

PRODUCCIÓN DE D-AMINOÁCIDO OXIDASA DE *RHODOTORULA GRACILIS*: OPTIMIZACIÓN Y CAMBIO DE ESCALA

(D-aminoácido oxidasa/*Rhodotorula gracilis*/cefalosporina C)

ANTONIO AYLLÓN SÁNCHEZ*, FERNANDO RAMÓN OLAYO*, TERESA ZAMARRO MOLINA*, GILDA GUERRA RIVERA** Y M^a ISABEL DE LA MATA RIESCO*

* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. 28040 Madrid. España.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Cuba.

RESUMEN

Se ha aumentado el contenido de D-aminoácido oxidasa en las células de *Rhodotorula gracilis* en condiciones de inducción, estableciendo las concentraciones adecuadas de cada constituyente del medio de producción. Asimismo, se ha caracterizado el cambio de escala en la producción, efectuado desde fermentación en discontinuo en incubadora con matraces de 1 l de capacidad con 0,25 l de caldo, hasta cultivo discontinuo en fermentador con 5 l de volumen de trabajo. La producción de D-aminoácido oxidasa está asociada al crecimiento y el final de la fermentación se estableció a las 22 horas. Los parámetros de la fermentación fueron: $\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/D-Ala} = 1,94 \text{ mg de biomasa producida/mg de D-alanina consumida}$, $Y_{x/glucosa} = 0,8 \text{ mg de biomasa producida/mg de glucosa consumida}$, $q_{D-Ala} = 0,11 \text{ h}^{-1}$, $q_{glucosa} = 0,26 \text{ h}^{-1}$, $Y_{p/x} = 8,42 \text{ U.I. producidas/g de biomasa producido}$, $q_p = 1,78 \text{ h}^{-1}$, $Y_{p/D-Ala} = 16,33 \text{ U.I. producidas/g de D-alanina consumido}$ y $Y_{p/glucosa} = 6,73 \text{ U.I. producidas/g de glucosa consumido}$. Una vez optimizada la producción de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* mediante fermentación se procedió a caracterizar funcionalmente la enzima llevando a cabo estudios de estabilidad y actividad frente a pH y temperatura. Asimismo, se determinó la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius: $\Delta E_a = 15,06 \text{ k J.mol}^{-1}$.

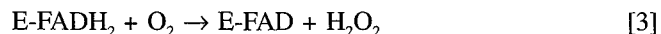
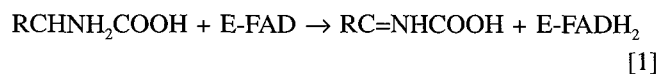
ABSTRACT

Culture broth composition has been optimized under induction conditions in order to enhanced D-aminoacid oxidase production from *Rhodotorula gracilis* cells. Scaling up has been characterized from 0.25 l to 5 l medium in batch fermentation. D-aminoacid oxidase production is growth associated. Fermentation was carried out during 22 hours. The fermentation parameters were: $\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/D-Ala} = 1.94 \text{ mg}$

biomass produced/mg D-alanine consumed, $Y_{x/glucose} = 0.8 \text{ mg}$ biomass produced/mg glucose consumed, $q_{D-Ala} = 0.11 \text{ h}^{-1}$, $q_{glucose} = 0.26 \text{ h}^{-1}$, $Y_{p/x} = 8.42 \text{ I.U. produced/g biomass produced}$, $q_p = 1.78 \text{ h}^{-1}$, $Y_{p/D-Ala} = 16.33 \text{ I.U. produced/g D-alanine consumed}$ and $Y_{p/glucose} = 6.73 \text{ I.U. produced/g glucose consumed}$. Functional characterization of D-aminoacid oxidase was carried out after optimization of D-aminoacid oxidase production from *Rhodotorula gracilis* by fermentation. Stability and activity to pH, and temperature and E_a ($15.06 \text{ k J.mol}^{-1}$) by Arrhenius plot were determined.

INTRODUCCIÓN

La D-aminoácido oxidasa (E.C. 1.4.3.3., DAAO) es una flavoproteína que cataliza la oxidación de D-aminoácidos a sus correspondientes iminoácidos, que son hidrolizados espontáneamente a α -cetoácidos y amoníaco de acuerdo con el esquema I:



Durante la reacción el cofactor, FAD, es reducido [1] llevándose a cabo la reoxidación mediante oxígeno molecular produciéndose agua oxigenada [3]. Esta reacción tiene varias aplicaciones biotecnológicas e industriales como son la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos, producción de α -cetoácidos, determinación analítica de aminoácidos y, la más interesante desde el punto de vista industrial, la obtención del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), producto de partida para la producción de cefalosporinas semisintéticas (1).

