

USO *IN VITRO* DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS INMOVILIZADOS

Lic. Erienne Jackson

Tutora: Dra. Lorena Betancor

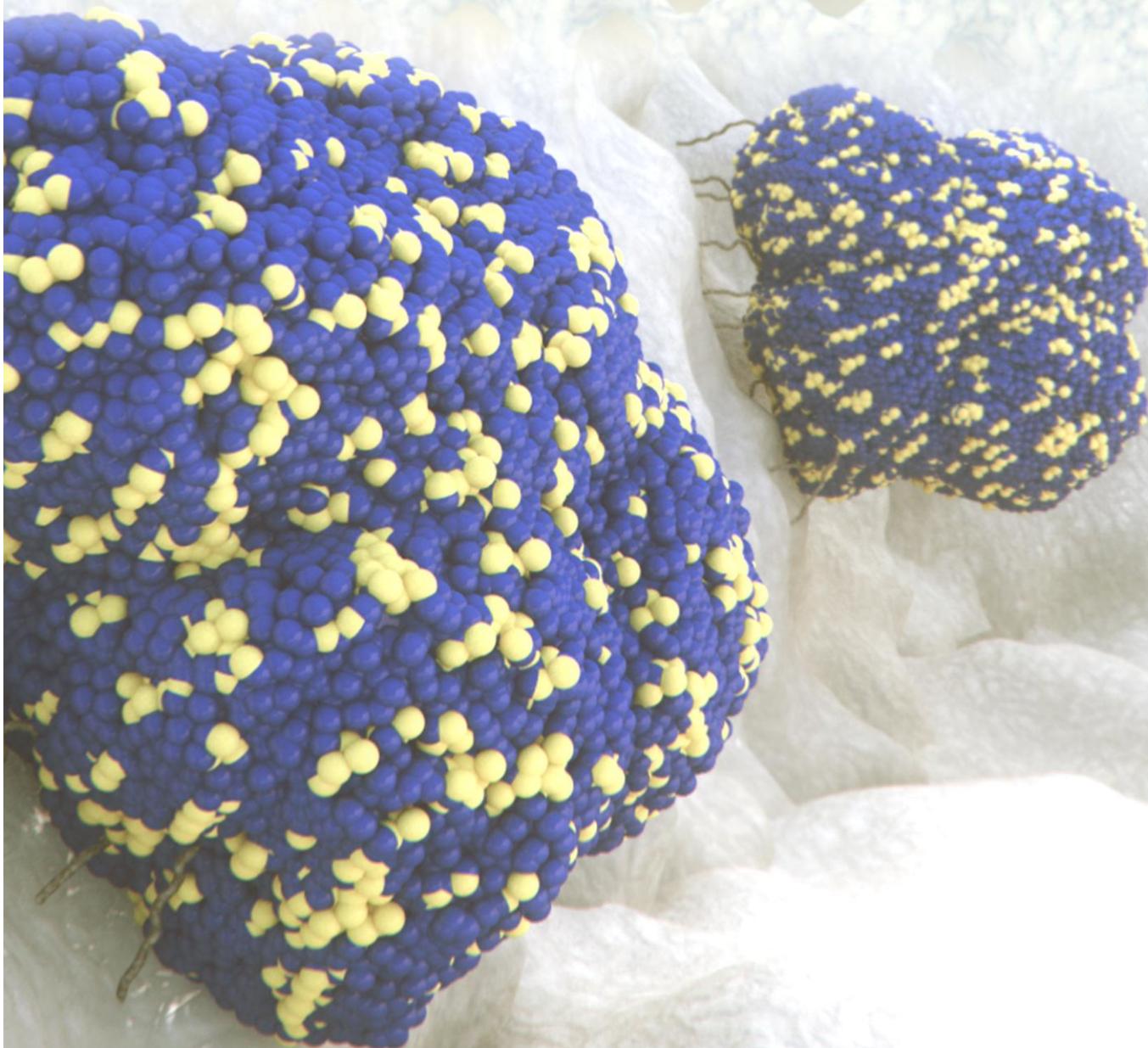
Tutor académico: Prof. Francisco Batista

Realizado en : Laboratorio de Biotecnología - Facultad de Ingeniería

Universidad ORT Uruguay

Tesis realizada en el marco del programa de Posgrado en Química de Facultad de Química,
Universidad de la República y PEDECIBA Química.

2012- 2015



Resumen

Las enzimas catalizan un importante número de reacciones, a menudo con regio o estero selectividad muy precisa, haciendo posible una variedad de procesos catalíticos que no serían posibles o son impracticables por síntesis convencional. El uso aplicado de enzimas en biocatálisis se afianza año a año con la aparición de nuevos y mejores biocatalizadores que facilitan la producción de moléculas de interés biotecnológico. Cada vez son más comunes los procesos en los que se combinan varias enzimas actuando secuencialmente. El uso de sistemas enzimáticos acoplados puede mejorar la cinética de las reacciones, disminuir la pérdida de intermediarios o evitar la inactivación o inhibición de una de las enzimas del sistema por eliminación rápida de algún intermediario inactivante. Sin embargo, la naturaleza soluble de las enzimas presenta restricciones específicas para su uso aplicado: pobre estabilidad, dificultad de separación, contaminación de productos y reuso limitado. La inmovilización de enzimas es usada comúnmente para mejorar estas limitaciones ya que muchas veces provee efectos estabilizantes, facilita su separación del medio de reacción y su reuso. En este trabajo de Maestría hemos abordado el estudio de sistemas enzimáticos que acoplados funcionan para producir moléculas de interés industrial. Nuestros estudios incluyeron la inmovilización de todas las enzimas de las vías sintéticas seleccionadas, caracterización y utilización in vitro. Muchos de los biocatalizadores utilizados debieron ser expresados de manera recombinante y purificados parcialmente previamente a su utilización. Las estrategias de inmovilización utilizadas incluyeron interacción covalente y atrapamiento físico. Además de utilizar agarosa como soporte de inmovilización se planteó el uso de un nuevo soporte para la unión de enzimas: las nanopartículas de sílica biomimética. Para mejorar las propiedades de este soporte para la unión de proteínas hemos propuesto una estrategia de síntesis novedosa que incluye moldes proteicos y genera nanopartículas más pequeñas y más homogéneas en tamaño. Para todas las enzimas con las que se trabajó se lograron preparar inmovilizados activos, en algunos casos muy estables, alcanzándose factores de estabilización sin precedentes en la literatura. Nuestros estudios permitieron el acoplamiento de 5 enzimas que en una secuencia no natural funcionaron en la producción enantioselectiva del L-ácido láctico a partir de mezclas racémicas de Alanina. Además, la co-inmovilización en un mismo soporte de dos enzimas que en la naturaleza funcionan secuencialmente en la vía de síntesis del antibiótico butirosina B, permitió la producción del antibiótico in vitro a partir de un

sustrato alternativo que debimos sintetizar químicamente. Asimismo, hemos sentado las bases para la inmovilización de uno de los sistemas enzimáticos más complejos de la naturaleza, las poliquétido sintetas demostrando mediante el seguimiento de actividades parciales su estabilización frente al complejo no inmovilizado. En todos estos sistemas hemos demostrado que un diseño adecuado de los procesos de inmovilización facilita el acoplamiento de múltiples enzimas trabajando en tándem para la síntesis in vitro de moléculas de interés biotecnológico.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi tutora Lorena Betancor por aceptarme para realizar esta tesis de maestría bajo su dirección. Por su apoyo y confianza en mi trabajo y su disposición para ayudarme, no solamente en el desarrollo de esta tesis sino también en lo personal.

A mi tutor académico, Francisco Batista por su ayuda y apoyo en la selección de los cursos que fueron indispensables para mi formación.

A Carlos Sanguinetti, por permitirme ser parte del equipo de Biotec.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, todos contribuyeron de alguna forma a la realización de esta tesis y por buen ambiente de trabajo que generan día a día.

A José Manuel Guisán, Fernando López-Gallego, Frank Schulz y Peter Leadlay por abrirme las puertas de su laboratorio, ayudarnos con el avance de la tesis y permitirme aprender un poco de cada uno de ellos.

A Valeria Grazú y Jesús M. De La Fuente por su gran ayuda y apoyo en el desarrollo de los estudios de caracterización de las nanopartículas de sílica biomimética.

A ANII por la financiación de la beca de posgrado nacional. A Santander Universidades por la financiación de la estancia de investigación en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid- España. A la Universidad ORT Uruguay por la financiación de la estancia de investigación en la Universidad de Cambridge-Inglatera. Al DAAD y a PEDECIBA Química por la financiación de la beca de investigación en la Universidad de Bochum-Alemania.

A mi familia y amigos que me acompañan y apoyan siempre. A Rodrigo, por su apoyo incondicional y su paciencia.

Índice

Resumen	1
Agradecimientos	3
Índice.....	4
Abreviaturas	1
Introducción general.....	3
Enzimas en biocatálisis	3
Sistemas multi-enzimáticos.....	3
Inmovilización de enzimas y sistemas multi-enzimáticos	5
Estrategias para la inmovilización de enzimas	6
Inmovilización de enzimas por unión covalente	7
Inmovilización de enzimas por atrapamiento.....	9
Objetivo general	10
Objetivos específicos	11
Metodología	12
<i>Materiales</i>	12
<i>Métodos</i>	12
<i>Preparación de células competentes</i>	12
<i>Transformación de E. coli</i>	13
<i>Expresión y purificación de proteínas</i>	13
<i>Electroforesis de poliacrilamida con Sodio dodecilsulfato (SDS-PAGE)</i>	14
<i>Determinación de la concentración proteica</i>	15
<i>Ensayos de actividad</i>	15
<i>Síntesis de nanopartículas de sílica biomimética</i>	17
<i>Síntesis de glioxil-agarosa</i>	18
<i>Inmovilización de enzimas en nanopartículas de sílicabiomimética</i>	18
Para BtrH se llevó a cabo en presencia de 0,2mg de proteína, para BtrG 0.4mg, DAAO 0,3 y 0,6UI, DEBS3 10 mg por mL de tampón.....	18
<i>Inmovilización en glioxil-agarosa</i>	19
<i>Caracterización de preparados inmovilizados</i>	20
<i>Uso in vitro de enzimas en solución y derivados de RAC, DAAO, CAT, LDH y FDH.</i>	22
<i>Uso in vitro de enzimas de la vía de síntesis de Butirosina</i>	24
Capítulo 1	29

Uso *in vitro* de sistemas enzimáticos inmovilizados

1	Uso <i>in vitro</i> de sistemas enzimáticos para la síntesis de Butirosina B.....	29
2.1	Introducción	29
1.1	Resultados y discusión	31
1.1.1	Expresión y purificación de enzimas del sistema.....	31
1.1.2	Uso <i>in vitro</i> de las enzimas de la vía de la butirosina B en solución.....	34
1.1.3	Inmovilización de enzimas del sistema	39
1.1.4	Sílica como soporte de inmovilización	40
1.1.5	Inmovilización de enzimas para la síntesis de butirosina B	43
1.2	Uso <i>in vitro</i> de las enzimas del sistema co-inmovilizadas.	44
1.2.1	Uso <i>in vitro</i> de BtrH y BtrG en solución para la síntesis de butirosina B.	46
1.2.2	Inmovilización de BtrH y BtrG.....	48
1.2.3	Uso <i>in vitro</i> de BtrH y BtrG inmovilizadas y co-inmovilizadas para la síntesis de butirosina B.	50
Capítulo 2	54
2	Uso <i>in vitro</i> de sistemas enzimáticos para la síntesis de alfa hidroxiácidos.....	54
2.1	Introducción	54
2.1.1	Alfa hidroxiácidos	54
2.1.2	Síntesis de alfa hidroxiácidos mediante cascadas enzimáticas.....	56
2.2	Resultados y Discusión	59
2.2.1	Uso <i>in vitro</i> de D-aminoácido oxidasa, Catalasa y Racemasa en solución para la síntesis de alfa cetoácidos.	59
2.2.2	Uso <i>in vitro</i> de Deshidrogenasas en solución para la síntesis de alfa hidroxiácidos 64	
2.2.3	Uso <i>in vitro</i> de RAC, DAAO CAT, LDH y FDH para la síntesis de L-ácido láctico 65	
2.2.4	Inmovilización de enzimas del sistema de síntesis de alfa hidroxiácidos.	68
2.2.5	Uso <i>in vitro</i> de preparados inmovilizados de RAC, DAAO/CAT y LDH/FDH para la síntesis de L-ácido láctico	82
Capítulo 3	85
3	Uso <i>in vitro</i> de DEBS3 para la síntesis de poliquétidos.....	85
3.1	Introducción	85
3.1.1	6-deoxieritronolida B sintasa (DEBS).....	85
3.2	Resultados y discusión	87
3.2.1	Expresión y purificación de DEBS3	87
3.2.2	Estudio de actividad quetoreductasa de DEBS3	88
3.2.3	Inmovilización de DEBS3.....	89
4	Conclusiones	92

5	Bibliografía	94
6	Anexo	103
6.1	Análisis por NMR de las etapas de síntesis de γ -Glu-AHBA-SNAC	103
6.2	Estudio por LC-MS de síntesis de butirosina B con BtrH y BtrG inmovilizadas	103
6.2.1	Análisis de las masas encontradas a 0.93 min	105
6.2.2	Análisis de las masas encontradas a 2.64 min	107
6.2.3	Análisis de las masas encontradas a 1.28 min	109

Abreviaturas

%I Porcentaje de inmovilización

%R Porcentaje de rendimiento

AHBA (S)-2-hidroxi-butiril -4-amino

ATP Adenina tri-fosfato

BCA Ácido bicinconínico

BSA seroalbúmina Bovina

CoA Coenzima A

D-Phg D fenilglicina

DTT Ditiotreititol

E. coli Escherichia coli

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

HEPES Acido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazineetanesulfónico

His Histidina

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

HRP peroxidasa de rábano

IPTG Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

KCl Cloruro de potasio

LC-ESI-MS Cromatografía líquida-Electrospray-Espectometría de masas

LC-MS Cromatografía líquida-Espectometría de masas

L-Glu L-glutamato

L-Phg L fenilglicina

MgCl₂ Cloruro de magnesio

MnCl₂ cloruro de manganeso

NaCl Cloruro de sodio

NAD⁺ Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

NADH Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OFDA ortofenilendiamina

PEI Polietilenimina

PEP Fosfoenol piruvato

PLP piridoxal fosfato

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TCA Acido tricloroacético

TFA ácido trifluoroacético

TLC Cromatografía en capa fina

UI Unidades de enzima

Enzimas

BtrG γ -glutamill cyclotransferasa

BtrH Aciltransferasa

BtrI Proteina portadora de acilo

BtrJ Ligasa ATP-dependiente BtrJ

BtrK Descarboxilasa PLP-dependiente

BtrO Monoxigenasa

BtrV Oxidoreductasa

CAT catalasa

DAAO D aminoácido oxidasa

DEBS3 Subunidad 3 de la 6-Deoxieritronolido B sintasa

L-LDH L lactato deshidrogenasa

MtaA Fosfopanteteinil transferasa MtaA

RAC *BsrV* Racemasa de *Vibrio cholerae*

RAC racemasa

Sfp Fosfopanteteinil transferasa Sfp

Introducción general

Enzimas en biocatálisis

La biocatálisis comprende el uso de microorganismos o enzimas para acelerar conversiones químicas. Tales procesos han sido utilizados por cientos de años en la elaboración de la cerveza o el pan, sin embargo, en las últimas décadas los aportes de la ciencia en este campo han aumentado notoriamente la disponibilidad de aplicaciones biocatalíticas¹. En particular las enzimas han ganado el interés de las industrias química y farmacéutica debido a sus características como biocatalizadores en relación a los catalizadores químicos convencionales. Las enzimas son proteínas catalíticas reciclables que frecuentemente muestran regio, quimio y enantioselectividad y operan en condiciones suaves de reacción. En general actúan en medios acuosos, a temperaturas moderadas, pH cercanos a la neutralidad y a presión atmosférica. Son muy específicas en relación al sustrato con el que interactúan y al producto que generan. Son además muy selectivas (capaces de catalizar una única modificación en un sustrato con varios grupos funcionales similares) lo que reduce la formación de subproductos por reacciones colaterales. Estas características hacen de las enzimas catalizadores sostenibles y económicos para una variedad de transformaciones químicas¹. Sin embargo, las condiciones de uso aplicado de las enzimas son muchas veces incompatibles con su naturaleza biológica y por esta razón deben ser mejoradas.

Las herramientas modernas de ingeniería, producción y descubrimiento de proteínas así como los avances en biología molecular y estructural, facilitan el desarrollo de catalizadores y su diseño a medida para integrarlos en procesos industriales².

Sistemas multi-enzimáticos

La síntesis enzimática puede implicar más de una enzima que operan secuencialmente o en paralelo para la síntesis de compuestos a menudo más complejos (Figura 1)^{3,4}. En la naturaleza, se pueden encontrar un gran número de cascadas de enzimas en diferentes vías metabólicas dentro de las células. El paradigma del uso tecnológico de estas cascadas involucra la utilización de microorganismos a nivel industrial en la producción de compuestos tales como antibióticos, esteroides y aminoácidos. Sin embargo, el uso de tecnología de células acarrea algunas limitaciones ya que puede implicar un incremento de reacciones colaterales y de formación de productos no deseados.

Además, el transporte del sustrato y el producto a través de la membrana celular puede ser limitante⁵.

La utilización de sistemas multi-enzimáticos *in vitro* presenta diferentes objetivos como la regeneración de cofactores, el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la formación de productos, la simplificación del proceso evitando pasos de recuperación y/o purificación de compuestos intermediarios, entre otros. Cuanto más larga sea la cascada de reacción enzimática, se deben invertir más esfuerzos en aislar las enzimas, reciclar cofactores y optimizar la reacción, lo que tiende a hacer el proceso desfavorable económicamente.

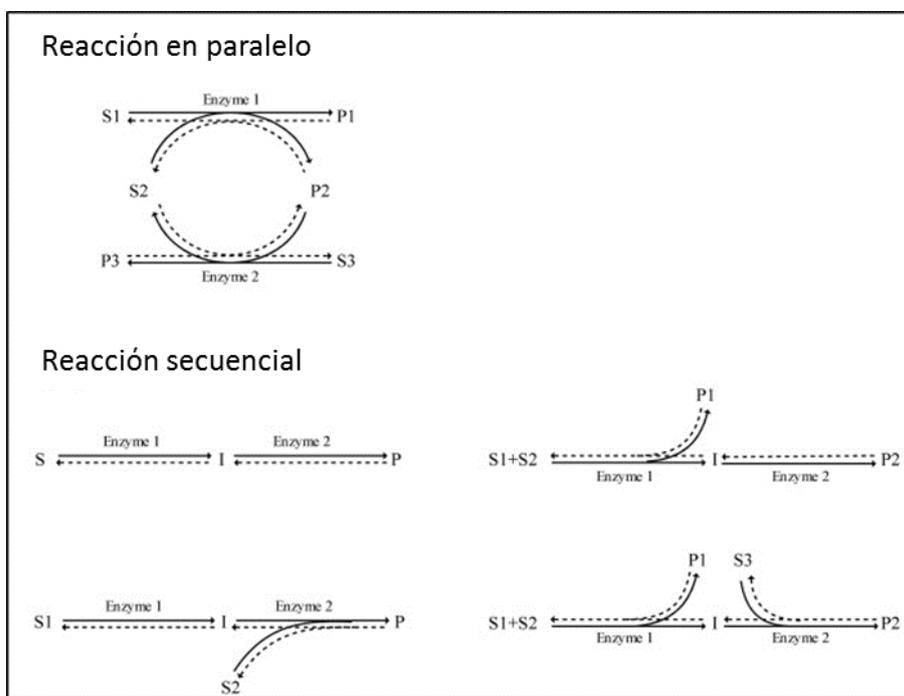


Figura 0.1: Esquema de diferentes reacciones con sistemas multi-enzimáticos. S: sustrato, I: intermediario, P: producto. Tomado de Xue y Woodley, 2012⁴.

Actualmente muchas de las reacciones reportadas *in vitro* con sistemas enzimáticos son llevadas a cabo en solución y a escala de laboratorio. En este caso la complejidad del sistema se reduce. Sin embargo, desarrollar, optimizar y controlar un proceso de este tipo es un desafío significativo⁶. Es importante resaltar que la reacción puede ser optimizada, mediante la variación de concentraciones de sustratos y/o enzimas, o variando factores tales como temperatura y pH de la reacción⁷. Además, rara vez se producen reacciones secundarias y por lo tanto la concentración y pureza del producto final puede ser mayor que las obtenidas utilizando microorganismos^{8,9}.

Las reacciones multi-enzimáticas pueden llevarse a cabo ya sea en un solo reactor o en varios. La síntesis en *one pot* utiliza más de una enzima en un solo reactor. Por lo tanto, los intermedios pueden participar en otras reacciones catalizadas por otros catalizadores simultáneamente. Las concentraciones de intermediarios de reacción se mantienen por lo general a un nivel bajo y de esta manera la posibilidad de inhibición por producto de una enzima o inhibición por sustrato de la siguiente puede ser reducida. Además, se eliminan los pasos de separación y purificación de intermediarios. Sin embargo, la limitación de un proceso *one pot* es que las condiciones en cada reacción (tales como medios, temperatura, pH, y la estabilidad del catalizador) deben estar bien equilibrados y optimizados para una productividad máxima⁴. En este caso las enzimas utilizadas deben ser compatibles con el medio de reacción, es decir deben mantener su actividad catalítica y ser estables en las mismas condiciones de pH y temperatura.

En una síntesis en varios reactores se divide la cascada en grupos lo que puede ser ventajoso y necesario cuando las enzimas no comparten temperaturas óptimas, pH óptimos y otras condiciones similares. Este puede ser el caso de cascadas artificiales en las que la combinación de enzimas puede provenir de diferentes orígenes y para el cual no existe un precedente biológico. Hoy en día, las síntesis con sistemas enzimáticos no se limitan al uso de cascadas de una vía metabólica existente o conocida y cada vez con más frecuencia se proponen secuencias no naturales de enzimas para la síntesis de productos de alto valor agregado¹⁰.

Inmovilización de enzimas y sistemas multi-enzimáticos

En general uso de biocatalizadores en solución presenta una serie de restricciones para su uso en la industria. Específicamente la baja estabilidad, dificultad de separación del catalizador, contaminación de los productos y su reuso limitado.

En particular, cuando se trabaja con sistemas multi-enzimáticos debe tenerse en cuenta la estabilidad operativa de las diferentes enzimas utilizadas. Dado que el coste de las enzimas es una fracción significativa del coste total de la producción, es ventajoso poder reciclar y reutilizar las mismas.

En este contexto, la inmovilización de enzimas es una estrategia comúnmente utilizada para evitar algunas de las limitaciones mencionadas ya que puede proveer estabilidad frente a la temperatura, solventes orgánicos y o cambios de pH. Además, las enzimas inmovilizadas pueden ser reusadas, a menudo durante muchos ciclos, minimizando

costos y en ciertas aplicaciones, facilitando el uso continuo del catalizador^{11,12}. La estabilización puede también mejorar las propiedades enzimáticas, fijando conformaciones proteicas que mejoren la especificidad de sustrato y reduzcan el efecto de inhibidores^{13,14}.

La inmovilización también tiene algunas desventajas. Durante la inmovilización, las enzimas pueden perder su actividad y cambiar algunas otras características, tales como pH o temperatura óptima y/o la constante de Michaelis¹⁵.

Sin embargo, hoy en día existen numerosas estrategias para lograr una inmovilización exitosa que minimice los impactos negativos en las propiedades de las enzimas y mejore aquellas propiedades deseables para su uso aplicado.

Cuando se utilizan varias enzimas involucradas en un proceso, se puede recurrir a la co-inmovilización. La cinética de reacciones en *one pot* puede ser sustancialmente mejorada mediante esta estrategia ya que aumenta la proximidad entre los diferentes catalizadores, imitando los complejos multi-enzimáticos celulares.

La co-inmovilización permite además eliminar productos o intermediarios tóxicos para algunos catalizadores del sistema. Así por ejemplo, la inactivación por peróxido de hidrógeno es un problema frecuente en las enzimas en las que este compuesto es sustrato o producto de las mismas (oxidases, peroxidases, catalasas, etc). La acumulación de este compuesto en el medio de reacción lleva en muchos casos, a la inactivación irreversible de las oxidases¹⁶ y puede promover oxidaciones no deseadas de algunos sustratos o productos¹⁷. La catalasa convierte rápidamente el H₂O₂ en subproductos inocuos que no atentan contra la estabilidad de la oxidasa o generan subproductos no deseados.

A su vez, la estrategia de co-inmovilización ha demostrado ser eficiente para la creación de un microambiente que previene la difusión de intermediarios de reacción ya que la proximidad física de los sitios activos puede promover una transferencia de intermediarios más eficiente¹⁸.

Estrategias para la inmovilización de enzimas

Existen en la bibliografía una amplia diversidad de estrategias de inmovilización (Figura 2). Estas pueden involucrar el uso de soportes en donde las enzimas son unidas a través de diferentes tipos de interacciones o meramente por atrapamiento físico. Las estrategias de interacción enzima-soporte pueden ser covalentes, iónicas, hidrofóbicas,

por afinidad o incluso mixtas. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas que deben ser consideradas de cara a la aplicación y al biocatalizador implicado.

La inmovilización no necesariamente involucra el uso de soportes. Tal es el caso de los CLEAS (o agregados enzimáticos entrecruzados) en donde aglomerados de enzimas o incluso cristales enzimáticos (CLECS) se entrecruzan con agentes químicos que insolubilizan el biocatalizador.

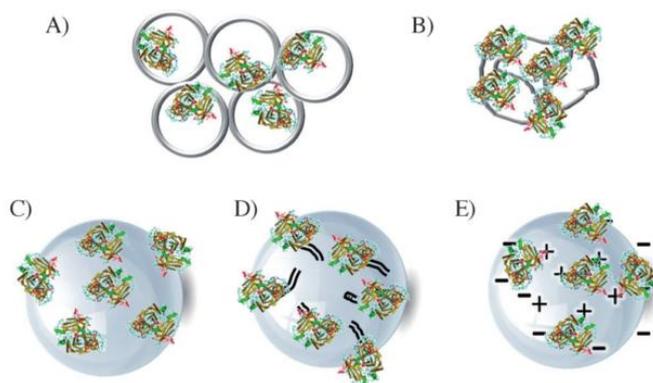


Figura 0.2: Esquema de estrategias de inmovilización de proteínas. A) atrapamiento, B) agregados enzimáticos entrecruzados, C) adsorción física, D) unión covalente al soporte y E) interacciones electroestáticas. Tomado de Betancor y cols. 2013¹⁹.

Cada caso debe ser estudiado acorde a las características de las enzimas en estudio ya que no existe actualmente un método universal de inmovilización que permita asegurar de antemano la retención de actividad luego de la unión al soporte o la mejora de las propiedades deseadas. En este trabajo se manejarán estrategias de inmovilización por unión covalente y atrapamiento y es por ello que nos detendremos a analizarlas en mayor detalle.

