. Tech.* **1999**, *24*, 160.

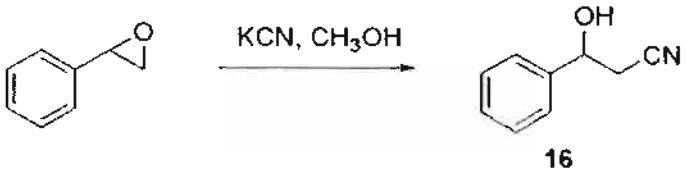
p. eb. 98-100 °C / 0.5 mm Hg. (Lit.[121] 85-90 °C / 0.15 mm Hg) que corresponde a (**14**).

^{1}H RMN: ($CDCl_3$, 400 MHz) (δ): 0.89 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz), 1.84 (sept, 1H, *J* = 6.4 Hz), 2.47 (d, 3H, *J* = 8.0 Hz), 3.82 (c, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (d, 2H *J* = 8.0 Hz).



3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropionitrilo (15).[122] A una solución de 10 g (94.3 mmoles) de benzaldehído y 15 g (283 mmoles) de acrilonitrilo en 100 mL de metanol, se adicionaron 10 g (89.15 mmoles) de 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano (DABCO) disueltos en 28 mL de agua. La solución se dejó a temperatura ambiente durante 66 horas, se concentró hasta sequedad en el rotavapor, se adicionaron 25 mL de agua, y se extrajo con acetato de etilo (3 X 15 mL). La fase orgánica se lavó con solución al 20 % de bisulfito de sodio (3 X 10 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor. El residuo líquido amarillo claro (14.86 g) se destiló a presión reducida, obteniendo 8.33 g (56 %) de la fracción que destiló a 120-125 °C / 1 mm Hg, (Lit.[123] 110 °C / 0.95 mm Hg) como un líquido incoloro y corresponde a (**15**).

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) (δ): 3.04 (b, 1H), 5.22 (s, 1H), 6.01 (d, 2H, *J* = 29.6 Hz), 7.39-7.33 (m, 5H).
^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) (δ) : 73.87, 116.85, 125.85, 126.22, 128.58, 129.65, 138.79.



[121] Hiyama, T.; Inove, M.; Saito, K. *Synthesis* **1986**, 645.
[122] Cai, J.; Zhou, Z.; Zhao, G.; Tang, C. *Org. Lett.* **2002**, *4*(26), 4723.
[123] Imagawa, T. *Synthetic Commun.* **1984**, *14*(13), 1267.

3-Hidroxi-3-fenilpropanonitrilo (16). Se disolvieron 24.42 g (375.3 mmoles) de KCN en 90 mL de agua, se agregaron 200 mL de metanol y, enfriando a 0 °C, se adicionaron 9.12 g (76.05 mmoles) de óxido de estireno. La mezcla se agitó entre -5 y 0 °C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 16 horas, verificando la terminación de la reacción por CCF (hexano-AcOEt 9:1). Se adicionaron 22.5 mL de ácido acético, se concentró al vacío hasta un volumen de 80 mL y se extrajo con AcOEt (3 X 15 mL). El extracto orgánico se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró hasta sequedad y el residuo se fraccionó a presión reducida, colectando la fracción que destiló a 106-108 °C / 0.050 mm Hg (Lit.[124] 120 - 125 °C / 0.1 mm Hg).

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) (δ): 2.73 (d, 2H, *J* = 6.21 Hz), 3.0-3.4 (b, 1H), 4.95-5.01 (m, 1H), 7.28-7.43 (m, 5H).

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) (δ): 28.01, 69.99, 117.64, 125.27, 128.84, 141.24.

[124] Reetz, M. T *Chem. Ber.* **1985**, *118*(4), 1421.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

5.2. Parte biocatalítica

5.2.1. Polvos acetónicos de riñón de mamífero

5.2.1.1. Procedimiento general para la preparación de polvos acetónicos de riñón de mamíferos. Los riñones del mamífero recién sacrificado se transportaron en hielo al laboratorio, se cortaron en trozos pequeños eliminando el tejido adiposo, se licuaron con acetona fría, empleando una relación de 3 mL de acetona por cada gramo de tejido de riñón y la suspensión se filtró al vacío. El proceso de licuado y filtración se repitió dos veces más, y el polvo acetónico resultante se secó extendiéndolo sobre un papel bajo la campana. Una vez libre de acetona, cada uno de los polvos acetónicos se tamizó a través de un tamiz de 20 mallas y se guardó en frascos herméticos a - 20 °C, obteniéndose entre 15 y 18 % del polvo acetónico de color café claro.

5.2.1.2. Resolución enzimática de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina. Se disolvieron 5 g de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) en 125 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 7.5, con 10 mg/L de cloruro de cobalto; se ajustó nuevamente el pH a 7.5 con hidróxido de sodio 6 M y se dividió en 5 fracciones de 20 mL cada una en matraces Erlenmeyer de 125 mL. A cada matraz se adicionaron 250 mg de polvos acetónicos de riñón de una de las especies estudiadas (ovino, porcino, perro, rata y bovino), y los matraces se incubaron con agitación orbital a 250 rpm, 37 °C. A las 24 horas, los matraces correspondientes a los polvos acetónicos de ovino, porcino y bovino mostraron un considerable incremento en turbidez. Los matraces con los polvos de perro y rata se mantuvieron durante un total de 90 horas, mostrando sólo la turbidez original. Cada una de las mezclas de resolución fue sometida al siguiente protocolo:

La mezcla se enfrió en baño de hielo, se ajustó el pH entre 11 y 11.5 con hidróxido de sodio 6 M y se centrifugó a 5000 rpm. Se ajustó el pH del sobrenadante entre 6.3 y 6.4 con ácido clorhídrico 10 M; el precipitado se filtró y el filtrado se conservó para el aislamiento de la D-*N*-acetil-homofenilalanina.

El sólido crudo se disolvió con 25 mL de solución 1 M de ácido clorhídrico, se decoloró con carbón activado y la solución se filtró sobre celita, se ajustó el pH entre 6.3 y 6.4 con hidróxido de sodio 6 M y se enfrió a 0 – 5 °C durante 1 hora. El producto sólido se filtro y se secó a 60 °C hasta peso constante.

Los rendimientos obtenidos y las rotaciones específicas registradas para la L-homofenilalanina obtenida en cada experimento se muestran en la Tabla 6.1. Los excesos enantioméricos, que se presentan en la misma Tabla, fueron determinados mediante el análisis por HPLC de los correspondientes ésteres metílicos en una columna quiral.

A partir del filtrado reservado previamente en cada ensayo, se aisló la D-*N*-acetil-homofenilalanina de la siguiente manera: Se ajustó el pH del filtrado a 2.0-2.3 con ácido clorhídrico 10 M, se enfrió entre 0 y 5 °C durante 2 horas, se filtró y se lavó con agua fría; se secó hasta peso constante a 60 °C y se recristalizó de acetato de etilo. En la Tabla 6.2 se reportan los rendimientos y rotaciones especificas para la D-*N*-acetil-homofenilalanina obtenida en cada experimento. Los excesos enantioméricos se determinaron sobre el éster metílico (**18**) correspondiente.

5.2.1.3. Derivatización y análisis cromatográfico de los productos de la resolución enzimática.

Ester metílico de la L-homofenilalanina (17). Se suspendieron 300 mg (1.67 mmoles) de la L-homofenilalanina (**7**) obtenida en cada uno de los experimentos de resolución con PAR de bovino, ovino y porcino en 6 mL de metanol anhidro, se enfrió en baño de hielo y se adicionaron, gota a gota, 156 microlitros (2.18 mmoles) de cloruro de tionilo. Se mantuvo en baño frío durante una hora más y luego a temperatura ambiente por seis horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el sólido obtenido se disolvió con la mínima cantidad de agua fria, se alcalinizó con bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 X 5 mL). La solución se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El éster

(**17**) se analizó por HPLC quiral en una columna CHIRACEL OD empleando, como fase móvil, una mezcla hexano-isopropanol 90:10; λ = 210 nm.; flujo: 1 mL/min. El tiempo de retención (tr) para el compuesto **17** fue de 9.35 min y para el isómero D fue de 14.10 min. Los resultados de este análisis, expresados como excesos enantioméricos (ee) de **17**, se muestran en la Tabla 6.1.

Ester metílico de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (18). La D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) obtenida en cada uno de los experimentos de resolución con PAR de bovino, ovino y porcino se trató con el mismo método descrito en el apartado anterior y se analizó por HPLC quiral en una columna CHIRACEL OD, empleando como fase móvil hexano-isopropanol 90:10; con λ = 210 nm y flujo de 1 mL/min.

Los tiempos de retención registrados fueron los siguientes: para el éster metílico de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**18**), tr = 12.5 min; para el éster metílico de la L-*N*-acetil-homofenilalanina, tr = 14.8 min. Los resultados de este análisis, expresados como ee de **18**, se muestran en la Tabla 6.2.

5.2.1.4. Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en el polvo acetónico de riñón de bovino. Se suspendieron 800 mg de polvo acetónico de riñón de bovino en 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 7.5 y la suspensión se sonicó en un baño de hielo con 30 % de amplitud (8 pulsos de 20 s). El sonicado se centrifugó a 27216 × g durante 30 minutos a 4 °C y se determinó la concentración de proteínas totales del sobrenadante (extracto enzimático) por el método del ácido bicinconínico.[125]

Se prepararon 25 mL de una solución 200 mM de *N*–acetil–DL–homofenilalanina (**4**) en solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 7.5, con 10 mg/L de $CoCl_2$ y se prepararon diluciones de las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100, 125,

[125] Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76; Erratum in: *Anal. Biochem.* **1987** *163*, 279.

150, 175 mM. De cada dilución se prepararon 6 tubos con 200 µL de la solución y se enfriaron en un baño de hielo; a cada tubo se le adicionaron 200 µL del extracto enzimático, se mezclaron y se incubaron a 30 °C con agitación orbital (200 rpm). Cada hora (hasta la hora 6) se tomó un tubo de cada dilución y se trató de la siguiente manera: se le adicionaron 200 µL de ácido tricloroacético al 50 %, se centrifugó a 27216 × g durante 10 minutos a 4 °C, se pasaron 350 µL del sobrenadante a un tubo limpio y se le adicionaron 750 µL de reactivo de ninhidrina, se incubó a 82 °C durante 5 minutos, se enfrió a 4 °C, y se leyó la absorbancia a 507 nm.

Los valores de absorbancia se transformaron en unidades de concentración de L–homofenilalanina por interpolación en una curva estándar y se graficaron contra el tiempo en horas. Se determinó, por regresión lineal, las velocidades iniciales de cada dilución, como se muestra en la gráfica 6.1. A partir de estos datos se calculó la actividad específica de la aminoacilasa contenida en el polvo acetónico de riñón de bovino.

5.2.2. Microorganismos degradantes de nitrilos

Este estudio se realizó sobre un total de 19 muestras de suelo obtenidas de los estados de México, Hidalgo, Morelos y Veracruz, así como dos muestras de agua termal del poblado de Atotonilco el Grande, Hgo. La localización de los sitios de muestreo y las características del suelo se describen en la Figura 5.1 y la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Descripción de la ubicación de los sitios de recolección de muestras de suelo para la búsqueda de microorganismos transformantes de nitrilos.

Muestra	*Región*	*Criterios*	*Ubicación*	*Coordenadas*	*Altura m*
1 a 8	1	a	Diferentes puntos de la carretera Pachuca-Atotonilco, Hgo.	nd	nd
9	2	c	Atotonilco el grande, Hgo. (aguas termales)	nd	nd
10 y 11	3	c	Desagüe industrial Tlalnepantla, Edo. Mex.	nd	nd
12	4	a	Coatepec, Ver.	nd	nd
13	5	b	Amecameca, Mex.	19°12'04 N 098°49'06 W	2400
14	5	b	Amecameca, Mex.	19°12'04 N 098°49'06 W	2400
15	6	b	Ozumba, Mex.	19°02'17 N 098°47'16 W	2360
16	7	c	Oaxtepec, Mor.	18°54'18 N 098°59'22 W	1287
17	8	c	Jiutepec, Mor.	18° 52'41'' N 099° 11'00'' W	1360
18	8	c	Jiutepec, Mor. (mina de tezontle)	18° 52'61'' N 099° 11'09'' W	1378
19	9	c	Bosque alto carretera federal Mex.-Cuernavaca, Mor.	19°05'25 N 099°13'01 W	3003

a) suelos agrícolas de bajo contenido de nitrógeno
b) suelos cercanos a árboles de la familia *Rosacea*
c) muestreo aleatorio
nd = no determinada

Mapa de Recolección de Muestras de Suelo

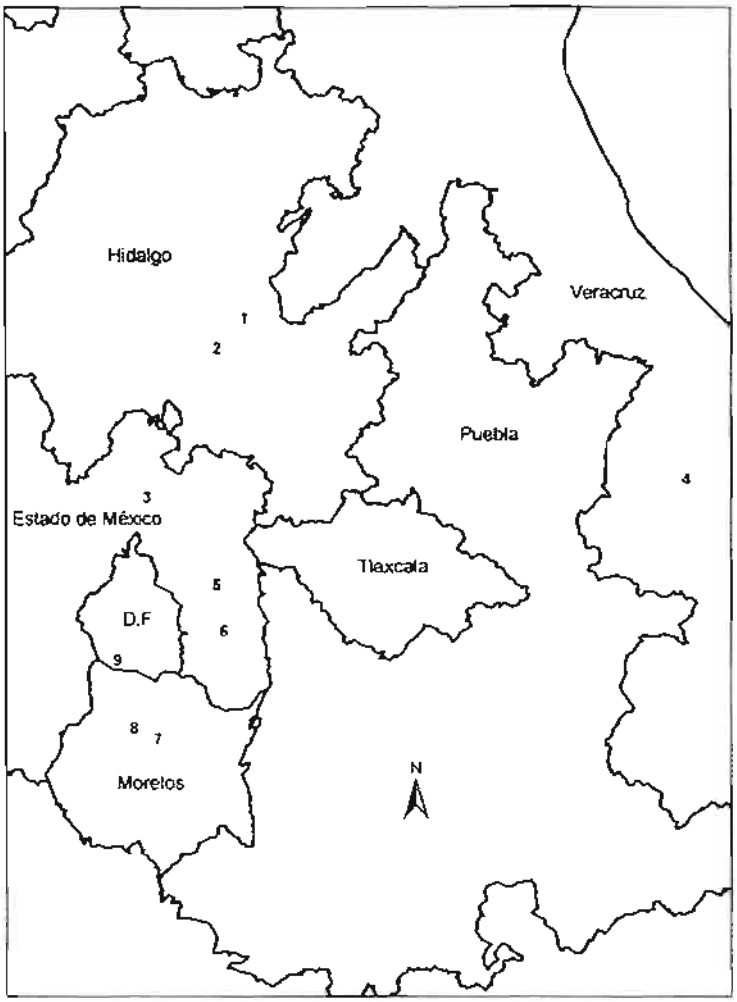


Figura 5.1. Regiones de muestreo de suelos

5.2.2.1. Aislamiento de microorganismos degradantes de nitrilos.

Procedimiento A. Se suspendieron 5 g de cada muestra de suelo (ver Tabla 5.1) en 90 mL de solución Ringer diluida 1:4, se agitó 5 minutos sobre Vortex y se dejó sedimentar. Se tomó una alícuota de 200 μL del sobrenadante y se inoculó en cajas Petri con MMSS-1. Las cajas se incubaron a temperatura de 28 °C, encontrando crecimiento en todas las muestras en períodos de 24 a 48 horas.