La DAAO, enzima intracelular localizada en peroxisomas, está ampliamente distribuida. Su actividad ha sido detectada en gran número de organismos, tanto animales como vegetales y microorganismos, siendo la enzima de riñón de cerdo la más ampliamente estudiada (2), si bien las enzimas de las levaduras *Trigonopsis variabilis* y *Rhodotorula gracilis* son más interesantes desde el punto de vista biotecnológico (3-6). La DAAO de *Rhodotorula gracilis* es un homodímero de 78 kDa con una molécula de FAD por monómero fuertemente unida, si bien esta unión no es de tipo covalente (2). Presenta una serie de propiedades que la hacen más idónea que las otras D-aminoácido oxidasas para su utilización biotecnológica e industrial, como son su elevada eficacia catalítica, un mayor número de recambio respecto a varios sustratos incluida la cefalosporina C (7), fuerte unión del cofactor FAD (8), alta estabilidad de la forma dimérica activa (9) y mayor resistencia a la oxidación por H_2O_2 , uno de los productos de la reacción. Su producción es inducible, siendo el inductor más efectivo la D-alanina, consiguiéndose la máxima expresión de DAAO cuando en el medio se encuentran D-alanina como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono (10).

Dado el elevado interés biotecnológico e industrial de esta enzima, sobre todo en su posible aplicación en la obtención industrial del 7-ACA, nuestro grupo de trabajo ha abordado la mejora de la producción de DAAO mediante procesos fermentativos de la levadura *Rhodotorula gracilis*, optimizando la concentración de los componentes del medio de cultivo y llevando a cabo un cambio de escala, consiguiendo mayor cantidad de biomasa celular con alto contenido en DAAO. Asimismo, y tras establecer un método de extracción y purificación de la enzima, hemos realizado una caracterización funcional de la DAAO determinando su estabilidad y actividad respecto al pH y temperatura y la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

El microorganismo utilizado en el presente trabajo ha sido la levadura *Rhodotorula gracilis*, suministrada por American Type Culture Collection, cepa nº 26217. Extracto de levadura, extracto de malta y peptona fueron de Difco (USA). D-fenilglicina, D-alanina, fluorescamina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron de Sigma (USA). β -mercaptoetanol y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) fueron de Fluka (Suiza). Todos los demás reactivos y disolventes fueron productos analíticos de Merck (Alemania). Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro DU-70 de Beckman (USA).

Condiciones de fermentación

El medio de producción y las condiciones de fermentación utilizadas fueron las descritas en la bibliografía (10) y

usadas habitualmente por nuestro grupo de trabajo (11) a pH inicial de 5,6, medio tamponado con MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico), y temperatura constante de 30°C. El resto de condiciones fueron las requeridas por la experimentación:

a) *Estudios de optimización.* Una vez elaborados, los medios se esterilizaron en autoclave a una presión manométrica de 1 kg/cm², a 110°C durante 30 minutos. A continuación, cada matraz se inoculó en condiciones de esterilidad con 40.000 células por ml de caldo de cultivo. La fermentación se llevó a cabo en un fermentador New Brunswick termostatzado provisto de agitación rotatoria. La fermentación se mantuvo durante 48 horas.

b) *Cultivo en fermentador.* Se utilizó un fermentador B. Braun-Biotech fabricado en Alemania, con una capacidad máxima de trabajo de 5 l. La esterilización del medio se llevó a cabo en el propio incubador a 110°C durante 30 minutos. El fermentador, conteniendo 4,75 l de medio estéril se inoculó, en condiciones de esterilidad, añadiendo 250 ml de suspensión celular, en medio de cultivo estéril, con una D.O. a 660 nm de 2, obteniéndose un volumen final de 5 l, con una D.O. a 660nm de 0,1 que corresponde a una concentración de 1.920.000 células por ml. Durante la fermentación la temperatura fue constante y la pO₂ se mantuvo entre el 50 y el 100% de saturación mediante flujo de aire constante de 10 l/min y variando la agitación entre 150 y 750 r.p.m..

Extracción y purificación de la enzima

Se llevó a cabo como se describe en la bibliografía (11). Una vez cultivada la levadura, se centrifugó el caldo y la pasta celular resultante se pesó (peso húmedo) y se liofilizó en un liofilizador Labconco. Con el liófilo resultante se determinó el peso seco y a continuación se molió con perlas de vidrio a 4°C (300 μ m de diámetro, 0,5 g/g de células). El polvo resultante se resuspendió (240 g células/l) en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5 con EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5 mM y PMSF 1 mM; se mantuvo en agitación durante 2 h a 4°C y se centrifugó a 4.000 g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (12) y la actividad enzimática como se describe a continuación en este apartado. Asimismo, el sobrenadante se sometió a un proceso de purificación de la enzima, mediante el método descrito en la bibliografía (11).

