



DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i5.3423

Identificación de ω -aminotransferasa en células completas de
Fusarium oxysporum: pH, temperatura y afinidades de (R)-(-)-(α -
metilbencilamina y piruvato de sodio

Rita María Campa Ramos

<https://orcid.org/0000-0001-6156-8896>
a206201997@unison.mx

Abraham Rogelio Martín García

<https://orcid.org/0000-0002-7794-9041>
abraham.martin@unison.mx

Patricia Guerrero German

<https://orcid.org/0000-0002-3835-7342>
patricia.guerrero@unison.mx

Universidad de Sonora. División de Ingeniería: Ingeniería Química. Posgrado en Ciencias
de la Ingeniería: Ingeniería Química. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N.
Hermosillo, Sonora- México

RESUMEN

La demanda de compuestos quirales e intermediarios que utilizan tecnología enzimática ha aumentado en la industria farmacéutica. En la elaboración de aminas enantioméricamente puras está aumentando la relevancia de las ω -aminotransferasas esto por su enantioselectividad que se utilizan para síntesis de aminas quirales. En este trabajo se ensayaron células completas de *Fusarium oxysporum* con la reacción de transaminación. El resultado de la prueba de transaminación mostró actividad correspondiente a R-Aminotransferasa. La prueba de aminotransferasa se llevó a cabo en un volumen de 50 mL, utilizando la mezcla de reacción compuesta por 15 mM de (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina, piruvato sódico 100 mM y 1 mM piridoxal-5-fosfato. La actividad de las aminotransferasas se midió directamente con la velocidad de reacción inicial de producción de acetofenona. Se prepararon cultivos celulares de *F. oxysporum* y se pusieron en contacto con nitrógeno líquido para liberar la enzima. Se utilizó una masa de 1.2 g de lisado de *F. oxysporum* para seleccionar valores adecuados de temperatura y pH. La temperatura óptima fue 32.5 ° C y el pH fue 6.28, mostrando una velocidad de reacción de 6 μ M/min. El piruvato de sodio presento una km de 9.55 mM y la (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina una km de 2.27 mM.

Palabras clave: *Compuestos quirales; Actividad óptica; ω -Aminotransferasas; Fusarium. oxysporum.*

Correspondencia: a206201997@unison.mx

Artículo recibido: 10 agosto 2022. Aceptado para publicación: 10 septiembre 2022.

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

Todo el contenido de **Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar**, publicados en este sitio están disponibles bajo

Licencia [Creative Commons](#) 

Como citar: Campa Ramos, R. M., Martín García, A. R., & Guerrero German, P. (2022). Identificación de ω -aminotransferasa en células completas de *Fusarium oxysporum*: pH, temperatura y afinidades de (R)-(-)-(α)-metilbencilamina y piruvato de sodio. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(5), 4650-4666.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i5.3423

Identification of ω -aminotransferase activity in whole cells of *Fusarium oxysporum*: pH, temperature and affinities of (R)-(-)-(α)-methylbenzylamine and sodium pyruvate

ABSTRACT

The demand for chiral compounds and intermediates using enzyme technology has increased in the pharmaceutical industry. In the elaboration of enantiomerically pure amines, the relevance of ω -aminotransferases is increasing, due to their enantioselectivity, which are used for the synthesis of chiral amines. In this work, whole cells of *Fusarium oxysporum* were tested in the transamination reaction. The results of the transamination reaction were positive to R-Aminotransferase activity. The aminotransferase activity test was carried out in a volume of 50 mL, using a reaction mixture composed by 15 mM of (R)-(-)-(α)-Methylbenzylamine, 100 mM sodium pyruvate and 1 mM pyridoxal-5-phosphate. The activity of the aminotransferases was measured directly from the initial reaction rate of acetophenone production. Cell cultures of *F. oxysporum* were prepared and placed in contact with liquid nitrogen to release the enzyme. A mass of 1.2 g of *F. oxysporum* lysate was used to select suitable temperature and pH values. The optimal temperature was 32.5 °C and the pH was 6.28, showing a reaction rate of 6 μ M/min. Sodium pyruvate presented a K_m of 9.55 mM and (R)-(-)-(α)-Methylbenzylamine a K_m of 2.27 mM.