Procedimiento B. Se suspendieron 5 g de cada muestra de suelo (Tabla 5.1) en 90 mL de solución Ringer diluida 1:4, se agitó 5 minutos sobre Vortex y se dejó sedimentar. Se tomó una alícuota de 200 μL del sobrenadante y se inoculó en MMSS-2. Se mantuvieron a temperatura de 28 °C en periodos de 3 a 7 días, descartando las muestras que no mostraron crecimiento a los 7 días.

Se observó crecimiento en las muestras 10, 11, 12, 13, 14 y 17 y se realizaron resiembras consecutivas de estos microorganismos en el medio anteriormente descrito, hasta obtener colonias aisladas.

5.2.2.2. Selección de los microorganismos capaces de emplear benzonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno.

Se sembró una colonia de cada una de las muestras anteriores en 25 mL del MMSL, al que se adicionaron 25 μL de benzonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno, y se incubaron en periodos de hasta 7 días, observando crecimiento, desde las 48 h, únicamente en la muestra 17. La cepa de la muestra 17, nombrada V51B, fue conservada en tubos de glicerol al 50% a – 22 °C para su posterior identificación y estudio.

5.2.2.3. Extracción de ADN de *R. pyridinivorans* V51B. Se creció la cepa V51B en 10 mL de medio líquido LB durante 18 horas a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm, se centrifugó a 18592 × g y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 200 μL de solución amortiguadora de TRIS 10 mM y EDTA 0.2 mM de pH 8.0 (solución amortiguadora TE), se adicionó 1 mg de lisozima y se incubó a 37 °C durante una hora, se agregaron 50 μL de dodecilsulfato de sodio al 10%, se mezcló suavemente por inversión y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 25 μL de solución de cloruro de sodio 5 M, se mezcló suavemente por inversión y luego se adicionaron 25 μL de una solución al

10% de bromuro de cetiltrimetilalmonio en NaCl 0.7M; se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 65 °C durante 15 minutos. Se agregó un volumen igual de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a 27216 × g durante 5 minutos.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se agregó un volumen de fenol–cloroformo (1:1), se mezcló suavemente y se centrifugó a 27216 × g durante 5 minutos. Se adicionaron 0.6 volúmenes de 2–propanol a la fase acuosa, mezclando hasta observar turbidez. Se dejó reposar durante 20 minutos en refrigerador (4 °C) y se centrifugó a 27216 × g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se escurrió el tubo sobre papel absorbente, se adicionaron 500 μL de etanol al 70 % y se enjuagó por inversión, descartando el sobrenadante. El paso anterior se repitió tres veces.

Se secó el ADN en la centrífuga de vacío durante 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 25 μL de solución amortiguadora con RNAsa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se secó el ADN a 50 °C con vacío, se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora TE y se guardó a -20 °C.

5.2.2.4. Amplificación del ADN del gen que codifica para el RNAr 16S. El ADN correspondiente al gen 16S RNAr de la cepa V51B (1.5 kb) se amplificó por la técnica de PCR con el siguiente protocolo:

A cada uno de dos tubos estériles para PCR, se adicionaron los siguientes reactivos:

- 5.0 μL de solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM de pH 8.3)
- 0.5 μL cebador Fd1 5'-CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'
- 0.5 μL cebador Rd1 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'
- 0.5 μL dNTPs (0.5 mM c/u)
- 0.5 μL *Pfu* DNA polimerasa
- 0.5 μL de DNA cepa V51B
- 2.0 μL de $MgCl_2$ 1.5mM (10 mg mL^{-1})

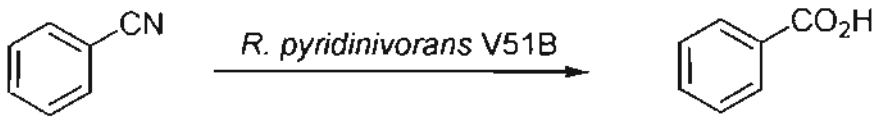
- 41 µL de H_20

Éstos se sometieron a una reacción de PCR con el siguiente programa de termociclado:

3 minutos a 95 °C,	1 ciclo
1 minuto a 95 °C 1 minuto a 48 °C 1.5 minutos a 68 °C	30 ciclos
10 minutos a 68 °C	1 ciclo

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observó la aparición de una banda de 1.5 Kb, la cual se purificó por electroforesis usando el sistema de purificación *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences, UK). El producto purificado (Figura 6.1) se envió a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para su secuenciación con los mismos cebadores con los que se amplificó el gen del RNAr 16S.

5.2.2.5. Biotransformación de benzonitrilo con *R. pyridinivorans* V51B en MMSL.



Dos matraces Erlenmeyer con 25 mL de MMSL fueron inoculados con la cepa V51B; un tercer matraz con MMSL se usó como blanco. Se adicionaron 25 µL de benzonitrilo a cada uno de los tres matraces y se incubaron a 28 °C con agitación rotatoria de 170 rpm, observándose ligera turbidez a las 48 horas en los dos matraces inoculados. Manteniendo condiciones de esterilidad, se adicionaron 100 µL

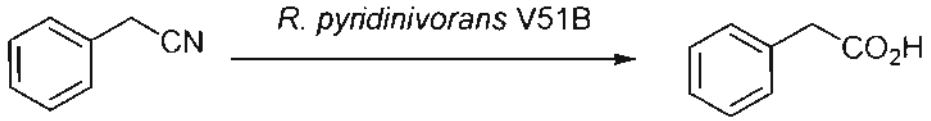
más de benzonitrilo a cada uno de los matraces y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones por cinco días más. Se mezcló el contenido de los dos matraces de reacción; la biomasa fue eliminada por filtración sobre una cama de celita, se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico concentrado, se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con acetato de etilo (5 X 10 mL). El extracto orgánico se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad en rotavapor. El residuo sólido se recristalizó en agua, decolorando con carbón activado. El producto obtenido se comparó contra una muestra de ácido benzoico por CCF (tolueno-THF-ácido acético 90:9:1), por HPLC (Tabla 5.2) y se verificó su identidad por comparación en infrarrojo con una muestra auténtica.

5.2.2.6. Procedimiento general de obtención de biomasa de *R. pyridinivorans* V51B. Se inoculó la cepa V51B por estriada en MMSS-2 y se incubó a 30 °C hasta la aparición de colonias bien definidas (48 horas). Se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de cultivo con 10 mL de medio líquido LB; se incubó a 30 °C por 14 a 18 horas con agitación orbital (250 rpm); se transfirió, en condiciones estériles, a un matraz con 250 mL de medio líquido LB conteniendo 250 µL de benzonitrilo, y a las 6 horas se adicionaron nuevamente 250 mL de benzonitrilo y se incubó a 30 °C durante 24 horas con agitación orbital de 250 rpm. El contenido se transfirió, en condiciones estériles, a otro matraz conteniendo 800 mL de medio líquido LB y 1 mL de benzonitrilo. Se incubó nuevamente en las mismas condiciones entre 20 y 24 h, hasta que la dilución de una alícuota 1:10 mostró una absorbancia de entre 0.38 y 0.4 a 562 nm.

Las células se cosecharon por centrifugación a 10,000 X *g* durante 20 min a 4 °C, se lavó la biomasa dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7, centrifugando durante 20 min a 10,000 X *g*. La biomasa se conservó a 4 °C. En diferentes lotes, se obtuvieron entre 4 y 7 g de biomasa húmeda por litro de medio.

5.2.2.7. Biotransformación de benzonitrilo con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B. Se suspendieron 5.46 g de biomasa de la cepa V51B en 136 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5 y se adicionaron 182 mg de benzonitrilo (relación 1:30 sustrato biomasa). La mezcla se incubó a 30 °C con agitación orbital de 200 rpm, siguiendo la reacción por HPLC cada 30 min. Se observó la completa transformación del benzonitrilo a los 130 minutos de incubación. La mezcla se filtró sobre celita, se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico 10 M y se evaporó hasta sequedad en rotavapor. El residuo sólido se suspendió con 40 mL de acetato de etilo, se trató con carbón activado, se filtró, se concentró hasta sequedad y se recristalizó en agua. Los resultados se muestran en la Tabla 6.4.

5.2.2.8. Biotransformación de fenilacetonitrilo con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B.



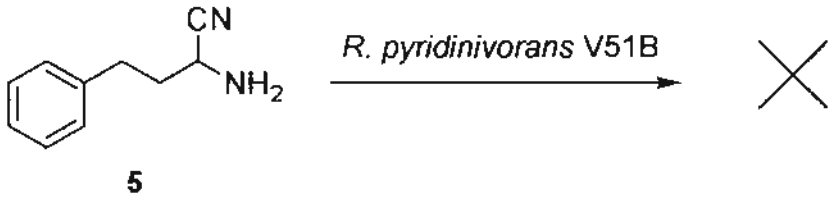
Se suspendieron 2.73 g de células íntegras de V51B en 70 mL de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 8.5, se adicionaron 89.6 mg de fenilacetonitrilo, relación 1:30 sustrato-biomasa. La mezcla se mantuvo a 30 °C con agitación orbital de 200 rpm, siguiendo el curso de la reacción por HPLC (Tabla 5.2), observando completo consumo de fenilacetonitrilo en 15 h. Se filtró sobre celita, se ajustó el pH a 2.0 con ácido clorhídrico 10 M y se concentró hasta sequedad en rotavapor. El residuo se suspendió en acetato de etilo, se calentó a ebullición con carbón activado, se filtró el material insoluble, se evaporó hasta sequedad y se recristalizó de acetato de etilo-hexano. Los resultados se muestran en la Tabla 6.4.

5.2.2.9. Obtención del extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B. 7g de la biomasa húmeda obtenida en el procedimiento descrito anteriormente se suspendió en 70 mL de solución amortiguadora de pH 7.7 para sonicación; se agregó 1 mg de

lisozima y se incubó a 30 °C durante 16 a 18 horas con agitación orbital de 100 rpm. La suspensión se enfrió en baño de hielo y se sometió a un protocolo de sonicación de 9 segundos con 48 % de amplitud X 9 segundos de reposo durante 3 periodos de 10 min, controlando la temperatura entre 5 y 10 °C. Se centrifugó a 27216 × g durante 20 min, se decantó y al sobrenadante se adicionaron 35 g de sulfato de amonio, para obtener un 70 % de saturación; se adicionaron 80 µL de 2-mercaptoetanol y se guardó en refrigeración a 4 °C. El contenido total de proteínas, determinado por el método del ácido bicinconínico fue de 1.97 a 2.3 mg mL^{-1}.

5.2.2.10. Determinación de la actividad específica de la nitrilasa en el extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B. Se centrifugaron 600 µL del extracto intracelular obtenido en el punto anterior (1 ml = 100 mg células húmedas); se desechó el sobrenadante y el sedimento se disolvió en 3.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M de pH 7.5. Se prepararon diez tubos con 750 µL de soluciones 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1 y 2 mM de benzonitrilo en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M de pH 7.5. A cada tubo se adicionaron 250 µL de la solución del extracto intracelular, equivalente a 0.14 mg de proteína total y se incubaron durante 5 minutos a 30 °C con agitación orbital de 175 rpm, deteniendo la reacción de todos los tubos por dilución con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM de pH 3. Las concentraciones de ácido benzoico producido en cada tubo se cuantificaron por HPLC, con base en una curva de calibración. Los datos se procesaron con el programa Prism 3.0, calculándose los valores de la actividad específica, la K_m y la V_{max}. Los resultados se muestran en la gráfica 6.2.

5.2.2.11. Biotransformación de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (5) con células integras de *R. pyridinivorans* V51B.