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la D-aminoácido oxidasas se determinó utilizando D-fenilglicina como sustrato. 2,5 mg de enzima se incubaron con 25 mM de D-fenilglicina en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, en un volumen final de 1 μ l, a 30°C durante 10 minutos. La liberación de ácido benzoilfórmico se analizó mediante el incremento de absorbancia a 252 nm una vez detenida la reacción mediante la adición de 100 ml de ácido acético (13).

Estudios de estabilidad y actividad de la enzima

Se han llevado a cabo con la enzima pura. Los estudios de actividad se realizaron en tampón fosfato-pirofosfato 25 mM-25 mM a las temperaturas y pHs señalados. Las condiciones fueron las mismas que en el ensayo estándar. A todos los tampones de ensayo se les añadió NaCl hasta alcanzar una fuerza iónica de 0,5M.

Para los estudios de estabilidad se valoró la actividad residual después de preincubar la enzima a los pHs y temperaturas señalados durante 10 minutos en tampón fosfato-pirofosfato 25 mM-25mM con una fuerza iónica de 0,5 M. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que el ensayo estándar.

Valoración de glucosa

Se llevó a cabo por el método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS) que forma un complejo coloreado con los azúcares reductores (14). A 2 ml de muestra se adicionaron 3 ml del reactivo DNS, se introdujo en un baño a 100°C durante 10 minutos, tras los cuales se detuvo la reacción por inmersión en un baño de hielo. Después de 10 minutos de reposo se leyeron las absorbancias a 640 nm. La concentración de azúcares reductores se calculó a partir de la recta patrón construida utilizando una solución de glucosa de 2 mg/ml.

Valoración de D-alanina

Se realizó utilizando el método fluorimétrico de la fluorescamina (15). Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer MPF-44E equipado con una unidad diferencial de corrección de espectros (DCSU), a 25°C en cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico. Los monocromadores de excitación y emisión se ajustaron a 390 nm (anchura de rendija 7 nm) y 475 nm (anchura de rendija 9 nm) respectivamente. Todas las medidas se registraron en modo *ratio*.

Alícuotas de 0,5 ml de muestra se adicionaron directamente sobre 0,5 ml de fluorescamina (0,15 mg/ml) en acetona e inmediatamente se añadió 1,5 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 7,8 y se procedió a su lectura. La concentración de D-alanina se determinó utilizando patrones de D-alanina de concentración conocida en cada ensayo.

RESULTADOS

Optimización del medio de cultivo

Se llevó a cabo mediante el método Rosebrock modificado (16). Para cada variable, los experimentos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 62,5 ml de caldo (relación entre volumen de

medio y volumen de matraz=1/4). Se partió de la composición del medio descrita (10 y 11). Después de la fermentación, siguiendo la metodología descrita en el apartado de extracción y purificación de la enzima de materiales y métodos, el contenido de cada matraz se procesa obteniéndose un extracto celular donde se procede a determinar la concentración de proteínas y la actividad enzimática. Las actividades específicas de cada muestra son tomadas como criterio de optimización. Los resultados se analizan de la siguiente forma:

Variable	Resultado	
	Positivo	Negativo
$x_1 > x_0$	$F(x) > F(x_0)$	$F(x) \leq F(x_0)$
$x \leq x_0$	$F(x) \geq F(x_0)$	$F(x) < F(x_0)$

siendo x_1 el valor experimental de la variable, x_0 el valor inicial de la variable y F la función evaluada o criterio de optimización. Cada próximo experimento se diseña de acuerdo a las siguientes consideraciones:

Positivo	Negativo
$K = 3K$	$K = -1/2K$
$x_0 = x_1$	$x_0 = x_0$
$x_1 = x_0 + 3K$	$x_1 = x_0 - 1/2K$

donde K es el factor de variación de cada variable en cada experimento. Los análisis estadísticos comparativos se efectuaron mediante *t de Student*, partiendo de 3 réplicas en cada experimento.

En la tabla I se muestran los valores de concentración inicial (x_0) junto con los factores de variación (K) fijados para el primer bloque de experimentos y el valor experimental para cada variable (x_1), así como las actividades específicas y los resultados. Estos fueron negativos salvo en el caso de la D-alanina que resultó positivo al aumentar su concentración, por lo que en el siguiente experimento se disminuyeron las concentraciones de todos los compuestos excepto la de D-alanina que se aumentó otra vez. En este caso ningún factor de variación resultó positivo (dato no mostrado), por lo que todos ellos cambiaron de signo y redujeron su valor a la mitad para el siguiente experimento. De nuevo los resultados mostraron un carácter negativo. Los factores de variación para el experimento 4 vuelven a oscilar en su signo y no superan en su mayoría el 3% del valor de concentración inicial de sus respectivas variables, por lo que, teniendo en cuenta que una variable se considera optimizada cuando se produce una oscilación del signo del factor K siendo éste pequeño, se consideró que el medio de cultivo estaba optimizado. La composición óptima del medio es la que refleja la tabla II como concentración inicial (x_0).