Inmovilización de enzimas por unión covalente

Los biocatalizadores pueden ser covalentemente unidos a un soporte insoluble. Esta estrategia es particularmente útil para evitar la pérdida de la enzima al medio de reacción dada la estabilidad del enlace enzima-soporte. Preferentemente, la unión covalente debe afectar a grupos funcionales de la enzima que no intervengan en el proceso catalítico o promuevan su desestabilización. En este sentido el uso de soportes activados con grupos aldehídos (glioxil) es especialmente ventajoso. Estos soportes presentan una estabilidad de almacenamiento muy buena dada la estabilidad de sus grupos funcionales²⁰. Los soportes glioxil unen a las enzimas a través de Lys superficiales que son abundantes en la mayoría de las proteínas y en general no participan en la catálisis. Esta estrategia idealmente requiere temperaturas moderadas

(20-25°C) y pH alcalinos (10-11) para tener la máxima reactividad de las enzimas y del soporte ya que los grupos aminos de las Lys superficiales poseen un pKa en el entorno de 10,6²¹. La reacción entre aldehídos del soporte y aminos de la enzima produce enlaces reversibles del tipo Bases de Schiff. Una reducción posterior con borohidruro de sodio transforma las bases de Schiff débiles en enlaces covalentes muy estables y los aldehídos libres en grupos hidroxilo inertes²² (Figura 3). Ya que generalmente se encuentran varios residuos de lisinas presentes en la superficie proteica, puede verse facilitada una unión multipuntual entre la enzima y el soporte. Un gran número de brazos espaciadores cortos entre enzima y soporte permiten fijar posiciones relativas de los grupos implicados en la inmovilización aumentando la rigidificación de la proteína²³. La rigidificación de la enzima en general aumenta la estabilidad de la misma aunque en algunos casos la actividad enzimática puede ser afectada negativamente²⁴.

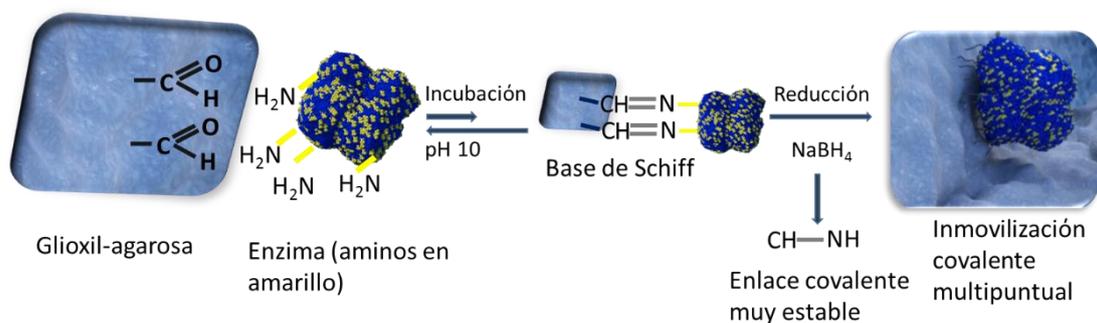


Figura 0.3: Inmovilización de proteínas en agarosa-glioxil.

Otra estrategia de inmovilización covalente ampliamente utilizada es mediante la unión a soportes funcionalizados con glutaraldehído.

En el caso de la inmovilización en soportes glutaraldehído se utilizan los grupos amino terminal de los biocatalizadores para la unión al soporte ya que son los más reactivos a pH neutros²⁵. Esta estrategia idealmente requiere temperaturas moderadas (20-25°C) y pH neutros, estas condiciones suaves pueden ser menos perjudiciales para la actividad enzimática. La actividad y estabilidad de proteínas inmovilizadas en este tipo de soportes depende del protocolo utilizado ya que puede estar unido a un brazo espaciador corto (monómero de glutaraldehído) o largo (dímero)²⁶, esta estrategia presenta algunas ventajas frente a la inmovilización con glioxil-agarosa como la sencillez de la funcionalización del soporte con glutaraldehído y el uso de pH neutro.

Inmovilización de enzimas por atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento involucra la confinación física de la proteína dentro de la estructura del soporte. Esta estrategia puede proteger a la enzima de su ambiente operativo aunque la transferencia de masa de sustratos y productos podría ser limitada comparada con enzimas no atrapadas. El atrapamiento en estructuras nanométricas puede mejorar los problemas de reparto de reactivos dentro y fuera del inmovilizado ya que se confina el biocatalizador en soportes nanoparticulados preparados con materiales semi permeables tales como polímeros (por ej. Polietileneimina) o materiales inorgánicos (SiO_2). En este sentido la encapsulación de biomoléculas dentro de nanopartículas de sílica biomimética (inspirada en la naturaleza) ha sido investigada para un gran número de enzimas^{27,28}. La deposición de sílica con esta metodología resulta de las interacciones específicas entre biomoléculas aminadas y derivados de ácido silícico. La precipitación de sílica es guiada por poliaminas de cadena larga y la presencia de aniones fosfato que sirven como *crosslinkers* iónicos induciendo la formación de microgotas enriquecidas en poliamina-fosfato que se solidifican con la adición de ácido silícico²⁹. Hasta el presente, la encapsulación de sistemas enzimáticos en sílica ha encontrado limitadas aplicaciones. Betancor y cols describe la co-encapsulación de nitrobenzenu nitroreductasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en nanopartículas de sílica lo que permitió la continua conversión de nitrobenzenu a hidroxil aminobenzenu regenerando el cofactor NADH consumido en el proceso¹¹. En este ejemplo las enzimas fueron encapsuladas en simultáneo.

La sencillez del protocolo de síntesis y las condiciones suaves de precipitación de la sílica, hacen de esta estrategia una alternativa ventajosa para la inmovilización de enzimas.

Objetivo general

Tal como se ha comentado en la introducción, las enzimas presentan algunas importantes limitaciones para su uso industrial (p.ej., falta de estabilidad) a pesar de ser capaces de catalizar los procesos químicos más complejos en las condiciones experimentales y medioambientales más suaves. Estas limitaciones se acentúan si lo que se propone es utilizar sistemas enzimáticos acoplados *in vitro* para la síntesis de productos de su acción concertada. Por este motivo, el diseño de biotransformaciones enzimáticas *in vitro* está muy condicionada por una muy buena ingeniería de biocatalizadores: p.ej., inmovilización y estabilización de enzimas.

En este trabajo se utilizarán tres sistemas enzimáticos modelo implicados en la síntesis de alfa-hidroxiácidos, butirosina B y poliquétidos.

Los alfa-hidroxiácidos encuentran aplicaciones en la industria alimentaria, química, farmacéutica, entre otras^{30,31}. Actualmente, a nivel industrial predomina su síntesis mediante química fina y procesos fermentativos. Estos procesos no siempre son eficientes en términos de enantioselectividad o rendimiento, además de ser poco amigables con el medio ambiente ya que muchas veces generan residuos tóxicos y tienen altos requerimientos energéticos.

La butirosina es un aminoglucósido con propiedades antibióticas que actúa a través de la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión específica al ribosoma bacteriano³². La butirosina es producida por *B. circulans* como una mezcla de dos epímeros, A y B que son estructuralmente idénticos a xilostastina y ribostamicina respectivamente, pero que poseen además una cadena lateral (S)-2-hidroxitiril -4-amino (AHBA). La biosíntesis de la cadena lateral AHBA, única de la butirosina, ha sido completamente dilucidada y es muy importante clínicamente ya que impide algunos mecanismos de resistencia a aminoglucósidos³³.

Los poliquétidos son moléculas estructuralmente muy diversas, producidas por poliquétido sintasas³⁴. Las poliquétido sintasas modulares (PKS) de actinomicetes han atraído un intenso interés tanto por sí mismas como por el valor medicinal de muchos de sus productos³⁵. Las PKS del Tipo 1 combinan varias actividades enzimáticas individuales en módulos y actúan a modo de línea de ensamblaje molecular. En particular, la 6 deoxieritronolida B sintasa (DEBS), es la sintasa responsable de la

síntesis de la eritromicina y está formada por tres grandes proteínas homodiméricas, DEBS1, DEBS2 y DEBS3. El estudio *in vitro* de sistemas mini PKS como DEBS3 constituye una forma de producción de pequeños poliquétidos que sirvieran como unidades estructurales para la preparación de moléculas más complejas.

Los biocatalizadores implicados en estos tres sistemas enzimáticos presentan diversidad en su complejidad estructural y propiedades catalíticas. Sin embargo, su naturaleza inherentemente lábil, común a todas las proteínas, justifica los esfuerzos por estabilizarlas para ser utilizadas fuera de su ambiente celular natural.

El objetivo de este trabajo es la obtención de preparaciones inmovilizadas activas y estables de sistemas enzimáticos capaces de catalizar *in vitro* reacciones para la preparación de productos de interés biotecnológico.

Objetivos específicos

Para la realización del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Inmovilización de los sistemas enzimáticos previamente presentados. La misma será llevada a cabo en soportes basados en agarosa y/o en nanopartículas de sílica biomimética. Apuntando a una mejora de la estabilidad de los biocatalizadores.
2. Caracterización de los inmovilizados y comparación de las enzimas en solución.
3. Aproximación a la síntesis *in vitro* de los compuestos de interés.

Metodología

Materiales

Los plásmidos conteniendo genes de biosíntesis de butirosina fueron donados por el Prof. Peter Leadley del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge. Las enzimas de síntesis de hidroxiácidos y reactivos en general, salvo excepciones aclaradas a continuación, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La racemasa (RAC) de *Vibrio cholerae* obtenida de forma recombinante en *E. coli* fue obtenida en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Cava del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid (Madrid-España). El tetrametil orto-silicato (TMOS) fue obtenido de MERCK (Whitehouse Station, NJ). Las sales: fosfato de sodio, acetato de sodio y potasio, bicarbonato de sodio y el HEPES fueron obtenidos de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El SDS y el Triton X-100 fueron de AppliChem (Darmstadt, Germany). El EDTA fue obtenido de J.T Baker (México). La solución de BSA de grado molecular fue de New England Biolabs (Ipswich, MA). Las columnas de gel filtración PD10 fueron de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Las columnas utilizadas en el HPLC fueron de Phenomenex (Torrance, CA, USA). Los solventes utilizados fueron de calidad HPLC o ACS. Los demás reactivos fueron de grado analítico.

Métodos

Preparación de células competentes

Se crecieron 5 mL de cultivo de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP durante 16 horas en medio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% cloruro de sodio) suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL). Se inocularon 50 mL de LB conteniendo cloranfenicol con 1 mL del precultivo en y se crecieron a 37°C en agitación a 250 rpm hasta observar una OD₆₀₀ = 0,3 ~ 0,6. Se centrifugaron las células a 4000 g, durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 50 mL de buffer A a 4°C (50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, pH 6.2). Se incubaron en hielo 60 minutos y se centrifugaron a 4000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 50 mL de buffer B a 4°C (50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, 20% glicerol, pH 6.2).

Transformación de E. coli

Se contaba con plásmidos conteniendo el gen de interés con colas de His terminales para las proteínas involucradas en la vía de síntesis de butirosina y para DEBS3. Se colocaron las células competentes preparadas en hielo. A 50µL de células se le agregaron 0,5µL de plásmido. La suspensión se dejó en hielo durante 30 minutos. La transformación se llevó a cabo por *heat shock* a 42°C por 45 segundos y hielo durante 5 minutos. Las células transformadas se suspendieron en 1 mL de medio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0.5 g/L NaCl, 20 mM glucosa, pH 7.0) y se incubaron a 37 °C por una hora. El cultivo se sembró en LB agar Kn (LB agar suplementado con 50 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL en el caso de DEBS3) y se incubaron 16 horas a 37°C.

Expresión y purificación de proteínas

Se tomaron colonias aisladas de *E. coli* BL21 Codón plus conteniendo el plásmido deseado en cada caso y se crecieron en 5mL de medio LB con kanamicina. En el caso de DEBS3 se suplementó además con ampicilina para seleccionar las que contuvieran también un segundo plásmido de expresión de chaperonas³⁶. El cultivo fue incubado 16 horas a 37 °C con agitación a 220 rpm. Se tomaron 0,5 mL de cada cultivo y se inocularon 500 mL del LB suplementado con los correspondientes antibióticos. Se incubó a 37 °C con agitación a 220 hasta observar que la OD600 alcanzara valores de absorbancia de entre 0.6 y 1.0. La inducción de la expresión proteica se llevó a cabo mediante el agregado de 0,2mM IPTG para enzimas de la vía de butirosina y 0,1mM para DEBS3 en ambos casos incubándose 16 h a 18°C en agitación a 190 rpm.

Se colectaron las células mediante centrifugación a 4000g a 4°C durante 15 min. Se resuspendieron en 15mL de tampón de lisis (Tris-HCl 20mM conteniendo 0,5M de NaCl, 5mM deimidazol y 10% de glicerol) y se lisaron por sonicado en hielo durante 3 minutos (15 segon, 15 seg off). El detrito celular y proteínas insolubles fueron removidos por centrifugación a 17000g 4°C durante 30 min. El clarificado celular se aplicó a una columna de afinidad por quelatos metálicos conteniendo 1 mL de agarosa-IDA previamente lavada con 10mL de agua destilada y cargada con 10mL de una solución 50mM de NiSO₄ y equilibrada con 15 mL de tampón de lisis. Las proteínas adsorbidas fueron lavadas con 10 mL de tampón de lisis y con 5mL de tampón de

lavado (Tampón de lisis conteniendo 60mM de imidazol) y finalmente eluidas con 4 mL de tampón de elución (tampón de lisis conteniendo 250mM de imidazol). Las proteínas eluidas fueron concentradas mediante ultrafiltración con *Amicon Ultra-4 concentrator (Millipore)* con corte de membrana de 3KDa, las mismas fueron rediluidas en su correspondiente tampón de almacenamiento (Tampón de almacenado de BtrG y H: 50 mM HEPES, 50% glicerol, pH 7,0; BtrI: 50 mM HEPES, 50 mMNaCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0; Sfp: 50 mM HEPES, 200 mMNaCl, 50% glicerol, pH 7,6). En el caso de las proteínas de la vía de síntesis de butirósina, las mismas fueron almacenadas a -20 °C a excepción de BtrI, la cual fue almacenada a 4 °C.

Para DEBS3 se llevó a cabo además un segundo paso cromatográfico de intercambio aniónico en columna HiTrap Q HP (5 mL, GE Healthcare). Se tomaron los eluidos de 6 cromatografías de afinidad por quelatos metálicos y se aplicaron 24 mL a una columna previamente equilibrada con 50 mL de tampón A (fosfato de sodio 50 mM conteniendo 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glicerol y 0.05% Triton X-100, pH 7.0). Las proteínas adsorbidas fueron lavadas con 10 mL de tampón A con 150 mM de NaCl, 10 mL de tampón A con 300mM de NaCl y se eluyeron con 10mL de tampón A con 600mM de NaCl. Se culminó con una gel filtración en matriz G-25 mediante el agregado de 2,5 mL de muestra y elución con 3,5 mL de tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.

Electroforesis de poliacrilamida con Sodio dodecilsulfato (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 18% para las enzimas de la vía de síntesis de butirósina y 8% para DEBS3. Las muestras de proteínas fueron preparadas con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, pH 6,8) y calentadas 5 minutos a 100°C.

Los geles fueron corridos en tampón de corrida Tris-glicina (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a 120 V durante 90 minutos, en el caso de DEBS3 se corrió a 140V durante 90 minutos. Se utilizaron marcadores de peso molecular PageRuler prestained protein ladder 26616 y Novex Sharp pre-stained protein standard.

Los geles fueron teñidos durante 16 horas a temperatura ambiente con solución de coomasie (2,5 g/L *Coomassie Brilliant Blue* en MeOH:H₂O:ácido acético 4,5:4,5:1) y se

decoloraron con solución decolorante (MeOH:H₂O:ácido acético 4.5:4.5:1) agua destilada. Fueron documentados utilizando un E-Gel® Imager (Life Technologies).

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método de BCA³⁷. Para el mismo se agregaron 25 µL de muestra a 200 µL de solución de BCA (50:1 de *Bicinchoninic Acid Solution: Copper (II) Sulfate Solution*), se incubó 30 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 562 nm. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración realizada en las mismas condiciones con seroalbúmina bovina.

Ensayos de actividad

Fosfoteteneilasa Sfp de *Bacillus subtilis*

La actividad se llevó a cabo en un ensayo de 0,02 mL conteniendo 1mM de MgCl₂, 5mM de DTT, 1mM de coenzima A (CoA), 35,2 µg de apoBtrIentampón HEPES 50mM pH 6,5. Se inició la reacción mediante el agregado de 3 µg de Sfp. Se incubó 30 minutos a 37 °C. Se precipitaron las proteínas con acetona y se analizó la muestra por LC-ESI-MS.

Ligasa ATP-dependiente BtrJ

El consumo de ATP por parte de BtrJ se detectó mediante un ensayo acoplado a L-LDH y piruvato quinasa. Se realizó un ensayo conteniendo 0,02mL de la reacción previamente descrita en 1.3.1 y 1 mL de una solución conteniendo 0,1mM de L-Glutamato, 5mM de MgCl₂, 5mM de MnCl₂, 2mM de ATP, 20mM de KCl, 500mM de PEP, 0,15mM de NADH, 10 U de piruvato quinasa y 10 U de L-LDH en tampón HEPES 50mM pH 7,5. Se inició la reacción mediante el agregado de 250 µg de BtrJ y se midió durante 4 minutos a 340nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Oxidoreductasa BtrV

La actividad se midió en un ensayo de 1mL conteniendo 0,2mM de NADH, 0,01mM de FAD en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de 18µg de BtrV y se midió durante 120 segundos a 340nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aciltransferasa BtrH

La actividad se midió en un ensayo de 108 μ L conteniendo 0.1mM ribostamicina, 0.5mM γ -Glu-AHBA-SNAC y 0,2mM de DTNB en tampón HEPES 50mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de 0.2mg de BtrH y se siguió la liberación de SNAC durante 10 minutos a 412nm ($\epsilon_M= 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

D-Aminoácido oxidasa (DAAO)

La actividad se midió en un ensayo de 2,2mL conteniendo 9,1mM de aminoácido, 0,09 mg/mL de ortofenilendiamina (OFDA), peroxidasa de rábano (HRP) (SIGMA Aldrich) 0,045 mg/mL en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,5. Se inició la reacción mediante el agregado de una solución 0.15 mg/mL de DAAO y se midió durante 120 segundos a 450nm ($\epsilon_M= 1100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Catalasa (CAT)

La actividad se midió en un ensayo de 2,9mL conteniendo 35mM de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de una solución 0,1 mg/mL de CAT y se midió durante 120 segundos a 240nm ($\epsilon_M= 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Racemasa (RAC)

La actividad se midió acoplado esta enzima a la reacción de DAAO (3.1) en presencia de L-aminoácido.

L-Lactato deshidrogenasa (L-LDH)

La actividad se midió en un ensayo de 2,5mL conteniendo 0,8mM de piruvato, 0,2 mM de NADH en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de una solución 0,015 mg/mL de L-LDH y se midió durante 120 segundos a 340nm ($\epsilon_M= 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Formiato deshidrogenasa (FDH)

La actividad se midió en un ensayo de 2mL conteniendo 100mM de ácido fórmico y 5mM de NAD^+ en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se inició la reacción

mediante el agregado de una solución dializada de 0,26 UI/mL de FDH y se midió durante 120 segundos a 340nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

En todos los casos las unidades de enzima (UI) se definieron como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato en un minuto en las condiciones del ensayo.

DEBS3

La actividad quetoreductasa de DEBS3 se midió en un ensayo conteniendo 50mM trans-1-decalona, 1,2mM de NADPH y 150mM de NaCl en tampón fosfato de sodio 400mM pH 7,5. Se inició la reacción mediante el agregado de una solución DEBS3 y se midió durante 20 min a 340nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Síntesis de nanopartículas de sílica biomimética

La síntesis se llevó a cabo mediante el agregado de 0,25mL de tetrametilortosilicato 0,9M (previamente hidrolizado con HCl 1mM) a 0.25 mL de polietilenimina (PEI) 10% pH 8,0 en 1mL de tampón fosfato de sodio 100mM pH 8,0. Se centrifugó el precipitado y se lavó con fosfato de sodio 25mM pH 7,0.

El mismo protocolo se llevó a cabo en presencia de 1mg/mL de Seroalbúmina bovina (BSA) en el tampón de reacción. De este modo se obtuvieron nanopartículas de sílica-BSA³⁸.

La síntesis de nanopartículas de sílica-glutaraldehído se llevó a cabo tomando 0.5 g de nanopartículas de sílica-BSA previamente sintetizadas y se incubaron con 1 mL de una solución de glutaraldehído al 15% en tampón fosfato de sodio 200mM pH 7. Las mismas se dejaron 16 h a 25°C en agitación.

Caracterización de nanopartículas de sílicabiomimética

Se llevó a cabo la caracterización de las nanopartículas cuya síntesis fue realizada en presencia (Si-PEI-BSA) y ausencia (Si-PEI) de una proteína modelo (Sero albúmina Bovina). Los resultados de estos estudios se obtuvieron por colaboración con la Dra Valeria Grazú del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Universidad de Zaragoza, España.

Morfología y distribución de tamaño

La morfología y distribución de tamaño se caracterizó por SEM. La distribución del tamaño de partícula fue evaluada a partir de una serie de micrografías utilizando un analizador de imágenes automático. Se seleccionaron aproximadamente 100 partículas para realizar el histograma de distribución de tamaño.

Reproducibilidad del método de síntesis

Se prepararon 4 lotes independientes de nanopartículas las cuales fueron analizadas por SEM como se describe en el apartado 1.5.1.1.

Síntesis de glioxil-agarosa

Se preparó según Guisán y cols 1988²². La activación de agarosa se realizó sobre 10,5 g de agarosa 6BCL en 3 mL de agua destilada a los que se les agregó 0,34 g de NaOH en 5 mL de agua destilada a 4°C, 0,145 g de BH₄Na y 3,6 mL de glicidol gota a gota. Se dejó la mezcla 16 horas a 24°C y se lavó con exceso de agua. La oxidación a grupos aldehído se obtuvo mediante el agregado de 150 mL de una solución 10 mM de NaIO₄ durante 2 horas. Se finalizó con 3 lavados de 50 mL de agua destilada.

Inmovilización de enzimas en nanopartículas de sílicabiomimética

La inmovilización en nanopartículas por atrapamiento se llevó a cabo incluyendo las enzimas de interés en el tampón fosfato de sodio 100 mM pH 8,0 y siguiendo el protocolo de síntesis de nanopartículas. Las enzimas resultaron así atrapadas en las esferas de sílica generadas en la misma reacción de síntesis del soporte.

Para BtrH se llevó a cabo en presencia de 0,2 mg de proteína, para BtrG 0,4 mg, DAAO 0,3 y 0,6 UI, DEBS3 10 mg por mL de tampón.

La co-inmovilización de BtrH y BtrG se llevó a cabo la inmovilización como se describe previamente en presencia de 0,2 mg de BtrH y 0,4 mg de BtrG por mL de tampón.

La co-Inmovilización de Sfp, BtrI, BtrJ, BtrK, BtrV, BtrO, BtrH y BtrG se llevó a cabo en presencia de 2 nmol de Sfp, 2nmol de BtrI, 4 nmol de BtrJ, 2 nmol de BtrK, 8 nmol de BtrV, 2 nmol de BtrO, 4 nmol de BtrH y 4 nmol de BtrG por mL de tampón.

En todos los casos se analizó el atrapamiento por SDS-PAGE 8-18% donde se observa el patrón de bandas antes y después del atrapamiento.

La inmovilización de BtrH y BtrG en superficie de nanopartículas de sílica funcionalizadas con glutaraldehído se llevó a cabo incubando 0.1 g de nanopartículas de sílica-BSA-glutaraldehído con 1 mL de tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0 conteniendo 0,2 mg de BtrH y 0,4 mg de BtrG por 16 h a 25 °C. Se colectan las nanopartículas por centrifugación 4000 g 1 min y se lavan dos veces con tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0.

Inmovilización en glioxil-agarosa

Se realizó según el protocolo descrito en Mateo y cols 2005³⁹. En general, las inmovilizaciones fueron realizadas ofreciendo una solución enzimática en tampón 0,1M bicarbonato de sodio pH 10,0 a glioxil-agarosa (en relación 10:1) previamente equilibrada en dicho tampón. Una vez culminado el tiempo de incubación, se procedió a incubar con 1 mg/mL de borohidruro de sodio en hielo para reducir las bases de Schiff generadas entre aminas y los grupos glioxil del soporte de manera de generar enlaces covalentes. En todos los casos, luego de terminada la inmovilización, se removió el sobrenadante mediante filtración y se lavó el soporte con tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.0.

Para DAAO, la incubación se realizó durante 16 h a 24°C. Para CAT, 3 h a 24°C., para RAC 30 minutos a 24°C, para FDH una 1,5 h a 4°C y luego 1 h a 24°C.

Inmovilización de LDH en glioxil-agarosa

Se incubó la enzima 15 minutos a 24 °C, 16 horas a 24 °C, 15 minutos a 4°C o 16 horas a 4°C previo a la reducción con 1 mg/mL de borohidruro de sodio. En el caso del derivado incubado 15 minutos a 24 °C se realizó además la incubación con 0,1 mg/mL de borohidruro de sodio en un volumen 10 veces mayor, en hielo.

Co-inmovilización de DAAO y CAT

La co-inmovilización se llevó a cabo como se describe previamente, en presencia de 0,03 UI de DAAO y 0,1 o 0,18 UI de CAT por gramo de glioxil-agarosa. Se incubó por 3 horas a 24 °C. La reducción se llevó a cabo con 1 mg/mL de borohidruro de sodio en hielo.

Co-inmovilización de L-LDH:FDH

La co-inmovilización se llevó a cabo en presencia de 0,25 UI de LDH y 1 UI de FDH por gramo de glioxil-agarosa con 300mM de trehalosa. Se incubó la FDH por 1,5 h 4°C y luego 45 minutos a 24°C, se agregó la L-LDH y se dejó 15 minutos. La reducción se llevó a cabo con 0.1 mg/mL de borohidruro de sodio en hielo en volumen 10 veces mayor.

Caracterización de preparados inmovilizados.

Porcentaje de inmovilización y rendimiento

El porcentaje de inmovilización (% I) se definió como el porcentaje de la diferencia entre la enzima ofrecida y el sobrenadante, con respecto a la enzima ofrecida. El mismo se calculó utilizando la medida de actividad de las enzimas o de concentración de proteínas según la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{(Enzimaofrecida - Enzimaensobrenadante) * 100}{Enzimaofrecida}$$

Para el rendimiento se resuspendió el derivado en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0 y se midió su actividad. El rendimiento se definió como el porcentaje de actividad recuperada en el derivado con respecto a la diferencia de la enzima ofrecida y el sobrenadante. El mismo se calculó utilizando la medida de actividad de las enzimas según la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{(Actividad en suspensión) * 100}{Actividad de enzimaofrecida - Actividad de enzimaensobrenadante}$$

Estabilidad de DAAO, FDH y L-LDH frente a peróxido de hidrógeno

Se tomaron derivados de DAAO, FDH y LDH en glioxil-agarosa. Se llevó a cabo la incubación de los mismos en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0conteniendo 10 mM de peróxido de hidrógeno. Se midió actividad residual a distintos tiempos.

Se midió de forma independiente la actividad de los derivados en presencia de peróxido en la mezcla de reacción para corroborar que el mismo no interfiriera con el ensayo.

Estabilidad térmica de L-LDH en glioxil-agarosa

Se llevó a cabo la incubación de la enzima en solución y su correspondiente derivado enzimático en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7 a 50 y 55°C. Se midió actividad residual a distintos tiempos.

Estabilidad de LDH en solución a pH 10

Una solución de LDH soluble (0,015mg/mL) fue incubada durante 15 minutos en buffer 0.1M bicarbonato de sodio pH 10 a 4°C. Se llevó a cabo este ensayo en presencia de 75, 150 y 300 mM de trehalosa, 0,1mM de NADH, 10mM de piruvato, 5% de PEG.

Estabilidad de L-LDH con el pH

Se llevó a cabo la incubación de la enzima en solución y su correspondiente derivado enzimático a 24°C, en tampón acetato de sodio 25mM pH 3,0, 4,0 y 5,0, fosfato de sodio 25mM pH 6,0, 7,0 y 8,0 y bicarbonato de sodio 25mM pH 9,0, 10,0 y 11,0. Se midió actividad residual a distintos tiempos.

