

MODELADO DE LA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMACIÓN TIPO BAEYER-VILLIGER MEDIANTE EL USO DE *E. coli* TOP10 pQR239.

Daniel Torres Martínez, Mariano Gutiérrez Rojas, Germán Aroca Arcaya, Sergio Huerta Ochoa. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa Av San Rafael Atlixco No. 186, Col Vicentina, México D.F. CP 09340, teléfono/fax: 01(55)58046554, sho@xanum.uam.mx. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Av Brasil 2147, Valparaíso Chile.

Palabras clave: biocatálisis, oxidaciones Baeyer-Villiger, modelamiento.

Introducción. La cepa *E. coli* TOP10 pQR239 [1] fue desarrollada para ser usada como biocatalizador en reacciones del tipo Baeyer-Villiger (Fig. 1). Sin embargo hasta el momento no se ha reportado un modelo cinético para este biocatalizador que pueda usarse en el diseño y operación de un biorreactor de partición.

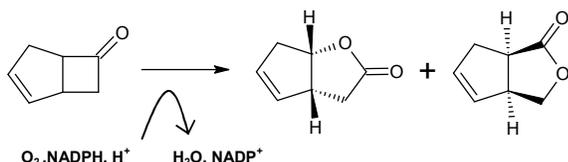


Fig. 1. Biocatálisis tipo Baeyer-Villiger de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one en (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona y (-)-(1R,5S)-3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona Doig et al. (2003)

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo cinético de reacción que nos permita predecir la velocidad de biotransformación de la cetona estudiada a sus correspondientes lactonas.

Metodología. Se propagó el biocatalizador (*E. coli*) a 37°C en un medio definido utilizando glucosa como fuente de carbono, y L-Arabinosa como inductor de la enzima intracelular ciclohexanona monooxigenasa. Posteriormente se cosecharon las células y se pusieron a reaccionar en buffer de fosfatos 50 mM pH7 con 10 g L⁻¹ de glicerol, a 37 °C a diferentes concentraciones iniciales de cetona (0.05 g L⁻¹ a 2 g L⁻¹). El volumen de reacción fue de 20 mL con agitación magnética. Durante los experimentos se controló el % de oxígeno disuelto (80%) medido con un electrodo de oxígeno disuelto. La cuantificación de sustrato y producto se hizo por cromatografía de gases.

Resultados y discusión. Se observa en la Figura 2 que la velocidad de biotransformación se ve disminuida a concentraciones mayores de 1.0 g L⁻¹ de sustrato. La expresión cinética de inhibición por sustrato (Ecuación 1) fue la que presentó el mejor ajuste a los resultados experimentales:

$$V = \left(\frac{V_{max} * S}{K_s + S} \right) * \exp\left(-\frac{S^3}{K_i} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde V= velocidad de producción de lactonas, V_{max}= velocidad máxima, S=concentración de sustrato, K_s= constante de afinidad, K_i= constante de inhibición. Para realizar el ajuste no lineal se usó el algoritmo de Levenberg-Marquardt de SigmaPlot 10.0, los valores de los diferentes parámetros del modelo fueron V_{max}=0.004 g L⁻¹ min⁻¹, K_s=2.15x10⁻¹¹ g L⁻¹, K_i=6.71 g L⁻¹, con una R²=0.9524.

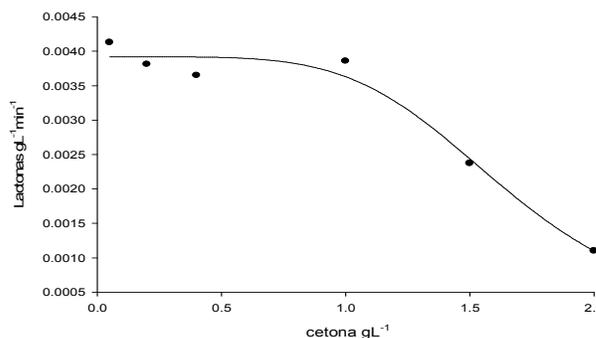


Fig. 1. Efecto de la concentración de cetona sobre la velocidad inicial de producción de lactonas, (●) Valores experimentales, (—) modelo cinético de reacción

Esta disminución de la actividad podría deberse a una muerte celular por la toxicidad del sustrato [2]. La reacción no sólo depende de la presencia de la ciclohexanona monooxigenasa, de sustrato y de oxígeno sino que es necesario que la célula este metabólicamente activa para regenerar el NADP(H). Çelik y col. [3] utilizando un modelo de inhibición por sustrato del tipo Haldane obtuvieron un buen ajuste de los datos experimentales de la biotransformación de 2-feniletanol a 2-fenilacetaldehído con *Gluconobacter oxydans*. Sin embargo, el modelo de inhibición por sustrato de Haldane no se ajustó a los datos experimentales obtenidos en este trabajo, probablemente debido a que la reacción Baeyer-Villiger tiene un mecanismo de reacción más complejo que la oxidación de alcoholes.

Conclusiones. Para la reacción Baeyer-Villiger estudiada no se observó una cinética tipo Michaelis-Menten, la biotransformación se ve inhibida por el sustrato, alcanzándose el 50% de la velocidad máxima a concentraciones de 1.6 g L⁻¹. El modelo de inhibición por sustrato propuesto tiene un factor exponencial que permitió un buen ajuste a los datos experimentales.

Agradecimientos. CONACYT proyecto No. SEP-2003-C02-42692, proyecto Alfa BIOPROAM. No. AML/190901/06/18414/II-0548

Bibliografía.

- Doig, S, Simpson, H, Alphand, V, Furstoss, R, Woodley J. (2003). Characterization of a recombinant *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer-Villiger oxidations. *Enzyme Microb Technol.* Vol. (32): 347-355.
- Hilker, I, Baldwin, C, Alphand, V, Furstoss, R, Woodley, J y Wohlgemuth, R. (2006) On the influence of oxygen and cell concentration in an SFPR whole cell biocatalytic baeyer-Villiger oxidation process. *Biotechnol Bioeng.* Vol. (93):1138-1144
- Çelik, D, Bayraktar, E y Mehmetoğlu, Ü. (2004) Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system. *Biochem Eng J.* Vol. (17): 5-13