Optimización del cambio de escala

Una vez optimizado el medio de cultivo, se procedió a caracterizar la fermentación de *Rhodotorula gracilis* en un

Tabla I. Experimento 1 para la optimización de la concentración de los constituyentes del medio para la producción de DAO de *Rhodotorula gracilis*.

Constituyentes del medio (Variables)	² x_0 Concentración inicial	² K Factor variación	² x_1 Valor experimental	³ Actividad específica	Resultado
Control				0,0499	
Na CL	0,5026	0,1	0,6026	0,0486	—
MgSO ₄	0,482	0,05	0,532	0,0446	—
K ₂ HPO ₄	0,9929	0,2	1,1929	0,0389	—
CaCl ₂	0,2553	0,01	0,2653	0,0355	—
MES	4,88	1	5,88	0,0563	—
D-Ala	2,6727	0,5	3,1727	0,0654	+
Glucosa	9,008	2	11,008	0,0534	—
¹ Solución oligoelementos	1	0,2	1,2	0,0519	—

¹ Solución de oligoelementos constituida por: 2 g/l de 7H₂O.ZnSO₄, 6,1 g/l de EDTA (sal férrico sódica), 5,1 g/l de Tiamina HCl, 2,4 g/l de Pantotenato Ca, y preparada fresca para cada bloque experimental.

² Concentraciones en g/l excepto para la solución de oligoelementos expresada en ml/l.

³ Actividad específica expresada en U.I./mg (µmoles de producto que aparecen por minuto y por mg de proteína en las condiciones de ensayo).

volumen superior de medio con el fin de llevar a cabo un cambio de escala.

La inoculación y la fermentación se efectuaron tal como se describen en materiales y métodos. Durante la fermentación se recogieron muestras de entre 10 y 20 ml (según la etapa de crecimiento) a intervalos regulares de tiempo y en condiciones estériles a través de un septo diseñado al efecto en el fermentador, hasta completar un tiempo de 75 h desde el final de la inoculación. En cada muestra se lleva a cabo la determinación del volumen y D.O. a 660nm, a continuación se centrifuga a 7.000 g durante 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante se mide el pH y se determina la concentración de glucosa, D-alanina y actividad DAO. Con el pre-

citado se determina el peso húmedo relativo, el peso seco y se procede a la preparación del extracto enzimático tal y como se describe en materiales y métodos, con el fin de determinar la concentración de proteínas y la actividad DAO.

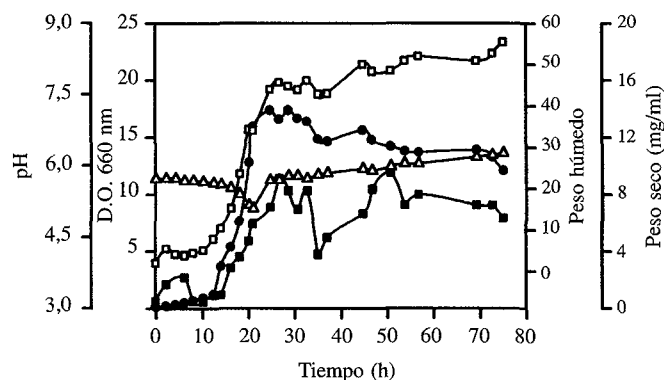
En la figura 1 se observa que la biomasa medida como D.O. a 660 nm, el peso húmedo y el peso seco mantienen la misma tendencia, mostrando una fase de latencia durante las primeras 10 h de fermentación, seguida de una fase de crecimiento exponencial que llega hasta las 22 h, momento en que comienza la fase estacionaria. El pH inicial se mantiene constante durante la fase de latencia, descende ligeramente durante la fase exponencial e incrementa su valor lentamente durante toda la fase estacionaria. La determinación de la biomasa por peso húmedo y por peso seco tiene un error experimental mayor que la determinada por D.O. a 660 nm, por lo que a

Tabla II. Composición óptima del medio de producción de DAO de *Rhodotorula gracilis*.

Constituyentes del medio	¹ x_0 Concentración inicial óptima
Na CL	0,5026
MgSO ₄	0,482
K ₂ HPO ₄	0,9929
CaCl ₂	0,2553
MES	4,88
D-Ala	3,1427
Glucosa	3,1427
² Solución oligoelementos	1

¹ Igual composición que en la tabla I.