Temperatura óptima de L-LDH

Se prepararon soluciones con enzima en solución y su correspondiente derivado enzimático en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se midió actividad como se describe previamente variando la temperatura del ensayo entre 25°C y 90°C.

pH óptimo de L-LDH

Se prepararon soluciones con enzima en solución y su correspondiente derivado enzimático en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se midió actividad en tampón acetato de sodio 25mM para pH 3,0, 4,0 y 5,0, en tampón fosfato de sodio 25mM pH 6,0, 7,0 y 8,0 y bicarbonato de sodio 25mM pH 9,0, 10,0 y 11,0. El ensayo se realizó mediante el agregado de 0,04 mL enzima a 2,65 mL de mezcla de reacción.

Determinación de parámetros cinéticos de L-LDH

Se prepararon soluciones con enzima en solución y su correspondiente derivado enzimático en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se midió actividad de los

mismos en presencia de diferentes concentraciones de piruvato (0,025-0,75mM). Se ajustaron los datos obtenidos a una hipérbola de Michaelis–Menten utilizando el programa GraphPrism (GraphPad Software, Inc.) y se obtuvieron los parámetros K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

Inhibición por sustrato de L-LDH

Se llevó a cabo el ensayo de actividad en presencia de concentraciones de sustrato de 0,025 a 6,0 mM. Se ajustaron los datos obtenidos a una curva de inhibición por sustrato utilizando el programa GraphPrism (GraphPad Software, Inc.) y se obtuvo el parámetro K_I .

Inhibición de DAAO por NADH y NAD⁺

Se llevó a cabo la incubación de DAAO:CAT en relación 1:10 en presencia y ausencia de 0,2 y 2 mM de NADH. Se analizó por HPLC la síntesis de ácido fenilglicólico a partir de D-Phg al cabo de 2 h. Se testeó además la actividad de DAAO por espectrofotometría como se describe en presencia de 0,2 y 2 mM de NADH.

La inhibición de DAAO por NAD⁺ se testeó midiendo la actividad de DAAO por espectrofotometría en presencia de 2 mM de NAD⁺.

Uso in vitro de enzimas en solución y derivados de RAC, DAAO, CAT, LDH y FDH.

Síntesis de alfa cetoácidos con enzimas en solución

El acoplamiento de DAAO y CAT se llevó a cabo en relaciones de 1:3 y 1:6. La síntesis se llevó a cabo incubando las enzimas solubles, inmovilizadas y co-inmovilizadas con 2 mM de D/L Phg en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,5. Se tomaron alícuotas a las 2, 5, 16 y 24 h y se analizaron por HPLC según se describe posteriormente.

Estudio de formación de ácido benzoico con enzimas en solución, inmovilizadas y co-inmovilizadas

El estudio de formación de ácido benzoico se llevó a cabo mediante el análisis por HPLC con un método especialmente desarrollado para la detección de ácido benzoico y comparando los resultados obtenidos en ausencia de CAT en la reacción.

Síntesis de ácido mandélico con enzimas en solución

El acoplamiento del sistema enzimático para la síntesis de ácido mandélico se realizó en iguales relaciones de unidades de enzima de RAC, DAAO y LDH y con 3 veces más CAT y 5 veces más FDH. La síntesis se llevó a cabo incubando las enzimas con 2 mM de D/L Phg, 0,2mM NADH o NAD⁺, 0,1M de ácido fórmico en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,5. Se tomaron alícuotas a las 2, 5, 16 y 24 h y se analizó la presencia de aminoácido y alfa hidroxiaácido por HPLC.

Síntesis de ácido láctico con enzimas en solución

El acoplamiento para la síntesis de ácido láctico se realizó en relaciones RAC:DAAO:CAT:LDH:FDH 1:1:3:1:5. La síntesis se llevó a cabo incubando las enzimas con 2 mM de D/L alanina, 0,2mM NADH o NAD⁺, 0,1M de ácido fórmico en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,5. Se tomaron alícuotas a las 2, 5, 16 y 24 h y se analizó la presencia de aminoácido y alfa hidroxiaácido por HPLC.

Síntesis de ácido láctico en dos etapas con enzimas inmovilizadas en glioxil-agarosa

Se tomaron derivados glioxil-agarosa y se incubaron 0,025UI de RAC, 0,025UI de DAAO, 0,075 UI de CAT en relación 1:10 soporte: volumen con una solución 5mM alanina D/L en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Se dejó 16 horas a 24 °C y se filtró. El filtrado se agregó a un derivado LDH: FDH con 0,025UI: 0,1 UI, 0,2mM NADH, 0,2M ácido fórmico e tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,0 y se dejó 16 horas a 24°C y se filtró. Se analizó la presencia de aminoácido y alfa hidroxiaácido por HPLC como se describe en el apartado.

Síntesis de ácido láctico en *onepot* con enzimas inmovilizadas en glioxil-agarosa

Se tomaron derivados glioxil-agarosa y se incubaron 0,025UI de RAC, 0,025UI de DAAO, 0,075 UI de CAT 0,025 UI de LDH y 0.1 UI de FDH en relación 1:10 soporte: volumen con una solución 5mM alanina D/L, 0,2mM NADH, 0,2M ácido fórmico en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Se dejó 16 horas a 24 °C y se filtró. Se analizó la presencia de aminoácido y alfa hidroxiaácido por HPLC como se describe en el apartado posteriormente.

Análisis por HPLC.

El análisis por HPLC de fenilglicina, ácido fenilglicólico y ácido mandélico se llevó a cabo en columna C18 (5µm, 250 x 4,6mm), fase móvil de 98:2 acetato de amonio 10 mM: acetonitrilo pH 2,3, 0,02% TFA, flujo 1mL/min y detección a 254 nm. El análisis de ácido benzoico se llevó a cabo en columna C18 (5µm, 250 x 4,6mm), fase móvil 70:30 acetato de amonio 10 mM: acetonitrilo pH 2,3, flujo 1 mL/min detección a 254 nm. El análisis de alanina y ácido láctico se llevó a cabo en columna Chirex ® 3126 (D)-penicillamina (50 x 4,6mm), fase móvil 1mM sulfato de cobre, flujo 1mL/min, detección a 254nm.

Uso in vitro de enzimas de la vía de síntesis de Butirosina

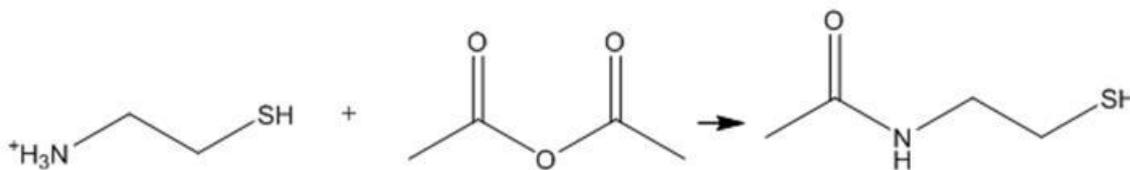
Síntesis de butirosina con Sfp, BtrI, BtrJ, BtrK, BtrV, BtrO, BtrH y BtrG acopladas en solución

El acoplamiento para la síntesis de butirosina B se realizó en relaciones equimolares, a excepción de BtrJ que se agregó el doble de moles. La síntesis se llevó a cabo incubando las enzimas con L-Glu 100 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CoA 1 mM, ATP 5 mM, KCl 50 mM, PLP 20µM, FAD 10µM, NADH 1mM, MnCl₂ 5mM, NaCl 50mM y ribostamicina 1mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0 30°C durante 2 h. Se precipitaron las proteínas con acetona y se analizó la muestra por TLC.

Síntesis con Sfp, BtrI, BtrJ, BtrK, BtrV, BtrO, BtrH y BtrG co-inmovilizadas

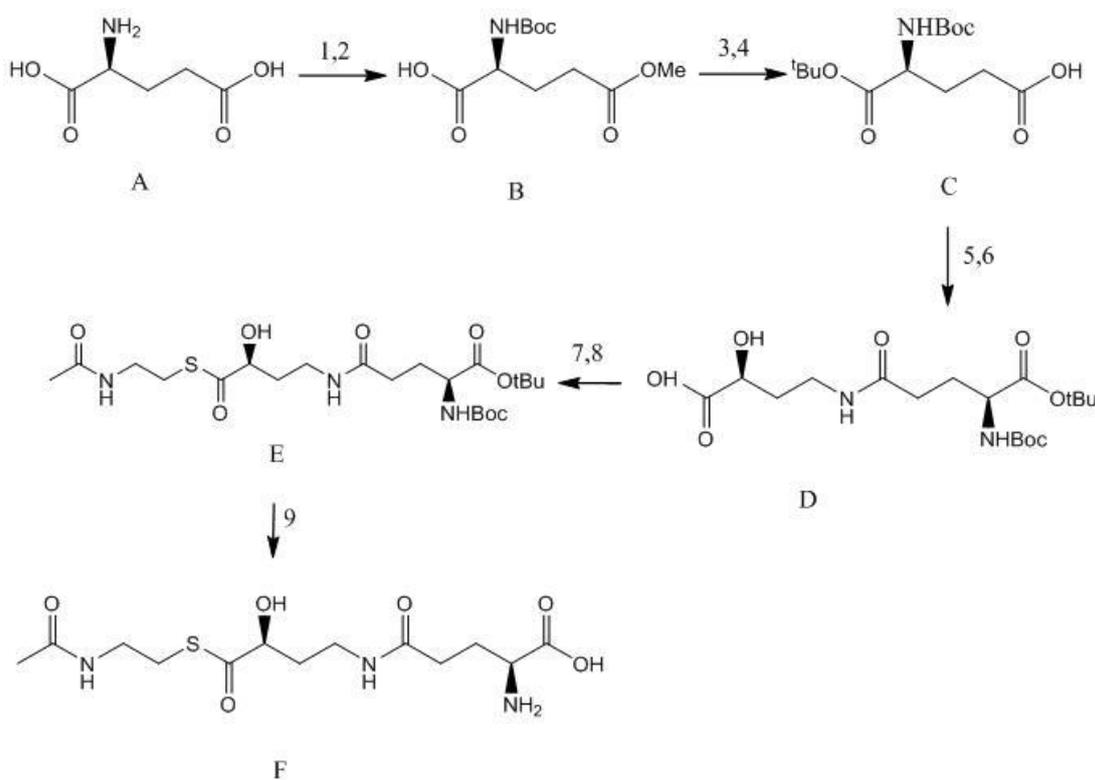
La síntesis se llevó a cabo incubando 0,1g de sílica con las enzimas atrapadas en 1mL de una solución conteniendo L-Glu 100 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CoA 1 mM, ATP 5 mM, KCl 50 mM, PLP 20µM, FAD 10µM, NADH 1mM, MnCl₂ 5mM, NaCl 50mM y ribostamicina 1mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0 30°C durante 2 horas en agitación. Se centrifugó durante 1 minuto a 4000 g y se analizó la muestra por TLC (15% de NaCl y etanol en relación 5:3. Revelado con ninhidrina 0,2% en etanol).

Síntesis de N-acetilcisteamina (SNAC)



La síntesis se llevó a cabo mediante el protocolo según Klopries *et al* 2013⁴⁰ modificado como se describe a continuación: Se disolvieron en 877 mL de agua, 40 g de hidrocloreto de cisteamina, 88,42 g de bicarbonato de sodio y 19,65 g de hidróxido de potasio. Se agregaron 33,3 mL de anhídrido acético gota a gota a 0°C. Se dejó 24 h a 24°C. Se ajustó el pH de la solución a 1,0 y se extrajo 3 veces con 150 mL de Acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron con Na₂SO₄ para obtener la N-acetilcisteamina.

Síntesis de γ -Glu-AHBA-SNAC



1- MeOH, trimetilsilil cloruro, 2- 1,4-dioxano, Boc₂O, NaHCO₃, 3- CH₂Cl₂, DCC, DMAP, tert-butil alcohol, 4- THF, LiOH, 5- trietilamina, p-nitrofenilchloroformato, 4-dimetilaminopiridina, 6- ácido (S)-4-amino-2-hidroxi-butirico, trietilamina 7- N,N'-dicyclohexylcarbodiimida, 8- N-acetilcisteamina, 9- TFA, H₂O, TIPS

Se partió de la síntesis de α -tert-butil éster de ácido N-Boc-L-glutámico (C). La misma se llevó a cabo según Cui *et al.*, 2013⁴¹. Se partió de una suspensión de 0.2 mol de L-Glutamato (A) en metanol seco (600 mL), se agregó gota a gota bajo argón, trimetilsilil cloruro (0,44 mol) y se dejó 10 minutos a 24 °C. La solución fue evaporada para obtener un sólido blanco. El mismo fue disuelto en agua (200 mL) a 0 °C y se agregaron 200 mL de 1,4-dioxano luego de lo cual se dejó 5 minutos a 24 °C. A esta solución se le agregó Boc₂O (0,24 mol) a 0 °C y NaHCO₃ (0,5 mol) y se dejó 16 h a 24 °C. Se secó la mezcla y el residuo fue disuelto en una solución al 10% de NaHCO₃ y se lavó con dietil éter. La fase acuosa fue llevada a pH 4,0 con ácido cítrico sólido y B fue extraído con Acetato de etilo. El mismo fue lavado con agua y NaCl saturado y se secó con MgSO₄ y se removió el disolvente por evaporación.

A 600 mL de una solución fría de CH₂Cl₂, se le agregó DCC (152 mmol), DMAP (12,69 mol) y tert-butil alcohol (1,27 mol). A la misma se le agregó gota a gota una solución de CH₂Cl₂ (100 mL) con B (0.127 mol) y se dejó 1 hora a 0 °C y 4 horas a 24 °C. La mezcla fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue disuelto en Acetato de etilo. La suspensión fue filtrada con Celite® para remover la DCU. Se corroboró por TLC que no quedara compuesto retenido en el Celite® (TLC: 9:1 diclorometano:metanol, revelado: 1% KMnO₄, 6.6% K₂CO₃, 1% NaOH en agua).

El filtrado fue lavado con una solución al 10 % de ácido cítrico saturado, NaHCO₃, NaCl saturado y fue secado con MgSO₄.

La solución se concentró *in vacuo* y el residuo obtenido fue purificado por cromatografía en matriz de sílica (fase móvil: éter de petróleo: acetato de etilo 5:5). El eluido se siguió por TLC para identificar las señales de producto purificado (TLC: éter de petróleo: acetato de etilo 9:1, revelado: 1% KMnO₄, 6.6% K₂CO₃, 1% NaOH en agua). Las fracciones de eluido colectadas fueron concentradas *in vacuo* y se agregó THF (500 mL) y LiOH (0.23 mol). La mezcla se dejó 1 h a 24 °C. Se corroboró por TLC (PetroÉter:Acetato de etilo, 9:1) la ausencia de compuesto B. Se removió entonces el THF por evaporación y el compuesto resultante se particionó entre dietil éter y agua. La fase acuosa se llevó a pH 4,0 con ácido cítrico. El precipitado se diluyó en acetato de etilo. Se repitió este proceso dos veces. Las fases orgánicas fueron combinadas, lavadas con agua, NaCl saturado, secado con MgSO₄ y evaporado *in vacuo*. Se compararon los spots por TLC (Éter de petróleo: etil acetato, 5:1, revelado: 1% KMnO₄, 6.6% K₂CO₃,

1% NaOH en agua) de antes y después del tratamiento con THF. El producto fue purificado por cromatografía en matriz de sílica (fase móvil: Hexano: Acetato de etilo 2:1 1% ácido acético).

Una vez obtenido el 1.1.1.1 α -tert-butil éster de ácido N-Boc-L-glutámico se prosiguió con la síntesis de N-Boc- α -tert-butil- γ -L-Glu-AHBA (D). Para esto se llevó a cabo un protocolo modificado de Llewellyn *et al* 2007³². Se partió del α -tert-butil éster de ácido N-Boc-L-glutámico sintetizado previamente y se disolvió (1,65 mmol) en 35 mL de acetonitrilo bajo argón. La solución fue enfriada en baño de hielo y se agregó trietilamina (4,0 mmol), p-nitrofenilchloroformato (2,0 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,02 mmol). Luego de 1 h se agregó gota a gota una solución de ácido (S)-4-amino-2-hidroxi-butirico (6,7 mmol) y trietilamina (7,9 mmol) en 20 mL de agua. Se dejó durante 3 h a 24 °C y se removió el acetonitrilo por evaporación. El residuo se disolvió en 25 mL de agua, se agregaron 25 mL de Acetato de etilo y se llevó a pH 2,0 con HCl 1M. Se separó la fase orgánica de la acuosa y se lavó la fase acuosa dos veces con Acetato de etilo. Se juntaron las fases orgánicas y se secaron con MgSO₄, se filtró y se evaporó el Acetato de etilo. Se diluyó el residuo en 20 mL de acetato de etilo y se precipitó mediante el agregado de 40 mL de éter de petróleo. El precipitado fue colectado por centrifugación, se lavó dos veces con éter de petróleo y se disolvió en MeOH. Se evaporó el metanol. Una vez obtenido el N-Boc- α -tert-butil- γ -L-Glu-AHBA se prosiguió con la síntesis de γ -Glu-AHBA-SNAC. Para esto se disolvió N-Boc- α -tert-butyl- γ -L-Glu-AHBA (D) (126 μ mol) en 5 mL de acetonitrilo bajo argón en agitación y calor. Se preparó una solución de N,N'-dicyclohexilcarbodiimida (132 μ mol) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (131 μ mol) en 5 mL de acetonitrilo y se agregó a la mezcla anterior a 24°C gota a gota. Se agregó finalmente N-acetylcysteamina (137 μ mol) previamente preparada. La reacción se dejó en agitación durante una hora, se agregó carbonato de potasio (65 μ mol) y se dejó 3 h. Se removió el acetonitrilo por evaporación y el residuo obtenido se diluyó en etil acetato y se extrajo 3 veces con 10 mL de bicarbonato de sodio saturado. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y evaporó el solvente. El residuo obtenido (E) se disolvió en 1 mL de TFA:H₂O:TIPS (95:2.5:2.5) bajo argón y se dejó a temperatura ambiente por 1,5 h. El producto fue precipitado por adición de 10 mL de dietileter frío y se colectó por centrifugación. El precipitado se disolvió en agua y se secó por evaporación para dar el producto final (F). Se corroboró su identidad por RMN.

Síntesis de butirosina con BtrH y BtrG y γ -Glu-AHBA-SNAC en solución

La síntesis se llevó a cabo incubando con 0,2 mg de cada enzima en 1mL de una solución con 0.5 mM γ -Glu-AHBA-SNAC y ribostomicina 1mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0 30°C durante 20 minutos en agitación. Se centrifugó durante 1 minuto a 4000 g y se analizó la muestra por TLC (15% de NaCl en agua y etanol puro en relación 5:3. Revelado con ninhidrina 0,2% en etanol).

Síntesis de Butirosina con BtrH y BtrG co-inmovilizadas e inmovilizadas

La síntesis se llevó a cabo incubando 0,1g de sílica con las enzimas co-inmovilizadas en superficie y co-atrapadas en 1mL de una solución conteniendo 0.5 mM γ -Glu-AHBA-SNAC y ribostamicina 1mM en tampón HEPES 50 mM pH 7,0 a 30°C durante 20 minutos en agitación. En el caso de las enzimas inmovilizadas separadamente tanto en superficie como por atrapamiento, se tomaron 0,1g de cada derivado y se incubaron en 2mL de mezcla de reacción. Se centrifugó durante 1 minuto a 4000 g y se analizó la muestra por TLC (15% de NaCl y etanol en relación 5:3. Revelado con ninhidrina 0,2% en etanol).

Análisis de aminoglicósidos por LC-ESI-MS

Los aminoglicósidos fueron analizados por LC-ESI-MS utilizando un espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan LCQ (Thermo Electron) acoplado a un sistema de UPLC-BEH (Waters). Los aminoglicósidos fueron separados en una columna C18 1.7 μ m, 2.1x100 mm (Waters) con un flujo de 0.3 mL/min a 40 °C mediante un gradiente de fases de 0 – 5 min, 10% B; 5 – 25 min, 10% – 50% B; 25 – 26 min, 50% – 10%B; 26 – 30 min, 10% B (Fase A 0.1% de Acido Fórmico en agua nanopura, Fase B Acetonitrilo). El espectro de masas fue adquirido entre 300 y 1000 Da.

Capítulo 1

Uso *in vitro* de sistemas enzimáticos para la síntesis de Butirosina B.

1.1 Introducción

La Butirosina es un antibiótico aminoglucósido producido originalmente por *B. circulans*^{42,43}.

Los antibióticos aminoglucósidos se utilizan para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones^{44,45}. El tratamiento sistémico con aminoglucósidos debe ser cuidadosamente monitoreado, ya que estos medicamentos conllevan el riesgo de nefrotoxicidad reversible y ototoxicidad irreversible⁴⁶. Sin embargo, los aminoglucósidos bactericidas siguen siendo una herramienta importante para el tratamiento de enfermedades, ya sea solo o en combinación con otros antibióticos⁴⁴. Los aminoglucósidos actúan interfiriendo con la maquinaria de síntesis de proteínas bacteriana. Este efecto se ejerce a través de la asociación de la molécula de aminoglucósido con el ARNr 16S de la subunidad ribosomal 30S. Durante la síntesis proteica en bacterias, la subunidad 30S es responsable de la traducción de ARN mensajero (ARNm) mediante el apareamiento de los codones de ARNm con sus correspondientes anticodones de ARN de transferencia (ARNt). Los aminoglucósidos interfieren con esta función mediante la unión al sitio A del 16S donde se reconocen y se unen las moléculas de ARNt⁴⁷. En presencia de una molécula de aminoglucósido unida, los ARNt se unen con más fuerza al sitio A, esto aumenta la afinidad de ARNt no específicos lo que compromete la habilidad del ribosoma de discriminar entre ARNt complementarios y no complementarios, llevando a la producción de proteínas dañadas, mal traducidas y, en última instancia, la muerte celular⁴⁸.

En la naturaleza, la butirosina se produce como un complejo de dos epímeros, butirosina A y butirosina B, los cuales son estructuralmente idénticos a la xylostacina y la ribostamicina respectivamente a excepción de una cadena lateral (S)-4-amino-2-hydroxibutiril (AHBA) (Figura 1.1). Esta cadena es única entre los aminoglucósidos naturales y es capaz de mejorar la actividad del antibiótico hacia un número de patógenos resistentes a aminoglucósidos⁴⁹. La cadena lateral AHBA protege el antibiótico de los efectos de desactivación de varias enzimas de resistencia bacteriana.

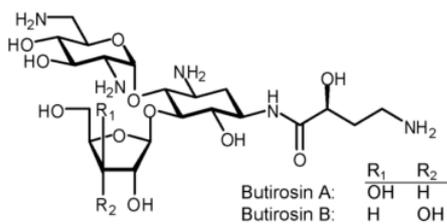


Figura 1.1: Estructura de la butirosina A y B.

La biosíntesis de la cadena lateral AHBA ha sido completamente dilucidada (Figura 1.2). El proceso comienza con la fosfopanteteinilación de la proteína portadora de acilo **BtrI** por una fosfopanteteinil transferasa, **Sfp**, de modo de obtener holo BtrI. Se continúa con la unión de una molécula de L-glutamato a BtrI por la ligasa dependiente de ATP **BtrJ**. Este paso es seguido por la descarboxilación del producto, γ -L-glutamyl-S-BtrI mediante una decarboxilasa PLP-dependiente, **BtrK**. El intermediario descarboxilado es inmediatamente γ -L-glutamilado en el amino terminal nuevamente por BtrJ. El intermedio resultante, γ -L-glutamyl-GABA-S-BtrI es α -hidroxilado por un sistema de dos componentes que consta de una monooxigenasa dependiente de FMN, **BtrO** y una oxidoreductasa dependiente de NADH: FMN **BtrV**. El grupo γ -glutamyl-AHBA se transfiere entonces a la Ribostomicina por un aciltransferasa, **BtrH**. Finalmente **BtrG** escinde el grupo protector L-glutamato para dar butirosina B.

La síntesis *ex vivo* de la butirosina, no tiene precedentes. En este capítulo se abordará el acoplamiento de las enzimas involucradas en la vía de síntesis, en solución e inmovilizadas, para la producción *in vitro* del aminoglucósido. Para lograr nuestro objetivo se plantearon dos estrategias alternativas.

Por un lado, se planteó el estudio de expresión heteróloga, purificación y ensayos de actividad parcial de enzimas clonadas en plásmidos de expresión gracias a la colaboración con el grupo del Prof. Peter Leadlay (Universidad de Cambridge). Nuestro trabajo por tanto involucra y se extiende a la evaluación de la síntesis global con enzimas solubles e inmovilizadas, partiendo de los sustratos naturales. Por otro lado, y dado el riesgo en el acoplamiento de siete enzimas diferentes para las que no hay trabajos previos reportados de utilización *in vitro* más que evidencias de su actividad en forma aislada^{32,50}, nos planteamos abordar la síntesis partiendo de sustratos no naturales con BtrG y BtrH. Estas dos últimas enzimas de la vía son las encargadas de transferir la cadena lateral a la ribostamicina (BtrH) y remover el grupo glutamato protector (BtrG).

Existen evidencias previas de que BtrH es capaz de tomar sustratos sintéticos derivados de N-acetilcisteamina (SNAC)⁵¹. De esta forma se podría simplificar la síntesis enzimática *in vitro* de Butirosina B, utilizando solamente dos enzimas acopladas.

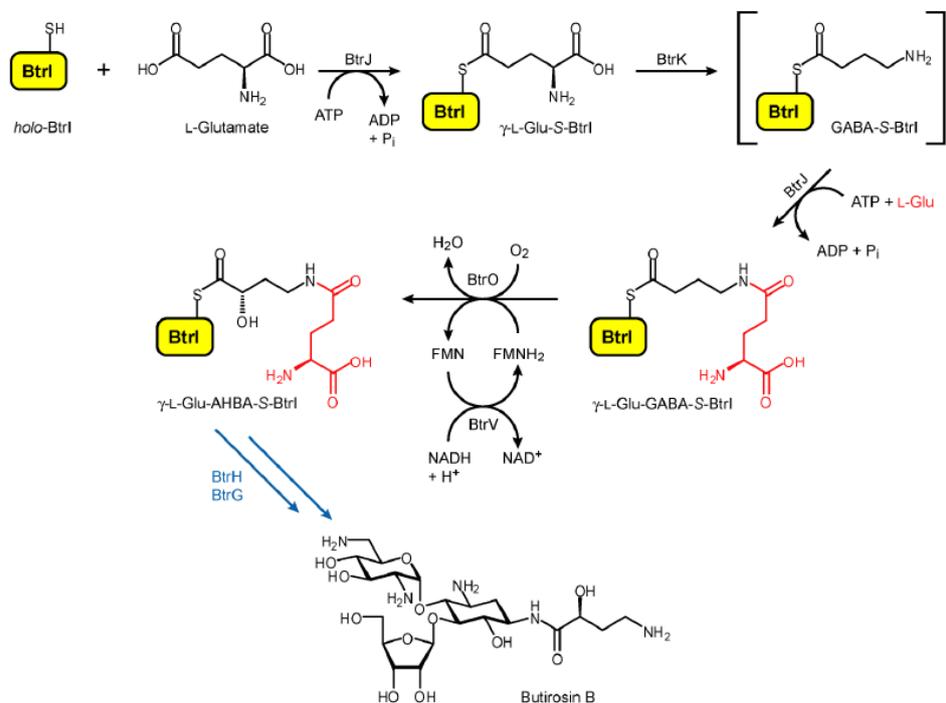


Figura 1.2: Esquema de síntesis de butirosina a partir de Holo BtrI.