Se suspendieron 3 g de biomasa de la cepa V51B en 80 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.0 y se centrifugaron a 10 000 X *g* durante 15 min. Separadamente, se preparó una solución de 123 mg de clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo en 60 mL de una solución 100 mM de KH_2PO_4, se dividió en 4 partes, se ajustó el pH con hidróxido de sodio 5 M; la primer fracción a 7.0, la segunda a 7.5, la tercera a 8.0 y la cuarta a 8.5. Cada fracción equivale a 25 mg (0.156 mmoles) de la base libre del aminonitrilo (**5**). Se tomaron 200 µL como control de cada solución. Se mezcló cada fracción con la biomasa de cada tubo de centrifuga (relación 1:30 sustrato-biomasa) y se incubó a 30 °C con agitación orbital de 200 rpm, siguiendo el curso de la biotransformación por HPLC.

El monitoreo de la biotransformación se realizó por HPLC, tomando una alícuota de 200 µL cada dos horas durante las primeras 12 horas y posteriormente cada 24 horas con el siguiente protocolo:

Se mezcló cada alicuota con un volumen igual de la fase 1 para HPLC, se centrifugó a 3400 rpm, se separó el sobrenadante y se analizó por HPLC, observando descomposición gradual del aminonitrilo desde las primeras 2 horas y completa descomposición entre 3 y 7 días, sin observarse aminonitrilo residual. El sedimento se suspendió en 10 mL de agua y se ajustó a pH de 9, se centrifugó y se analizó el sobrenadante por HPLC, comparando con muestras del sustrato **5** y de L-homofenilalanina (**7**). Los resultados se muestran en la Tabla 6.4.

KOCHANEGO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

5.2.2.12. Biotransformación de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (5) con extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B. 6 mL del extracto intracelular de la cepa V51B, conteniendo 2.3 mg mL^{-1} de proteínas totales, se centrifugaron durante 15 min a 14000 rpm; el sobrenadante se descartó y el sedimento se disolvió con 4 mL de una solución 11 mM de clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**) en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5. El pH bajó a 7.22 y no se reajustó. Se incubó a 28-30 °C durante tres días, siguiendo la biotransformación por HPLC cada 24 horas. A los tres días se observaron sólo trazas de materia prima y no se detectó el producto esperado **7** en la mezcla de reacción. El blanco de **5** mostró degradación desde las 24 horas; agotándose a los tres días.

5.2.2.13. Biotransformación de otros nitrilos con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B.

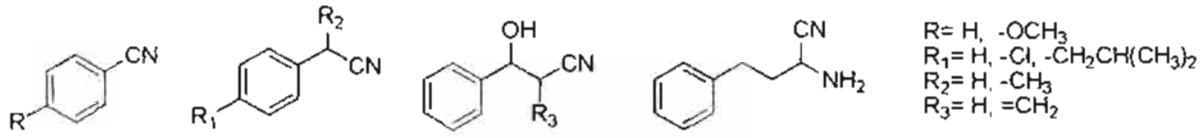


Figura 5.2. Nitrilos sometidos a biotransformación con células íntegras de *R. pyridinivorans* V51B.

Los nitrilos que se representan en la Fig. 5.2 fueron sometidos a las condiciones de biotransformación que se describen a continuación.

Metodología general. Se suspendió la biomasa húmeda recién obtenida de la cepa V51B en 25 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5 y se adicionó el nitrilo en una relación 1:30 nitrilo-biomasa. En los casos de los nitrilos insolubles en este medio, se adicionó entre 5 y 20 % v/v de dimetilsulfóxido. Se incubó a 30 °C con agitación orbital de 200 rpm, siguiendo el curso de la reacción por HPLC (ver Tabla 5.2) cada hora durante las primeras 8 horas y posteriormente cada ocho horas, hasta las 24 horas. Los nitrilos que no mostraron transformación en 24 horas se mantuvieron en las mismas condiciones hasta siete días, analizando una muestra cada 24 horas.

En los casos en los que se observó el producto esperado de la biotransformación, se procedió a su aislamiento, para lo cual la mezcla se filtró sobre celita, el pH del filtrado se ajustó a 2 con ácido clorhídrico 10 M y se concentró hasta sequedad en rotavapor; el residuo se suspendió en acetato de etilo, se calentó a ebullición y se trató con carbón activado, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo se recristalizó de acetato de etilo. Los resultados obtenidos de la biotransformación de los nitrilos evaluados se reportan en la Tabla 6.4.

5.2.2.14. Evaluación de la capacidad del extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B para transformar diferentes nitrilos. 18 microtubos, cada uno con 1.5 mL del extracto intracelular de la cepa V51B, fueron centrifugados a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C; se desechó el sobrenadante y el sedimento se utilizó para evaluar la biotransformación los nitrilos representados en la Fig. 5.2. El sedimento de dos de los tubos (aproximadamente 340 mg) fue mezclado con 3 mL de una solución 10 mM de cada uno de nitrilos preparada con solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5, adicionando entre 5 y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 30 °C con agitación orbital de 200 rpm durante los tiempos que se registran en la Tabla 6.5, siguiendo el curso de la biotransformación por HPLC (Tabla 5.2). Se comparó en cada caso con los controles del sustrato, y en los casos en los que se observó consumo del nitrilo, se comparó con los correspondientes ácidos carboxílicos. Los rendimientos fueron cuantificados por HPLC y se muestran en la Tabla 6.5.

5.2.2.15. Método analítico para el seguimiento de las biotransformaciones por HPLC. Se empleó una columna Symetry® C_{18}, de 4.6 X 75 mm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM de pH 3.0 y acetonitrilo, en diferentes proporciones. Los flujos empleados variaron entre 0.6 y 1.0 mL/min. Se utilizó un detector de UV con longitud de onda variable. En la Tabla 5.2 se resumen las condiciones del análisis para cada compuesto.

Preparación de las muestras para análisis: Cada alícuota de 200 µL fue tratada de la siguiente manera: Se mezcló con 200 µL de fase móvil, se centrifugó por 15 min a 3400 rpm, se tomaron 150 µL del sobrenadante y se filtró a través de un acrodisco de nylon de 0.45 micras.

Se inyectaron 10 µL de esta solución para el registro de los cromatogramas, comparando contra blancos del sustrato y de biomasa, así como estándares de sustrato y de producto esperado. Los tiempos de retención (tr) observados se registran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Método analítico para el seguimiento de las biotransformaciones por HPLC.

Compuesto	*Fase móvil*	*tr (min)*	*Flujo (mL/min)*	*λ (nm)*
benzonitrilo	a	6.58	1	240
fenilacetonitrilo	a	8.14	1	240
2-fenilpropionitrilo	a	13.49	1	220
3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropionitrilo	a	4.76	1	240
3-hidroxi-3-fenilpropionitrilo	a	3.31	1	240
4-metoxibenzonitrilo	a	8.49	1	240
4-clorofenilacetonitrilo	b	2.72	1	220
DL-2-(4-isobutilfenil) propionitrilo)	b	9.90	1	220
2-amino-4-fenilbutironitrilo	a	2.86	0.6	220
benzamida	a	1.52	1	240
ácido fenilacético	a	3.62	1	240
ácido benzoico	a	3.23	1	240
ácido *p*-anísico	a	3.55	1	240
L-homofenilalanina	a	1.80	0.6	220
DL-Ibuprofeno	b	4.72	1	220

tr = tiempos de retención; a = KH_2PO_4 50 mM pH 3.0-acetonitrilo 70:30; b = KH_2PO_4 50 mM, pH 3.0-acetonitrilo 40:60.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La demanda de compuestos quirales enantiopuros se está incrementando, principalmente en la industria farmacéutica, debido a las regulaciones sobre nuevos fármacos y al reconocimiento de que los enantiómeros de un compuesto quiral pueden tener dramáticas diferencias en sus propiedades biológicas. El cambio a fármacos enantiopuros puede mantener el éxito comercial y mejorar la eficacia de un fármaco racémico que ha perdido su patente.[126]

Una de las estrategias más usadas para la preparación de aminoácidos enantiopuros es la resolución enzimática de sus ésteres o amidas. Sin embargo, las resoluciones tienen generalmente la desventaja de que uno de los enantiómeros obtenidos no tiene aplicación, haciendo necesario un paso de racemización para ser reutilizado, lo que encarece el proceso. Sin embargo, la resolución de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) es una estrategia tecnológicamente viable, debido a que, en este caso en particular, es posible emplear tanto la D-homofenilalanina (**1**) como la L-homofenilalanina (**7**) en forma enantiopura como materia inicial para la síntesis de fármacos del tipo de los inhibidores de la ECA, por ejemplo el Benazepril, como se puede ver en la Figura 6.1.

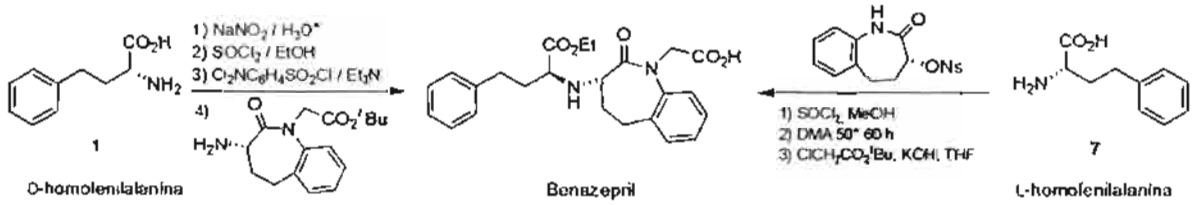
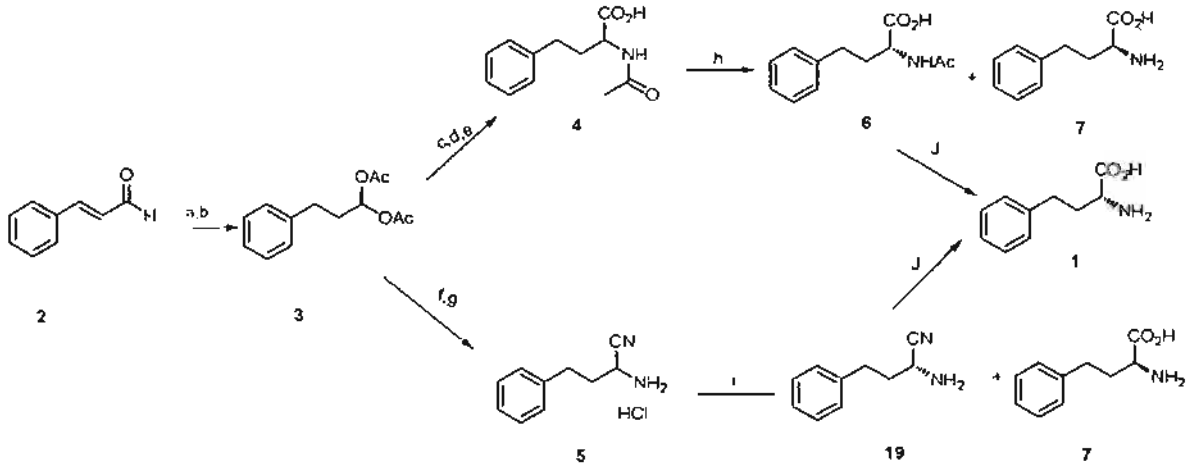


Figura 6.1. Síntesis enantioconvergente de benazepril[127,128]

Partiendo de esta necesidad, se evaluaron en este proyecto dos diferentes alternativas biocatalíticas para la preparación de **1**, empleando, en ambos casos, el cinamaldehído (**2**) como materia de partida. Ambas estrategias sintéticas

[126] Rovhi, A. M. *Chem. & Eng. News* **2004**, *82*(24), 47
[127] Ching-Yao Chang ; Teng-Kuei Yang. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 2239.
[128] Boyer, S. K.; Pfund, R. A.; Portmann, R. E.; Sedelmeier, G. H.; Wetter, H. F. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 337.

originalmente planteadas se resumen en la Figura 6.2.



a= Ac_2O, APTS; b= H_2, Pd/C; c= KCN, $(NH_4)HCO_3$; d = $NaOH/H_2O$, 130 °C; e= Ac_2O, 0-5 °C; f= KOH, 0-5 °C; g= NaCN, NH_4Cl; h= polvos acetónicos de riñón de mamífero; i= microorganismo transformante de nitrilos; j= HCl 1 N, reflujo.

Figura 6.2. Síntesis químico-enzimática de la D-homofenilalanina (**1**)

Como se discutirá más adelante, la primera opción biocatalítica probada, la resolución enzimática de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) condujo a la L-homofenilalanina con alto rendimiento y buena pureza enantiomérica, mientras que la segunda estrategia, consistente en la hidrólisis enzimática del aminonitrilo racémico (**5**) no tuvo los resultados esperados.

6.1. Síntesis química

Síntesis de DL-*N*-acetilhomofenilalanina (4)

El compuesto **4** fue obtenido químicamente como se muestra en la Figura 6.2, mediante una secuencia de reacciones adaptadas de varias metodologías conocidas.[129-131]

El primer paso consistió en la protección del cinamaldehído (**2**) como diacetato, empleando 1.1 equivalentes de anhídrido acético y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. Esta reacción, que permitió un aislamiento simple del intermediario **9**

(Figura 6.3) y un rendimiento del 80%, superior al 60% reportado en la literatura, representó una mejora al método descrito,[129] que utiliza un gran exceso (3 equivalentes) de anhídrido acético, lo cual complica su aislamiento.