² Concentraciones expresadas en las mismas unidades que en la tabla I.

**Figura 1.** Crecimiento de *Rhodotorula gracilis* frente al tiempo de fermentación. (● D.O. a 660nm, □ Peso húmedo, ■ Peso seco, △ pH).

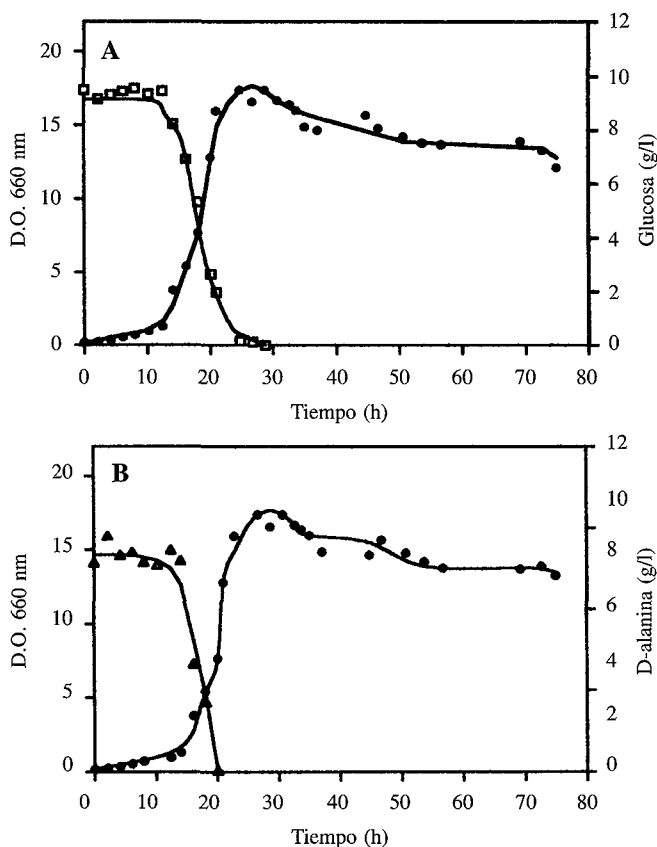


Figura 2. Velocidad de consumo de glucosa (A) y de alanina (B) durante la fermentación. (\square Glucosa g/l, \triangle D-alanina, \bullet D.O. 660 nm).

partir de estos datos se determinó la tasa específica de crecimiento (μ). Para ello se tomaron logaritmos de D.O. a 660 nm de la fase de crecimiento exponencial y se representan frente al tiempo, se obtuvo una línea recta cuya pendiente es el valor de μ y que resultó ser $\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$.

En la figura 2A se observa una clara concordancia entre el crecimiento y el consumo de glucosa. Durante la fase de latencia el consumo de glucosa es prácticamente nulo, ya que los valores de concentración de glucosa en el medio se mantienen alrededor de la concentración inicial en las primeras 10 h de fermentación; durante la fase de crecimiento exponencial (10-22 h) se aprecia un descenso pronunciado de la concentración de glucosa en el caldo. La glucosa se agota coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria.

En la figura 2B, al igual que ocurre con la glucosa, se aprecia un consumo mínimo de D-alanina durante la fase de latencia, seguido de un descenso brusco de su concentración que coincide con la fase de crecimiento exponencial, al final de la cual y coincidiendo con el comienzo de la fase estacionaria su concentración baja a cero.

Tanto la glucosa como la D-alanina son nutrientes que contribuyen directamente al crecimiento celular, es decir, el crecimiento está asociado al consumo de ambos. La glucosa es, como ocurre para la mayor parte de las células, el nu-

triente que principalmente debe contribuir a la obtención de energía metabólica (ATP) mientras que la D-alanina debe servir como fuente de nitrógeno, induciendo de esta forma la producción de DAAO.

Respecto a la variación de la proteína celular (Figura 3A) es, como cabe esperar, paralela a la curva de crecimiento. Se observa un periodo de latencia en las primeras 10 h de fermentación, seguida de una fase de crecimiento exponencial que acaba a las 22 h, momento en el que empieza la fase estacionaria.