Keywords: *Chiral compounds; Optical activity; ω -Aminotransferase; Fusarium oxysporum.*

INTRODUCCIÓN

La biocatálisis es una herramienta útil para producir compuestos orgánicos a través de procesos altamente estereoselectivos (Behrens y col., 2011). Así, las enzimas son catalizadores extraordinariamente precisos que actúan en condiciones no agresivas para el medio ambiente. La mayoría de las moléculas que se encuentran en la naturaleza son compuestos ópticamente activos, ya que las enzimas de los organismos vivos son estereoespecíficas y por lo tanto tienden a producir un solo enantiómero (Koszelewski y col., 2009). Por ello, las industrias químicas están incorporando cada vez más estos procesos, especialmente para la síntesis de compuestos quirales de alta pureza óptica. Las enzimas son de gran utilidad en la síntesis de fármacos gracias a que realizan reacciones con temperaturas suaves y pH moderado, además de presentar alta quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad para producir compuestos enantioméricamente puros (Torres, 2014). Los biocatalizadores presentan alta selectividad; esto los hace muy interesantes para la síntesis de fármacos porque la pureza enantiomérica del producto final es un paso crucial en la síntesis de fármacos. En el uso de aminotransferasas, tanto en la industria química como en aquellas que requieren el uso de catalizadores altamente especializados, como en la industria farmacéutica, su importancia ha aumentado (Gerlach y col., 2003). La relevancia de la biosíntesis tanto de aminoácidos como de aminas con actividad óptica ha aumentado en los últimos veinte años ya que las aminas quirales se utilizan como productos farmacéuticos intermedios y finales, así como en la síntesis y resolución asimétrica de sustancias químicas (Carracedo, 2005). Las aminotransferasas interactúan en la síntesis de compuestos que presentan actividad óptica y pueden utilizarse de dos formas diferentes: resolución y síntesis. La síntesis asimétrica, que es la opción escogida en este proyecto, permite obtener la amina quiral ópticamente pura objetiva con un rendimiento teórico del 100%, lo que le confiere una gran ventaja sobre la resolución. La eficacia de la enzima vendrá dada por la velocidad de reacción a la que transformen el sustrato en producto. Actualmente en el desarrollo de la síntesis asimétrica se evidencia en la industria farmacéutica, la producción de fármacos quirales ha variado del 30% al 76%.

Ejemplos destacados en este campo fueron la producción de (S)-Dopa, fármaco fundamental para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la síntesis enantioselectiva del agente antiinflamatorio (S)-Naproxeno, y la oxidación enantioselectiva de alcoholes alílicos (Juaristi, 2011). Los sistemas biológicos pueden reconocer el par de enantiómeros como sustancias diferentes. De hecho, cada uno de los enantiómeros de numerosos productos naturales quirales y compuestos sintéticos presenta una actividad biológica diferente. Actualmente, aproximadamente el 56% de los medicamentos disponibles en el mercado tienen al menos un centro quiral; de estos, el 86% se comercializan como mezclas racémicas. Gran parte de los fármacos comercializados en la actualidad son aminas quirales o contienen grupos funcionales derivados de estas aminas, por ejemplo: Etambutol (antibiótico), Zoloft (antidepresivo), Rivastigmina (colinérgico), Cinacalcet (calamimético), Laniam (antipalúdico), Codeína (analgésico) y Lopinavir (antirretroviral). Por lo tanto, la obtención de muchas moléculas biológicamente activas, ya sean derivadas de fuentes naturales o sintéticas, se basa en el desarrollo de métodos eficientes para preparar aminas quirales. (Speisky y col., 1995). Por esta razón, la síntesis orgánica moderna se ha centrado en la síntesis asimétrica o enantioselectiva.

En comparación con la amina (S)-transaminasa selectiva, las (R)-transaminasas homólogas selectivas se han estudiado menos. Dado su papel fundamental en la biocatálisis asimétrica, es de gran importancia encontrar amina (R)-transaminasas más selectivas con capacidad o potencial para la síntesis de los compuestos. Dado lo anterior, es importante producir (R)-Aminotrasferasa purificada a partir de células enteras de *Fusarium oxysporum*, ya que dicha enzima se reporta mayormente en configuración "S", ya que la mayoría de los sustratos naturales tienen configuración S, por lo que la configuración R será de gran aporte para uso posterior (Guevara y col., 2017).

METODOLOGÍA

Propagación de *Fusarium oxysporum*

El cultivo de células de *F. oxysporum* se realizó a 30°C durante 72 h, utilizando medio de cultivo con 10 g/L de glucosa, 1 g/L de urea, 1 g/L de fosfato dibásico de potasio y minerales traza, a un pH de 6 (Álvarez et al., 2016). Para obtener la biomasa de las células retenidas en peso húmedo (Figura 1), el cultivo se filtró al vacío a través de papel filtro Whatman de 150 μ m.