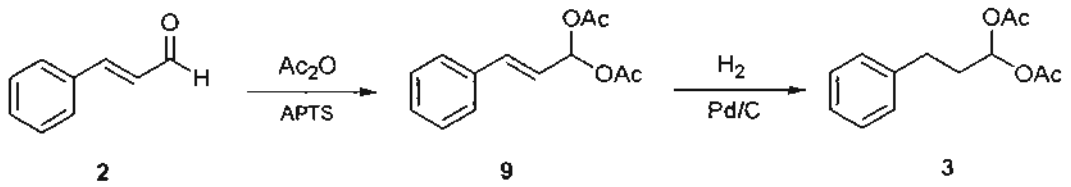


Figura 6.3. Síntesis del diacetato de hidrocinamaldehído (**3**)

El diacetato de cinamaldehído (**9**) fue sometido a hidrogenación catalítica (Figura 6.3), obteniendo el diacetato de hidrocinamaldehído (**3**) con 92 % de rendimiento. El hecho de emplear el cinamaldehído protegido como diacetato evitó la reducción parcial del aldehído durante la hidrogenación, lo cual se observó al tratar de reproducir, con resultados mediocres, las condiciones descritas en la patente,[130] en la que se describe la hidrogenación directa de **2**. Además, se encontró que es factible realizar esta hidrogenación sobre la mezcla cruda de reacción de **9**, con resultados similares.

Para la elaboración de la 5-feniletiletilhidantoina (**11**) se desarrollaron también condiciones originales, basadas en el método propuesto por Iwasaki,[131] que consistieron en el tratamiento directo de **3** con cianuro de sodio y bicarbonato de amonio (generado *in situ*) en un sistema cerrado (Figura 6.4).

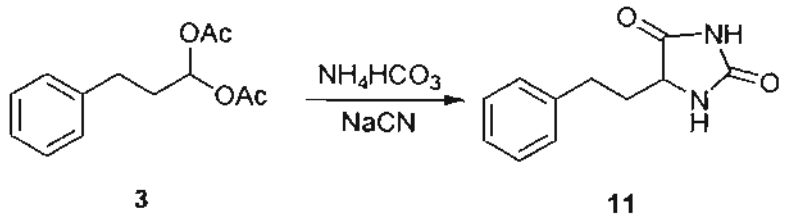


Figura 6.4. Síntesis de la 5-feniletiletilhidantoina (**11**)

[129] Kochhar, K. S.; Bal, B. S.; Deshpande, R. P., Rajadhyaksha, S. N.; Pinnick, H. W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1765.
[130] Castelijns, A. M.; Hogeweg, J. M.; van Nispen, S. U.S. Pat. 5,811,588, **1998**.
[131] Iwasaki, G.; Kimura, R.; Numao, N.; Kondo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37(2)*, 280.

El rendimiento obtenido de **11** (73.3 %), fue superior al 45% que describe el autor referido a partir de hidrocinamaldehído (**10**), carbonato de amonio y cianuro de potasio.

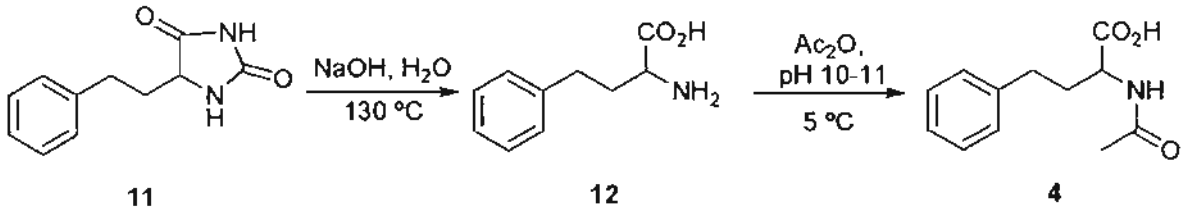


Figura 6.5. Síntesis de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**)

La hidrólisis alcalina de la hidantoína **11** se realizó eficientemente a 130 °C en un reactor a presión. La eliminación del exceso de amoniaco y el ajuste de pH a 6.3 permitió aislar la DL-homofenilalanina (**12**) con un rendimiento de 53% desde cinamaldehído. La acetilación de **12** por métodos convencionales generó, con 92% de rendimento, la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) (Figura 6.5).

Síntesis de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (5)

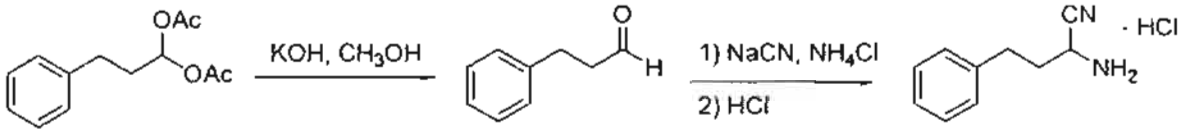
Para evaluar la segunda estrategia biotecnológica propuesta, la síntesis de D-homofenilalanina empleando microorganismos degradantes de nitrilos, se requirió preparar el clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**). Este producto se aísla y almacena en forma de clorhidrato debido a su baja estabilidad como base libre.

El compuesto **5** fue preparado siguiendo un protocolo descrito por López-Serrano y col.[132] a partir de hidrocinamaldehído (**10**) y cianuro de sodio como reactivo limitante. La modificación propuesta por estos autores a la reacción original de Strecker consiste en el empleo de un exceso del hidrocinamaldehído en relación con el cianuro, con lo que reportan un 57 % de rendimiento estequiométrico del compuesto **5** en forma de clorhidrato. El aislamiento aprovecha las propiedades básicas del aminonitrilo formado y el exceso de **10** puede ser recuperado y empleado en lotes

[132] López-Serrano, P.; Sheldon, R. A.; Jongejan, J. A.; van Rantwijk, F. Tetrahedron: *Asymmetry* **2001**, *12*, 219.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

posteriores. En nuestro caso, el hidrocinamaldehído (**10**), preparado por hidrólisis alcalina del diacetato **3**, fue utilizado sin purificación en el método modificado de López-Serrano (Figura 6.6).



3 **10** **5**

Figura 6.6. Síntesis del clorhidrato de DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**)

Otros nitrilos sintetizados

Los compuestos **14** - **16** fueron sintetizados en el laboratorio siguiendo metodologías descritas en la literatura.[133]

6.2. Parte biocatalítica

Para alcanzar el objetivo general establecido en este proyecto se probaron dos diferentes estrategias biocatalíticas. La primera alternativa evaluada fue la resolución enzimática de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) empleando la actividad aminoacilasa contenida en los polvos acetónicos de riñón de mamíferos. Se estudió la viabilidad de esta biotransformación con los polvos acetónicos obtenidos de cinco diferentes especies de mamífero de fácil disponibilidad. La segunda estrategia evaluada fue la potencial hidrólisis del DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**) con enzimas transformantes de nitrilos. Este estudio incluyó la búsqueda, en muestras de suelos, de microorganismos con esta capacidad, su aislamiento e identificación, además de la obtención de un extracto intracelular con la actividad transformante de nitrilos y de su evaluación sobre diferentes nitrilos.

[133] a) Snell, D., Colby, J. *Enzyme Microb. Tech.* **1999**, *24*, 160. b) Brady, D.; Beeton, A.; Zeevaart, J.; Kgaje, C.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 76. c) Hiyama, T.; Inove, M.; Saito, K. *Synthesis* **1986**, 645. d) Cai, J.; Zhou, Z.; Zhao, G.; Tang, C. *Org. Lett.* **2002**, *4*(26), 4723.

6.2.1. Resolución enzimática de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (4) empleando polvos acetónicos de riñón de mamíferos.

El polvo acetónico de riñón (PAR) es un preparado proteico obtenido a partir de riñones de diferentes especies de mamífero, que por trituración en frio con acetona, producen un polvo fino, libre de grasa y agua, con un contenido variable de aminoacilasa en diferentes especies.[134] Aunque existen reportes de la resolución enzimática de *N*-acetil-aminoácidos con aminoacilasas aisladas a partir de microorganismos,[135] de riñón de porcino[136] y con extractos acuosos preparados a partir de PAR de porcino,[137] no se encontró en la literatura referencia al empleo directo de PAR para este tipo de transformación. Lo anterior nos motivó a estudiar la factibilidad de utilizar estos preparados en la resolución de la DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) (Figura 6.7), buscando cubrir el objetivo general de este trabajo, además de contribuir al desarrollo de métodos que empleen enzimas parcialmente purificadas en síntesis orgánica.

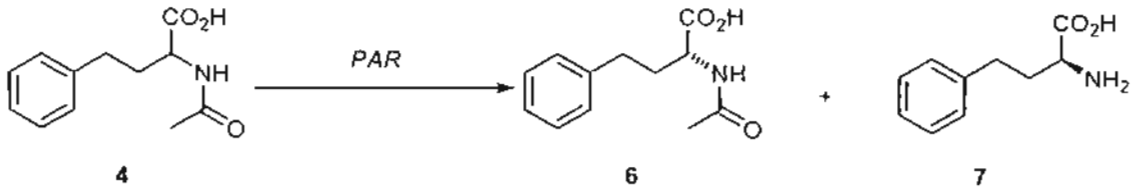


Figura 6.7. Resolución enzimática de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**)

En una etapa inicial, se comparó la capacidad de los PAR de diferentes mamíferos de fácil disponibilidad para efectuar la resolución de **4**. Se efectuaron experimentos con los polvos acetónicos obtenidos de riñones de canino, murino, bovino, porcino y ovino, aunque después de los primeros ensayos se descartaron los materiales de murino y canino, debido a que no mostraron una actividad significativa. En diferentes experimentos, se compararon los resultados obtenidos en la bioconversión al

[134] Lindner, H.; Höpfner, S.; Tafler-Naumann, M.; Miko, M.; Konrad, L.; Rohm, K. *Biochimie* **2000**, *82*, 129.
[135] Chibata, I. *Adv. Mol. Cell. Biol.* **1996**, *15A*, 151.
[136] Palm, G J.; Rohm, K.H. *J. Protein Chem.* **1995**, *14(4)*, 233.
[137] Nadai, Y. *J. Biochem.* **1958**, *45*, 687. CA **53**:17730

emplear el riñón entero y la corteza, aunque no se observó una diferencia apreciable.

Para realizar este estudio, se emplearon riñones de mamífero de animales recién sacrificados, con el objeto de descartar interferencias por la acción de las proteasas, presentes en el tejido de riñón, sobre las aminoacilasas. Para este fin se logró la colaboración de los responsables del rastro "La Aurora", en Cd. Netzahualcoyotl, Mex.; del Centro de Control Canino de la Delegación Iztapalapa y del Bioterio de la FES-Zaragoza.

Con una metodología simple, que consistió en incubar a 37 °C una solución de **4** en solución amortiguadora de fosfatos 200 mM de pH 7.5, con 25 % de PAR en relación al sustrato, se logró la resolución deseada en 24 horas.

La base del éxito de esta resolución consistió en que, por un lado, el sustrato tiene una solubilidad de 18 g/L en el medio de reacción, mientras que el aminoácido libre, producto de la resolución, tiene muy baja solubilidad (0.8 g/L), permitiendo un desplazamiento del equilibrio. La separación de los productos también se facilita debido a las diferentes solubilidades de ambos productos en el punto isoeléctrico de de la L-homofenilalanina.

Los PAR de porcino y de bovino condujeron a los mejores resultados en cuanto a rendimiento químico y exceso enantiomérico, tanto de la L-homofenilalanina (**7**) como de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) residual. En las Tablas 6.1 y 6.2 se muestran los resultados obtenidos de los experimentos comparativos de resolución de **4** con las especies estudiadas.

Tabla 6.1. Rendimientos, rotación específica y excesos enantioméricos (e.e.) de la L-homofenilalanina (**7**), obtenida por resolución enzimática de **4** con PAR de ovino, porcino, bovino, murino y canino.

Especie de mamífero	Rendimiento (%)	$[\alpha]_D^{20}$ [a]	ee[b] (%)
ovino	34.0	+ 44.8°	99.4
porcino	40.0	+ 45.1°	99.9
bovino	41.0	+ 45.2°	99.9
murino	–	--	–
canino	–	--	--

a = Lit.[138] $[\alpha]_D^{20}$ + 45.0° (c=1, HCl 3N)
b = Cuantificado por HPLC quiral como el éster metílico de L-homofenilalanina (**17**).

Tabla 6.2. Rendimiento, rotación específica y ee de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**), obtenida por resolución enzimática de **4** con PAR de ovino, porcino, bovino, murino y canino.

Mamífero	Rendimiento (%)	$[\alpha]_D^{25}$ [a]	ee [b] (%)
ovino	26.0	- 18.9 °	94.0
porcino	33.0	- 19.4 °	99.9
bovino	37.0	- 19.5 °	96.0
murino	–	--	--
canino	--	--	--

a= Lit.[139] $[\alpha]_D^{20}$ = – 19.2 ° (c=1, metanol),
b= Cuantificado por HPLC quiral como el éster metílico de D-*N*-acetil-homofenilalanina (**18**).

Se realizaron experimentos tendientes a mejorar esta biotransformación. Las variables estudiadas para el desarrollo de condiciones mejoradas de reacción fueron: proporción de polvos acetónicos, temperatura y tiempo de reacción. Así, se determinó que una proporción entre 15 y 25 % de polvo acetónico de riñón de

[138] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 294373.
[139] Giannis, A., Henk, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *8*, 789.

bovino, una temperatura de 37 °C y tiempos de reacción de 24 horas condujeron a los mejores resultados.

Lo anterior llevó a establecer que, en una escala productiva, se requerirían de 150 a 250 g de PAR por cada kilogramo de DL-*N*-acetil-homofenilalanina (**4**) por resolver para producir 370 g de la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**) y 327 g de la L-homofenilalanina (**7**). La separación y purificación de los productos de la resolución involucra llevar el pH a 11 – 11.5 para solubilizar ambos productos y poder separarlos, por centrifugación o filtrado, de la mayor parte de las proteínas presentes en la mezcla de resolución. Un ajuste de pH entre 6.3 y 6.4 permite la precipitacion del aminoácido libre **7**, permaneciendo en solución la D-*N*-acetil-homofenilalanina (**6**), la cual precipita a valores de pH entre 2 y 2.3.