1.1 Resultados y discusión

1.1.1 Expresión y purificación de enzimas del sistema

Las proteínas involucradas en la vía de síntesis de butirosina B fueron expresadas de forma heteróloga en *E. coli* BL-21 (DE3) con una cola de Histidina N-terminal (6x His-tag) lo que facilitó su purificación por cromatografía de afinidad con níquel. Las muestras se concentraron por centrifugación en concentradores con membrana de corte de 3KDa y se re-diluyeron en tampón de almacenado para reducir la concentración final de imidazol a 1mM.

En la Figura 1.3 se observa el análisis por SDS-PAGE de las proteínas expresadas y purificadas. Con el protocolo estándar, el análisis mostró que BtrH, I, J, V y Sfp fueron correctamente sobreexpresadas. Sin embargo, para BtrG, K y O los rendimientos de purificación no fueron satisfactorios por lo que se evaluaron diferentes condiciones de elución de la cromatografía. Los análisis por SDS-PAGE de las figuras 1.4, 1.5 y 1.6

muestran una mejor recuperación de las proteínas diana con eluciones a 250 y 400 mM de imidazol.

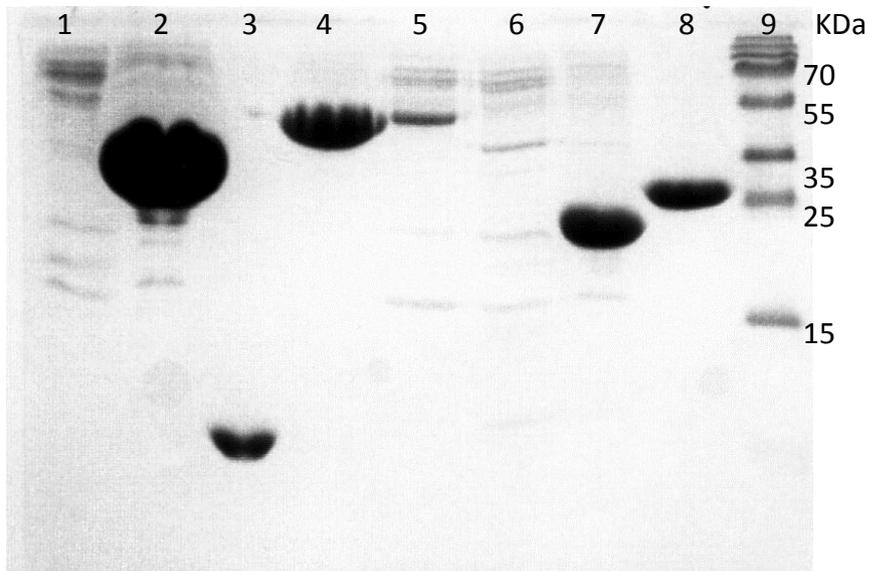


Figura 1.3: SDS-PAGE 18% de las proteínas de la vía de síntesis de butirosina expresadas y purificadas. Carril 1, BtrG, Carril 2, BtrH, Carril 3, BtrI, Carril 4, BtrJ, Carril 5, BtrK, Carril 6, BtrO, Carril 7, BtrV, Carril 8, Sfp, marcador de peso molecular.

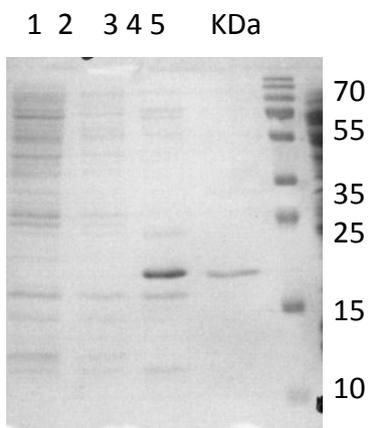


Figura 1.4: Purificación de BtrG, Carril 1, lavado 40mM imidazol, Carril 2, lavado 60 mM deimidazol, Carril 3 eluido 250 mM de imidazol, Carril 4, eluido 400 mM imidazol, Carril 5: marcador de peso molecular

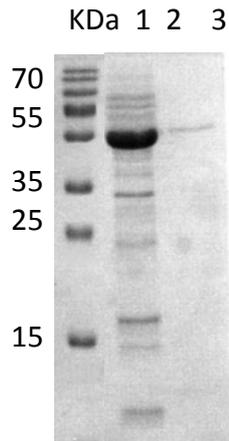


Figura 1.5: Purificación de BtrK, Carril 1 marcador de peso molecular, Carril 2, lisado celular sin inducir, Carril 3, fracción insoluble, Carril 4, lavado 40 mM imidazol, Carril 5 lavado 60 mM deimidazol, Carril 6, eluido 250 mM de imidazol, Carril 7 eluido 400 mM imidazol,

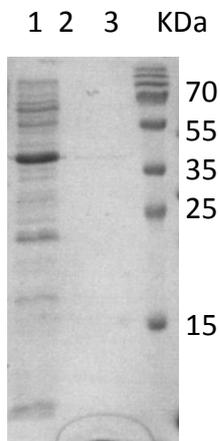


Figura 1.6: Purificación de BtrO, Carril 1, eluido 250 mM de imidazol, Carril 2 eluido 400 mM imidazol, Carril 3 marcador de peso molecular.

En la Tabla 1.1 se observa la cantidad de proteína obtenida luego de la expresión y purificación parcial por litro de cultivo bacteriano, el rango de cantidad de proteínas obtenido varía entre los 17mg para BtrJ y los 29 mg para BtrH.

Tabla 1.1: Proteínas purificadas, pesos moleculares y concentración obtenida por litro de cultivo celular.

Proteína	Peso Molecular (Da)	Proteína obtenida (mg/L cultivo)
apoBtrI	11812	32
Sfp	28133	16
BtrJ	50962	17
BtrK	47800	22
BtrO	38700	18
BtrV	26100	26
BtrG	18100	15
BtrH	37916	29

1.1.2 Uso *in vitro* de las enzimas de la vía de la butirosina B en solución

Una vez obtenidas todas las enzimas de forma soluble se estudió la actividad de las preparaciones obtenidas para Sfp, BtrJ y BtrV. Para las demás enzimas no se contaban con ensayos de actividad previamente descritos en la literatura por lo que no fue posible evaluar su actividad parcial.

1.1.2.1 Fosfopanteteinilación de apo BtrI con Sfp de *Bacillus subtilis*

El primer ensayo realizado con enzimas en solución fue el estudio de la fosfopanteteinilación de apo-BtrI por Sfp (Figura 1.7).

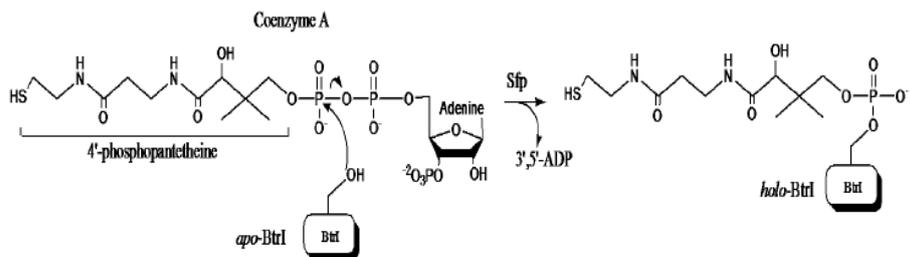


Figura 1.7: Fosfopanteteinilación de apo-BtrI por Sfp

Este ensayo se llevó a cabo mediante la incubación de Sfp con la forma apo de BtrI en condiciones previamente descritas⁵⁰ y se analizó por LC-MS la aparición de la forma holo de BtrI. En la figura 1.8 se observa la aparición de holo BtrI (m/z 12149) aunque se ve también que la reacción no es completa en las condiciones planteadas ya que se observa la masa de 11889 correspondiente a apo BtrI luego de 30 min de reacción.

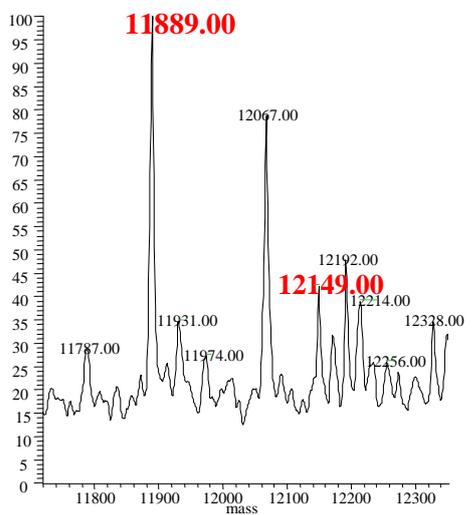


Figura 1.8: Análisis por LC-MS del ensayo de fosfopanteteinilación de apo-BtrI por Sfp

En vista de este resultado se procedió a ensayar la fosfopanteteinilación de apoBtrI *in vivo* considerando reportes previos exitosos para esta estrategia con otras enzimas³⁶. Esto se llevó a cabo mediante la co-expresión de apoBtrI con Sfp. Se llevó a cabo la purificación de BtrI y se analizó por SDS PAGE y LC-MS.

En la figura 1.9 puede observarse el análisis por electroforesis de la co-expresión de BtrI y Sfp. En el mismo se observa una banda de sobreexpresión a la altura aproximada donde se esperaba encontrar BtrI (11800 Da para la forma apo y 12149Da para la forma Holo de la proteína) y Sfp (28133 Da). Esta observación indica que la expresión de BtrI fue exitosa cuando fue co-expresada con Sfp.

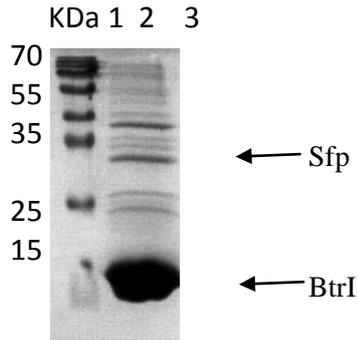


Figura 1.9: SDS-PAGE al 18% de BtrI co-expresado con Sfp. Carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, fracción eluida de la cromatografía IMAC.

En el análisis por LC-MS se encontraron las masas de ambas formas proteicas (apo y holo). Esto implica que en este caso tampoco se logró una conversión total a holoBtrI (Figura 1.10).

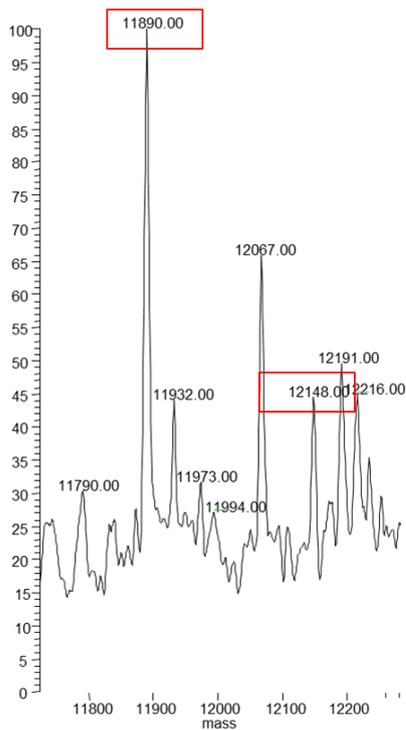


Figura 1.10: LC-MS de co-expresión de BtrI con Sfp.

En ninguno de los casos se llevó a cabo la puesta a punto de las metodologías (*in vitro* e *in vivo*) de manera de obtener una mayor conversión a holo enzima. Esto se debió a que la cantidad de Holo BtrI obtenida en ambos casos era suficiente para los ensayos acoplados consiguientes.

Para los ensayos de acoplamiento se continuó trabajando con Sfp y BtrI expresadas de manera independiente y realizando la fosfopanteteinilación *in vitro*. De esta manera se tiene un mayor control de la cantidad de cada proteína a utilizar en los ensayos.

1.1.2.2 Ligación de L-Glutamato a holo-BtrI con BtrJ

Se prosiguió entonces con la siguiente enzima cuya actividad parcial se podía constatar: BtrJ. El ensayo realizado midió el consumo de ATP utilizado por BtrJ para ligar una molécula de L-glutamato a holo-BtrI. Esto se llevó a cabo mediante un ensayo acoplado con piruvato quinasa y L-lactato deshidrogenasa, donde se monitorea la oxidación de NADH por espectrofotometría (Figura 1.11).

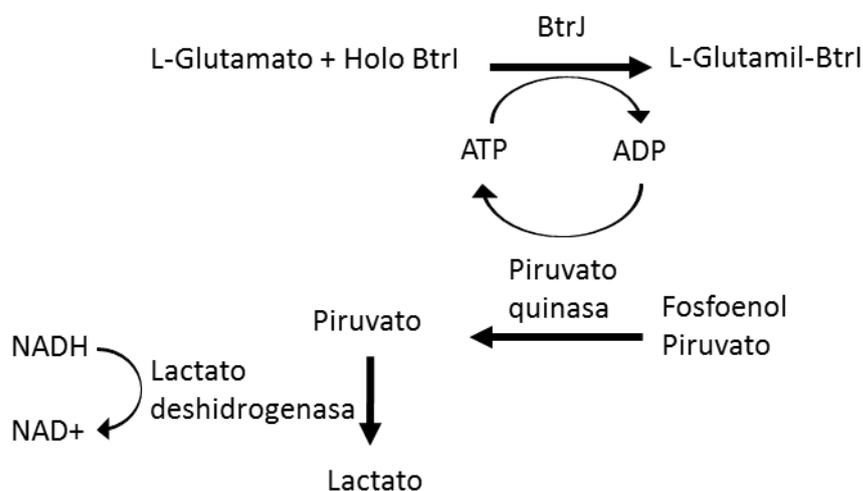


Figura 1.11: Esquema de ensayo acoplado para medir actividad ligasa de BtrJ.

Se realizó un control con apo BtrI el cual no presentó actividad. Mediante este ensayo se obtuvo que la preparación de BtrJ contaba con $0.02\text{U/mg} \pm 0.0001$.

1.1.2.3 Estudio de actividad de la oxidoreductasa BtrV

La tercera enzima cuya actividad parcial se estudió fue BtrV. El ensayo midió el consumo de NADH en presencia de FAD por disminución de la absorbancia a 340 nm (Figura 1.12). En este caso también pudo demostrarse que la enzima se expresaba de forma activa obteniéndose 1.4 UI/mg .

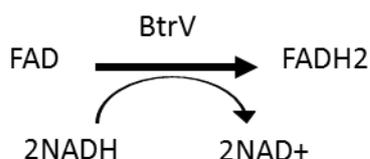


Figura 1.12: Esquema de reacción para medir actividad de BtrV.

1.1.2.4 Síntesis de Butirosina B con las enzimas acopladas en solución

Una vez estudiadas las actividades parciales de las enzimas para las cuales existe un ensayo reportado, se procedió a acoplarlas en solución (Sfp, BtrI, BtrJ, BTRK, BtrO, BTRV, BTRG y BtrH).

Se partió de L-Glutamato y ribostamicina, y se agregaron cantidades equimolares de cada enzima. Se tomaron muestras a 4 y 24 horas que fueron analizadas por cromatografía de capa fina (TLC) con ribostamicina y butirosina B como estándar. El análisis pretendió detectar el consumo de ribostamicina y aparición de butirosina B.

Los resultados de la TLC no fueron concluyentes, la figura 1.13 muestra que los spots revelados a las 24 horas de reacción donde se observa que no se corresponden con el estándar de butirosina B pero tampoco con ribostamicina lo cual implicaría el posible consumo de sustrato aunque no se logra visualizar el producto. Se desconoce la migración del intermediario protegido con glutamato por lo que no se descarta que se haya formado. Además la composición en las muestras pudo haber influido en la migración. En la figura 1.13 c se observa el mismo ensayo de síntesis con 10 veces más cantidad de enzimas (moles) que en el ensayo anterior. En este ensayo puede observarse que los controles sin enzima a lo largo del ensayo se mantienen inalterados y en el análisis de la muestra a las 24 h de reacción con enzimas permanece el spot de ribostamicina sin la aparición de butirosina B.

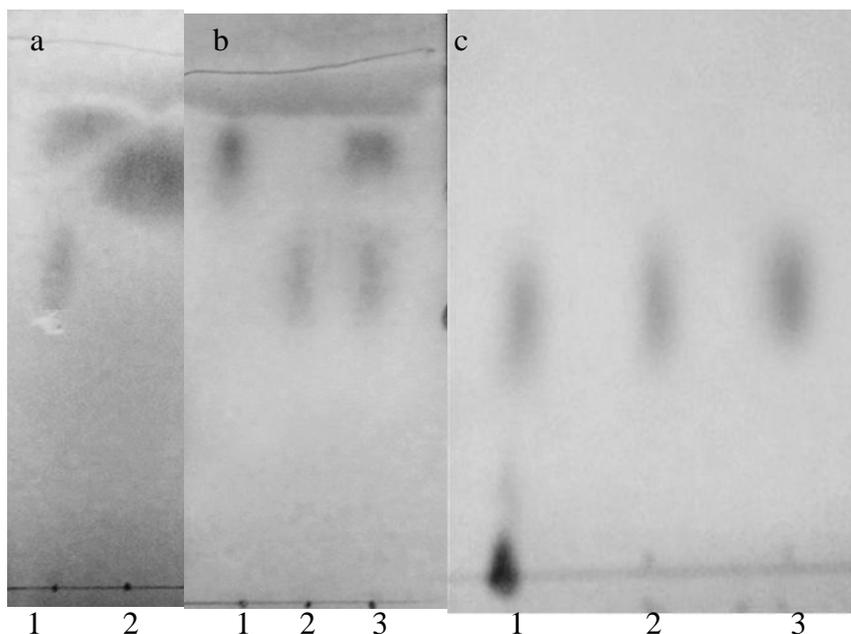


Figura 1.13: TLC de las reacciones de síntesis de butirosina B (a) Carril 1: estándares de robostamicina y butirosina, carril 2 reacción con enzimas solubles, (b) carril 1, estándar de butirosina B, carril 2, estándar de robostamicina, carril 3 estándares de robostamicina y butirosina.(c) carril 1, control sin enzimas inicial, carril 2, control 24 h, carril 3, enzimas solubles 24h.

Las causas por las que no se logró la síntesis podrían ser múltiples: las enzimas podrían haberse inactivado, al no contar con un ensayo individual para cada una de ellas esta hipótesis es difícil de corroborar. Por otro lado las enzimas podrían tener un bajo número de recambio lo cual haría la reacción muy lenta, podría existir la necesidad de incluir exceso de algunas de ellas, las enzimas podrían tener una baja estabilidad *in vitro*, etc. La falta de proximidad de las enzimas en solución podría ser la causa de una síntesis ineficiente debido a la difusión de los intermediarios que a su vez podrían ser inestables. Con este propósito en mente se llevó a cabo la inmovilización de las enzimas en nanopartículas de sílica biomimética para la síntesis de butirosina B.

1.1.3 Inmovilización de enzimas del sistema

El sistema de inmovilización seleccionado en este trabajo fue el de nanopartículas de sílica biomimética²⁹ ya sea por atrapamiento o unión covalente en superficie a nanopartículas funcionalizadas con glutaraldehído. Se llevó a cabo la co-inmovilización de las enzimas de la vía en nanopartículas de sílica con el propósito de forzar una cercanía entre las proteínas que se consideró sería positiva para la transferencia de intermediarios de reacción. Se pretendió de este modo acercar físicamente las enzimas y los sitios activos de las mismas de manera de hacer la transferencia del intermediario de

modo más eficiente. También se pretendía mantener altas concentraciones *in situ* de los intermediarios lo que podría favorecer la cinética global de la reacción.

Aun cuando las nanopartículas de sílica han sido usadas en el atrapamiento de enzimas,⁵² no existen reportes de su uso para la unión de proteínas en superficie. La derivatización de un nuevo soporte requiere una mínima caracterización fisicoquímica del mismo. Es por esto que se propuso estudiar y mejorar algunas propiedades de la sílica biomimética para ser utilizada como soporte de inmovilización de proteínas.

1.1.4 Sílica como soporte de inmovilización

1.1.4.1 Caracterización de nanopartículas de sílica biomimética

El uso de enfoques biomiméticos en la producción de nanoestructuras inorgánicas podría ser de gran interés para la comunidad científica e industrial debido a las condiciones físicas relativamente suaves necesarias para su síntesis^{53,54}. En particular, la sílica biomimética se puede sintetizar como un material nanoestructurado con variadas morfologías en cuestión de minutos, bajo condiciones suaves y amigables con el medio ambiente^{29,55}. Considerando las proteínas tipo silafinas utilizadas por diatomeas unicelulares⁵⁶, varios estudios han identificado moléculas aminadas alternativas, como candidatas para inducir la precipitación de sílica *in vitro* a partir de compuestos precursores^{29,57,58}. La influencia de moldes en la biomineralización de la sílica se ha estudiado *in vitro* utilizando moléculas biológicas y no biológicas. Por ejemplo, los flagelos bacterianos resultaron ser un molde prometedor para el desarrollo de la síntesis de nanotubos de sílica⁵⁹. Esta clase de trabajos demuestran que el estudio de moldes para la formación de sílica biomimética no sólo aumenta sus posibles aplicaciones, sino también ayudan a develar detalles del mecanismo de nucleación biomimético de la sílica.

Las condiciones de reacción suaves asociadas a la formación de sílica biomimética *in vitro* las hace compatibles con la inmovilización de proteínas; cualquier biomolécula presente en la mezcla de reacción de síntesis se verá atrapada debido a la rápida formación de una red de nanoesferas de sílica. La encapsulación de moléculas dentro de partículas de sílica biomimética se ha investigado para una amplia variedad de enzimas^{29,35,60-62} e incluso ha demostrado tener éxito para el co-atrapamiento de diferentes entidades catalíticas²⁸.

Previo a este trabajo no se contaba con literatura sobre la interacción de proteínas en la superficie de nanopartículas de sílica biomimética. La naturaleza de la interacción entre la proteína y las nanopartículas puede tener implicancias en sus posibles aplicaciones,^{63,64} por lo que el diseño de nuevas estrategias que permitan cambios en las propiedades de las partículas puede ser de interés.

En esta sección, se ha estudiado la influencia de un molde biológico en las propiedades físico-químicas de las nanoesferas de sílica biomimética. Se pretendió desarrollar un nuevo enfoque para la síntesis de nanopartículas de sílica biomimética con seroalbúmina bovina (BSA) como molde proteico (Figura 1.14). Por otra parte, se han explorado las características del material obtenido tales como el tamaño, dispersión, y carga superficial pensando en que pueden tener un impacto sobre cualquier aplicación biocatalítica.

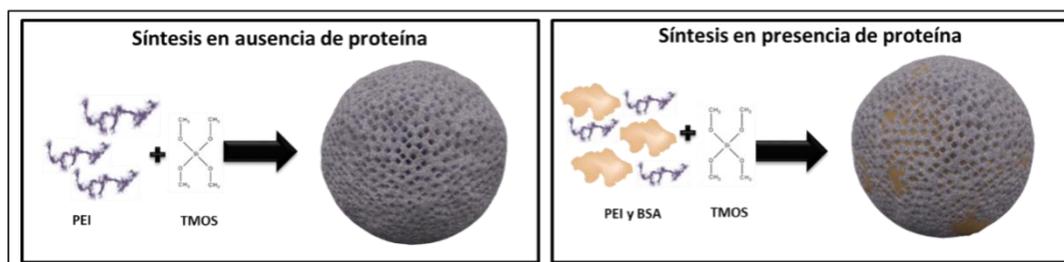


Figura 1.14: Estrategias de síntesis de nanopartículas. TMOS, Tetrametil ortosilicato. PEI, Polietilenimina, BSA Seroalbúmina Bovina.

La síntesis se realizó con polietilenimina (PEI) como catalizador. PEI es un polímero ramificado que contiene aminas primarias y secundarias y ya ha sido utilizado para síntesis de nanopartículas⁶². Durante esta estrategia de síntesis, PEI podría estar recubriendo la superficie de BSA debido a interacciones iónicas y por lo tanto generar una estructura más organizada que dirija la precipitación de la sílica.

1.1.4.1.1 Morfología y distribución de tamaño

La morfología y distribución de tamaño de las nanopartículas se estudió mediante espectrometría óptica de barrido (SEM). El análisis por SEM mostró que en presencia de BSA se formaron partículas más dispersas y esféricas (Figura 1.15 a) con diámetros en el rango de ~280–300 nm (Figura 1.15b). En ausencia de proteína se generaron partículas menos homogéneas y más aglutinadas (Figura 1.15 c) de diámetros en un rango más amplio (~700–1400 nm), (Figura 1.15d).

La distribución de tamaños más homogénea observada en las nanopartículas con BSA apoya la hipótesis de que PEI se ordena sobre esta proteína formando partículas más compactas.

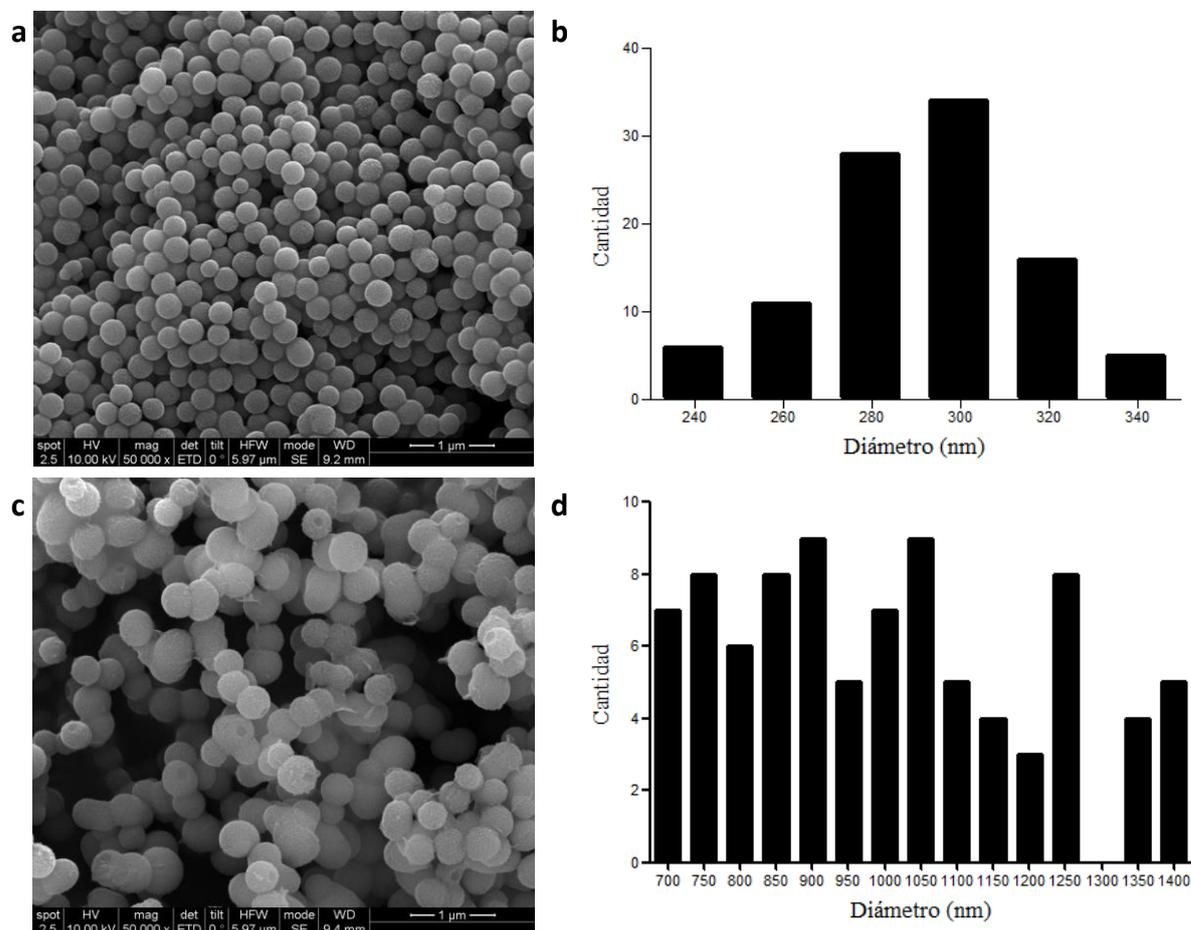


Figura 1.15: Estudio de morfología por SEM (a y c) y distribución de tamaño (b y d) de nanopartículas de sílica biomimética sintetizadas en ausencia (c y d) y presencia de BSA (a y b).