La actividad DAAO se detectó en los extractos celulares, ya que su presencia en el medio extracelular es nula (datos no mostrados), lo que corrobora la localización celular de la enzima (17). La actividad DAAO no se observa durante la fase de latencia (Figura 3b), produciéndose un fuerte incremento de la actividad durante la fase de crecimiento exponencial que se detiene al llegar a la fase estacionaria para de-

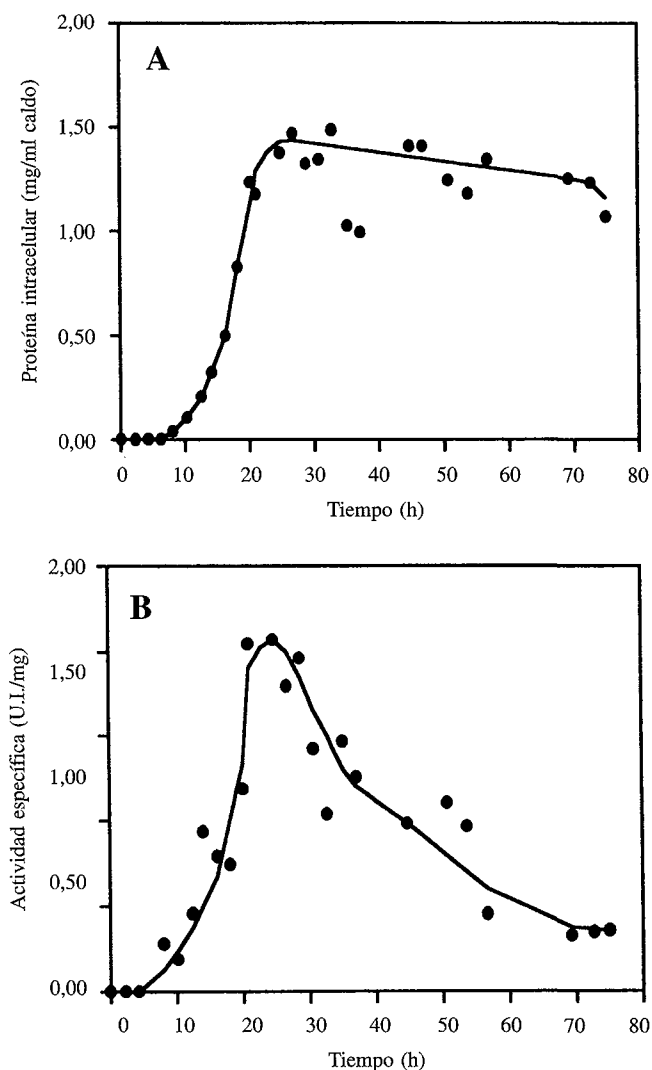


Figura 3. Variación de la concentración de proteína celular durante la fermentación (A). Producción de actividad D-aminoácido oxidasa durante la fermentación (B).

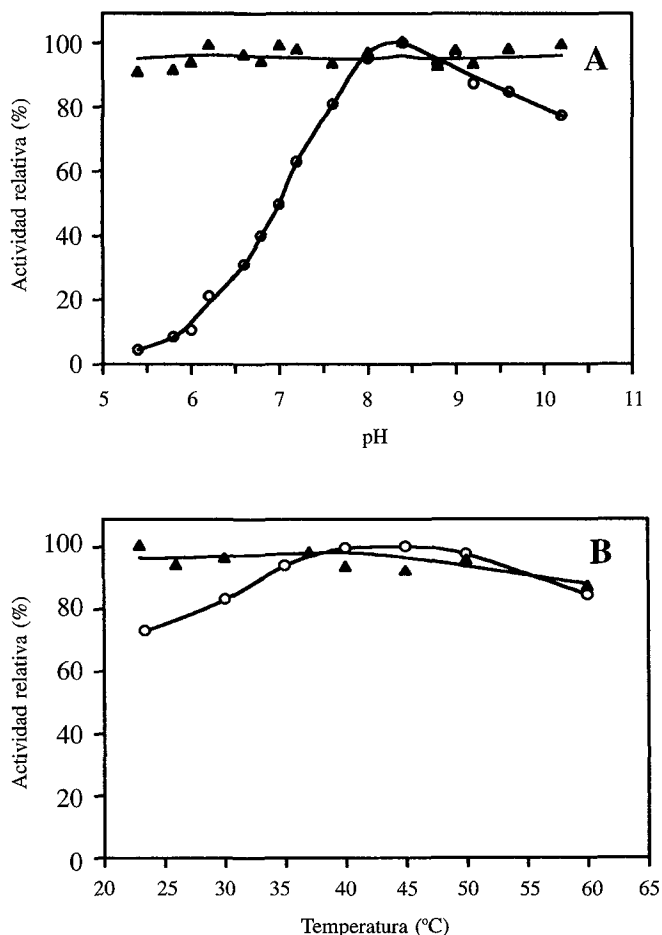


Figura 4. Estabilidad ▲ y actividad ○ de la D-aminoácido oxidasa frente a: pH (A) y temperatura (B).

crecer a lo largo de dicha fase. La producción de la enzima está asociada al crecimiento y por tanto, relacionada directamente con el metabolismo intermediario de la levadura.