Pruebas de identificación de estereoselectividad

Esto se llevó a cabo realizando una reacción de transaminación en un reactor encamisado de 100 ml, utilizando piruvato de sodio (PS) 100 mM, piridoxal 5-fosfato (PLP) 1 mM, fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 100 mM y 1,2 g de biomasa de *F. oxysporum*. La reacción de transaminación (Clay y col., 2010) (Figura 2 y Figura 3) se inició con una concentración 15 mM de (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina o (S)-(-)-(α)-metilbencilamina como donante de grupos amino (Koszelewski y col., 2010), el sistema de reacción se mantuvo durante 20 horas a una temperatura de 25 °C, luego se tomaron muestras por triplicado de 1 mL de ambos sistemas de reacción, (S)-(-)-(α)-metilbencilamina y (R)-(-)-(α)-metilbencilamina, y se depositaron en tubos Eppendorf de 1 mL, se agitaron durante 10 s y se centrifugaron en una microcentrífuga modelo Beckman Microfuge a 7826 x g durante 10 min a temperatura ambiente, luego se tomó el sobrenadante de los tubos Eppendorf, se filtró con filtros millipore de 0.8 μ m y se midió la absorbancia del producto en un detector UV-VIS producido entre 250-260 nm, en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (Gao y col., 2017).

Purificación de la cepa

Para el aislamiento de *F. oxysporum* se preparó un medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (65 g/L) con 200 mL al 0,05 %, utilizando también una muestra de *F. oxysporum* preservada con una solución de Tween al 0,05 %, utilizando el método de dilución (De Granada y col., 2001). Sucesivas concentraciones de 10^{-1} a 10^{-8} cepas de purificación se realizaron en campana de flujo laminar, el mismo procedimiento se realizó por triplicado.

Identificación de *Fusarium oxysporum*

Para la identificación de *F. oxysporum* (Figura 4), se utilizó una técnica basada en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación), en un análisis molecular, clonación, purificación del producto PCR (Martin y col., 2007), cuantificación y secuenciación del ADN, realizada por el Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IPICT).

Ruptura celular

La ruptura celular se realizó por contacto con nitrógeno líquido, poniendo en contacto 1,2 g de células enteras de *F. oxysporum* en un mortero común en campana de flujo laminar, se cubrieron completamente con nitrógeno líquido, se evaporó el nitrógeno y se congelaron las células, luego molido en el mortero (Madigan, 2006).

Reacción de transaminación

La reacción de transaminación se llevó a cabo a escala de 50 mL en un reactor encamisado de 100 mL (Wheaton), como amina donante (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina (Aldrich) y como aceptor del grupo amino, piruvato de sodio, seguido de la medición de la concentración de acetofenona, por recirculación de agua a temperatura constante, se controló la temperatura de reacción, la agitación fue por medio de un agitador magnético. Con la tasa inicial de generación de acetofenona, se midió la actividad de (R)-aminotransferasa. La mezcla de reacción de los sistemas de ensayo de actividad de (R)-aminotransferasa consta además de (R)-(-)-(α)-metilbencilamina (15 mM) de SP (100 mM), piridoxal-5-fosfato (1 mM) y fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) (Shin y Kim., 1997). La velocidad se determinó midiendo las concentraciones de acetofenona a los 10, 20, 30 y 40 min. Se tomó una muestra de 200 μ L del sistema de reacción y se mezcló con 800 μ L de HCl 0.1 N.

Análisis de muestras

Las muestras del sistema de reacción ya con HCl se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV-VIS en un equipo Varian Pro Star (Hamid y col., 2021). La absorbancia se midió a 254 nm, el volumen de inyección fue de 20 μ L, el caudal de la fase móvil fue de 0.6 mL/min y el tiempo de análisis fue de 23 min. La columna utilizada fue Varian C-18 a 30 °C (Munir y col., 2020). La composición de la fase móvil fue 40 % metanol y 60 % (v/v) agua. El tiempo de elución con acetofenona (Aldrich) fue de 19.8 min.