1.1.4.1.2 Reproducibilidad del método de síntesis

Se estudió la reproducibilidad de la estrategia de síntesis utilizada en este trabajo. Se llevaron a cabo 4 lotes de nanopartículas sintetizados de forma independiente los cuales fueron estudiados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los diámetros obtenidos en cada caso pueden verse en la figura 1.16y muestran como no existen diferencias sustanciales entre las mismas. De cara a estos resultados se puede concluir que la estrategia de síntesis es reproducible.

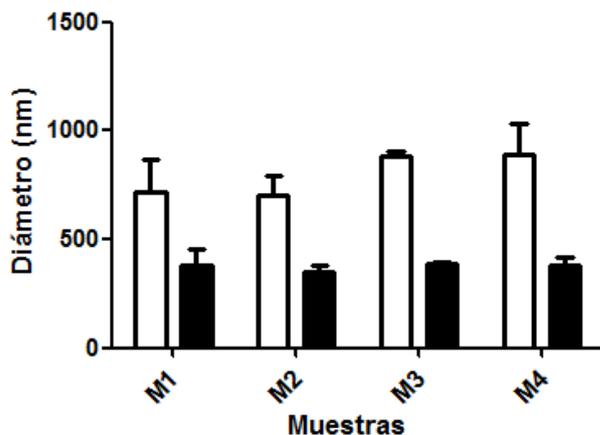


Figura 1.16: Estudio de reproducibilidad de la síntesis de nanopartículas de sílica biomimética. Se muestra el diámetro de las partículas en nm de cada lote (M). En blanco nanopartículas sintetizadas en ausencia de BSA y en negro en presencia de dicha proteína.

1.1.4.1.3 Estudio de tamaño de poro

Para caracterizar las propiedades texturales de las nanopartículas, las muestras fueron enviadas para el análisis de porosimetría.

El alto contenido orgánico de las nanopartículas dificultó el análisis. Para las nanopartículas de Sílica-BSA fue posible determinar poros de entre 2 y 4.5 nm. Sin embargo debido a la dificultad que representaba, estos nanoporos podrían ser producto de mesoporos que colapsan durante el proceso de preparación de la muestra.

Las nanopartículas de sílica biomimética fueron caracterizadas además para su uso como soporte para adsorber proteínas en superficie. Estos resultados, junto a los previamente descritos fueron publicados por la revista *Langmuir* y se presentan como documento anexo³⁸.

1.1.5 Inmovilización de enzimas para la síntesis de butirósina B

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de sílica biomimética en presencia de las enzimas de la vía de síntesis de butirósina B. Esta estrategia presentó un 92% de porcentaje de inmovilización medido por concentración de proteínas totales en el aplicado y sobrenadante. El análisis por SDS-PAGE (Figura 1.17) corroboró lo obtenido donde puede observarse que la mayoría de las proteínas de la fracción inicial no son detectables en la fracción del sobrenadante de la inmovilización.

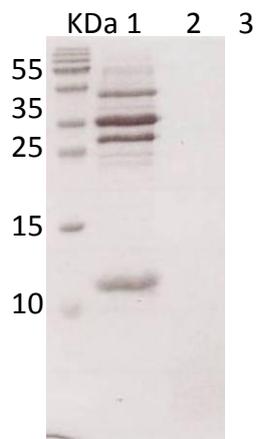


Figura 1.17: Inmovilización de todas las enzimas de la vía: Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 aplicado, carril 3 sobrenadante

1.2 Uso *in vitro* de las enzimas del sistema co-inmovilizadas.

Se llevó a cabo la síntesis de butirosina B con las enzimas co-inmovilizadas. Se procedió a evaluar la actividad de todas las enzimas de la vía actuando de forma concertada mediante TLCa diferentes tiempos de reacción (4 y 24 horas). En la Figura 1.18 se observa la detección del posible de sustrato por la desaparición del spot correspondiente de ribostamicina. Sin embargo, no se detectó aparición de producto. Se chequeó que la ribostamicina no se adsorbiera a la superficie de las nanopartículas por interacción inespecífica. Se llevó cabo un ensayo de incubación de ribostamicina con nanopartículas de sílica (sin proteínas) y se analizó el sobrenadante de la incubación por TLC. En la figura 1.19 se muestra como luego de la incubación con el soporte aún se observa el spot de ribostamicina.

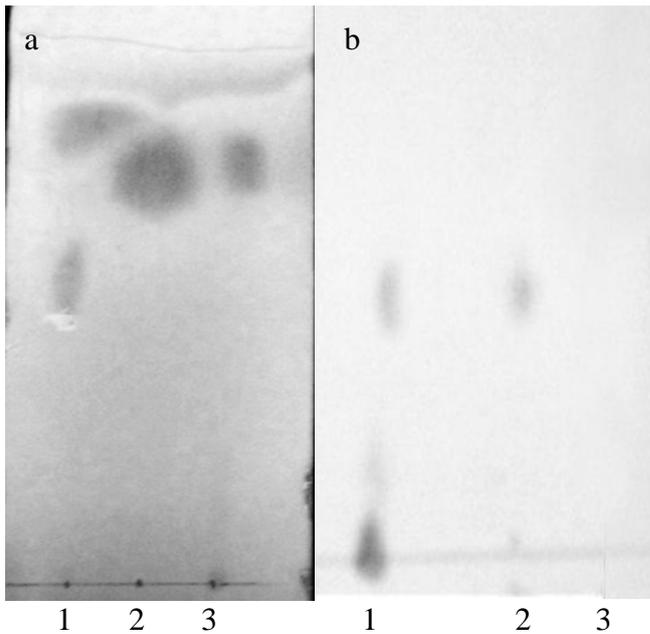


Figura 1.18: TLC de las reacciones de síntesis de butirosina B realizadas (a) Carril 1 estándares de ribostamicina y butirosina, carril 2 reacción con enzimas solubles, carril 3 reacción con enzimas inmovilizadas (b) carril 1, control sin enzimas inicial, carril 2, control 24 h, carril 3, reacción con enzimas inmovilizadas 24h.



Figura 1.19: Carril 1: ribostamicina 5mM, carril 2: sobrenadante de la incubación de ribostamicina con nanopartículas de sílica.

Además, las reacciones fueron analizadas por SDS-PAGE para corroborar que no hubiera pérdida de proteínas a la suspensión. En la figura 1.20 puede observarse como en los carriles 2 y 3 no se observa proteína.

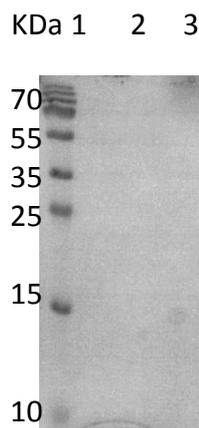


Figura 1.20: SDS-PAGE 18% del sobrenadante de nanopartículas de sílica conteniendo las enzimas del sistema. Carril 1 MPM, 2, sobrenadante de nanopartículas conteniendo proteínas, carril 3, duplicado, carril 4, *BtrI* soluble.

Descartadas estas posibles causas, la ausencia del producto esperado podría deberse por ejemplo a que al menos una de las enzimas implicadas se expresa o recupera inactiva. Lamentablemente no contábamos con metodologías para evaluar la actividad parcial de todas las enzimas. Otras posibilidades podrían radicar en un efecto inactivante de la inmovilización en alguna enzima o la transferencia ineficiente del intermediario. Estas posibilidades no fueron exploradas ya que se contaba con una estrategia alternativa para la síntesis de butirosina B.

1.2.1 Uso *in vitro* de BtrH y BtrG en solución para la síntesis de butirosina B.

Dado que el acoplamiento de las siete enzimas de la vía de la butirosina B no fue exitoso, se abordó la síntesis utilizando un sustrato sintético con BtrH y BtrG acopladas. Se sintetizó un derivado de N-acetilcisteamina (SNAC), el γ -Glu-AHBA-SNAC que ha sido reportado que actúa como sustrato alternativo de BtrH⁵¹(Figura 1.21).

La síntesis de γ -Glu-AHBA-SNAC fue realizada en colaboración con el grupo del Prof. Schulz del Departamento de Química y Bioquímica de Universidad de Bochum, Alemania.

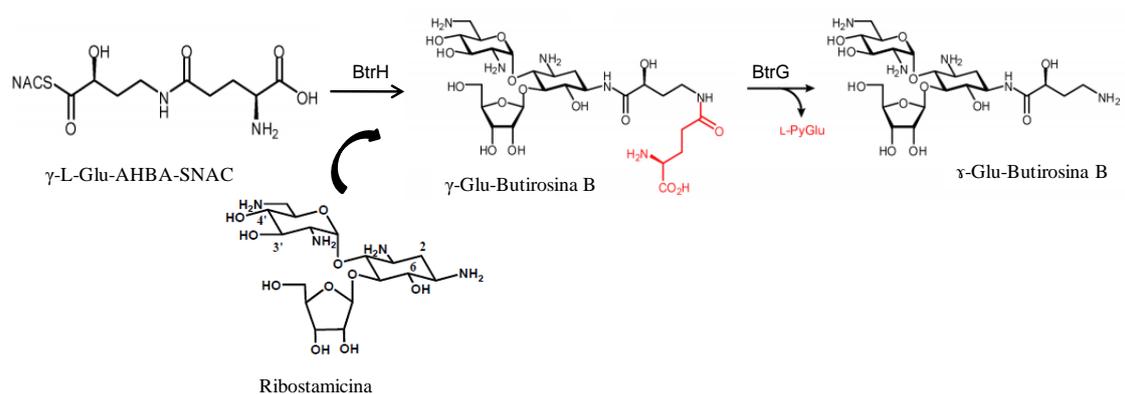


Figura 1.21: Síntesis quimioenzimática de Butirosina. Se parte del γ -Glu-AHBA-SNAC previamente sintetizado. El grupo γ -glutamil-AHBA se transfiere a una molécula de ribostamicina por la aciltransferasa, BtrH y se escinde el L-glutamato, por BtrG para dar Butirosina B.

La estrategia de síntesis de este sustrato se encontraba descrita⁵¹ partiendo de N-boc-tert-glutamato por lo que a la síntesis reportada se le agregaron una serie de pasos para poder partir directamente del aminoácido L-glutamato. Se partió de este sustrato por ser más económico y se agregaron pasos de protección de grupos del mismo. Se debió sintetizar además el SNAC a utilizar a partir de cisteamina clorhidrato y anhídrido acético, el cual se obtuvo con 53.9% de rendimiento.

Para la síntesis global del sustrato sintetizado, se obtuvo un rendimiento de 7.8% luego de 9 pasos de síntesis. Cada etapa fue corroborada por resonancia magnética nuclear (NMR) para asegurar la identidad de las moléculas sintetizadas. Los resultados del análisis se observan en las figuras 5.1-5.4 del anexo.

Una vez obtenido el sustrato alternativo a utilizar, se corroboró la actividad de BtrH con el mismo. Se realizó la incubación del sustrato, ribostamicina y la enzima en presencia de DTNB. El objetivo de este ensayo fue detectar la presencia de tioles libres producto de la liberación del SNAC al medio una vez transferida la cadena Glu-AHBA por BtrH. Los tioles libres del SNAC reaccionan con el DTNB clivando el enlace disulfuro para dar TNB^- que en solución pasa a TNB^{2-} el cual presenta un color amarillo cuantificable a 412 nm ($\epsilon_{\mu\text{M}} = 0.01415 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Figura 1.22).

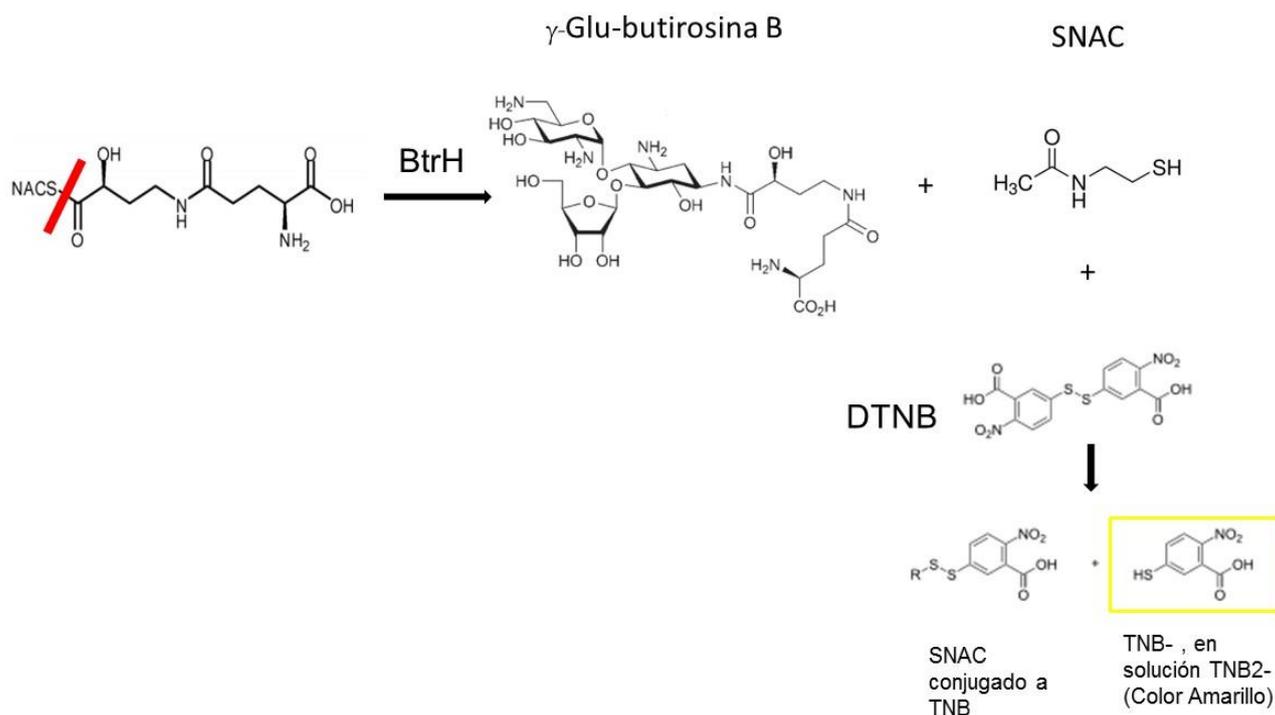


Figura 1.22: Esquema de ensayo de actividad diseñado para BtrH.

De este ensayo se obtuvo que se contaba con una preparación de $3.8 \text{ UI/mg} \pm 0.2$ de BtrH. Este valor no pudo ser comparado con valores previamente reportados ya que los ensayos reportados con esta enzima y este sustrato no describen la cinética de la reacción sino que describen detección por LC-MS y no la cuantificación de producto⁵¹.

Para BtrG no se contaba con un ensayo de evaluación de actividad más que la detección del producto fruto del acoplamiento de ambas enzimas. Por lo que, una vez corroborada la actividad de BtrH con el sustrato sintetizado se procedió a la inmovilización de BtrH y G para la síntesis de butirosina B.

1.2.2 Inmovilización de BtrH y BtrG

Se llevó a cabo la inmovilización de BtrH y BtrG mediante dos aproximaciones (Figura 1.23). La primera fue por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética, la cual fue elegida con el mismo criterio descrito previamente, acercar los sitios activos del sistema bi-enzimático de modo de procurar favorecer la transferencia del intermediario y disminuir su difusión al medio. La segunda estrategia fue la inmovilización covalente en nanopartículas de sílica-BSA funcionalizadas con glutaraldehído. Esta última fue seleccionada con la intención de devaluar posibles problemas difusionales del sustrato o producto que podría presentarse en la preparación inmovilizada por atrapamiento.

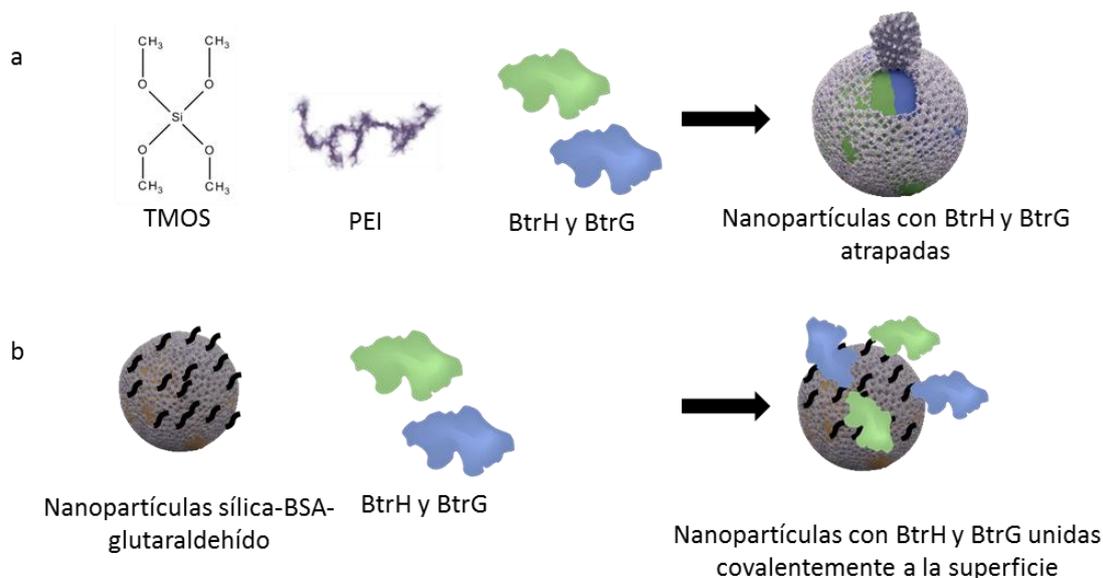


Figura 1.23: Estrategias alternativas de inmovilización de BtrH (azul) y BtrG (verde). (a) Inmovilización por atrapamiento, (b) inmovilización en superficie. TMOs, tetrametilortosilicato, PEI, polietilenimina.

Tanto la co-inmovilización como inmovilización de BtrH y BtrG fueron analizadas por cuantificación de proteínas y en el caso de la inmovilización de BtrH se analizó la actividad recuperada en la suspensión co-inmovilizada. En la Tabla 2 puede observarse que ambas proteínas fueron exitosamente atrapadas y co-atrapadas en nanopartículas de sílica biomimética con porcentajes de inmovilización superiores a 70% mientras que en el caso de unión covalente en superficie los porcentajes de inmovilización fueron superiores a 50%. Sin embargo, la actividad recuperada fue significativamente mayor en el caso de la unión en superficie (4.3 veces mayor). Esto podría deberse a un retardo en la transferencia de sustratos y productos desde y hacia la nanopartícula. Lo que produciría una disminución aparente de la velocidad de formación de producto.

Tabla 2: Inmovilización de BtrH y BtrG en nanopartículas de sílica biomimética por atrapamiento y unión covalente en superficie. %I, porcentaje de inmovilización, %R rendimiento de inmovilización.

Estrategia de inmovilización	%I BtrH	%I BtrG	% I BtrH y BtrG	%R BtrH
Atrapamiento	89.7± 2.2	96.8± 1.1	75.2± 1.1	20± 3.5
Unión Covalente	61.24± 3.5	50.12± 2.6	53.3± 1.2	86± 1.4

Una vez obtenidas las preparaciones inmovilizadas se continuó hacia la síntesis del producto de interés.

1.2.3 Uso *in vitro* de BtrH y BtrG inmovilizadas y co-inmovilizadas para la síntesis de butirosina B.

Se estudió la síntesis de butirosina B utilizando como sustratos ribostamicina y γ -Glu-AHBA-SNAC con enzimas solubles, inmovilizadas y co-inmovilizadas por atrapamiento y en superficie. Se analizaron los resultados por LC-MS (Figuras 5.11-5.28, ver Anexo) donde se buscó la presencia de ribostamicina, γ -Glu-butirosina (intermediario de reacción, ver figura 1.20) y butirosina B. En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para cada ensayo.

Se observó en controles con ribostamicina en solución y en presencia de nanopartículas vacías, la presencia de un pico correspondiente a la masa de ribostamicina lo que confirma que la misma no se adsorbe de manera inespecífica a las nanopartículas.

Tabla 3: Análisis de resultados obtenidos por LC-MS de los estudios de síntesis con diferentes preparaciones inmovilizadas de BtrH y BtrG.

Muestra	Ribostamicina (m/z 455)	γ -Glu-butirosina (m/z 685)	Butirosina B (m/z 556)
Control solo Ribostamicina	✓	X	X
Control con nanopartículas sin enzimas	✓	X	X
BtrH y G en solución	✓	X	X
Btr H y G inmovilizadas en superficie	✓	X	X
Btr H y G co-inmovilizadas en superficie	✓	X	✓
Btr H y G atrapadas por separado	X	✓	✓
BtrH y G co-atrapadas	✓	X	✓

El ensayo para las enzimas en solución se encontraba reportado en dos etapas, primero la incubación con BtrH y luego de la precipitación de la primer enzima, la incubación con BtrG⁵¹. En este trabajo se llevó a cabo la incubación con ambas enzimas en solución en simultáneo. Los resultados demuestran que bajo las condiciones ensayadas no fue

posible la síntesis de butirosina B. Estos resultados están de acuerdo con los reportados previamente donde la síntesis solo fue exitosa cuando se realizó el ensayo en dos etapas⁵¹. En ese reporte no se analiza en profundidad las causas de tal comportamiento, sin embargo creemos que una posible explicación podría radicar en algún tipo de inhibición de BtrG por ribostamicina. Los procesos en una sola etapa presentan ciertas ventajas con respecto a los realizados en varios pasos: rapidez, disminución de la degradación de intermediarios, ausencia de pasos de acondicionamiento de etapas intermedias, etc. Es por esta razón que en los experimentos subsiguientes nos enfocamos en la síntesis *one pot* de butirosina.

La síntesis con enzimas inmovilizadas de manera independiente en superficie de nanopartículas no mostraba aparición del producto esperado. Mientras que cuando la síntesis se realizó con las enzimas co-inmovilizadas en superficie, aunque no hubo consumo total de ribostamicina, se logró observar un pico correspondiente a butirosina B. Esto indicaría que BtrG se encuentra activa luego de la inmovilización ya que se acopla eficientemente a BtrH para la formación de producto. Una posible explicación podría ser la inactivación de BtrG por ribostamicina. Cuando BtrG se encuentra inmovilizada en la superficie del soporte podría estar en contacto con concentraciones inactivantes de ribostamicina. Sin embargo, cuando se encuentra co-inmovilizada, la acción de BtrH sobre este reactivo podría disminuir la concentración efectiva de ribostamicina en el microambiente de la BtrG, disminuyendo los efectos inhibitorios de este compuesto. Tales efectos han sido reportados para penicilin G acilasa por Abian donde enzimas inmovilizadas recubiertas con polímeros eran más estables frente a solventes orgánicos inactivantes⁶⁵. Un cuidadoso diseño experimental en el futuro podría llegar a develar nuevos detalles de la enzimología de estas enzimas con las preparaciones inmovilizadas.

Se estudió además la síntesis con las preparaciones inmovilizadas de BtrH y BtrG atrapados por separado en nanopartículas. En este caso se logró la síntesis exitosa de Butirosina B. Se obtuvo un consumo de la totalidad del sustrato pero no una conversión total a producto ya que se detectó también la presencia del intermediario de reacción. Esto podría deberse a la difusión del intermediario al medio disminuyendo la eficiencia de su consumo por BtrG. No pueden descartarse además otras explicaciones para este resultado. Por ejemplo, el proceso de inmovilización podría estar afectando la actividad de las enzimas, su estabilidad. Incluso hay que considerar el efecto de reparte

de productos y sustratos desde y hacia el interior de las nanopartículas donde se encuentran las enzimas. Para probar estas hipótesis es necesario realizar estudios experimentales adicionales, contando con una adecuada metodología que permitiera estudiar la actividad enzimática de BtrG.

La síntesis de butirosina B fue exitosa para los casos en que las enzimas fueron co-inmovilizadas, tanto por atrapamiento como en superficie. En ambos casos no se observó consumo total de sustrato, lo cual podría implicar que el tiempo de incubación fue insuficiente. Sin embargo, no se detectó el intermediario de reacción. En el caso de las enzimas co-atrapadas el confinamiento físico de las enzimas podría llevar a que el intermediario generado por BtrH sea más eficientemente convertido a producto por BtrG. En el caso de las enzimas inmovilizadas en superficie, la co-inmovilización también permitiría el acercamiento físico de las enzimas lo cual resulta beneficioso para la transferencia del intermediario de reacción.

Los resultados obtenidos sugieren que la estrategia de co-inmovilización de las enzimas podría ser más eficiente para la síntesis de butirosina B bajo las condiciones ensayadas. No existen antecedentes de inmovilización de estas enzimas ni de síntesis de butirosina *Bin vitro* con enzimas inmovilizadas, lo cual hace de gran interés mejorar las condiciones para obtener una conversión total del sustrato. A su vez sería valioso realizar estudios de caracterización de los inmovilizados de cara a su uso en continuo o re-uso para la síntesis del antibiótico.

Capítulo 2

Uso *in vitro* de sistemas enzimáticos para la síntesis de alfa hidroxiácidos

2.1 Introducción

2.1.1 Alfa hidroxiácidos

Los alfa hidroxiácidos son encontrados en la naturaleza en una variedad de especies incluyendo plantas, animales y microorganismos. Los mismos están involucrados en muchos procesos metabólicos y participan en mecanismos celulares esenciales. En particular, los alfa hidroxiácidos ópticamente activos encuentran aplicaciones en la industria alimentaria, química, farmacéutica o en la industria del plástico^{30,31}.

Actualmente a nivel industrial predomina su síntesis mediante procesos fermentativos y química fina. Estos procesos no siempre son eficientes en términos de enantioselectividad o rendimiento, además de ser poco amigables con el medio ambiente ya que muchas veces generan residuos tóxicos y tienen altos requerimientos energéticos^{66,67}. En los últimos años, la biocatálisis ha surgido como una poderosa estrategia para la producción estereoselectiva de hidroxiácidos ópticamente activos en alto rendimiento⁶⁸.

Muchos medicamentos, productos farmacéuticos y compuestos biológicamente activos son mezclas racémicas con isómeros que presentan propiedades químicas y físicas casi idénticas. Sin embargo, los enantiómeros de productos químicos terapéuticos quirales a menudo tienen diferencias significativas en la toxicidad y su actividad biológica. La importancia de las moléculas quirales para uso en la producción de productos farmacéuticos y compuestos biológicamente activos ha generado una demanda considerable para el desarrollo de técnicas de síntesis y/o de separación adecuadas para la generación a gran escala de moléculas enantioméricamente puras⁶⁹⁻⁷¹.

Los alfa hidroxiácidos más comunes utilizados a nivel industrial son el ácido glicólico, láctico, cítrico y mandélico. En este trabajo se tomaron como alfa hidroxiácidos modelo al ácido mandélico y láctico.

2.1.1.1 Ácido mandélico

El ácido mandélico y sus derivados, encuentran un amplio uso como bloques para la síntesis de una gran diversidad de productos farmacéuticos y agrícolas⁷². A su vez, el ácido D-mandélico, es un valioso bloque quiral en la síntesis de diversos productos farmacéuticos, tales como penicilinas, agentes antiobesidad, antitumorales y cefalosporinas⁷³.