La D-homofenilalanina (**1**) fue preparada a partir de **6** por hidrólisis química en medio ácido, sin racemización apreciable, con un rendimiento de 84.8 %. La rotación óptica del producto obtenido fue de – 45.7° (1, HCl 3N) (Lit.[140] $[\alpha]_D^{20}$ = - 45° (1, HCl 3N).

6.2.1.1. Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en la fracción soluble de los polvos acetónicos de riñón de bovino. La determinación de proteínas totales determinadas por el método del ácido bicinconínico[141] en la fracción soluble de los polvos acetónicos de riñón de bovino dio como resultado una concentración de 3.2 mg mL^{-1}. Con esta disolución de proteínas solubles se determinaron las velocidades iniciales de la hidrólisis enzimática de soluciones 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 mM de *N*–acetil–DL–homofenilalanina (**4**), mediante la cuantificación colorimétrica a 507 nm del producto de reacción de la L–homofenilalanina con la ninhidrina. Los valores de absorbancia se transformaron en unidades de concentración de L–homofenilalanina por interpolación en una curva estándar y se graficaron contra el tiempo en horas. Los datos de velocidad inicial en

[140] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 294365.
[141] Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76; *Erratum* en: *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 279.

función de la concentración de sustrato, se ajustaron a la ecuación de la hipérbole (ecuación de Michaelis-Henri) por regresión no lineal (Gráfica 6.1).

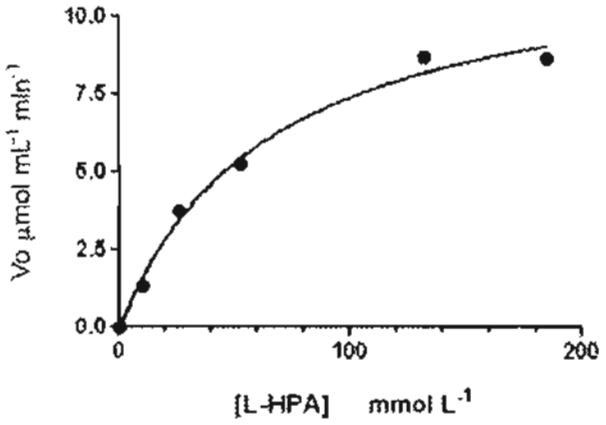
Los parámetros de la ecuación, velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis (K_m), con sus errores estándar de regresión fueron:

$$V_{max} = 12.4 \pm 0.98 \ \mu mol\ min^{-1}\ mL^{-1}$$

$$K_m = 65.0 \pm 12.7\ mmol\ L^{-1}$$

El valor de V_{max} depende de la concentración de enzima y de la constante catalítica de ésta (k_{cat}). A su vez, la k_{cat} es dependiente de la temperatura y del pH. La K_m, en cambio, es un parámetro que caracteriza a esta enzima y al sustrato utilizado, y también es dependiente de la temperatura y del pH. Debido a que no utilizamos la aminoacilasa pura, no es posible calcular la k_{cat} (V_{max} / [enzima]) ya que no conocemos la concentración de la aminoacilasa. Damos el dato de la actividad específica (Q) en nuestra preparación, que depende del valor de k_{cat} y de la abundancia de la enzima en la mezcla de proteínas solubles, calculada como:

Q = V_{max} / [proteína total], obteniendo el valor de 3.9 $\mu mol\ mg^{-1}\ mL^{-1}$ para una preparación típica.



Gráfica 6.1. Aminoacilasa contenida en la fracción soluble del polvo acetónico de riñón de bovino. Curva de velocidad versus concentración de L-HPA. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Henri por regresión no lineal.

6.2.2. Biotransformación con microorganismos transformantes de nitrilos.

La segunda estrategia probada para la obtención de la D-homofenilalanina (**1**) consistió en la hidrólisis enzimática del DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**), empleando microorganismos transfomantes de nitrilos, lo cual daría lugar, dependiendo del tipo de enzimas presentes en el microorganismo, a una mezcla de dos compuestos de fácil separación, como serían, por ejemplo, el L-aminoácido (**7**) y el D-aminonitrilo (**19**), o el L-aminoácido (**7**) y la D-aminoamida (**8**) (Figura 6.8), según han descrito Wang[142] y Wegman.[143]

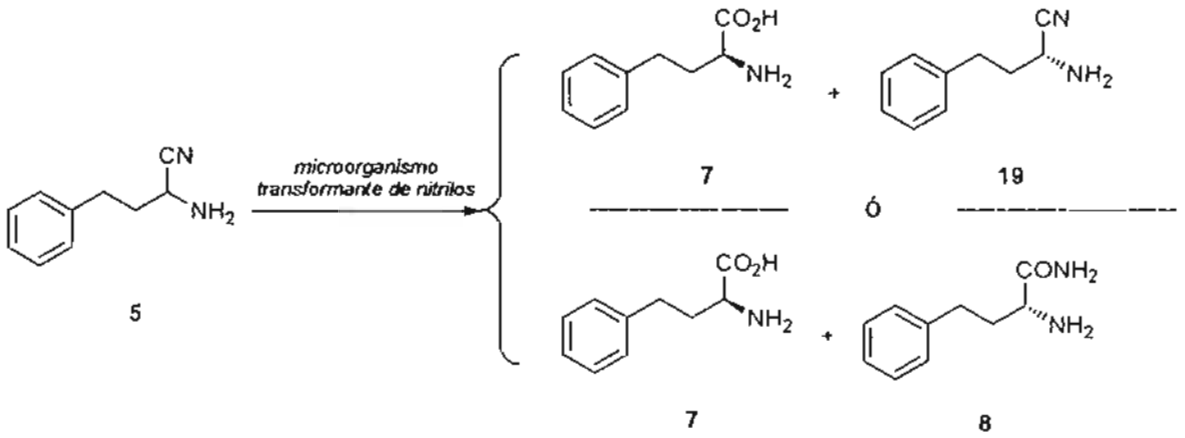


Figura 6.8. Resolución enzimática planteada para DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**)

El primer paso para afrontar este problema consistió en la búsqueda de microorganismos con capacidad de utilizar nitrilos como fuente de nitrógeno a partir de muestras de suelo de algunas regiones del centro del país (ver Fig. 5.1). Para este muestreo se siguieron tres criterios: a) suelos agrícolas de bajo contenido de nitrógeno; b) suelos cercanos a árboles de la familia de las *Rosaceas*, que contienen en sus semillas glucósidos cianogénicos, tales como *Prunus capulli;* c) muestreo aleatorio (Tabla 5.1).

[142] a) Wang, M. X. and Shuang-Jun, L. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6925. b) Wang, M. X. and Shuang-Jun L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6542.
[143] Wegman, M. A.; Sheldon, R. A.; Heinemann, U.; Stolz, A.; van Rantwijk, F. *J. Mol. Catal. B:Enzim* **2001**, *11*, 249.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

Para la búsqueda de microorganismos con capacidad transformante de nitrilos se diseñó un método de selección que consistió en el empleo de un medio de cultivo mínimo salino sólido conteniendo 1% de glucosa como fuente de carbono y 0.1 % de una mezcla 1:1 de benzonitrilo y valeronitrilo como fuente de nitrógeno (MMSS-1) (procedimiento A). Se decidió incluir en los medios de selección un nitrilo alifático y uno aromático, tomando en cuenta su disponibilidad, se optó por los compuestos mencionados.

Ahora bien, en vista de que casi todas las muestras recolectadas mostraron, al ser inoculadas en el MMSS-1, abundante crecimiento en periodos de 1 a 3 días, se decidió emplear un medio de cultivo sin glucosa, conteniendo como única fuente de carbono y nitrógeno 0.1% de una mezcla de valeronitrilo y benzonitrilo (MMSS-2). Con esta restricción, se observó crecimiento en las muestras que se señalan en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Resultados de la búsqueda de microorganismos con capacidad degradante de nitrilos

Muestra	Región	MMSS-1	MMSS-2	MMSL
1 a 8	1	+		
9	2			
10 y 11	3	+	+	
12	4	+	+	
13	5	+	+	
14	5	+	+	
15	6	+		
16	7	+		
17	8	+	+	+
18	8	+		
19	9	+		

Las colonias que crecieron en el MMSS-2 fueron incubadas en un medio mínimo salino líquido 9.8 mM con benzonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno (MMSL). El benzonitrilo es menos volátil y menos tóxico que el valeronitrilo, presenta buena solubilidad en agua y, tanto el mismo benzonitrilo como sus productos de

bioconversión, tienen una intensa absorción entre 220 y 260 nm, lo cual facilita su detección por HPLC.

La muestra 17 fue la única que creció en este medio. Esta cepa se aisló en forma pura por resiembras consecutivas en el MMSS-2 y se conservó en glicerol al 50% a -20 °C. La tinción de Gram mostró bacilos Gram-positivos. Esta cepa fue denominada V51B.

La biotransformación de benzonitrilo con la cepa V51B en el medio de cultivo (MMSL) produjo ácido benzoico con 41 % de rendimiento y p.f. 119-121 °C (Lit.[144] 122-123 °C). Sin embargo, en vista de que esta bioconversión fue muy lenta, siendo necesario adicionar el sustrato en dos porciones para continuar el crecimiento, se decidió cambiar la estrategia: se crecieron las células en medio líquido LB, se aislaron y se suspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.5. Con esta metodología se logró la completa conversión de benzonitrilo en aproximadamente dos horas, empleando una relación de sustrato a biomasa 1:30. El rendimiento de ácido benzoico obtenido por este método fue de 45.4 % (Tabla 6.4).

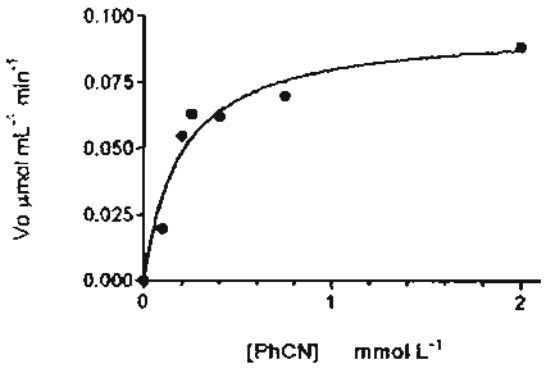
Se demostró que este microorganismo no produce benzamida ni tampoco la metaboliza, con lo que se concluyó que posee enzimas con actividad de nitrilasa y no de nitrilo hidratasa ni amidasa. Por otro lado, se observó que el ácido benzoico producido es completamente metabolizado en 24 horas al emplear células íntegras de V51B, lo cual es consistente con reportes en la literatura para diferentes microorganismos.[145] Se exploró entonces la conveniencia de emplear un extracto intracelular de V51B, con lo que se evitaría la degradación del ácido benzoico. Esta hipótesis fue corroborada con la experimentación correspondiente, obteniendo un rendimiento de 92.3 % del ácido benzoico (Tabla 6.5).

[144] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 242381

[145] a) Yamaguchi, M.; Fujisawa, H. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8848. b) Yamaguchi, M., Fujisawa, H. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 5058. c) Reiner, A.M. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 4960. d) Hosokawa, K.; Stanier, R.Y. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 245.

El extracto intracelular fue preparado por tratamiento de las células con lisozima, sonicación y centrifugación. Después de saturar del sobrenadante al 70% con sulfato de amonio, se conservó a 4 °C con mercaptoetanol como antioxidante. La concentración de proteínas totales, determinada por el método del ácido bicinconínico, fue de 1.96 mg mL^{-1}

6.2.2.1. Determinación de la actividad específica de nitrilasa en el extracto intracelular de la cepa V51B. Se cuantificó por HPLC el ácido benzoico formado en la reacción de la nitrilasa, usando benzonitrilo como sustrato. Se ensayó la enzima contenida en el extracto intracelular, variando la concentración de sustrato en el intervalo de 0.1 a 2.0 mM. Se cuantificó el producto formado en un tiempo fijo (5 min), en el cual el avance de la reacción fue menor del 10 %, de modo que las velocidades obtenidas se pueden considerar como velocidades de reacción iniciales (v_0). La cuantificación del ácido benzoico producido en cada muestra se obtuvo por referencia a una curva de calibración. Los datos de velocidad *versus* concentración de benzonitrilo se ajustaron a una cinética hiperbólica (Gráfica 6.2), de igual manera que en el caso de la aminoacilasa, como se explicó en la sección 6.2.1.1.



Gráfica 6.2. Cinética de la nitrilasa en un extracto intracelular de *R. pyridinivorans* V51B con un contenido de 1.96 mg mL^{-1} de proteínas totales. Datos ajustados a la ecuación de Michaelis-Henri por regresión no lineal. Los parámetros obtenidos en el ajuste con su error estándar fueron: V_{max}, 0.0957 ± 0.0095 µmol L^{-1} min^{-1} ; K_m, 0.196 ± 0.063 mM. Actividad específica: 0.677 µmol L^{-1} min^{-1} mg^{-1}.