Los rendimientos de biomasa producida respecto a los sustratos ($Y = \Delta X / \Delta S$) durante la fase de crecimiento exponencial fueron $Y_{X/D-Ala} = 1,94$; $Y_{X/Glucosa} = 0,80$ expresados en mg de biomasa producida/mg de sustrato consumido.

Las tasas específicas de consumo de sustrato se calcularon en base a la siguiente expresión: $q_s = \mu / Y_{X/S}$. Los valores hallados para nuestra fermentación fueron $q_{D-Ala} = 0,11 \text{ h}^{-1}$; $q_{glucosa} = 0,26 \text{ h}^{-1}$.

El rendimiento de producto (DAAO) respecto a la biomasa durante la fase de crecimiento exponencial fue $Y_{P/X} = 8,42 \text{ U.I. producidas/g de biomasa producida}$.

La tasa específica de aparición de producto se calculó de acuerdo con la siguiente expresión: $q_p = \mu / Y_{X/P} = \mu \cdot Y_{P/X}$, dando como resultado $q_p = 1,78 \text{ h}^{-1}$.

Los rendimientos de producto respecto a los sustratos consumidos durante la fase exponencial fueron $Y_{P/D-Ala} =$

16,33, $Y_{P/Glucosa} = 6,73$ expresados en U.I. producidas/g de sustrato consumido.

Caracterización funcional de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis*

Una vez optimizada la producción se llevó a cabo la caracterización funcional de la enzima. Para ello se procedió a su purificación mediante el método ya descrito (11). Se estudió su actividad y estabilidad frente a pH y temperatura. Los ensayos se realizaron tal como se describe en materiales y métodos.

En la figura 4A se muestran los resultados de actividad y estabilidad frente a pH a 30°C. Se observa que a esta temperatura la enzima es estable en todo el intervalo de pH ensayado y muestra un pH óptimo de actividad entre 8,0 y 8,4. Por tanto, el pH que se eligió para el ensayo estándar de actividad fue el óptimo, ya que en él la enzima es completamente estable.

En la figura 4B se muestran los resultados de actividad y estabilidad frente a temperatura a pH 8,0. Se observa que a este pH la enzima es estable entre los 23 y los 40°C, a partir de los cuales la enzima empieza a sufrir desnaturalización térmica, que es más acusada a medida que aumenta la temperatura.

Al ensayar la actividad de la enzima se observa que la temperatura óptima de actividad se sitúa en torno a los 45°C. Para el ensayo estándar se eligió una temperatura de 30°C, ya que, si bien no es la temperatura óptima de actividad, la enzima tiene una actividad importante y es totalmente estable a esta temperatura.

La energía de activación de la reacción catalizada por la D-aminoácido oxidasa utilizando D-fenilglicina como sustrato fue determinada mediante la ecuación de Arrhenius, y su valor fue $15,06 \text{ k J.mol}^{-1}$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha abordado la optimización de la producción de la DAAO a partir de la levadura *Rhodotorula gracilis*. Partiendo de una composición de medio descrito en la bibliografía (10), se observa que las concentraciones de los constituyentes son óptimas excepto para la D-alanina. La D-alanina actúa como inductor de la DAAO, ya que es la única fuente de nitrógeno presente en el medio y obliga a la levadura a sintetizar la DAAO para poder metabolizarla y proliferar en ese medio. La concentración de D-alanina puede aumentarse hasta $3,1727 \text{ g/l}$ (Tabla II) consiguiendo un aumento de la actividad específica del extracto obtenido de aproximadamente un 30% sobre el control, mejorando así la producción de DAAO.

Respecto al cambio de escala, dado el elevado interés industrial de la DAAO, se procedió a optimizar un método de

obtención de mayor cantidad de enzima, por lo que se llevó a cabo un estudio del crecimiento y la producción de DAAO mediante fermentación de la levadura *Rhodotorula gracilis* en un fermentador en discontinuo con un volumen máximo de trabajo de 5 l. Se observa que la aparición de la DAAO se produce durante la fase exponencial (Figuras 1 y 3B), lo que indica que la producción está asociada al crecimiento, decayendo durante la fase estacionaria, cuando el inductor es consumido por completo, lo cual ocurre al final de la fase exponencial (Figuras 1 y 2B). La disminución progresiva de la actividad puede deberse a la acción de las proteasas presentes en la célula de levadura.