Los procesos químicos para la producción de ácido mandélico generalmente dan lugar a la mezcla racémica D/L mandélico⁷⁴. Es por esto que se han desarrollado una serie de estrategias biocatalíticas para la obtención de D-mandélico partiendo de la mezcla racémica del mismo. Entre ellas resaltan la esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas⁷⁵, la oxidación enantioselectiva catalizada por óxido-reductasas y la degradación enantioselectiva microbiana^{76,77}. A nivel comercial, se ha potenciado el estudio de nitrilasas para la producción biocatalítica de ácido D-mandélico a partir de mandelonitrilo⁷².

2.1.1.2 Ácido láctico

El ácido láctico, así como sus derivados (sales y ésteres) son ampliamente utilizados en la industria, farmacéutica, textil, la agricultura, alimenticia como acidulante y conservante, en la química como solubilizador y como agente controlador de pH en la producción de pinturas y resinas⁷⁸.

El ácido L-láctico es el más ampliamente utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica ya que es mayoritariamente asimilada por el cuerpo humano mientras que el D-láctico puede llegar a ser dañino para el metabolismo humano y puede llevar a la acidosis y decalcificación⁷⁹.

Aunque puede ser sintetizado químicamente^{80,81}, actualmente, aproximadamente el 90 % de ácido láctico es producido por la fermentación microbiana. En este caso se requieren etapas de purificación que encarecen el proceso, las mismas incluyen etapas de hidrólisis, esterificación, y la destilación. Generalmente se forman subproductos tales como el etanol y el ácido acético⁸⁰. Estos procesos se han ido mejorando para producir de manera selectiva uno de los dos estereoisómeros de ácido láctico.

2.1.2 Síntesis de alfa hidroxiaácidos mediante cascadas enzimáticas

Una corriente de científicos de renombre mundial en biotransformaciones tal como Kroutil, entre otros, están buscando alternativas biocatalíticas para la síntesis de alfa-hidroxiaácidos ópticamente puros. Recientemente se ha presentado una estrategia para la síntesis de alfa hidroxiaácidos a partir de L-aminoácidos mediante el uso de cascadas enzimáticas en *E. coli* que expresaban enzimas recombinantes. Los L-aminoácidos eran consumidos por una aminoácido deaminasa para dar alfa cetoácidos. Estos eran sustrato de lactato deshidrogenasas expresadas en diferentes microorganismos. La reducción estereoespecífica dependía de la deshidrogenasa utilizada¹⁰. Se encuentra reportada además la co-expresión de estas enzimas en *E. coli* para lograr la síntesis en *one pot* a partir de estas cascadas artificiales generadas. En estos estudios se logró la síntesis de alfa hidroxiaácido enantioméricamente puro⁸².

En el presente trabajo se utilizaron el ácido mandélico y láctico como alfa hidroxiaácidos modelo. A diferencia del trabajo realizado por Kroutil, la síntesis fue planteada *in vitro* a partir de mezclas racémicas de aminoácidos. Esto fue abordado con enzimas en solución e inmovilizadas.

El sistema de síntesis planteado en este trabajo se compone de 4 enzimas comerciales de diversos orígenes y 1 enzima recombinante expresada en *E. coli* (Figura 2.1): La primera enzima del sistema, **Racemasa**, catalizará la racemización de mezclas de aminoácidos (AA). Luego la **D-Aminoácido oxidasa** provocará la deaminación oxidativa de los D-AA a α -cetoácidos. Esta reacción generará peróxido como producto secundario el cual pretendemos se descomponga por acción de una **Catalasa**. Una **Lactato Deshidrogenasa** catalizará la reducción de α -cetoácido a α -hidroxiaácido utilizando NADH como cofactor. Acoplaremos una **Formato deshidrogenasa** a esta reacción para regenerar el NADH consumido utilizando ácido fórmico como fuente de hidruros y así favorecer termodinámicamente la acción de la FDH.

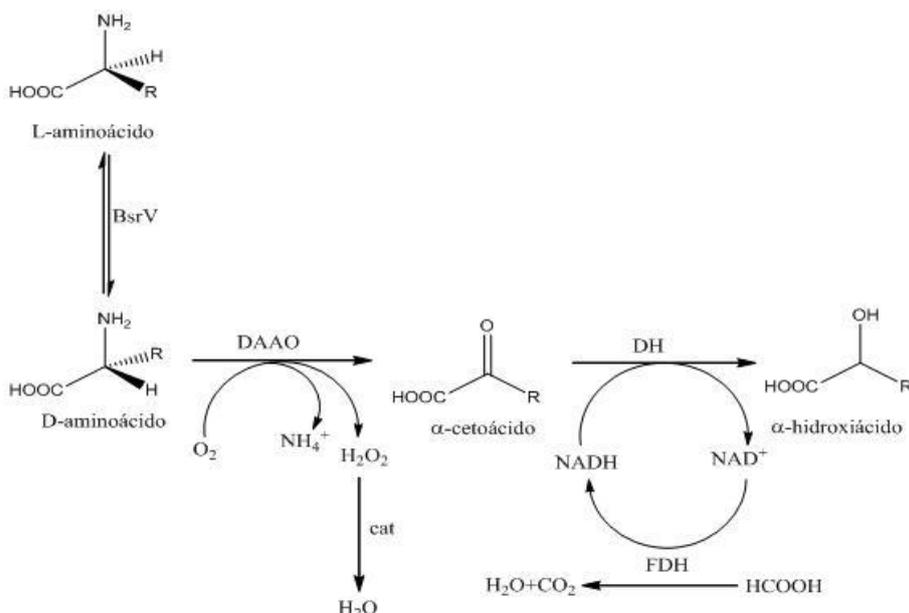


Figura 2.1: Esquema de síntesis de alfa hidroxiácidos partiendo de una mezcla racémica de aminoácidos.

A continuación se describen las enzimas utilizadas:

- Racemasa (RAC) de *Vibrio cholerae* obtenida de forma recombinante en *E. coli*. Es una racemasa de amplio espectro con una alta homología de secuencia con la alanina racemasa principal de *V. cholerae*. Se encuentra reportado que la misma lleva a cabo la racemización reversible de al menos 10 de los 19 aminoácidos quirales naturales conocidos además de catalizar la racemización de varios aminoácidos que no son normalmente incorporados en las proteínas⁸³.
- D-aminoácido oxidasa (DAAO, E.C. 1.4.3.3) de origen comercial: esta enzima es capaz de llevar a cabo la deaminación oxidativa de D aminoácidos⁸⁴. En este proceso se genera peróxido de hidrógeno como producto secundario. Es una enzima que ya ha probado ser activa para una amplia gama de aminoácidos. Es utilizada en varios procesos basados en tecnología enzimática⁸⁵, como la producción de alfa-cetoácidos⁸⁶.
- Catalasa (EC 1.11.1.6) de origen comercial: Es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. La estequiometría de esta reacción es un mol de agua y medio mol de oxígeno por cada mol de peróxido consumido. Ya ha sido acoplada con éxito a la DAAO. El acoplamiento no solo aumenta la vida útil de la DAAO por eliminación del peróxido sino que favorece la actividad de DAAO por aumento de la concentración de oxígeno *in situ*

- Deshidrogenasas de origen comercial: en general las deshidrogenasas son enzimas que catalizan dos tipos de reacciones, la oxidación de un grupo alcohol a un grupo carbonilo y la reacción inversa de reducción de un carbonilo a un alcohol. Estas enzimas intervienen en importantes rutas de síntesis de gran demanda en la química moderna, en química fina y farmacéutica, relacionadas con la síntesis altamente eficiente de enantiómeros puros como alfa hidroxácidos a partir de sustratos pro quirales⁸⁷. La principal característica de estas enzimas es que requieren de un cofactor redox. El uso de enzimas aisladas hace necesario el agregado de este cofactor como sustrato. En nuestro caso particular se trabaja con la enzima L-lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27), la misma requiere de NADH para su funcionamiento, por lo que se presenta la necesidad del diseño de un sistema de regeneración *in situ* del mismo, de tal forma que siempre se encuentre disponible en el medio de reacción. La inclusión de un sistema de regeneración de cofactor tiene sentidos desde un punto de vista termodinámico, cinético y de costos ya que es necesario que el diseño y desarrollo de este sistema sea eficiente y económico⁸⁸ y resulta inviable la adición del cofactor como sustrato al reactor. La regeneración de tipo enzimática es el método más reconocido para este propósito. Un método altamente usado para la regeneración enzimática de la forma reducida del cofactor es el uso de Formato deshidrogenasa (EC 1.1.99.33), esta enzima cataliza la oxidación del ácido fórmico con la reducción concomitante del cofactor NAD(P)H. Cuenta con la ventaja de que el ácido fórmico es un sustrato de bajo costo, estable e inocuo para las enzimas. El subproducto (dióxido de carbono) es también inocuo y puede ser fácilmente eliminado de la reacción.

El estudio de las enzimas del sistema se llevó a cabo en primer lugar en solución con el propósito de estudiar los parámetros que podrían afectar las propiedades de las diferentes enzimas y sus condiciones óptimas de reacción. Luego se procedió a la inmovilización de cada una de las enzimas por separado para optimizar las condiciones de inmovilización e intentar obtener preparados inmovilizados muy estables. Los estudios de inmovilización fueron seguidos de la co-inmovilización la cual procuraba la eliminación de productos indeseados, la regeneración de cofactores y una síntesis más eficiente de producto final. Para el uso *in vitro* del sistema acoplado para la síntesis de ácido mandélico, se partió del aminoácido no natural fenilglicina y para la síntesis de ácido láctico se partió del aminoácido natural alanina.

2.2 Resultados y Discusión

2.2.1 Uso *in vitro* de D-aminoácido oxidasa, Catalasa y Racemasa en solución para la síntesis de alfa cetoácidos.

Como primer paso hacia la síntesis de alfa hidroxí ácidos, se estudió el acoplamiento de las primeras tres enzimas de la vía en solución.

Se llevó a cabo el estudio de actividad de DAAO con alanina (Ala) y fenilglicina (Phg) para la producción de ácido pirúvico y ácido fenilglicólico. La actividad de DAAO de diferentes orígenes con aminoácidos naturales como la alanina ha sido estudiada tanto *in vivo* como *in vitro*^{89,90}. Sin embargo, la actividad de DAAO con fenilglicina no se encontraba reportada. En la figura 2.2 se observa que presenta actividad para ambos aminoácidos.

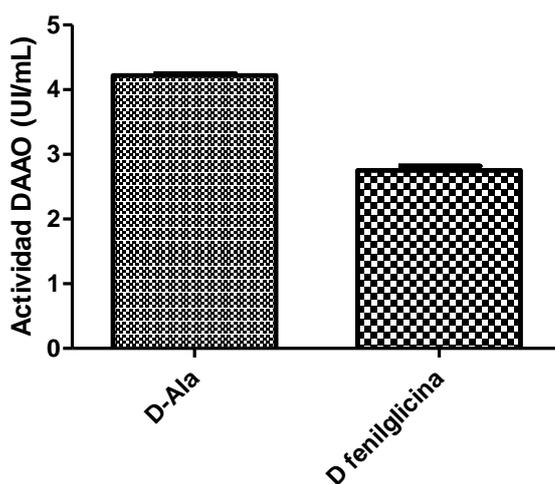


Figura 2.2: Actividad de DAAO frente a D-alanina y D-fenilglicina.

Se estudió la descarboxilación oxidativa de D-Phg por DAAO soluble para dar ácido fenilglicólico y peróxido de hidrógeno como producto secundario. La generación de peróxido de hidrógeno puede promover la descarboxilación oxidativa de los alfa cetoácidos generados a la vez que puede provocar oxidaciones inespecíficas de residuos aminoácidos de la DAAO u otras enzimas del sistema, provocando su inactivación¹⁷.

En la búsqueda de una estrategia para remover el peróxido de la mezcla de reacción se estudió el acoplamiento de la enzima CAT a la reacción. Una ventaja adicional de acoplar la CAT para la actividad de DAAO es el aumento de la concentración *in situ* de oxígeno, producto de la CAT y sustrato de la DAAO. Reportes previos indican que en

química fina y en procesos industriales cuando se utiliza DAAO surge la necesidad de agregar oxígeno a la reacción (por burbujeo del reactor)⁹¹.

Se llevó a cabo entonces la conversión del aminoácido D-Phg por DAAO a su correspondiente cetoácido, en presencia y ausencia de exceso de CAT (relación en unidades de enzima DAAO:CAT 1:10). Este aminoácido fue seleccionado para estos ensayos debido a la facilidad de la detección por HPLC del ácido fenilglicólico y del ácido benzoico producto de descarboxilación del cetoácido. En la figura 2.3 se observan los resultados de la detección por HPLC donde se cuantificó la cantidad de D-Phg que era convertido a ácido benzoico. Se observa que en los ensayos con DAAO en ausencia de CAT se genera un $50 \% \pm 0.02$ de ác. benzoico a las 5 horas de transcurrida la reacción mientras que en presencia de esta enzima se detectó solamente $0,19 \% \pm 0.001$ de ác. benzoico a las 20 horas de reacción.

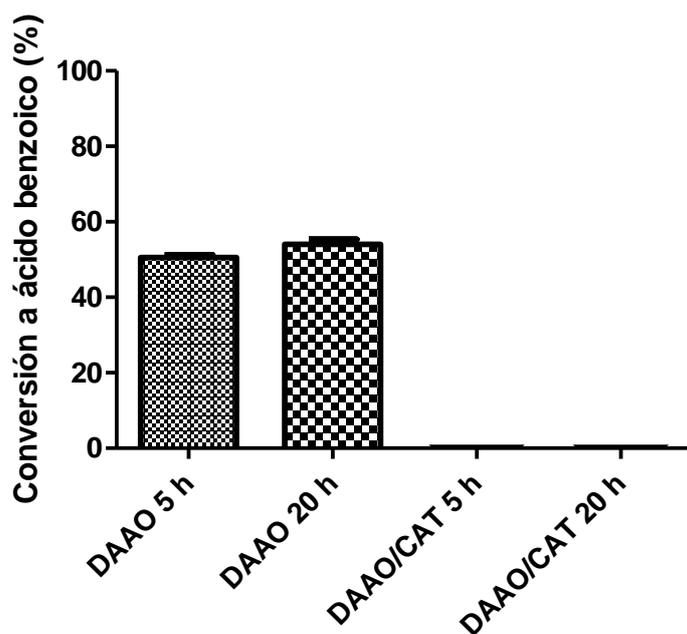


Figura 2.3: Conversión de Phg en presencia de DAAO y DAAO/CAT (1/10). Se detectó la presencia de ácido benzoico por HPLC.

En la búsqueda de optimizar la relación de enzimas utilizadas en el ensayo, se testaron dos proporciones de unidades de enzima diferentes de DAAO:CAT, las mismas fueron 1:3 y 1:6 respectivamente. En la tabla 4 pueden observarse los porcentajes de conversión obtenidos de cetoácido y el ácido benzoico a las 4 horas de ensayo. Puede observarse como la generación de ácido benzoico es casi nula en ambos casos y mientras que la conversión a fenilglicólico (cetoácido) es superior a 60 %. Se seleccionó entonces la relación 1:3 para futuros experimentos ya que minimiza la

formación de peróxido de hidrógeno, lo que podría aumentar la vida útil del catalizador DAAO sin comprometer la cantidad de soporte ocupada por la enzima “accesoria” CAT.

Tabla 4: Conversión de Phg en presencia de DAAO y DAAO:CAT (1:3 y 1:6).

Relación DAAO:CAT	% Conversión a ácido benzoico	% Conversión ácido fenilglicólico
1:3	2.3 ± 0.46	68.27 ± 1.1
1:6	0.4 ± 0.3	79.4 ± 2.5

Se llevó a cabo además el estudio de DAAO frente a cofactores y moléculas que estarían presentes en la síntesis de hidroxiácidos una vez acopladas todas las enzimas de la vía, con el objetivo de descartar que los mismos interfieran con la generación del cetoácido deseado.

En primer lugar se estudió el efecto del NADH (cofactor de la enzima deshidrogenasa encargada de la reducción de cetoácido a hidroxiácido) en la actividad de DAAO. Para esto se incubó una solución con DAAO y CAT (relación 1:3) con Phg, en presencia y ausencia de dos concentraciones diferentes de NADH donde se observó que DAAO en presencia de 2 mM de NADH generaba 10% menos cetoácido que en presencia de 0.2 mM NADH bajo las mismas condiciones de ensayo (Figura 2.4 a). Se corroboró este fenómeno estudiando la actividad espectrofotométrica de DAAO donde se observó que en presencia de 2 y 0.2 mM de NADH la actividad de DAAO disminuyó a un 2 % y 18 % respectivamente en comparación con la actividad en ausencia de dicho cofactor (Figura 2.4b). Por lo tanto lo que se observa es un efecto inhibitorio del NADH en la actividad de la DAAO ya que la actividad sin NADH es significativamente mayor que con NADH y esto repercutirá en la conversión final de la reacción. Sería de interés estudiar la reversibilidad de este efecto. El efecto inhibitorio de NADH sobre DAAO no tiene reportes previos en la literatura.

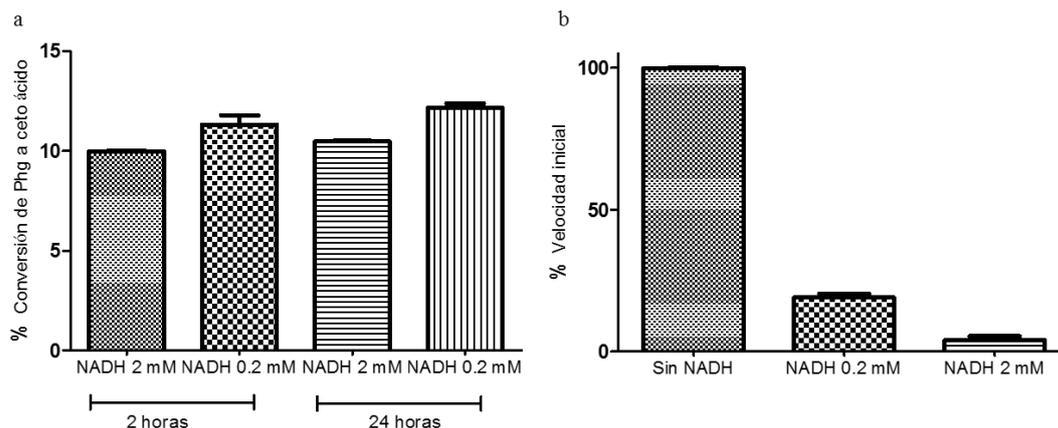


Figura 2.4: Efecto del NADH en la actividad de DAAO. (a) Análisis por HPLC. Se cuantificó la conversión a ácido fenilglicólico por DAAO en presencia de NADH a diferentes concentraciones (b) Análisis por espectrofotometría. Se mide la velocidad inicial de DAAO acoplada a HRP en presencia de D-Ala y NADH a diferentes concentraciones.

El análisis por espectrofotometría fue también realizado para NAD⁺ donde se demostró que el NAD⁺ no tenía un efecto apreciable en la actividad de la enzima (Figura 2.5).

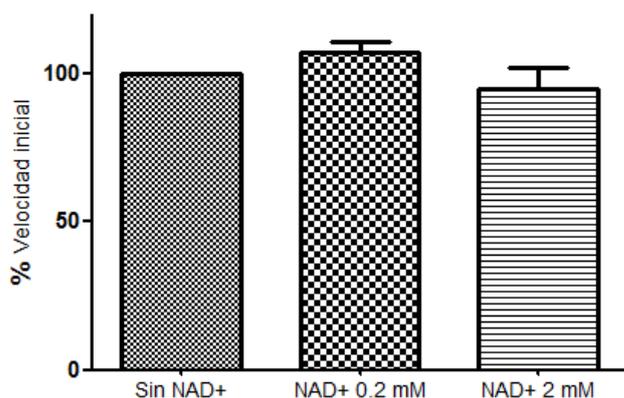


Figura 2.5: Efecto del NAD⁺ en la actividad de DAAO medida por espectrofotometría. Los ensayos se realizaron incubando DAAO en ausencia o presencia de 0.2 y 2 mM de NAD⁺

El NAD⁺ no parece ejercer efectos adversos sobre la actividad de DAAO. Los resultados obtenidos hicieron necesario mantener las concentraciones de cofactor controladas durante la síntesis para no bajar la eficiencia del proceso por inhibición de la DAAO. A su vez la síntesis de alfa hidroxiaácido debió ser testada con NAD⁺ además de NADH.

Finalmente, se estudió el efecto del ácido fórmico sobre la actividad de DAAO (utilizado por la enzima formato deshidrogenasa para regenerar el NADH consumido en la reacción). Se llevó a el ensayo de actividad espectrofotométrico de DAAO en

presencia y ausencia de 0.1 M de ácido fórmico donde no se encontraron diferencias significativas entre los ensayos lo cual indicó que el ácido fórmico no afectaba la actividad de la enzima.

Como se indicó previamente, la enzima DAAO es capaz de llevar a cabo la síntesis de alfa cetoácidos a partir de una amplia gama de aminoácidos. Sin embargo, esta enzima es estereoespecífica de isómeros D de su sustrato. La síntesis a partir de isómeros específicos aumenta mucho el costo del proceso. La utilización de mezclas racémicas de aminoácidos para la síntesis de alfacetoácidos tendría un impacto económico mucho menor en los costos del proceso. Es por esta razón que se incluyó en nuestro sistema enzimático una racemasa (RAC) que catalice la racemización de la mezcla de partida a D aminoácidos capaces de ser oxidados por DAAO.

Se llevó a cabo un ensayo acoplado a DAAO, partiendo de L y D Phg y L y D Ala, en ausencia y presencia de RAC. Se observó que en presencia de RAC se logró determinar una actividad enzimática de DAAO partiendo de L aminoácido en la solución, comparable a la observada para el D aminoácido (Figura 2.6).

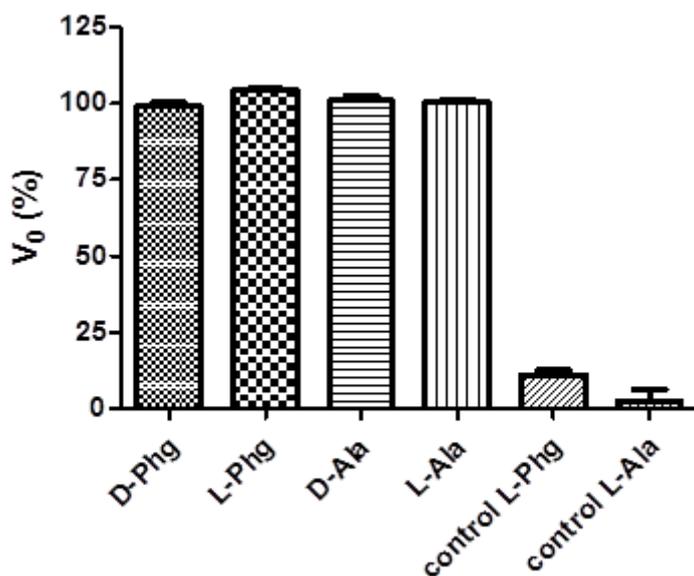


Figura 2.6: Ensayo de acoplamiento de RAC y DAAO. Se observa como control la actividad de DAAO a partir de L y D aminoácido sin RAC acoplada y ensayos con L- aminoácido con DAAO y RAC en relaciones iguales de unidades de enzima.

En la figura 2.6 puede observarse como la RAC lleva a cabo la racemización exitosa de los isómeros L, lo que permite que la enzima DAAO pueda llevar a cabo la

descarboxilación oxidativa de los isómeros D que se van generando. Estos resultados además demuestran un buen acoplamiento entre ambas actividades enzimáticas.

2.2.2 Uso *in vitro* de Deshidrogenasas en solución para la síntesis de alfa hidroxiácidos

Se llevó a cabo el estudio de acoplamiento de dos enzimas en solución para la síntesis de alfa hidroxiácidos a partir de alfa cetoácidos y la regeneración del cofactor utilizado.

La primer enzima en estudio, la lactato deshidrogenasa (LDH) realiza la reducción de alfa cetoácido a alfa hidroxiácidos utilizando NADH como cofactor. Se estudió la actividad de L-LDH y D-LDH de músculo de rata con ácido fenilglicólico. Se partió de cetoácido proveniente de la incubación de RAC, DAAO y CAT con D/L Phg y de ácido fenilglicólico de origen comercial. En ninguno de los casos se logró detectar la presencia del producto esperado ácido mandélico por HPLC. Se testeó sin éxito la actividad de una serie de deshidrogenasas alternativas, entre ellas alcohol deshidrogenasas (de caballo y de levadura).

Estos resultados demostraron que las deshidrogenasas seleccionadas para síntesis no fueron las adecuadas. Actualmente existe una única mandelato deshidrogenasa de origen comercial que podría ser la adecuada para esta ruta sintética. El alto costo y baja disponibilidad de la misma determinó que los ensayos de acoplamiento de todas las enzimas implicadas en la vía de síntesis de AA a alfa hidroxiácido, se continuaran solamente con la síntesis a partir del aminoácido alanina.

Bajo la premisa de que la LDH es una deshidrogenasa que lleva a conversión reversible de piruvato a ácido láctico⁹², se planteó entonces enfocar los estudios hacia la síntesis de ácido láctico partiendo de D/L alanina. Con el objetivo de obtener un producto final de mayor valor agregado se llevó a cabo la síntesis estereoespecífica del isómero L del ácido láctico utilizando únicamente una L-LDH.

Como se mencionó anteriormente, la LDH requiere de un cofactor NADH para la conversión de piruvato a lactato. Dicho cofactor representa un alto costo para su uso en reacciones *in vitro* a gran escala⁹³. Se han desarrollado diferentes sistemas de regeneración para superar esta dificultad, como la regeneración electroquímica, química y fotoquímica⁹⁴. Sin embargo, el uso de enzimas adicionales ha atraído mucha atención en los últimos años debido a varias ventajas: las condiciones suaves de reacción,

catálisis efectiva, alta selectividad, y la facilidad de monitoreo de reacción⁸⁸. Los cofactores de nicotinamida, NAD(P)(H), son los cofactores oxidorreductasa más utilizados. En particular el NADH puede ser regenerado usando formato deshidrogenasas, glucosa deshidrogenasas (EC 1.1.1.47^{95,96}, o alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.1)⁹⁷.

El estudio de acoplamiento de FDH a deshidrogenasas para regeneración de NADH ya ha sido ampliamente estudiado⁹⁸. En este estudio se partió de una FDH de origen comercial. De cara al acoplamiento de todas las enzimas del sistema en solución, se llevó a cabo un estudio de estabilidad de las deshidrogenasas frente a peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos demostraron que una pérdida de 80% de actividad para L-LDH y 20% para FDH en los primeros 30 minutos del ensayo cuando las deshidrogenasas eran incubadas en presencia de 10 mM de H₂O₂ (Figura 2.7 a y b). Estos resultados demostraron la necesidad de incluir la catalasa en la vía de síntesis no solo por aumento de la estabilidad de la DAAO como se había demostrado previamente, sino también para impedir la inactivación de LDH y FDH.

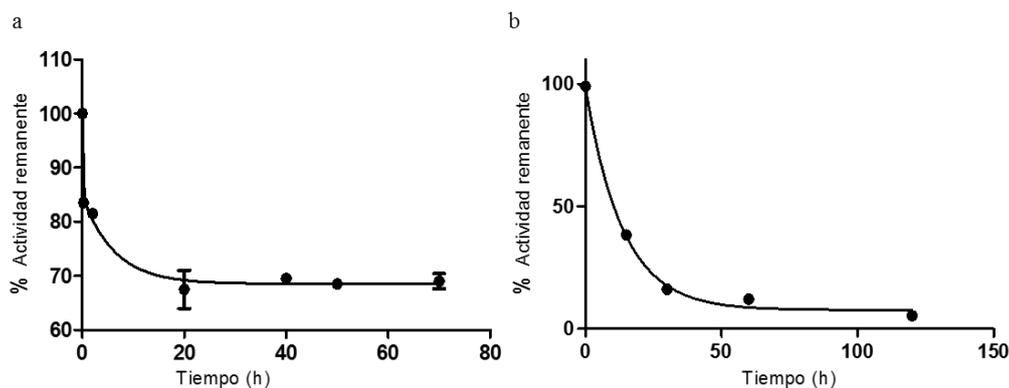


Figura 2.7: (a) Estabilidad de FDH a 24°C, en presencia de H₂O₂, (b) Estabilidad de LDH a 24°C en presencia de H₂O₂.