Efecto de la temperatura

La estabilidad de temperatura de la (R)-aminotransferasa se observó sobre la velocidad de reacción inicial, se incubaron 50 mL de la mezcla de reacción en un rango de temperatura de 20-40 °C con 1.2 g de células de *F. oxysporum* en un rango de pH entre 4-8 (Melo y col., 2020). La composición de la mezcla de reacción fue (R)-(-)-(α)-

metilbencilamina 15 mM, piruvato de sodio 100 mM y piridoxal-5-fosfato 1 mM (Martin y col., 2011).

Efecto del pH

Se observó la estabilidad del pH de la R-Aminotransferasa sobre la velocidad de reacción inicial, para estimar el pH apropiado para la reacción se incubaron 50 mL de mezcla de reacción en un rango de pH de 4-8 (Junqueira y col., 2019) con 1.2 g de células de *F. oxysporum*, y temperatura en un rango de 20 - 40 °C (Yañiquez y col., 2019). La composición de la mezcla de reacción es (R)-(-)-(α)-metilbencilamina 15 mM, piruvato de sodio 100 mM y piridoxal-5-fosfato 1 mM (Martin y col., 2007).

Afinidad por sustratos

Se analizó la afinidad del piruvato de sodio a diferentes concentraciones en varios experimentos cuyas concentraciones van desde 15 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM, 120 mM y 140 mM, se agregaron los siguientes reactivos manteniendo su concentración constante (PLP 1 mM, (R)-(-)-(α)-Metilbencilamina 15 mM, K₂HPO₄ 100 mM) en 50 mL de reacción, controlando temperatura y pH. En el siguiente experimento se analizó la afinidad de (R)-(-)-(α)-metilbencilamina a diferentes concentraciones en varios experimentos cuyas concentraciones van desde 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM, las concentraciones de todos los demás componentes eran constantes (PLP 1 mM, PS 100 mM, K₂HPO₄ 100 mM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estereoespecificidad de ω -aminotransferasa de *F. oxysporum*

Según el diseño de los experimentos, era probable que las aminotransferasas de *F. oxysporum* pudieran ser positivas hacia R-MBA y S-MBA, lo que nos mostraría actividad, pero no estereoespecificidad, que es lo que buscábamos. Con la reacción de transaminación, se identificó la actividad de (R)-aminotransferasa.

Identificación de microorganismos

Se encontró, aisló y purificó un microorganismo positivo para R-MBA, y el producto obtenido se envió para su identificación al Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IPICYT) donde se obtuvo un producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN del hongo para análisis por secuenciación, donde la prueba PCR resultó positiva para este tipo de hongo (*F. oxysporum*). La Figura 4 muestra

el gel de agarosa al 1,0% mostrando los resultados de la prueba PCR para la identificación del hongo tipo *F. oxysporum*.

Selección de temperatura de reacción y pH

La figura 5 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de una enzima. La parte descendente de la curva se debe a la desnaturalización térmica. En el pico de la Figura 5 se presentó el 100 % de la actividad enzimática a 32.5 °C (Veneros y col., 2017); Ajustando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 1) (Shuler y Kargi., 1992) a los datos experimentales se obtuvo la energía de activación de 50,50 kcal/mol, que es la energía mínima necesaria para que se produzca la reacción y menor la energía de activación energía, más rápido tendrá lugar. La reacción al inicio tiene cierta energía mientras sus sustratos reaccionan para formar un complejo activo y quedan en un estado de transición, en el cual se puede observar como los reactivos se debilitan para formar los productos, en cuanto a la energía de desactivación es de 78.04 kcal/ mol es mayor ya que involucra la diferencia de energía entre el complejo activado y los productos, la disminución en la velocidad de la reacción se debe a la desnaturalización de la enzima.

$$k = Ae^{-\left(\frac{Ea}{RT}\right)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En cuanto al pH, al ajustar el modelo (Ecuación 2) (Shuler y Kargi., 1992) a los datos experimentales se obtuvo $V_{max} = 6 \mu\text{M}/\text{min}$. La figura 6 muestra el efecto del pH sobre la tasa de producción de acetofenona. Se encontró que el pH óptimo fue de 6.28, por inspección de la gráfica correspondiente ya que es el punto donde experimentalmente se obtuvo la mayor velocidad de reacción.

$$v = \frac{v_m[S]}{k_m \left[1 + \frac{k_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{k_1} \right] + [S]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde v es la tasa de formación de acetofenona en $\mu\text{M}/\text{min}$, v_m es un parámetro de ajuste con unidades de $\mu\text{M}/\text{min}$, $[S]$ es la concentración de sustrato en μM , k_m es una constante aparente de Michaelis-Menten en unidades de mM que es una función del pH, $[H^+]$ es la concentración molar de iones hidronio, y finalmente los valores k_1 y k_2 son parámetros de ajuste del modelo con unidades de concentración molar de iones hidronio.