Por tanto, desde el punto de vista de producción de DAAO mediante procesos fermentativos en las condiciones estudiadas de pH inicial, temperatura, pO₂ y volumen de trabajo, queda caracterizada la fermentación, estableciéndose el final de la misma a las 22 h, coincidiendo con el final de la fase exponencial y el agotamiento de la fuente de nitrógeno e inductor de la DAAO.

Tras caracterizar la fermentación y purificar la enzima mediante el método previamente establecido en nuestro laboratorio (11), se procedió a una primera caracterización funcional de la DAAO, llevándose a cabo estudios de estabilidad y actividad de la enzima frente a pH y temperatura (Figura 4).

Se observa que la enzima presenta una temperatura óptima de actividad a los 45°C, sufriendo desnaturalización térmica a partir de los 40°C (Figura 4B). En las mismas condiciones de incubación Pollegioni y col. (7) observan una pérdida importante de actividad por encima de los 30°C, presentando a esta temperatura sólo un 75% de la inicial. Parece que la preparación enzimática obtenida en nuestro laboratorio es más estable, probablemente debido al método de purificación. Aunque la temperatura óptima de actividad fue 45°C se elige la temperatura de 30°C para el ensayo estándar ya que a ésta temperatura la enzima es completamente estable, mientras que a partir de 40°C comienza a sufrir desnaturalización térmica.

En cuanto al comportamiento frente al pH coincide con el descrito en la bibliografía (10) con un pH óptimo de actividad entre 8,0 y 8,4 (Figura 4A), intervalo al cual la enzima es completamente estable.

REFERENCIAS

1. Pilone, M.S., Butò S. & Pollegioni, L. (1995) A process for bioconversion of cephalosporin C by *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biotechnol. Lett.* **17**, 199-204.
2. Curti, B., Ronchi, S. & Pilone M.S. (1992) D- and L-amino acid oxidase. En *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Ed.: Müller, F. CRC Press, Boca Raton. Vol **III**, pp 69-94.
3. Butò S., Pollegioni, L., Dangiuro, L. & Pilone M.S. (1994) Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of α -keto acids: a reactor system. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1288-1294.
4. Golini, P., Bianchi, D., Battistel, E., Cesti, P. & Tassinari, R. (1995) Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeast: Characterization and application in the deamination of phallosporin C. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 324-329.
5. Conlon, H.D., Baqai, J., Baker, K., Shen, Y.Q. Wong, B.L., Noiles, R. & Rausch C.W. (1995) Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 510-513.
6. Sakal, Y., Abe, T., Ohbayashi, Y., Isaka, K., Yamamoto, K., Tani, Y. & Kato, N. (1996) Bioconversion of 7-aminocephalosporanic acid by intact *Rhodotorula glutinis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2669-2672.
7. Pollegioni, L., Falbo, A. & Pilone M.S. (1992) Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 11-16.
8. Casalin P., Pollegioni, L., Curti, B. & Pilone, M.S. (1991) A study on apoenzyme from *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Eur. J. Biochem.* **197**, 513-517.
9. Pilone, M.S., Pollegioni, L., Casalin, P., Curti, B. & Ronchi, S. (1989) Properties of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 199-204.
10. Pilone, M.S., Verga, R., Fretta, A. & Hanozet, G.M. (1989) Induction of D-amino acid oxidase by D-alanine in *Rhodotorula gracilis* grown in defined medium. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 593-600.
11. Ramón, F., de la Mata, Y., Iannaccone, S., Castillón, M.P. & Acebal, C. (1995) Chemical modification of histidyl residues in D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *J. Biochem.* **118**, 911-916.
12. Bradford, M.H. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-(dye)-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
13. Fonda, M.L. & Anderson, B.M. (1969) D-amino acid oxidase. I. Spectrophotometric studies. *J. Biol. Chem.* **242**, 3957-3962.
14. Miller, L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-429.
15. Underfriend, S. (1972) Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. *Science* **172**, 871-872.
16. Guerra, G. & Rodríguez, M. (1987) Implementación computacional del método de optimización de Rosembrock. *Fac. Biología, UH*.
17. Perotti, M. E., Pollegioni, L. & Pilone, M.S. (1987) Expression of D-amino acid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* **55**, 104-109.

**SERIE «GALERÍA PRESIDENTES»
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS**



D. Amós Salvador y Rodríguez

V Presidente

1916-1922

*Nació en Logroño el 31 de marzo de 1845.
Elegido Académico el 3 de mayo de 1893, leyó su discurso
de ingreso sobre el tema «Del uso de las aguas en España,
con aplicación especial al abastecimiento de poblaciones y a los
riesgos», el 31 de diciembre del mismo año.
Fue elegido Presidente de la Academia el 15 de noviembre
de 1916, cargo que ocupó hasta su fallecimiento ocurrido
el 4 de noviembre de 1922.*