6.2.2.2. Identificación de la cepa V51B. Los RNAr participan activamente en la síntesis de proteínas en procariotes y eucariotes y sus secuencias son conservadas en la filogenia. Por esta razón, en las bacterias se ha utilizado la secuencia del gen de uno de los RNAr, el llamado 16S como "reloj molecular", indicando el tiempo en que una especie se separó de otra y permitiéndonos agrupar a miembros de la misma especie por la similitud en la secuencia de sus genes de RNAr 16S. La secuenciación del gen de RNAr 16S de la cepa V51B fue realizada en un secuenciador de DNA ABI Prism modelo 3100 en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; los electroferogramas obtenidos se muestran en el anexo 2. Se usaron cebadores ("primers") universales, de origen comercial (Stratagene). Por limitaciones del equipo de secuenciación, fue necesario proceder en dos partes, sobre dos segmentos del DNA del gen de 16S, para lo cual se diseñó y se sintetizó un oligonucleótido de 16 pares de nucleótidos, complementario de un segmento en la mitad del gen, para usarse como cebador intermedio y secuenciar el gen entre los nucleótidos 650 y 1473.

La alineación de la secuencia de 1473 nucleótidos del gen de RNAr 16S de la cepa V51B con el GenBank presentó una identidad del 99.93 % con *Rhodococcus pyridinivorans*.[146]

R. pyridinivorans, como su nombre lo indica, es una bacteria capaz de utilizar piridina como fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, la cepa V51B fue incapaz de biodegradar piridina bajo las mismas condiciones en que biotransforma al benzonitrilo. Es común que los genes que permiten la utilización de compuestos químicos antropogénicos estén codificados en elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos) o bien en elementos móviles de ADN (transposones).[147] Es muy probable que la capacidad de degradar piridina esté codificada en uno de estos elementos y, en consecuencia, sea una propiedad no asociada a la identidad molecular de la bacteria. Del mismo modo, es común

[146] Yoon, J-H., Kang, S-K.; Cho, Y-G.; Lee, S. T.; Kho, Y. H.; Kim, C-J.; Park, Y-H. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **2000**, *50*, 2173.
[147] Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T; *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 21.

encontrar bacterias del mismo género y diferente especie que comparten genes que permiten la utilización de compuestos químicos antropogénicos, como es el caso de los genes para degradar dibenzotiofeno en bacterias del género *Rhodococcus* o carbazol dentro del género *Pseudomonas*.[148] En este caso, consideramos que la clasificación "*pyridinivorans*" podría estar asociada a un conjunto de genes que no necesariamente están presentes en el cromosoma de esta bacteria. Por el momento, a la cepa V51B le denominaremos en lo sucesivo *Rhodococcus pyridinivorans* V51B.

La Figura 6.9 muestra la fotografía del gel de agarosa al 1 % con marcadores de peso molecular y el producto de la PCR purificado por electroforesis usando el sistema de purificación *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences, UK). El producto purificado, de 1.5 Kb se envió al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para su secuenciación con los mismos cebadores con los que se amplificó el gen del RNAr 16S.

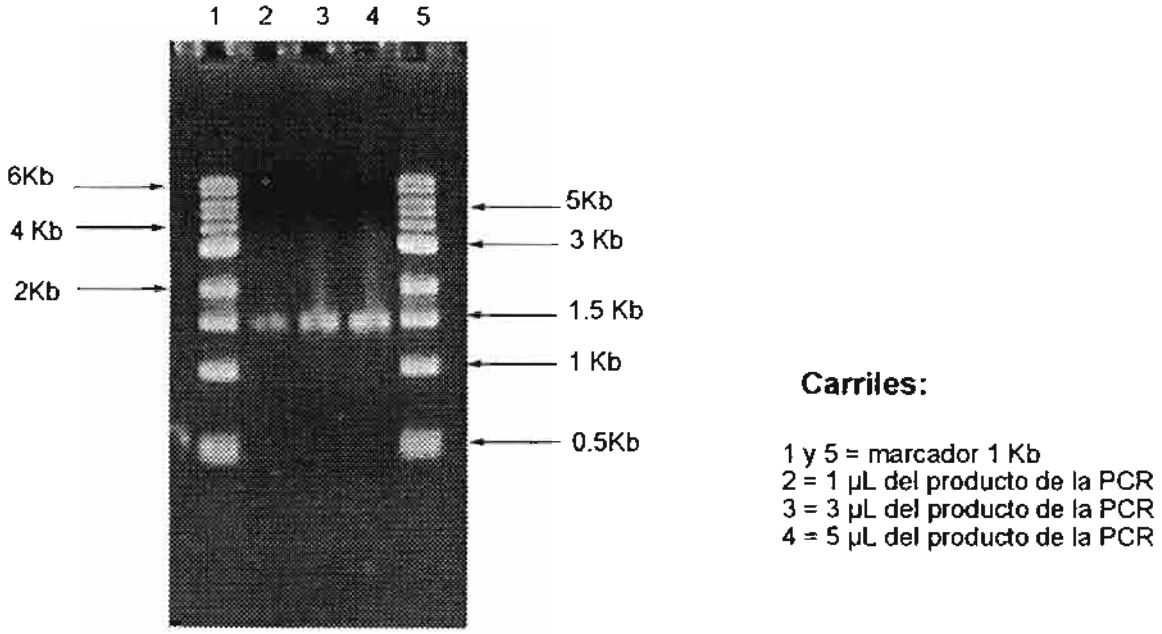


Fig. 6.9. Fotografía del gel de electroforesis que muestra el producto purificado de la PCR y marcadores de diferentes pesos moleculares

[148] K., Widada, J., Nakai, S., Endoh, T., Urata, M., Ashikawa, Y., Shintani, M., Saiki, Y., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T. and Nojiri, H. *Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1467.

Se evaluó la capacidad de V51B para la hidrólisis de fenilacetonitrilo, como un ejemplo de nitrilo alifático. La biotransformación se realizó con células íntegras y con extracto intracelular, obteniendo mejores resultados con este último método (Tablas 6.4 y 6.5).

Ahora bien, a pesar de que *R. pyridinivorans* V51B transformó eficientemente al benzonitrilo y al fenilacetonitrilo en los correspondientes ácidos carboxílicos, esta bioconversión no tuvo éxito empleando como sustrato el DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**), aun después de varios experimentos, en los que se evaluaron diferentes condiciones de biotransformación. Las variables que fueron examinadas fueron las siguientes: a) valores de pH entre 6.5 y 8.0; b) proporción de sustrato – biomasa de 1:30 a 1:50; c) el empleo de células íntegras de V51B y de su extracto intracelular. En todas las pruebas realizadas, se observó descomposición del sustrato, lo cual es consistente con lo que algunos autores han reportado para la biotransformación de aminonitrilos.[149] Esta descomposición es debida, en gran parte, a una reacción de tipo retro-Strecker[150,151] del aminonitrilo, en la que se produce el aldehído correspondiente (hidrocinamaldehído (**10**)) y amoniaco (Figura 6.10). De hecho, en los controles sin enzima de estos experimentos, se observó, en todos los casos, descomposición gradual del sustrato, desde las primeras dos horas, siendo completa la degradación en tres días. Este tipo de biotransformaciones puede ser útil cuando la velocidad de hidrólisis del nitrilo es alta. Así, por ejemplo, Wegman[151] describe la biotransformación de DL-fenilglicinonitrilo con células de *Rhodococcus* sp., a pH 7.4 y 30 °C, obteniendo en cuatro horas 48 % de la D-fenilglicinamida y 52 % de la L-fenilglicina.

[149] a) Wang, M. X. and Shuang-Jun, L. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 6925. b) Wang, M. X. and Shuang-Jun L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6542.
[150] López-Serrano, P.; Sheldon, R. A.; Jongejan, J. A.; van Rantwijk, F. Tetrahedron: *Asymmetry* **2001**, *12*, 219.
[151] Wegman, M. A.; Sheldon, R. A.; Heinemann, U.; Stolz, A.; van Rantwijk, F. *J. Mol. Catal. B:Enzim.* **2001**, *11*, 249.

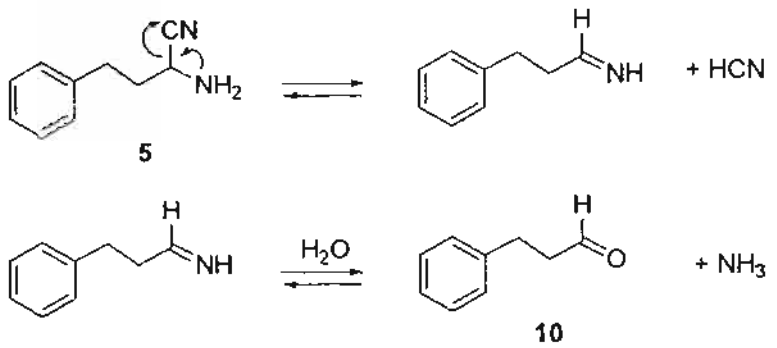


Fig. 6.10. Mecanismo para la reacción de descomposición del aminonitrilo **5**

Se buscaron aplicaciones para la cepa V51B en la hidrólisis de otros nitrilos, para lo cual se realizaron experimentos, empleando condiciones similares a las establecidas para la biotransformación de benzonitrilo, con células íntegras y con el extracto intracelular de V51B sobre diferentes sustratos, observándose inactividad frente a los sustratos α- y β-sustituidos (ver resultados en las Tablas 6.4 y 6.5).

Tabla 6.4. Biotransformación de nitrilos con células íntegras de V51B.

Nitrilo	*Tiempo (horas)*	*Rendimiento (%)*	*p.f. del producto (°C)*
benzonitrilo	2 [a]	45.4 [d]	118-120 [e]
fenilacetonitrilo	15 [a]	53.6 [d]	74-76 [f]
2-fenilpropionitrilo	168 [b]	-	
3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropionitrilo	168 [b]	-	
3-hidroxi-3-fenilpropionitrilo	168 [b]	-	
4-clorofenilacetonitrilo	168 [b]	-	
DL-2-(4-isobutilfenil)propionitrilo)	168 [b]	-	
2-amino-4-fenilbutironitrilo	168 [c]	-	

a) tiempo necesario para lograr la completa transformación del nitrilo; b) no se transformó el sustrato; c) descomposición del aminonitrilo; d) producto aislado y purificado; e) Lit.[152] 122-123, °C; f) Lit.[153] 77-78 °C.

[152] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 242381.
[153] *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Milwaukee: Aldrich Chemical Co. **2003-2004**. No. cat. 16621.

Tabla 6.5. Biotransformación de nitrilos con extracto intracelular de V51B.

Nitrilo	*medio*	*Tiempo (horas)*	*Rendimiento (%)*
benzonitrilo	a	2 [d]	92.3 [g]
fenilacetonitrilo	b	48 [d]	86.6 [g]
2-fenilpropionitrilo	b	168 [e]	-
3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropionitrilo	b	168 [e]	-
3-hidroxi-3-fenilpropionitrilo	a	168 [e]	-
4-metoxibenzonitrilo	b	24 [d]	84.7 [g]
4-clorofenilacetonitrilo	c	168 [e]	-
DL-2-(4-isobutilfenil)propionitrilo)	c	168 [e]	-
2-amino-4-fenilbutironitrilo	a	120 [f]	-

a = solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5; b = 95 % de solución amortiguadora de fosfatos100 mM de pH 7.5, 5 % de DMSO; c = 80 % de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.5, 20% de DMSO; d = tiempo en el que se observó completo consumo del nitrilo; e = no se consumió el sustrato; f = completa descomposición; g = cuantificado por HPLC.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

I. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un eficiente proceso modificado de la reacción de Bucherer-Bergs para la síntesis química de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina (**4**) que involucra procedimientos simples y limpios, lo que permitiría su posible escalamiento a nivel comercial.
2. La primera alternativa biotecnológica evaluada, en la que se exploró la viabilidad de someter al compuesto **4** a un proceso de resolución enzimática empleando PAR de diferentes especies de mamíferos, dio como resultado la obtención enantiopura de la *N*-acetil-D-homofenilalanina (**6**) y la L-homofenilalanina (**7**).
3. De las cinco especies de mamífero evaluadas, se observó que los polvos acetónicos obtenidos de riñones de bovino generaron los mejores resultados en la resolución enzimática de *N*-acetil-DL-homofenilalanina (**4**).
4. La segunda estrategia evaluada permitió el aislamiento e identificación de un microorganismo con capacidad de transformar nitrilos, obtenido de una muestra de suelo del poblado de Jiutepec, Mor. La cepa fue identificada como un miembro del género *Rhodococcus* mediante la secuenciación del gen RNAr 16S. El alineamiento de 1473 nucleótidos de este gen muestra 99.93 % de identidad con el gen RNAr 16S de la bacteria degradante de piridina *Rhodococcus pyridinivorans.*
5. Esta cepa, a la cual denominamos *Rhodococcus pyridinivorans* V51B, posee actividad nitrilasa, pero no nitrilo hidratasa ni amidasa.
6. Un extracto enzimático intracelular de *R. pyridinivorans* V51B que mantiene la actividad enzimática de nitrilasa de las células íntegras.
7. No se logró la biotransformación deseada sobre el 2-amino-4-fenilbutironitrilo (**5**) empleando células íntegras de *R. pyridinivorans*

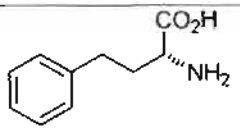
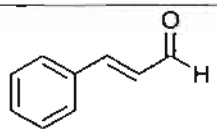
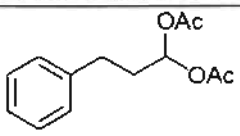
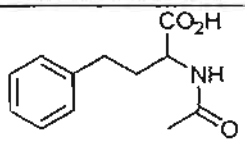
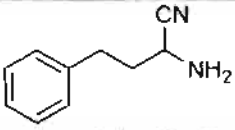
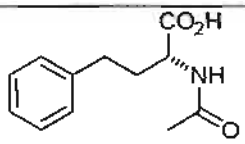
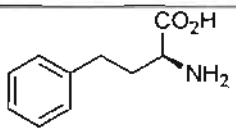
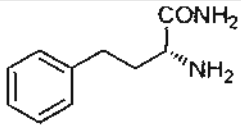
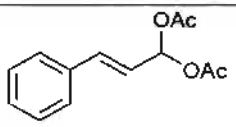
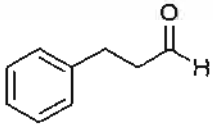
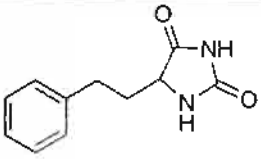
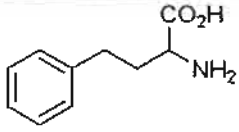
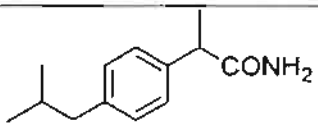
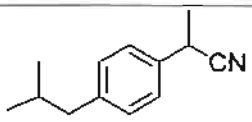
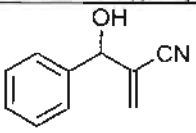
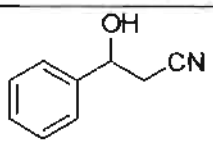
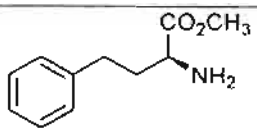
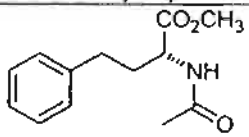
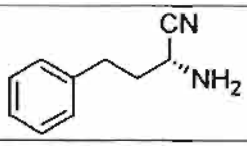
V51B, ni con su extracto intracelular, observándose descomposición, en tiempos largos de incubación del sustrato.