La mayor actividad de la enzima se presentó a un pH de 6.28, disminuyendo su actividad a pH mayor de 7 y menor de 4, para temperatura la mayor actividad se presentó a 32.5 °C, dando una disminución a temperaturas mayores de 40 °C y menores de 25 °C (Melo

y col., 2020), con ese pH y temperatura óptimos se logra una velocidad de reacción de 6 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Velocidad de producción de acetofenona

La actividad de R-aminotransferasa, que se obtuvo en función de la concentración de acetofenona, se detectó a los 19.8 min por HPLC. Dando una tasa de producción de 6 $\mu\text{M}/\text{min}$, en sus condiciones óptimas de 32.5 °C y pH de 6.28.

Efecto de las afinidades del sustrato

En este experimento se encontró inhibición por parte del R-MBA, ya que se observa una disminución progresiva de la actividad a concentraciones del sustrato superiores a 15 mM.

Afinidad por el piruvato de sodio

La afinidad del piruvato de sodio a 32.5 °C y pH 6.28 mostró una velocidad de reacción máxima de 6 $\mu\text{M}/\text{min}$ y el valor de k_m 9.55 mM, como se muestra en la Figura 7.

A concentraciones constantes de enzima, el comportamiento mostrado es lineal, a medida que aumenta la velocidad de reacción, al igual que la concentración de sustrato, hasta llegar a la velocidad máxima, que es cuando la enzima se satura y no aumenta, aunque sigamos aumentar la concentración del sustrato.

Afinidad por (R)-(-)-(α)-metilbencilamina

Las afinidades de (R)-(-)-(α)-metilbencilamina a 32.5 °C y pH 6.28 se muestran en la Figura 8. A partir de los datos experimentales y usando la ecuación de velocidad de formación de acetofenona (Ecuación 3), los parámetros cinéticos de máxima Podría calcularse una velocidad de reacción de 6 $\mu\text{M}/\text{min}$ y el valor de k_m es 2.27 mM.

$$V = V_{max} \left(\frac{(S)}{k_m + (S)} \right) \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde V es la tasa de formación de acetofenona con unidades de $\mu\text{M}/\text{min}$, V_{max} es la tasa máxima con unidades de $\mu\text{M}/\text{min}$, (S) la concentración del sustrato con unidades de μM , k_m es la aparente constante de Michaelis-Menten con unidades de μM .

Cuando la concentración de enzima es constante y aumentamos la concentración de sustrato, la tasa de catálisis en el gráfico no muestra un comportamiento lineal. Inicialmente, el comportamiento es constante (lineal), pero con el tiempo la velocidad de reacción alcanza la velocidad máxima hasta que comienza a disminuir debido a la inhibición del sustrato. Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una concentración de sustrato dada, la velocidad de la reacción aumenta linealmente con el aumento de la

concentración de sustrato, sin embargo, cuando aumentamos la concentración de sustrato, la enzima se satura con el sustrato y alcanza su máxima velocidad de reacción (V_{max}), el de la (R)-(-)-(α)-metilbencilamina $6 \mu\text{M}/\text{min}$, que no superará en ningún caso, independientemente de la concentración del sustrato. Se mostró inhibición para (R)-(-)-(α)-metilbencilamina, dando una K_m de 2.27 mM .

ILUSTRACIONES, TABLAS, FIGURAS.

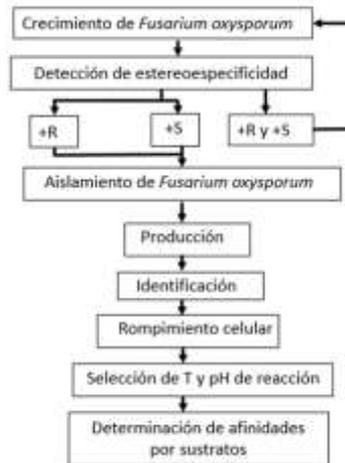


Figura 1. Metodología

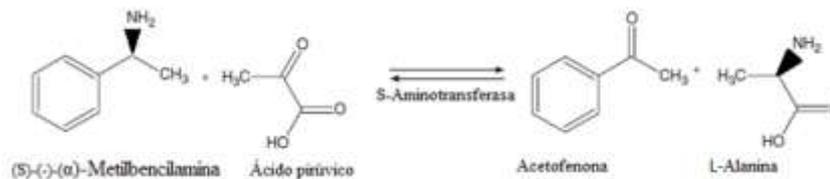


Figura 2. Reacción de identificación de S-aminotransferasas.