2.2.3 Uso *in vitro* de RAC, DAAO CAT, LDH y FDH para la síntesis de L-ácido láctico

Se procedió al acoplamiento de las enzimas del sistema en solución para la síntesis estereoespecífica de ácido láctico. Se llevó a cabo dicha síntesis a partir de una mezcla racémica de D/L Alanina utilizando RAC, DAAO, CAT, FDH y L-LDH acopladas en solución en relación de UI 1:1:3:4:1. La relación 1:3 DAAO y CAT fue elegida en base a los resultados previamente obtenidos de desaparición de productos secundarios no

deseados. Por otro lado se seleccionó una relación 1:4 de LDH:FDH en base a estudios recientes de la relación de enzimas deshidrogenasas y el reciclado de cofactor donde se estableció que biocatalizadores co-inmovilizados reciclaban cofactores (NADH y NADPH) de manera más eficiente que cuando se encontraban inmovilizados de manera independiente. Este efecto llegaba a ser óptimo cuando se trabajaba entre 4 y 5 veces en exceso de la enzima recicladora de cofactor⁹⁸. En vista de estos resultados se propuso utilizar estas relaciones con las enzimas solubles para luego aplicarlas a los ensayos de síntesis con enzimas co-inmovilizadas.

La reacción se llevó a cabo a 25°C en agitación durante 24 horas. Se realizaron ensayos paralelos con NADH y NAD⁺ en la solución. Esto se realizó debido a los resultados previamente obtenidos de inhibición de la actividad de DAAO en presencia de NADH además de ser NAD⁺ un cofactor más económicamente rentable.

En ambos casos se tomaron alícuotas a una serie de intervalos de tiempo desde 2 hasta 24 horas, se removieron las enzimas por precipitación con TCA y se analizaron las muestras por HPLC. Se observó que el control al cabo de 16 horas se mantiene inalterado luego del proceso de agregado de TCA (Figura 2.8 a). En el ensayo realizado con 0.2 mM de NADH se detectó un 37% ± 4.8 de conversión a piruvato a las 16 horas, sin embargo no se detecta ácido L-láctico (Figura 2.8 b). Por su parte, en el ensayo con NAD⁺ se detectó un 67.5% ± 3.6 de conversión a ácido L-láctico a las 16 horas de ensayo. Estos resultados podrían indicar que el efecto inhibitorio de 0.2 mM de NADH afecta la velocidad de generación del piruvato afectando por consecuencia la velocidad global del proceso. Posiblemente la conversión a ácido láctico en presencia de NADH requiera mayores tiempos de incubación.

En ambos casos se observó además la disminución del área del pico correspondiente a L-alanina. Esto implicaba un acoplamiento efectivo de la RAC y la DAAO ya que el consumo de DAA por DAAO favorecía la racemización a DAA catalizada por la RAC (Figura 2.8 c). Es importante destacar que el producto de la síntesis se detectó como un único pico cuyo tiempo de retención corresponde con el estándar de L ácido láctico testeado lo que confirma que la síntesis dio lugar a un único isómero del producto.

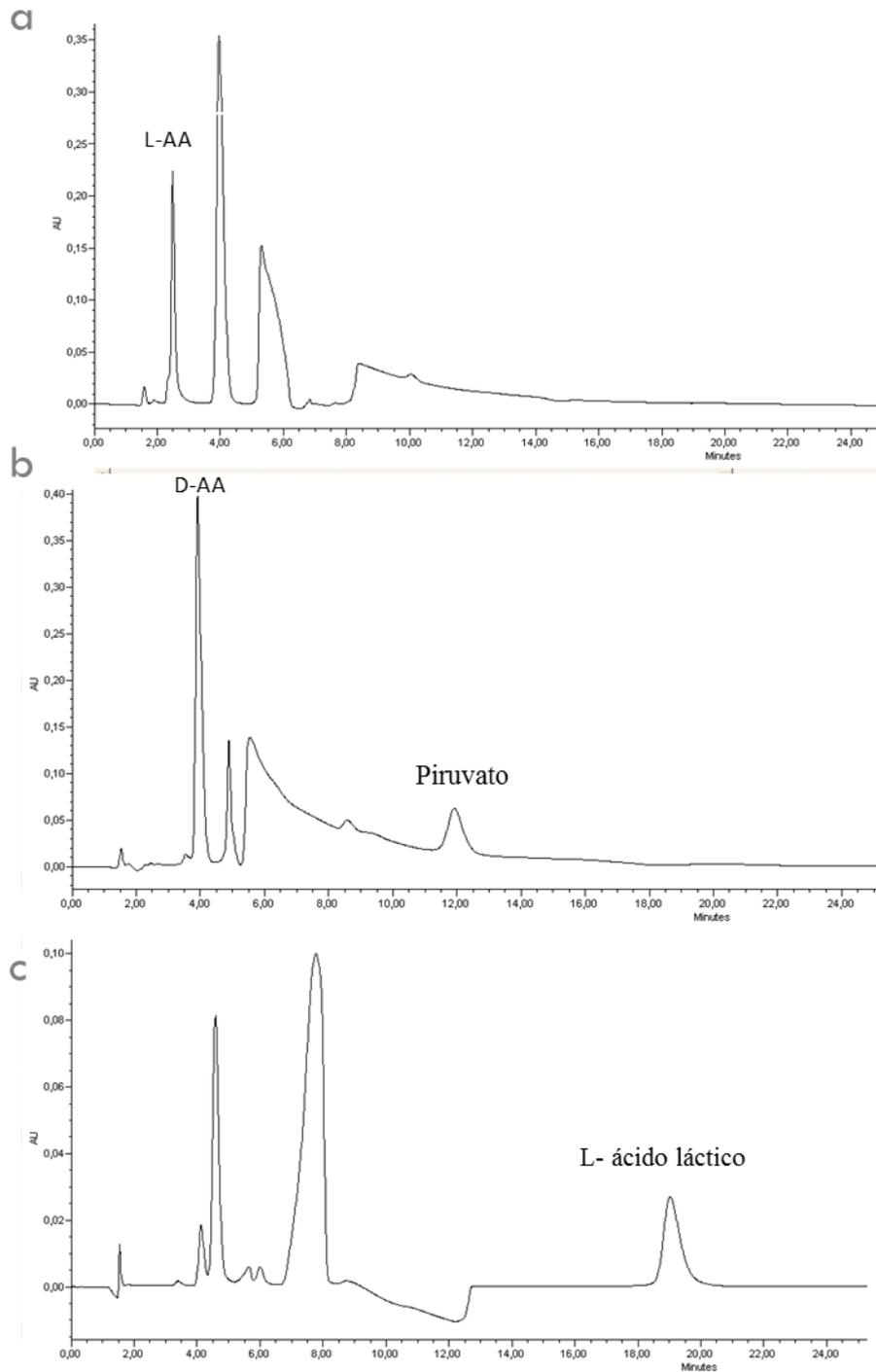


Figura 2.8: Síntesis de L ácido láctico con enzimas en solución. (a) Control tiempo 16 h, (b) Síntesis con NADH 16 horas, (c) Síntesis con NAD+ 16 h.

Se confirmó entonces que las enzimas planteadas en este sistema fueron capaces de trabajar *in vitro* para la síntesis esteroespecífica de L ácido láctico.

2.2.4 Inmovilización de enzimas del sistema de síntesis de alfa hidroxiaácidos.

La disponibilidad de biocatalizadores inmovilizados y estabilizados permite una mayor eficiencia de los procesos catalizados con enzimas y disminuye los costos. La insolubilización de las enzimas facilita su reuso si conservan actividad luego de un primer *round* de síntesis, es decir, si son estables en condiciones de reacción. Con el fin de lograr una síntesis de hidroxiaácidos más eficiente, se abordó la inmovilización de las enzimas del sistema. Actualmente no hay informes de síntesis de alfa hidroxiaácidos con enzimas inmovilizadas. Las estrategias que se plantearon para este sistema fueron el atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética y la unión covalente multipuntual en soportes glioxil-agarosa. El atrapamiento en nanopartículas fue seleccionado bajo la hipótesis de que el co-atrapamiento de las enzimas otorgaría una mayor proximidad entre los sitios catalíticos que podría acelerar el proceso global. La unión covalente a soportes glioxil-agarosa fue seleccionado en base a que tres de las cinco enzimas del sistema ya se reportaban estabilizadas en dicho soporte.

2.2.4.1 Inmovilización de RAC, DAAO y CAT

Se llevaron a cabo estudios de inmovilización por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética. El atrapamiento en sílica además de acercar físicamente a las enzimas del sistema podría proporcionar estabilización como lo ha hecho para numerosas proteínas⁵². Adicionalmente, la co-inmovilización podría traer como consecuencia un consumo más eficiente del peróxido de hidrogeno generado en las preparaciones inmovilizadas de DAAO y CAT, evitando su difusión hacia el medio de la reacción y aceleraría el reciclado de NADH del sistema L-LDH/FDH por la cercanía de las deshidrogenasas evitando también la difusión del NAD⁺. No se contaba con reportes previos de inmovilización de ninguna de las enzimas del sistema en nanopartículas de sílica biomimética por lo que se comenzó estudiando la inmovilización de cada una de las enzimas por separado. La primera enzima en ser testeada fue la DAAO. Se sintetizaron nanopartículas en presencia de dos concentraciones diferentes de DAAO (1,5 y 0,75 mg/mL) y se obtuvieron porcentajes de inmovilización de $62\% \pm 3.2$ y $40\% \pm 1.6$. Sin embargo, no se logró recuperar actividad en la suspensión. Estudios de actividad de DAAO en presencia de PEI indicaron que la enzima no perdía actividad en estas condiciones por lo que estimamos que durante el

proceso de inmovilización, ya sea la hidrólisis del TMOS o la interacción de la enzima con el soporte resultan inactivantes para la DAAO. El fracaso en la inmovilización de esta enzima utilizando nanopartículas de sílica nos condujo a estudiar la estrategia alternativa previamente planteada.

Dado los reportes previos de inmovilización y estabilización de tres de las enzimas del sistema (DAAO, CAT y FDH)^{16,99,100} en soportes glioxil-agarosa, se seleccionó esta estrategia para testear las enzimas RAC y LDH. El uso de una única estrategia de inmovilización/estabilización para todas las enzimas simplifica el control del proceso y facilita el acoplamiento de las enzimas que necesariamente deben ser co-inmovilizadas: DAAO/CAT y FDH/LDH.

La inmovilización en glioxil-agarosa se lleva a cabo mediante los grupos amino de lisinas superficiales de las proteínas. Se estudió entonces la estructura tridimensional de la RAC, la primera enzima del sistema, en búsqueda de lisinas superficiales para corroborar la factibilidad de la estrategia de inmovilización elegida. El análisis se muestra en la figura 2.9, donde se observa que existen una serie de lisinas (amarillo) en la superficie de ambas subunidades de la enzima.

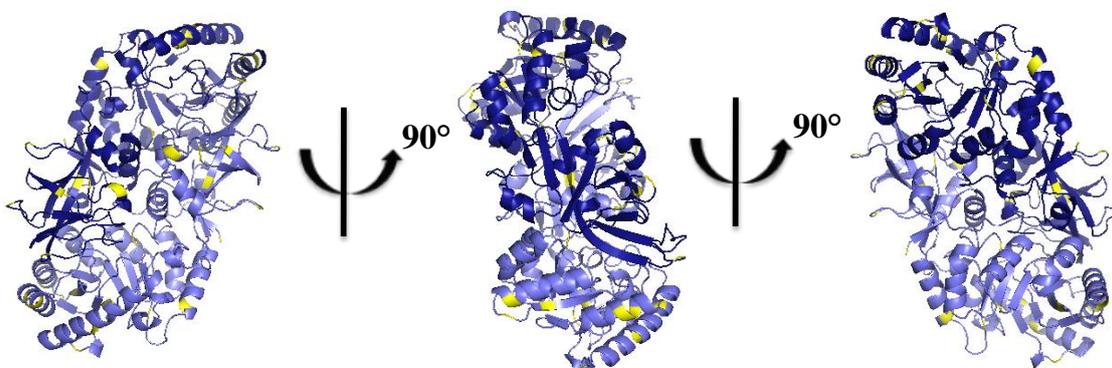


Figura 2.9: Análisis de estructura tridimensional de la RAC. En amarillo, residuos de Lys. Análisis realizado en Pymol.

Se estudió la inmovilización de RAC en glioxil agarosa. Para esto se llevó a cabo la incubación de la enzima con el soporte a pH 10 y temperatura ambiente. Se monitoreó la adsorción de la proteína al soporte mediante la medida de actividad en el sobrenadante durante un período de 16 horas y se redujo con 1 mg/mL de borohidruro de sodio durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. Se logró un $94.1\% \pm 5.9$ de inmovilización al cabo de 15 minutos, sin embargo, bajo estas condiciones, no se observó actividad apreciable en la

suspensión luego de ser reducida ($3.95\% \pm 1.1$). Se observó que la actividad de la suspensión disminuía drásticamente luego de la reducción con borohidruro sódico por lo que se llevaron a cabo una serie de estrategias para suavizar las condiciones de reducción de manera de proteger a la enzima. Se testeó la reducción a 0°C y una concentración 10 veces menor de borohidruro de sodio (manteniendo la cantidad total del mismo en la reacción). En ambos casos no se recuperó actividad en la suspensión.

En la literatura se describen diferentes estrategias para la estabilización de enzimas. Debido a que en general el paso limitante de la inactivación involucra el desplegamiento de la proteína, estrategias para estabilizarla se avocan a intentar disminuir o suprimir este fenómeno. Esto puede hacerse trabajando a temperaturas más bajas y o a pH más moderados. Puede además intentarse estabilizar la estructura nativa de la proteína mediante el uso de aditivos. Los aditivos pueden actuar estabilizando la conformación nativa o de manera inespecífica. Dentro de los aditivos que actúan sobre la conformación de la proteína se encuentran los sustratos, productos, cofactores, inhibidores entre otros además de los polímeros, proteínas y carbohidratos¹⁰¹.

Debido a que la RAC es una enzima piridoxal fosfato dependiente (PLP)⁸³ se llevó a cabo la incubación de la preparación inmovilizada con PLP durante luego del paso de reducción. De este modo se logró recuperar el 100% de la actividad racemasa en la preparación inmovilizada. La caracterización de la preparación inmovilizada generada se llevó a cabo en contexto de tesis de grado del Lic. Alejandro Herrero del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC, Madrid-España. Sus resultados demostraron que la RAC inmovilizada en glioxil lograba estabilizarse 767 veces con respecto a la enzima soluble en experimentos de estabilidad térmica llevados a cabo a 50°C .

Se prosiguió entonces con la inmovilización y co-inmovilización en glioxil-agarosa de DAAO y CAT con las condiciones previamente reportadas^{16,99}. La estrategia de co-inmovilización fue seleccionada para estudiar si se lograba minimizar la concentración *in situ* de peróxido generado gracias a la conversión del mismo a agua y oxígeno por CAT. Esto se llevó a cabo con el objetivo de minimizar a su vez la descarboxilación del cetoácido, y mantener la integridad de las enzimas del sistema.

Tanto DAAO como CAT fueron exitosamente inmovilizadas (%I de 95 ± 1.1 y 99 ± 0.8 % respectivamente) y se recuperó un porcentaje de actividad en las preparaciones inmovilizadas de 80 ± 5.5 y 100 ± 0.1 % respectivamente. La co-inmovilización se llevó

a cabo en diferentes proporciones ya que se pretendía estudiar la relación óptima de ambas enzimas en la síntesis de nuestro producto de interés. Así, se prepararon inmovilizados que contenían los siguientes excesos en unidades de enzima de CAT con respecto a DAAO: 1:3 (%I DAAO 96 ± 2.7 y CAT 100 ± 0.2 %), (%R DAAO 80 ± 7.7 y CAT 48 ± 3.2) y 1:6 (%I DAAO 95 ± 1.4 y CAT 100 ± 0.05 %), (%R DAAO 85 ± 0.6 y CAT 50 ± 0.8).

2.2.4.2 Uso *in vitro* de RAC, DAAO y CAT inmovilizadas y co-inmovilizadas.

Una vez obtenidos las preparaciones con enzimas inmovilizadas y co-inmovilizadas se prosiguió con las reacciones de síntesis de ácido decetoico a partir de mezclas racémicas de aminoácidos. Estos ensayos se realizaron con Phg bajo el mismo criterio utilizado en las enzimas en solución, su facilidad de detección por HPLC. De manera análoga a los ensayos con enzimas solubles, se estudió la síntesis de ácido benzoico y ácido fenilglicólico con enzimas inmovilizados y co-inmovilizadas. A pesar de haber determinado la relación 1:3 de DAAO y CAT como óptima para las enzimas solubles, se testearon las preparaciones inmovilizadas con relaciones 1:3 y 1:6 de enzimas inmovilizados de manera independiente y co-inmovilizados para estudiar si se presentaba un beneficio en la co-inmovilización a la hora de eliminar el peróxido de la mezcla.

Los resultados del estudio de formación de ácido benzoico en ausencia y presencia de CAT se muestran en la Tabla 5. Puede observarse que la relación 1:3 con enzimas co-inmovilizadas probó ser suficiente para la eliminación total del producto secundario no deseado en tan solo 1 h de reacción. Es precisamente en esta relación que se observa un beneficio en la co-inmovilización con respecto a los inmovilizados separados utilizados en la reacción. La co-inmovilización logra reducir casi 20 veces la aparición del ácido benzoico con respecto a las inmovilizadas por separado. Este resultado prueba un acoplamiento más eficiente de las enzimas inmovilizadas en proximidad (co-inmovilizadas). Así en los co-inmovilizados DAAO/CAT, la CAT destruye el peróxido tan pronto es formado por la DAAO. En mezclas de inmovilizados separados, el peróxido debe difundir fuera de la partícula de agarosa y dentro de una nueva, en donde está inmovilizada la CAT, para ser destruido.

Tabla 5: Estudio de conversión a ácido benzoico en reacciones con DAAO y CAT inmovilizadas por separado, co-inmovilizadas y su comparación con las reacciones en solución.

Reacción 1h	% ác. Benzoico
DAO:CAT 1:3 soluble	2.8 ± 0.1
DAO:CAT 1:3 inmovilizadas	1.8 ± 0.05
DAO:CAT 1:3 co-inmovilizadas	0.1 ± 0.02
DAO:CAT 1:6 soluble	0.7 ± 0.1
DAO:CAT 1:6 inmovilizadas	0.1 ± 0.001
DAO:CAT 1:6 co-inmovilizadas	0.1 ± 0.001

En las mismas reacciones, se estudió la síntesis de cetoácido para cada caso. No se encontró una diferencia importante entre las preparaciones inmovilizadas y co-inmovilizadas, obteniéndose en todos los casos ~70% de conversión a las 4 horas de reacción (Figura 2.10 a y b).

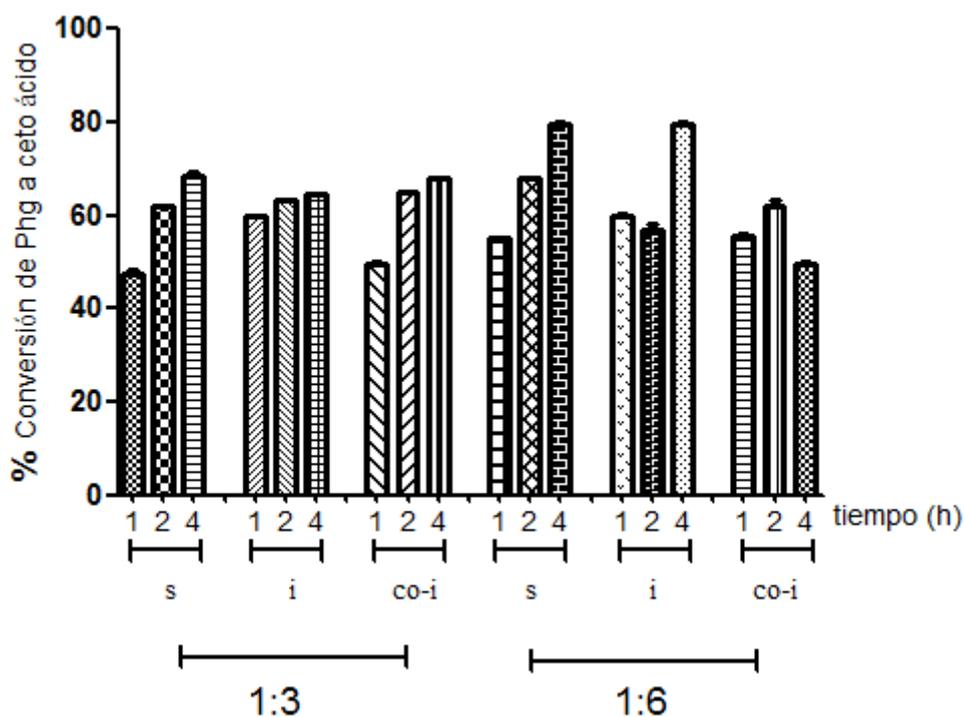


Figura 2.10: Conversión de Phg a cetoácido. Ensayos a 1, 2 y 4 horas con DAAO y CAT 1:3 y 1:6 en solución (s), inmovilizadas (i) y co-inmovilizaciones (co-i) en agarosa glioxil.

Se seleccionó para la síntesis de hidorxiácidoslapreparación inmovilizada 1:3 co-inmovilizada por ser la relación que probó ser eficiente en evitar la formación del ácido benzoico sin comprometer la síntesis de cetoácido. No se profundizó más en la caracterización de esta preparación inmovilizadas ya que se encuentra reportada que es estabilizante para las enzimas en estudio^{16,17}.

2.2.4.3 Inmovilización de L-LDH y FDH

La inmovilización de L-LDH y FDH se llevó a cabo en glioxil-agarosa para compatibilizar la metodología de inmovilización con las preparaciones inmovilizadas ya obtenidos de RAC, DAAO y CAT. Este sistema bi-enzimático acoplado pretendió llevar a cabo la reducción de cetoácido a α -hidroxiácido estereoespecífico y la regeneración *in situ* del cofactor utilizado de forma más eficiente.

En general, los reportes de inmovilización de LDH son escasos^{102,103}, por lo que fue necesario desarrollar un protocolo de inmovilización óptimo en glioxil-agarosa.

Como se mencionó previamente, la inmovilización en glioxil-agarosa se lleva a cabo mediante los grupos amino de lisinas superficiales de las proteínas. Se estudió entonces la estructura tridimensional de la L-LDH, en búsqueda de lisinas superficiales para corroborar la factibilidad de la estrategia de inmovilización elegida. El análisis se muestra en la figura 2.11, donde se observa que existen una gran cantidad de lisinas (rojo) que recubre la superficie del tetrámero lo cual la hace una buena candidata para este tipo de estrategia.

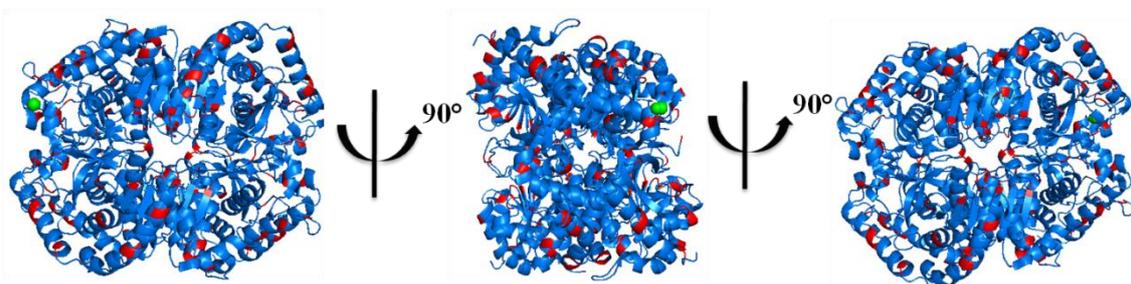


Figura 2.11: Análisis de estructura tridimensional de la LDH. En rojo, residuos de Lys, en verde, N-terminal. Análisis realizado en Pymol.

De forma análoga al desarrollo del protocolo desarrollado para RAC, se llevó a cabo la incubación de la enzima con el soporte glioxil-agarosa a pH 10 y 24°C. Se monitoreó la adsorción de la proteína al soporte mediante la medida de actividad en el sobrenadante durante un período de 30 minutos y se redujo con 1 mg/mL de borohidruro de sodio

durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se logró un 94 ± 0.5 % de inmovilización al cabo de solo 15 minutos de incubación, lo que era de esperarse dada la gran cantidad de grupos Lys en superficie de la enzima. Sin embargo, bajo estas condiciones, no se observó actividad apreciable en el inmovilizado luego de ser reducido (1%). Se observó que la actividad de control con enzima en solución a pH 10 se reducía drásticamente a 2.5% de su actividad inicial al cabo de 15 minutos. Evidentemente las condiciones de incubación de la enzima durante la inmovilización resultaban ser deletéreas. Se estudió la inmovilización de la enzima a 4°C con la intención de minimizar el efecto inactivante del pH 10. En estas condiciones tampoco se recuperó actividad luego de la inmovilización. Se procedió a estudiar la actividad de la enzima soluble a pH 10 en presencia de una serie de potenciales estabilizantes: trehalosa, NADH, PEG y piruvato. Estas moléculas fueron elegidas debido a que como se mencionó previamente sustratos y cofactores (en este caso piruvato y NADH) ya han demostrado ser estabilizantes de proteínas en condiciones adversas^{104,105} y a su vez carbohidratos y polímeros como trehalosa y polietilenglicol (PEG) son ampliamente utilizados en estabilización de enzimas para su almacenamiento, liofilizado, entre otras aplicaciones^{106,107}. Como puede observarse en la figura 2.12, tanto la trehalosa, NADH y PEG demostraron ser estabilizantes cuando la enzima se incubaba a pH10, siendo la trehalosa la más eficiente, ya que resultó el único aditivo en el que se recuperó el 100% de actividad luego de 15 minutos de incubación. Este tiempo fue seleccionado dada la rápida inmovilización de la enzima sobre glioxil agarosa.

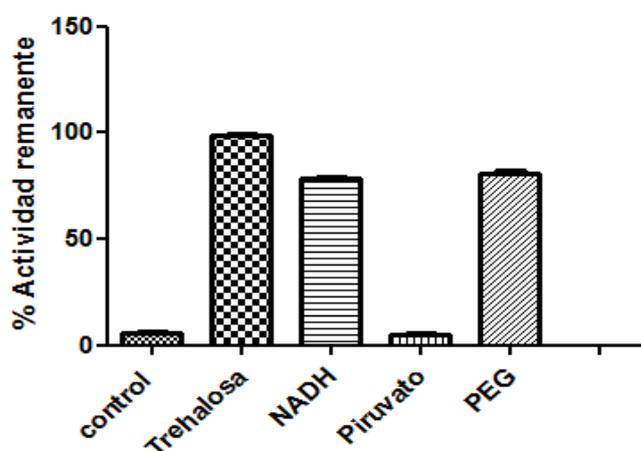


Figura 2.12: Estabilidad de LDH soluble (0.015mg/mL) en presencia de aditivos. La enzima fue incubada durante 15 minutos en tampón 0.1M bicarbonato de sodio pH 10 a 4°C . Control, sin aditivos; las concentraciones de aditivos utilizadas fueron 150mM de trehalosa, 0.1mM de NADH, 10mM de piruvato, 5% de PEG

Se llevó a cabo la inmovilización de LDH en glioxil-agarosa en presencia de los estabilizantes antes propuestos y se observó que la trehalosa y el NADH dieron lugar a las preparaciones inmovilizadas con mayor actividad recuperada (Tabla 6).