8. El procedimiento diseñado para la selección de microorganismos degradantes de nitrilos promete ser útil en la selección de otros microorganismos que posean este tipo de capacidad metabólica.

II. PERSPECTIVAS

1. Extender la aplicación de nuestro proceso modificado de Bucherer-Bergs a la síntesis de otros α-aminoácidos racémicos y someterlos al proceso de resolución con los PAR.
2. Evaluar la capacidad de los PAR en la resolución de *N*-acetil-DL-β-aminoácidos.
3. Evaluar la actividad aminoacilasa contenida en los PAR en reacciones de transesterificación con diversos sustratos.
4. Considerando la creciente demanda de compuestos orgánicos enantiopuros para la industria farmacéutica, agroquímica y de alimentos, propongo extender la búsqueda de microorganismos con actividad degradante de nitrilos empleando nuestro método de selección consistente en un medio mínimo salino conteniendo, como única fuente de carbono y nitrógeno, nitrilos racémicos precursores de ácidos carboxílicos quirales de interés comercial.
5. Extender el estudio de la actividad nitrilasa del extracto intracelular de *Rhodoccocus pyridinivorans* V51B, ya sea inmovilizada en algún material mesoporoso o bien liofilizando la fracción de proteínas precipitadas con sulfato de amonio, para evaluar su estabilidad y actividad, en disolventes orgánicos, frente a nitrilos precursores de ácidos carboxílicos de interés comercial. En caso de lograrse esto último, clonar y sobreexpresar la nitrilasa en *E. coli*.

8. ÍNDICE DE ESTRUCTURAS

1	 D-homofenilalanina	2	 cinamaldehído
3	 diacetato de hidrocinamaldehído	4	 DL-*N*-acetilhomofenilalanina
5	 DL-2-amino-4-fenilbutironitrilo	6	 D-*N*-acetilhomofenilalanina
7	 L-homofenilalanina	8	 D-homofenilalaninamida
9	 diacetato de cinamaldehído	10	 hidrocinamaldehído
11	 5-feniletilhidantoína	12	 DL-homofenilalanina
13	 DL-2-(4-isobutilfenil)propionamida	14	 DL-2-(4-isobutilfenil)propionitrilo
15	 3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropionitrilo	16	 3-hidroxi-3-fenilpropionaldehído
17	 éster metílico de L-homofenilalanina	18	 éster metílico de D-homofenilalanina
19			

Anexos

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Tetrahedron: Asymmetry 15 (2004) 1285–1288
Tetrahedron: Asymmetry

Enzymatic resolution of *N*-acetyl-homophenylalanine with mammalian kidney acetone powders

Ignacio Regla,[a,b,*] Héctor Luna,[a] Herminia I. Pérez,[a] Patricia Demare,[b] Ismael Bustos-Jaimes,[c] Victor Zaldívar[b,c] and Mario L. Calcagno[c]

[a]*Depto. Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Apdo. Postal 23-181, México, D.F., Mexico*

[b]*Laboratorio de Síntesis de Fármacos, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 09230, México, D.F., Mexico*

[c]*Laboratorio de Fisicoquimica e Ingenieria de Proteínas, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), PO Box 70-159, 04510 México, D.F., Mexico*

Received 5 January 2004; accepted 24 February 2004

Abstract—Kidney acetone powders (KAP) from beef, dog, hog, rat, and sheep have been evaluated for resolving *N*-acetyl-DL-homophenylalanine. We also propose a simple protocol for the preparation of both enantiomers of homophenylalanine by enzymatic resolution using mammalian KAP. The beef kidney afforded the best results, rendering the highest isolated yields, 37.5% and 41% and enantiomeric excesses of 94% and >99% for both D-*N*-Ac-homophenylalanine and L-homophenylalanine, respectively.
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, such as Benazepril **1**, Temocapril **2**, Cilazapril **3**, and Enalapril **4** (Fig. 1), contain an L-homophenylalanine ethyl ester moiety in their structure, which can be efficiently introduced through nucleophilic displacement of the corresponding chiral amine over (*R*)-2-nosyloxy-4-phenylbutyric acid ethyl ester **5**, as shown in Scheme 1 for the synthesis of Benazepril **1**,[1] with a concomitant inversion of configuration. The homochiral α-substituted ester **5** can be obtained from D-homophenylalanine (D-HPA) **6** (Scheme 2).

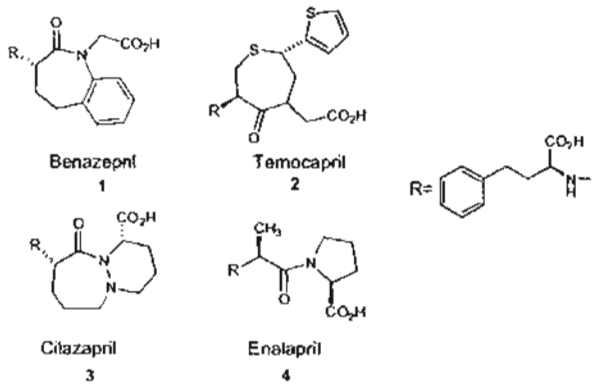
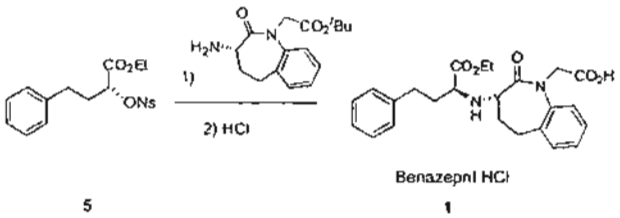


Figure 1. Some ACE inhibitors holding the L-HPA moiety.



Scheme 1. Synthesis of Benazepril from (*R*)-2-nosyloxy-4-phenylbutyric acid ethyl ester.

Scheme 2. Reagents: (a) $NaNO_2$, H_2SO_4, H_2O (89%); (b) $SOCl_2$, ethanol. (65%); (c) NsCl, Et_3N (74%).

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5623-0727; fax: +52-55-5642-8977; e-mail: regla@servidor.unam.mx

0957-4166/$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved
doi:10.1016/j.tetasy.2004.02.026

Table 2. D-*N*-Ac-HPA **13** from enzymatic resolution of **11**

Mammalian	Isolated yield (%)	$[\alpha]^a$ (*c* 1, CH_3OH)	Ee[b] (%)
Sheep	26%	−18.9	94
Beef	37.5%	−19.5	>99
Hog	33%	−19.4	96

[a] Lit.[8] $[\alpha] = -19.2$ (*c* 1.0, CH_3OH).
[b] Determined as the methyl ester on a CHIRALCEL OD column.

A series of tubes containing varying substrate (*N*-acetyl-DL-homophenylalanine) concentration were prepared and the reaction started by the addition of the KAP extract. L-HPA was measured colorimetrically by the ninhydrin method modified by Doi et al.[10] Commercial DL-HPA was used as standard.

Samples were taken at different times to follow the time course of the hydrolysis. Linear product concentration versus time was obtained for 360 min under our experimental conditions. From these data, initial reaction rates were calculated for each substrate concentration and the data fitted to hyperbolic kinetics by nonlinear regression analysis with the program Prism 3.0 cx for Macintosh. The fitted curve and parameters are shown in Figure 2.

From the obtained V_{max} value and the measured protein concentrations in the sample, a specific activity of 3.9 μmole min^{-1} mg^{-1} was calculated for beef material.

A simplified estimation of the specific activities of sheep and hog extracts were performed by measuring the HPA produced over a fixed incubation time, at variable *N*-acetyl-DL-HPA concentration. Measured rates were lower than those in Figure 2, so the linearity of the reaction rate at each substrate concentration can be assumed with confidence. The data for all the KAP extracts are shown in Table 3.

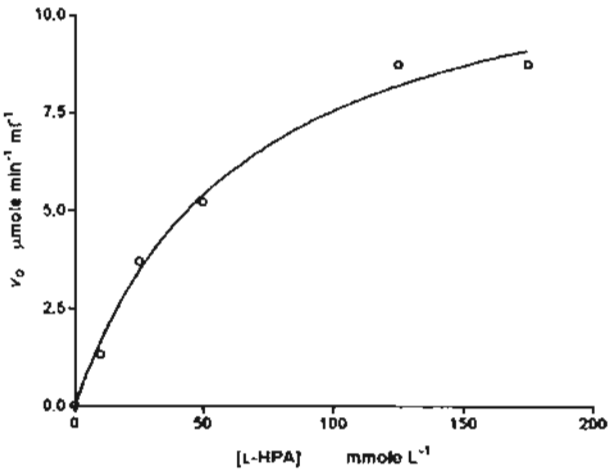


Figure 2. Curve of initial velocity against substrate concentration. Data fitted to Michaelis–Henri kinetics, as detailed in the text. Extract concentration: 3.165 mg mL^{-1}. V_{max}: 12.4±0.98 μmole min^{-1} mL^{-1}; $K_m = 65.0 \pm 12.7$ mmole L^{-1}.

Table 3. Specific activities for the different KAPs

KAP	Specific activity (μmole min^{-1} mg^{-1})
Beef	3.91
Hog	2.51
Sheep	2.54

3. Experimental

3.1. Preparation of kidney acetone powders

Beef, sheep, and hog kidneys were obtained from recently slaughtered animals from a nearby slaughterhouse. Dog kidneys were supplied by the local dog control center and rat kidneys from the animal breeding facility of our university. Fresh sheep kidneys (142 g) were blended in 420 mL of chilled acetone using a household blender and filtered through a Büchner funnel. The cake was treated twice in the same manner, until the filtrate was colorless. The solid residue was air dried under the hood and sifted on a 20-mesh sieve. The procedure yielded 22.4 g of dry powder, which was kept at −20 °C. A similar procedure was used to obtain beef, dog, hog, and rat KAP. A typical KAP preparation kept its specific activity after six months.

3.2. Chemical synthesis

3.2.1. DL-Homophenylalanine 14. A 1 L stainless steel reactor was charged with 81.73 g (0.402 mol) of DL-5-phenethylhydantoin **10**, 400 mL of water and 48.31 g (1.207 mol) of NaOH. After closing the vessel, the mixture was heated for four hours at 130–132 °C. The reaction mixture was treated with activated charcoal for 5 min, filtered over diatomaceous earth and washed with water. After acidifying to pH 6.3 with 10 M HCl and cooling to 0–5 °C for 1 h, a beige powder crystallized out, which was filtered, washed with water, and dried at 60 °C until a constant weight was seen. The yield of **14** was 56.63 g (74.3%), mp 279–280 °C [lit.[11] m.p. 282 °C (dec)].