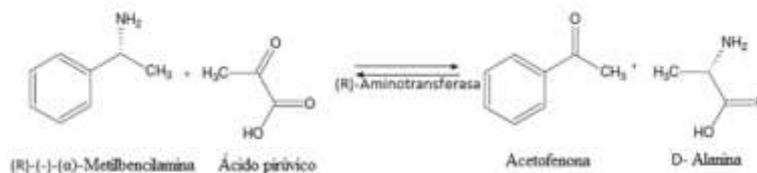


Figura 3. Reacción de identificación de R-aminotransferasas.

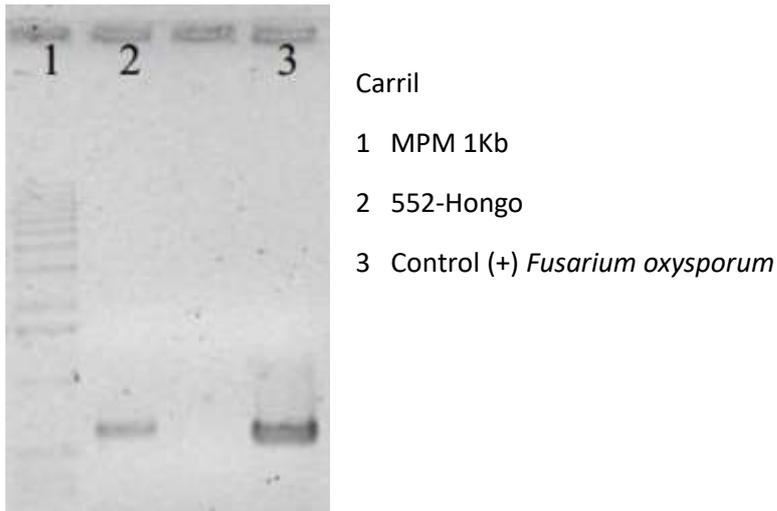


Figura 4. Prueba de PCR para la detección de hongos.

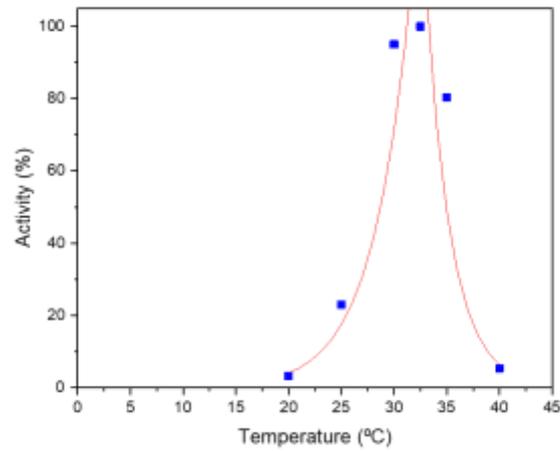


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de una enzima.

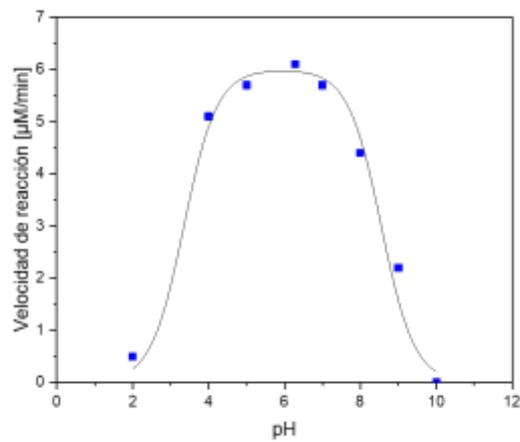


Figura 6. Efecto del pH en la velocidad de producción de acetofenona.

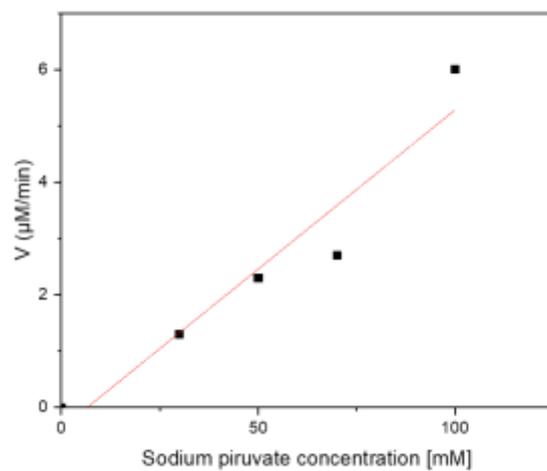


Figura 7. Efecto del PS en la velocidad de reacción.

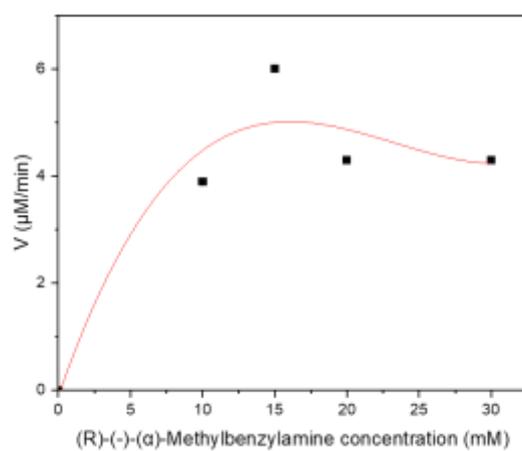


Figure 8. Effect of (R) - (-) - α -Methylbenzylamine on reaction rate.

CONCLUSIONES

En esta investigación se logró la identificación y caracterización de la ω -Aminotransferasa. Se pudo utilizar (R)-(-)-(α)-metilbencilamina como donante de grupos amino con una aminotransferasa con estereoselectividad R, para obtener acetofenona, donde se midió la actividad de R-Aminotransferasa por la producción de acetofenona. La temperatura de reacción aparente y el pH de 32.5 °C y el pH de 6.28 se determinaron utilizando modelos que correlacionan los datos experimentales con los parámetros de ajuste. Fue posible identificar y caracterizar ω -Aminotransferasas con estereoespecificidad selectiva con células enteras de *F. oxysporum*. Se identificó el proceso de transaminación donde la actividad óptica de la aminotransferasa fue seguida por la medición de la concentración de Acetofenona. De acuerdo con otros autores que reportan la importancia de las aminotransaminasas enantioselectivas (R) de *F. oxysporum*, en comparación con la aminotransaminasa selectiva (S), la contraparte selectiva (R) ha sido menos estudiada. Dado su papel fundamental en la biocatálisis asimétrica, es de gran importancia encontrar más (R)-transaminasas selectivas de amina con capacidad o potencial para la síntesis de los compuestos diana (Gao y col., 2017). La R-Aminotransferasa detectada mostró la mayor actividad a 32.5 °C y pH 6.28; coincidiendo con otros autores que reportan la mejor actividad enzimática a altas temperaturas y pH ácido para este tipo de enzimas (Vedia y col., 2019), otros autores reportan 25°C de alta temperatura y pH de 7 para una nueva amina transaminasa enantioselectiva (R) de *F. oxysporum* (Gao y col., 2017). En las condiciones de temperatura y pH se obtuvo una velocidad de reacción de 6 μ M/min.

LISTA DE REFERENCIAS

- Álvarez, J., Sánchez, C., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. 2016. Characterization of production of laccases, cellulases and xylanases of *Pleurotus ostreatus* grown on solid-state fermentation using an inert support. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 323-331. <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/998>
- Behrens, G. A., Hummel, A., Padhi, S. K., Schätzle, S., & Bornscheuer, U. T. 2011. Discovery and protein engineering of biocatalysts for organic synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353 (13), 2191-2215. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100446>
- Carracedo Martínez, E. 2005. Enantiómeros puros partiendo de sus racémicos ¿Realmente se beneficia el paciente? *Farm. aten. prim*, 3(1), 6-10.

<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?search=Farm.%20aten.%20prim&connector=ET&lang=pt>

Clay, D., Koszelewski, D., Grischek, B., Gross, J., Lavandera, I., & Kroutil, W. 2010. Testing of microorganisms for ω -transaminase activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 21 (16), 2005-2009. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.07.009>

De Granada, E. G., De Amezquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., & Zapata, H. A. V. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25. <https://doi.org/10.15446/abc>

Gao, S., Su, Y., Zhao, L., Li, G., & Zheng, G. 2017. Characterization of a (R)-selective amine transaminase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 63, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.012>

Gerlach, Matthias; Pütz, Claudia; Enders, D. and Gaube, Gero. "Procedure for the synthesis of chiral compounds". European patent. Number: 2234908. (2003.12.25).