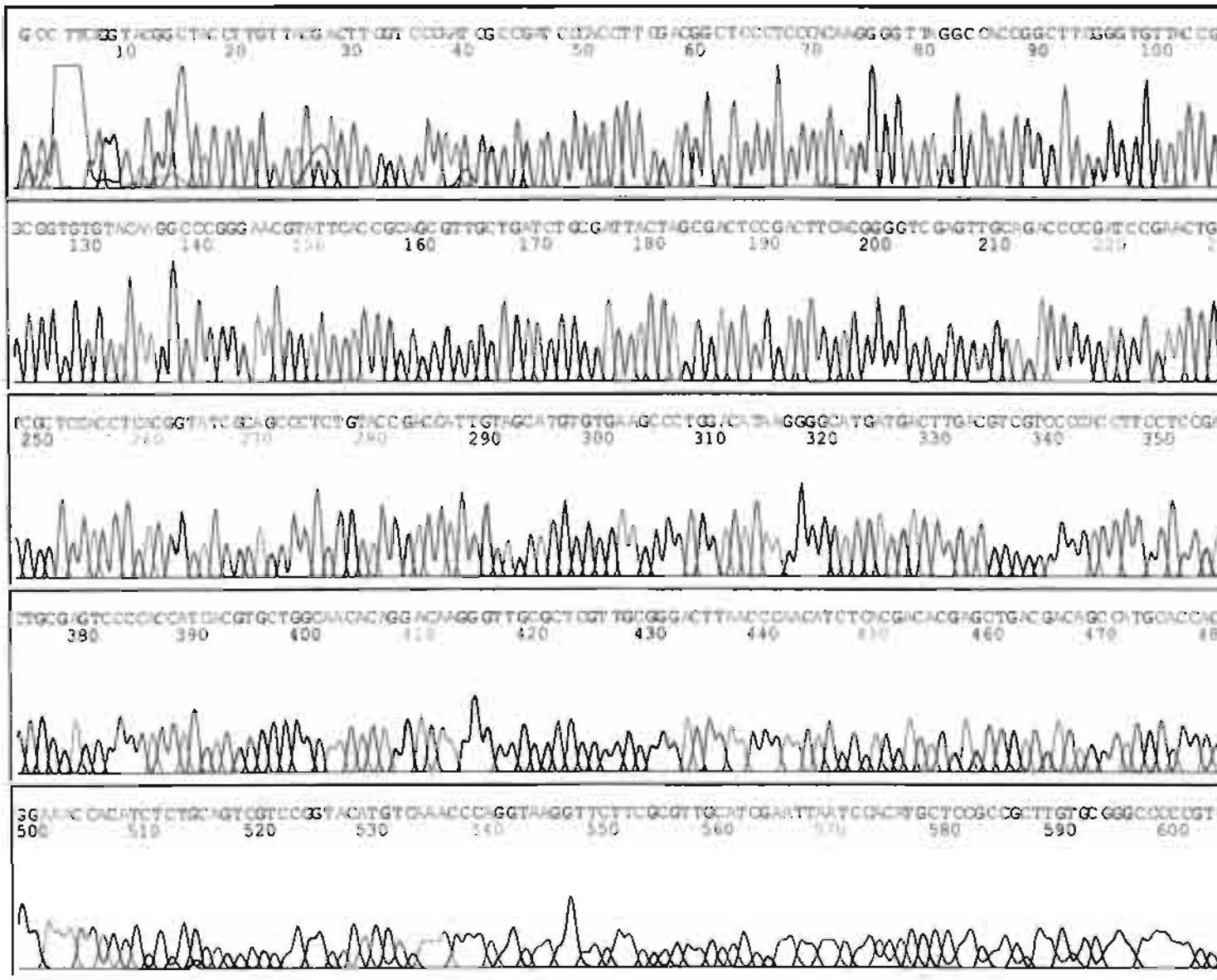
3.2.2. DL-*N*-Acetyl-homophenylalanine 11. To a cold solution of 12.5 g (69.7 mmol) of **14** in 115 mL of water, and 2.79 g (69.7 mmol) of NaOH (0–5 °C), were added 9.26 g (90.6 mmol) of acetic anhydride, while the pH was kept in the range 11–11.5 by adding 50% NaOH, at the same temperature. Temperature and pH were maintained for one hour; after acidifying to pH 2.3 with 10 M HCl, the mixture was kept at 0–5 °C for 1 h, filtered and washed with the minimum amount of water. The yield of compound **11** was 13.8 g (89.5%), m.p. 145–147 °C, [lit.[12] m.p. 147–148 °C].

3.3. Enzymatic hydrolysis

A mixture of 2.4 g of **11** and 60 mL of 0.2 M potassium phosphate buffer pH 7.5, containing 10 mg L^{-1} of $CoCl_2$ was adjusted to pH 7.5 with 6 M NaOH. The solution

Model 3100 V51B_rd1.ab1
Version 3.7 Ignacio Regla
Basecaller-3100SR.bcp 9036
BC 1.3.0.0 Cap 10

Signal G:730 A:281 T:242 C:264
DT3100POP6{BD}v2.mob
demo_3100
Points 486 to 10106 Pk 1 Loc: 486

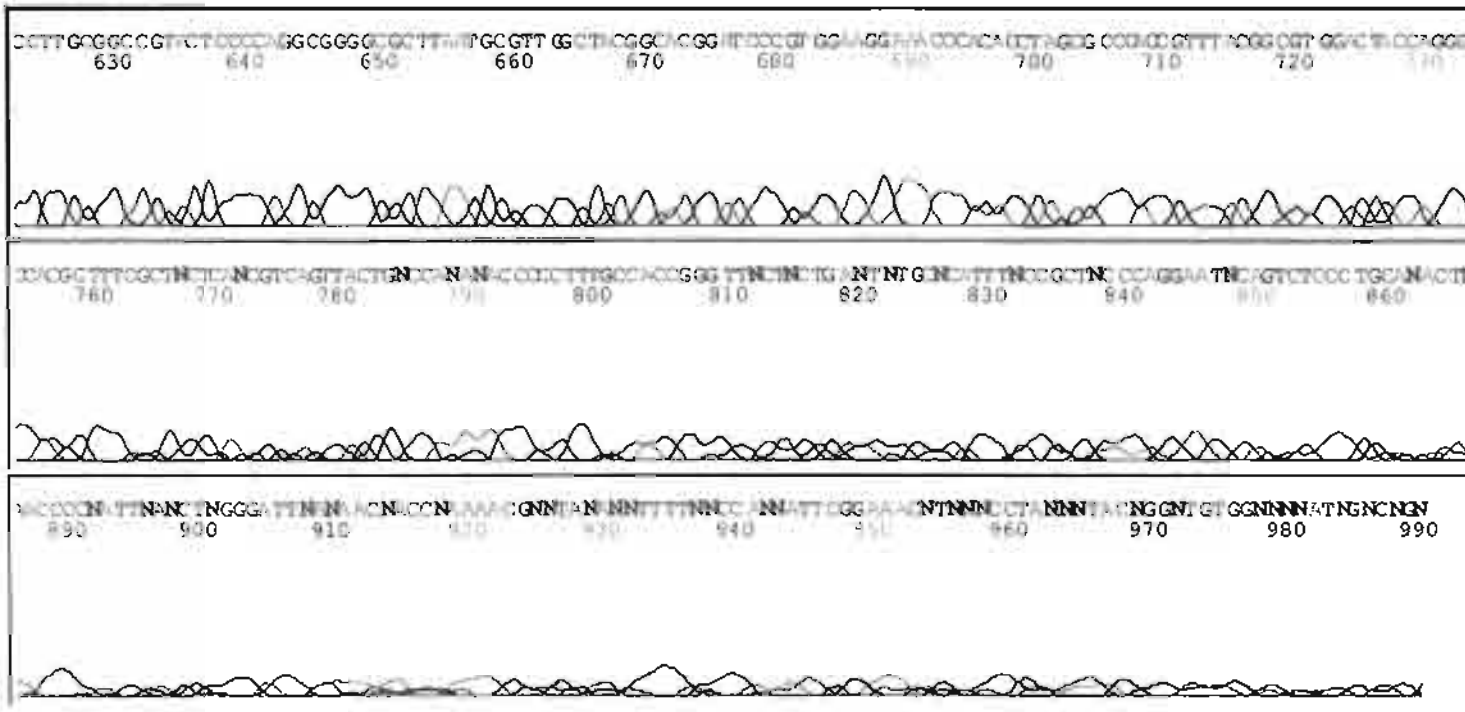


ABI PRISM

Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

V51B_rd1.ab1
Ignacio Regla
9036
Cap 10

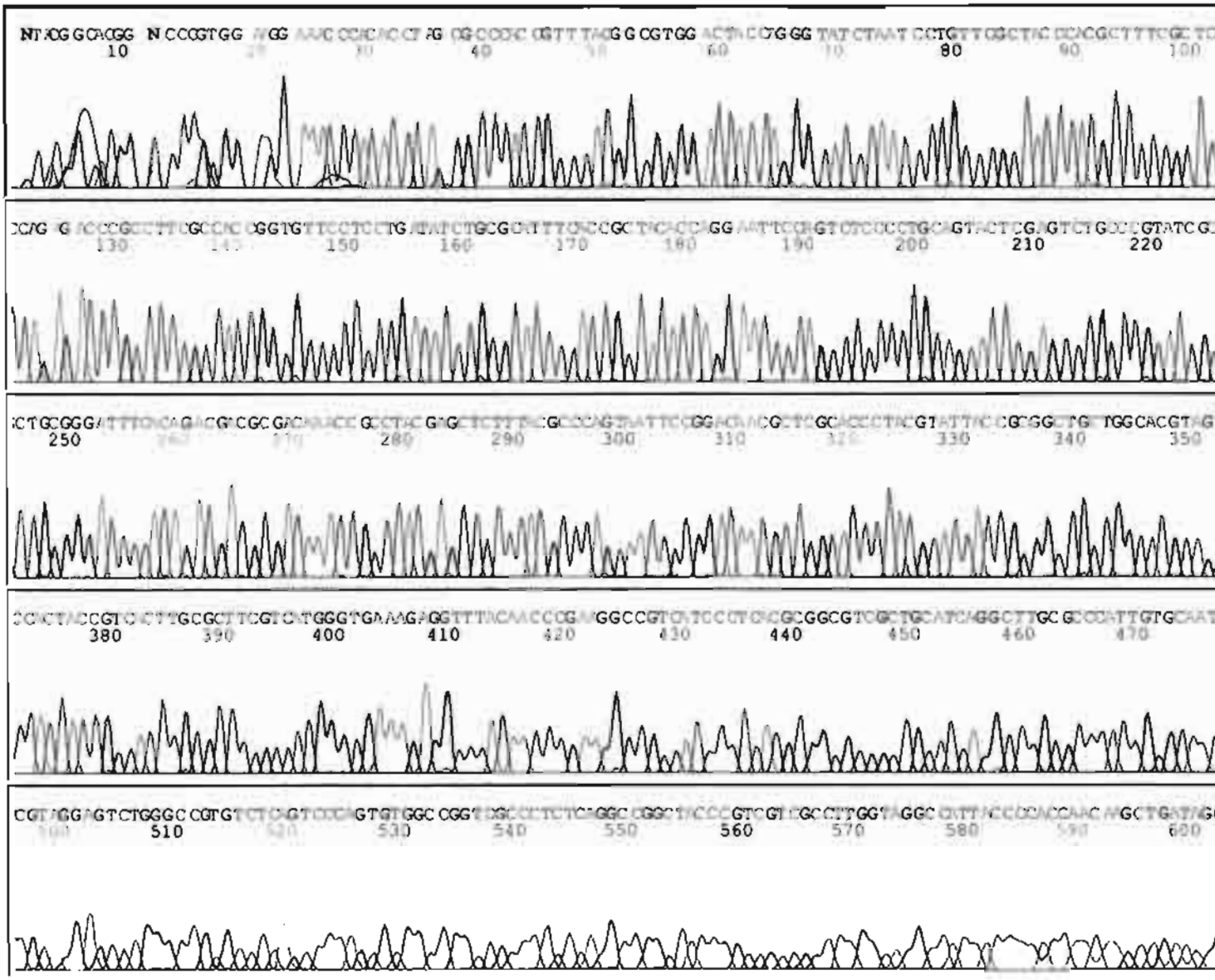
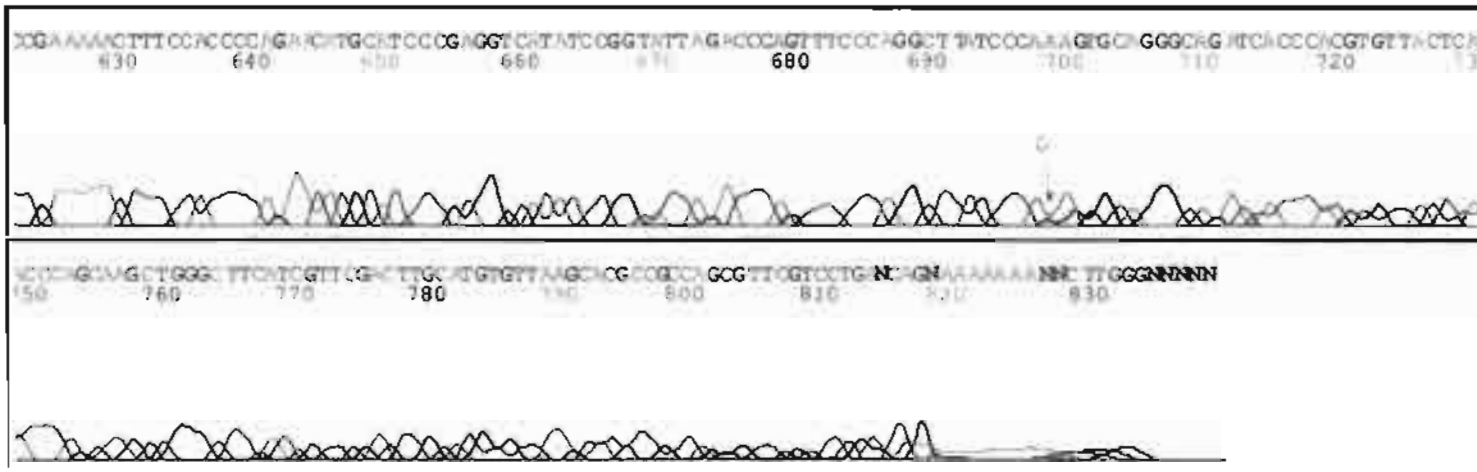
Signal G:730 A:281 T:242 C:264
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 486 to 10106 Pk 1 Loc: 486



AGN AGENCIA NACIONAL DE SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

Model 3100 V51B_3915.ab1
Version 3.7 Ignacio Regla
Basecaller-3100SR.bcp 9140
BC 1.3.0.0 Cap 15

Signal G:823 A:354 T:299 C:346
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 518 to 9200 Pk 1 Loc: 518



Model 3100	V51B_3915.ab1	Signal G:823 A:354 T:299 C:346	
Version 3.7	Ignacio Regla	DT3100POP6{BD}v2.mob	Fri
Basecaller-3100SR.bcp	9140	demo_3100	Wed
BC 1.3.0.0	Cap 15	Points 518 to 9200 Pk 1 Loc: 518