Guevara-Pulido, J. O., Caicedo, J., David, F., Vela, M., & González, J. 2017. Catálisis asimétrica, una nueva era en la síntesis de fármacos: Historia y evolución. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(2), 105-116. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2747>

Hamid, A., Hussain, Z., Tayyab, M., Zafar, A., Nawaz, M. A., Ali, S., & Aftab, M. N. 2021. Production and characterization of a thermostable extracellular esterase from *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 839-852. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2034>

Juaristi, E. 2011. Organocatalizadores quirales y su aplicación en síntesis asimétrica. *Educación química*, 22(1), 12-14. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(18\)30108-3](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(18)30108-3)

Junqueira, L. L., De Brito, A. R., Franco, M., & De Assis, S. A. 2019. Partial characterization and immobilization of Carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* produced by solid-state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(1), 241-250. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Junqueira>

Koszelewski, D., Pressnitz, D., Clay, D., & Kroutil, W. 2009. Deracemization of mexiletinebiocatalyzed by ω -transaminases. *Organic letters*, 11 (21), 4810-4812. <https://doi.org/10.1021/ol901834x>

Koszelewski, D., Göritzer, M., Clay, D., Seisser, B., & Kroutil, W. 2010. Synthesis of optically active amines employing recombinant ω -transaminases in *E. coli* cells. *ChemCatChem*, 2(1), 73-77. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900220>

Martin, A. R., DiSanto, R., Plotnikov, I., Kamat, S., Shonnard, D., & Pannuri, S. 2007. Improved activity and thermostability of (S) -aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine. *Biochemical Engineering Journal*, 37 (3), 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.001>

Martin, A. R., Shonnard, D., Pannuri, S., & Kamat, S. 2011. Characterization of a High Activity (S)-Aminotransferase for Substituted (S)-Aminotetralin Production: Properties and Kinetics. *J. Bioprocess. Biotech*, 1, 107. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000107>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. 2006. *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11, p. 136). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. https://www.researchgate.net/profile/MichaelMadigan4/publication/48363170_Brock_Biology_of_MicroOrganisms/links/5573057208aeb6d8c017dcd8/Brock-Biology-of-Micro-Organisms.pdf

Melo, G. M., Filippa, M. A., Sanchez, J. R., & Gasull, E. I. 2020. PPO activity of two varieties of pears. Control of enzymatic browning for temperature effect, presence of inhibitors and complexation with b-cyclodextrin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19 (2), 877-887. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Cat726>

Munir, M., Abdullah, R., Haq, I. U., Kaleem, A., Iqtedar, M., & Ashraf, S. 2020. Purification, characterization, kinetics and thermodynamic analysis of polygalacturonase from *Aspergillus tamarii* for industrial applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(Sup. 1), 293-304. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1753>

Shin, J. S., & Kim, B. G. 1997. Kinetic resolution of α - methylbenzylamine with o - transaminase screened from soil microorganisms: Application of a biphasic system to overcome product inhibition. *Biotechnology and bioengineering*, 55 (2), 348-358. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970720\)55:2<348::AID-BIT12>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<348::AID-BIT12>3.0.CO;2-D)

Shuler, M. L. & Kargi, F., 1992. *Bioprocess engineering: basic concepts*. Second Edition. Prentice-Hall PTR. Konak, Turquía.

Speisky C, H., Squella, J. A., & Núñez Vergara, L. (1995). Implicancias farmacocinéticas asociadas al uso de fármacos como racematos o enantiómeros puros. *Rev. méd. Chile*, 884-91. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/midias/lil-162289>

Torres Camacho, Vanesa. 2014. METABOLISMO DE PROTEINAS. libres, vol. 1, p. 5-7. http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/pdf/raci/v41/v41_a03.pdf

Veneros-Terrones, R., Cerna-Rebaza, L., & Chico-Ruíz, J. 2017. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*. *Sagasteguiana*, 5(1), 1-6.

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/2610>

Yañiquez Vedia, J. F., Huanca Lopez, S., Tejeda, L. K., Aliaga Rossel, E., Peñarrieta Loria, J. M., & Mollinedo Portugal, P. A. 2019. Determination of the temperature, pH and concentration parameters for α -Amilasa Mg a new enzyme. *Revista Boliviana de Química*, 36(1), 51-59. ISSN 0250-5460. http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v36n1/v36n1_a05.pdf