Tabla 6: Inmovilización en agarosa-glioxil de LDH. Condiciones: Control, enzima incubada sin aditivos antes de reducir; trehalosa, 300 mM final; 0.1mM final de NADH; 10mM final de piruvato; 5% final de PEG. Todas las inmovilizaciones fueron a 4°C.

Inmovilización	%I	%R
Control	93±1	6±0,5
Trehalosa	80,3±1.3	18±1
NADH	98,0±1,0	13,8±0,2
piruvato	100±0,5	2,5±0,2
PEG	98,8±1,0	10,1±1,2

El uso de NADH durante la inmovilización aumentaría mucho el costo del proceso, por lo que se continuó con los estudios con la preparación inmovilizada generado con trehalosa. Se testearon diferentes concentraciones de trehalosa intentando mejorar el rendimiento de inmovilización obtenido. Así, se probó la inmovilización en presencia de 75, 150 y 300mM de trehalosa. Para todos los casos se obtuvieron porcentajes de inmovilización superiores a 80% y con 300mM de trehalosa se logró mejorar la actividad recuperada luego de la inmovilización obteniéndose un 30% de rendimiento en la suspensión reducida (Tabla 7).

Tabla 7: Inmovilización de LDH en agarosa glioxil frente a diferentes concentraciones de trehalosa.

Inmovilización	%I	%R
75mM trehalosa	97.3±1	6±0.3
150mM trehalosa	80,3±1.3	18±1
300mM trehalosa	94.7±1,0	30.6±0,2

En un intento de mejorar aún más el rendimiento obtenido, se realizó la inmovilización contrehalosa 300mM modificando las condiciones de reducción de 1 mg/mL de borohidruro de sodio a 0.1mg/mL, con 10 veces más volumen de tampón. La disminución de la concentración de este reactivo se llevó a cabo ya que el borohidruro puede tener efectos deletéreos sobre las proteínas¹⁰⁸. Estos efectos pueden afectar la

actividad o estabilidad de las preparaciones inmovilizadas. Bajo estas condiciones se recuperó 72% de actividad en el inmovilizado LDH-glioxil-agarosa.

Una vez obtenidas las condiciones de inmovilización necesarias para recuperar actividad en la preparación inmovilizada, se llevaron a cabo una serie de ensayos de unión a glioxil-agarosa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempos de incubación. Estos parámetros afectan el grado de unión multipuntual entre enzima y soporte, lo cual se ve directamente reflejado en la estabilidad de la preparación inmovilizada²³. Se llevaron a cabo 4 condiciones diferentes de incubación previa a la reducción: 15 minutos y 16 h a 4°C, 15 minutos y 16 h a 24°C. Se observó que en todos los casos se recuperó actividad luego de la inmovilización a excepción de la incubación de 16h a 24°C (Tabla 8) la cual se descartó para futuros experimentos.

Tabla 8: Inmovilización en agarosa glioxil de LDH 0.015mg/mL proporción 1:10 soporte:volumen con 150mM de trehalosa. Condiciones en que se realizó la inmovilización previo a la reducción: 15 minutos a 4°C; 15 minutos a 24°C; 15 minutos a 4°C más 16hs a 24°C y 16 horas a 4°C.

condiciones de inmovilización	%I	%R
15 min 4°C	76±2	72±0,1
15 min 24° C	88.6±0,1	30.6±0.4
16 h a 24°C	96,0±0,2	1,4±0,2
16 h a 4°C	98,2±0,6	50,0±0,1

Se llevaron a cabo ensayos de estabilidad a 50°C (Figura 2.13 a). Se ajustaron los datos obtenidos a los modelos de decaimiento propuestos por Henley y Sadana¹⁰⁹. Se determinó la vida media de la enzima soluble (0.3 h) y de la preparación inmovilizada incubada 15 min a 4°C (2 h) donde se observa un factor de estabilización de 6.7 veces de la preparación inmovilizada con respecto a la enzima soluble. Las preparaciones inmovilizadas incubadas 15 minutos a 24°C y 16 h a 4°C fueron las más estables y no se logró determinar la vida media en el transcurso del ensayo (Figura 2.13a). Se realizó entonces la estabilidad de estas dos preparaciones inmovilizadas y la enzima soluble a 55°C para determinar la vida media de los mismos. Se determinó la vida media de la enzima soluble (0.03 h), de la preparación inmovilizada incubado 15 min a 24°C (48 h) y de la preparación inmovilizada incubado 16 h a 4°C (3.6 h) donde se observó un factor de estabilización de 1600 y 120 veces de los inmovilizados con respecto a la enzima soluble. El inmovilizado incubado 15 minutos a 24°C se determinó entonces como el más estable manteniendo el 50% de actividad luego de 50 h de ensayo (Figura 2.13 b).

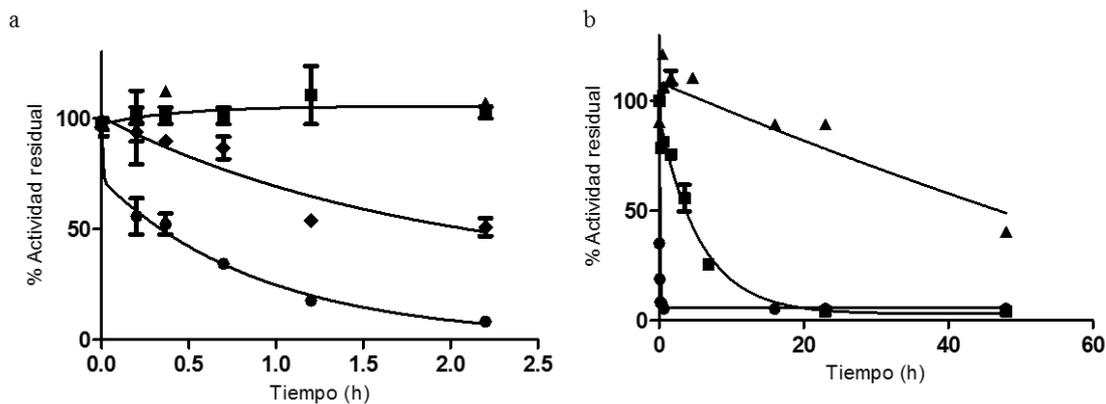


Figura 2.13: (a) Estabilidad de las preparaciones inmovilizadas a 50°C. L-LDH soluble(●), LDH condición 15 minutos a 4°C (◆), LDH condición 16hs a 4°C (■) y 15 minutos a temperatura ambiente(▲). (b) Estabilidad de las preparaciones inmovilizadas a 55°C. L-LDH soluble(●), LDH condición 16hs a 4°C (■) y 15 minutos a temperatura ambiente(▲)

Estos resultados sugieren que tal como ha ocurrido con otras enzimas²⁰, a mayor temperatura se favorece una unión multipuntual de la enzima con el soporte lo que rigidifica la estructura enzimática, estabilizándola frente a la enzima soluble (1600 veces). Los escasos reportes de inmovilización de LDH describen inmovilizaciones en nanoclusters magnéticos, nanopartículas de óxido de cerio y nanorods de óxido de zinc^{102,103,110}. Únicamente el trabajo con nanoclusters magnéticos reportan una disminución de la tasa de inactivación de la preparación inmovilizada entre 5 y 7 veces a 45°C¹⁰³.

El inmovilizado obtenido en nuestro trabajo logró una estabilización altamente significativa con respecto a la enzima soluble que potencia su uso aplicado. En este contexto se consideró necesario abordar la caracterización completa de la preparación inmovilizada. Esto fue llevado a cabo mediante el estudio de condiciones óptimas de reacción, estabilidad frente a pH y solventes orgánicos y parámetros cinéticos.

En primer paso hacia la caracterización de la preparación inmovilizada fue entonces establecer los parámetros óptimos de reacción de la enzima L-LDH se habían visto modificados.

Para esto se prepararon suspensiones de preparación inmovilizada LDH-glioxil y la enzima LDH soluble en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.

Se midió la actividad a 24°C en tampón a diferentes pH de 3 a 11 para estudiar el pH a la cual la actividad enzimática es la óptima. Se midió velocidad inicial para cada caso y se graficaron los valores como porcentaje del máximo de velocidad alcanzada. En la

figura 2.14 se observa que los valores óptimos de reacción se mantuvieron incambiables (pH 6-7), sin embargo el rango de pH al cual la enzima es activa fue ampliado al estar inmovilizada. La enzima inmovilizada es activa en un rango de pH de 3 a 9 mientras que la enzima libre es activa en un rango de pH de 5 a 9. La inmovilización entonces amplía la perspectiva de utilización de la LDH en conversiones que requieran llevarse a cabo en pH más extremos.

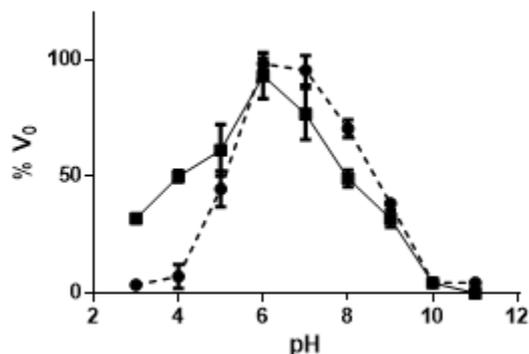


Figura 2.14: pH óptimo para L-LDH. Enzima libre (●) y preparación inmovilizada incubada 15 min a 4°C (■).

Partiendo de las mismas suspensiones descritas previamente, se midió la actividad en un rango de temperaturas de 25 a 90°C para estudiar la temperatura a la cual la actividad enzimática es la óptima. Se midió velocidad inicial para cada caso y se graficaron los valores como porcentaje del máximo de velocidad alcanzada. En la figura 2.15 se observa que el rango de valores óptimos para la reacción de 37 a 70°C se mantuvo incambiado cuando la enzima fue inmovilizada. Mientras que a temperaturas más elevadas (90°C) se observó actividad solamente en la preparación inmovilizada a diferencia de la enzima soluble, donde la actividad es cercana a cero.

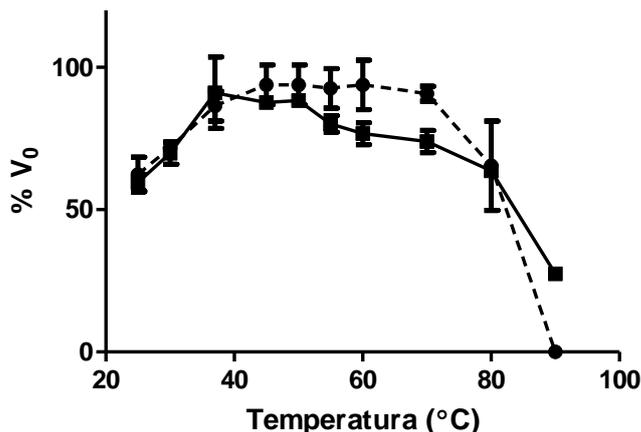


Figura 2.15: Temperatura óptima para L-LDH. Enzima libre (●) y preparación inmovilizada incubada 15 min a 4°C (■).

Estos ensayos en conjunto indican que los parámetros óptimos de reacción se mantienen incambiables, sin embargo el rango de actividad de la enzima se ve ampliado.

El estudio de estabilidad frente a pH se llevó a cabo resuspendiendo la preparación inmovilizada LDH-glioxil y la enzima LDH soluble en tampón a diferentes pH en un rango de 3 a 11 y se midió el porcentaje de actividad remanente para cada caso al cabo de 1 h de incubación. En la figura 2.16 se observa como el rango de estabilidad fue más amplio para la enzima inmovilizada con respecto a la soluble. La preparación inmovilizada probó ser estable a pH de 3 a 10 mientras que la enzima soluble fue estable en un rango de 5 a 9.

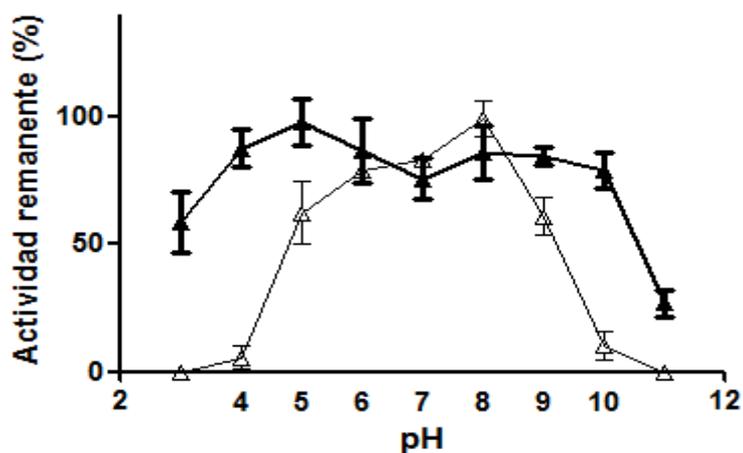


Figura 2.16: Estabilidad de L-LDH frente a pH. Enzima soluble (△) y preparación inmovilizada (▲)

El estudio de estabilidad frente a solventes orgánicos se llevó a cabo utilizando etanol como solvente modelo. Para esto se resuspendió el inmovilizado LDH-glioxil y la

enzima LDH soluble en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7 conteniendo 30% de etanol.

En la figura 2.17 se observa que al cabo de 10 minutos la enzima soluble se encuentra totalmente inactiva mientras que la enzima inmovilizada mantiene el 75% de su actividad inicial al cabo de 50 horas de ensayo.

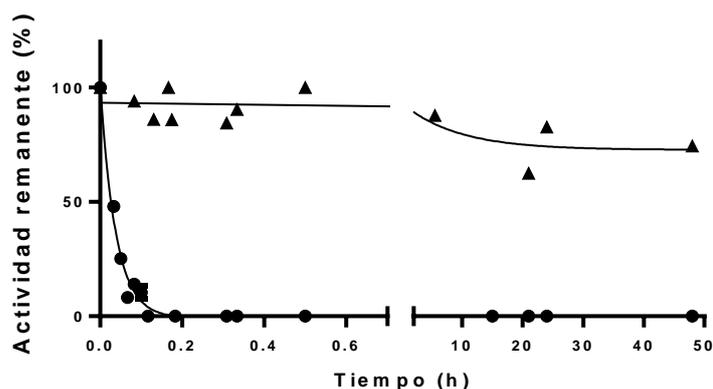


Figura 2.17: Ensayo de estabilidad de LDH en etanol 30%. (●)enzima soluble y (▲) enzima inmovilizada.

Se culminó la caracterización del inmovilizado obtenido con el estudio de los parámetros cinéticos de la enzima soluble y de la preparación inmovilizada utilizando ácido pirúvico como sustrato. Este ensayo fue de especial importancia debido a que cambios en la constante K_M significarían un cambio en la afinidad aparente de la enzima por el sustrato.

Para este ensayo se partió de la misma cantidad de unidades de enzima en las suspensiones de enzima soluble y preparación inmovilizada. En la figura 2.18a y b se observa que K_M no se ve significativamente modificada por lo que se podría afirmar que la afinidad por la enzima por piruvato no se ve afectada luego de la inmovilización ($0,13 \pm 0,011$ mM y $0,1328 \pm 0,017$ mM para enzima soluble e inmovilizada respectivamente). Estos resultados indican la ausencia de problemas de transferencia de masa en la preparación inmovilizada lo cual es sumamente ventajoso para usos aplicados de la misma. El valor de K_{cat} disminuyó luego de la inmovilización de 276.5 ± 7.4 s⁻¹ a 170.7 ± 8.2 s⁻¹ en concordancia con la pérdida de actividad ocurrida durante la inmovilización.

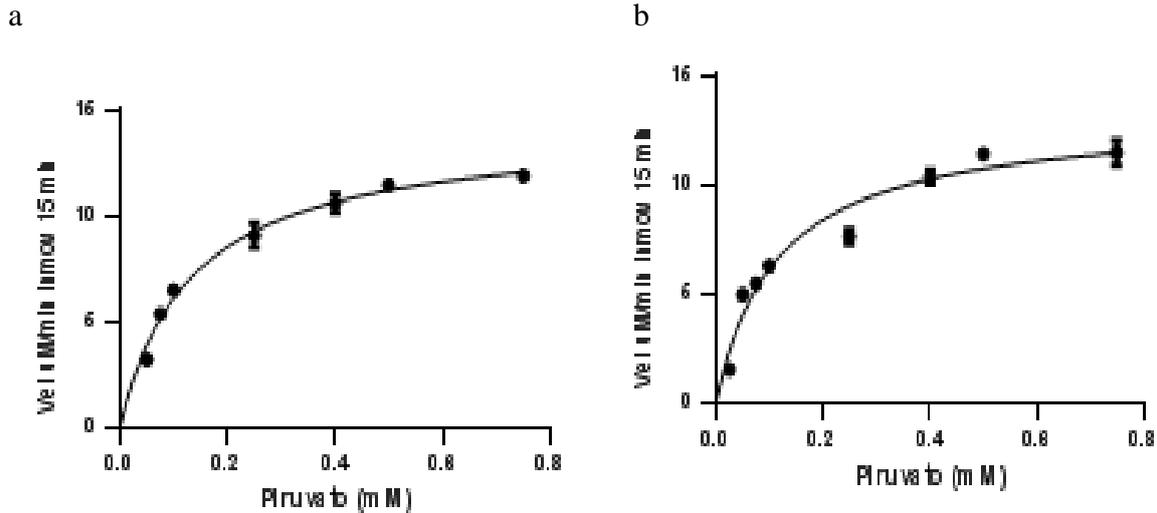


Figura 2.18: Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima soluble (a) y de la preparación inmovilizada (b)

Reportes previos indican que la enzima LDH es inhibida por piruvato, este fenómeno se relaciona con la formación de un complejo enzima-piruvato-NAD⁺^{111,112}. Durante el estudio de parámetros cinéticos se observó este fenómeno a mayores concentraciones de piruvato. El estudio de la constante de inhibición por piruvato en la enzima soluble y la preparación inmovilizada demostró un aumento de KI para la LDH inmovilizada (5.67 ± 0.97 mM) en relación a la enzima soluble (3.30 ± 0.36 mM). Es posible que la inmovilización imponga restricciones estructurales que afectan a la afinidad por el complejo inhibidor. El valor de KI 1.75 veces mayor en el caso de la enzima inmovilizada implica un aumento en la concentración de piruvato necesaria para generar el mismo grado de inhibición que a la enzima soluble. Esto representa una ventaja a la hora de acoplar el sistema ya que aumenta el rango de concentración de piruvato generada *in situ* donde la enzima permanece activa.

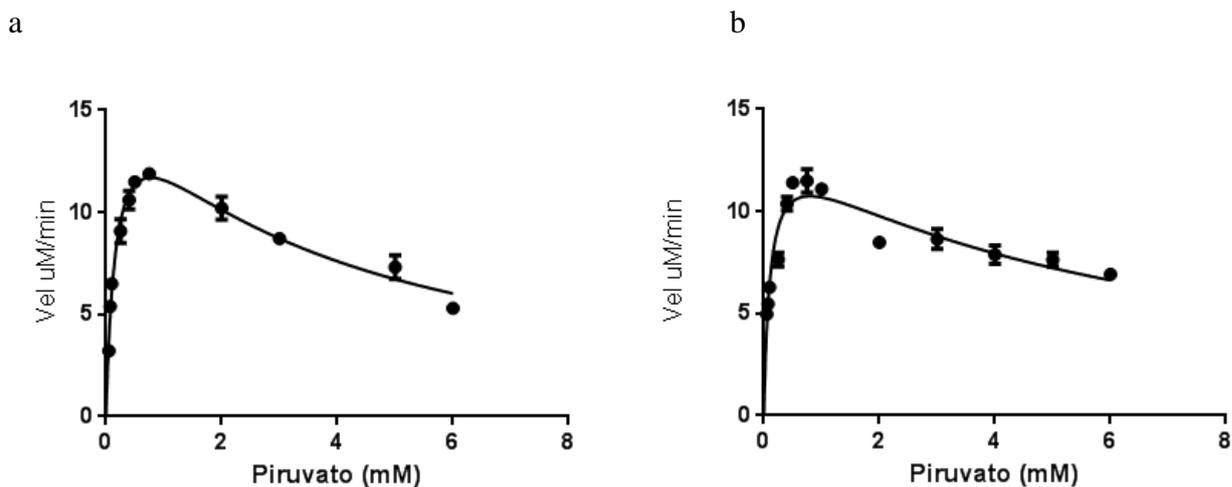


Figura 2.19: Estudio de KI para L-LDH con piruvato. (a) enzima soluble, (b) preparación inmovilizada.

2.2.5 Uso *in vitro* de preparados inmovilizados de RAC, DAAO/CAT y LDH/FDH para la síntesis de L-ácido láctico

Una vez que se obtuvieron los preparados de enzimas inmovilizadas, se procedió al acoplamiento de los mismos para la síntesis estereoespecífica de ácido láctico.

Se llevó a cabo dicha síntesis partiendo de una mezcla racémica de D/L Alanina utilizando las preparaciones inmovilizadas de RAC, DAAO y CAT y FDH con L-LDH en *one pot*. El inmovilizado de DAAO y CAT 1:3 se utilizó en base a los resultados previamente obtenidos de desaparición de productos secundarios no deseados. En el caso del preparado de FDH y LDH se utilizó un inmovilizado en relación 4:1⁹⁸. La reacción se llevó a cabo a 25°C en agitación durante 48 horas. El estudio fue realizado con NAD⁺ ya que fue el caso de éxito en la síntesis con enzimas solubles. Se tomaron alícuotas a una serie de intervalos de tiempo desde 2 hasta 48 horas, en cada caso el soporte fue removido por filtración y se analizaron las muestras por HPLC.

En la figura 2.20 se observa el análisis por HPLC que a las 2 horas de reacción se observa 33% de conversión a L-ácido láctico. Al igual que con las enzimas solubles, se detecta un pico único que corresponde al tiempo de retención del estándar de L ácido láctico y no a una mezcla de isómeros. Se alcanzó bajo estas condiciones, un máximo de conversión de 46% a las 16 h de reacción.

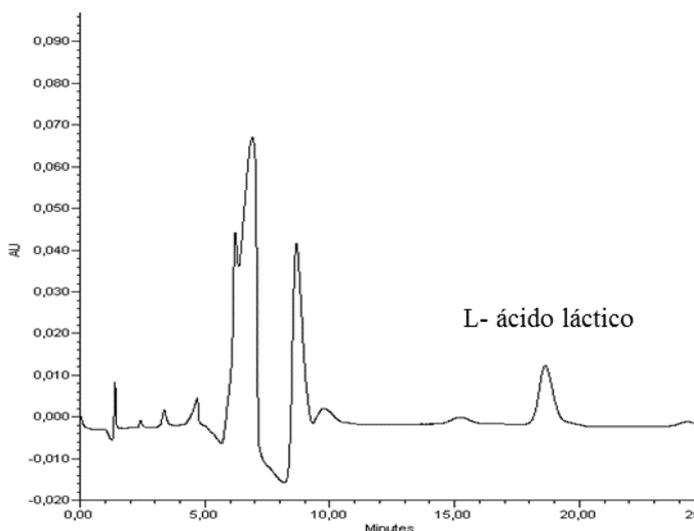


Figura 2.20: Análisis por HPLC de la síntesis de L- ácido láctico *one pot* con enzimas inmovilizadas.

Los resultados demuestran que todas las enzimas inmovilizadas del sistema propuesto son capaces de acoplarse *in vitro* para la síntesis estereoespecífica del producto ácido L-láctico.

Recientemente se ha presentado una estrategia para la síntesis de alfa hidroxiácidos a partir de L-aminoácidos mediante el uso de cascadas enzimáticas en *E. coli* que expresaban enzimas recombinantes. Los L-aminoácidos eran consumidos por una aminoácido deaminasa para dar alfa cetoácidos. Estos eran sustrato por lactato deshidrogenasas expresadas en diferentes microorganismos. La reducción estereoespecífica dependía de la deshidrogenasa utilizada. En estas condiciones se lograron conversiones de entre 73 y 85% partiendo de concentraciones de 50 mM de L-fenilalanina¹⁰. Se encuentra reportada además la co-expresión de estas enzimas en *E. coli* para la síntesis en *one pot* de alfa hidroxiácidos enantioméricamente puro a partir de L-aminoácido (100-200 m/m) con 71 a 96% de conversión⁸². Estas estrategias a pesar de ser más eficiente a la presentada en este trabajo, en términos de conversión a producto, requiere pasos de purificación del producto que incluyen altas temperaturas (218°C) durante varias horas y pasos de acidificación, extracción y lavados con solventes¹⁰. El modelo de síntesis aquí propuesto con enzimas inmovilizadas, aún cuando puede ser optimizado presenta la ventaja de no requerir pasos sucesivos de purificación de producto sino que el mismo es separado de los catalizadores mediante filtración del soporte. En cuanto a las cantidades de producto generado, resta aún por estudiar la potencialidad de reúsos de los inmovilizados y síntesis a mayor escala para poder realizar comparaciones con los procesos que actualmente se utilizan para producir alfa hidroxiácidos enantioméricamente puros.

Capítulo 3

Uso *in vitro* de DEBS3 para la síntesis de poliquétidos

3.1 Introducción

Los poliquétidos son una clase de compuestos naturales y con una amplia diversidad química de gran interés en el área de la medicina. Las drogas poliquetídicas incluyen antibióticos, drogas anti-cáncer, anti-parasitarias, antifúngicas, insecticidas e inmunosupresores¹¹³.

El descubrimiento o diseño de nuevas o mejores drogas basadas en poliquétidos constituye un área de investigación muy intensa tanto en la academia como en la industria¹¹⁴. La complejidad química de los poliquétidos impide, en la mayoría de los casos, una síntesis química eficiente¹¹⁵. Es por esto que la producción heteróloga *in vivo* de poliquétidos mediante ingeniería metabólica de rutas biosintéticas, representa la estrategia más utilizada actualmente en la producción de estos productos naturales^{116,117}. Sin embargo, esta estrategia cuenta con algunas limitaciones, tales como la permeabilidad de sustrato limitada en la célula, la presencia de vías que compiten con los controles regulatorios complejos y la toxicidad celular^{118,119}.

3.1.1 6-deoxieritronolida B sintasa (DEBS)

En la naturaleza, los poliquétidos son sintetizados por complejos enzimáticos denominados poliquétido sintasas (PKSs). Las PKSs de actinomicetes representan uno de los ejemplos más sofisticados de catálisis biológica y han atraído un intenso interés tanto por sí mismas como por el valor medicinal de muchos de sus productos³⁴. En términos de cantidad y actividad biológica, la fuente más rica de poliquétidos, son los Actinomicetales que contienen PKS gigantes del Tipo I. Estos sistemas combinan varias actividades enzimáticas individuales en módulos y actúan a modo de línea de ensamblaje molecular. Cada módulo lleva a cabo un ciclo de adición a la cadena poliquetídica la cual es luego transportada al módulo siguiente sin ser liberada al medio en ningún momento. Estos sistemas enzimáticos están constituidos por varios módulos que se asocian para formar una PKS gigante. Un ejemplo de esta organización es la 6-deoxieritronolida B sintasa (DEBS) sintetizada por *Saccharopolyspora erythraea*. Este complejo proteico de 2MDa es responsable de la biosíntesis de la eritromicina (Figura

xx). DEBS se encuentra conformada por 3 módulos homodiméricos: DEBS 1 (371 kDa), DEBS 2 (374 kDa) y DEBS 3 (332 kDa).

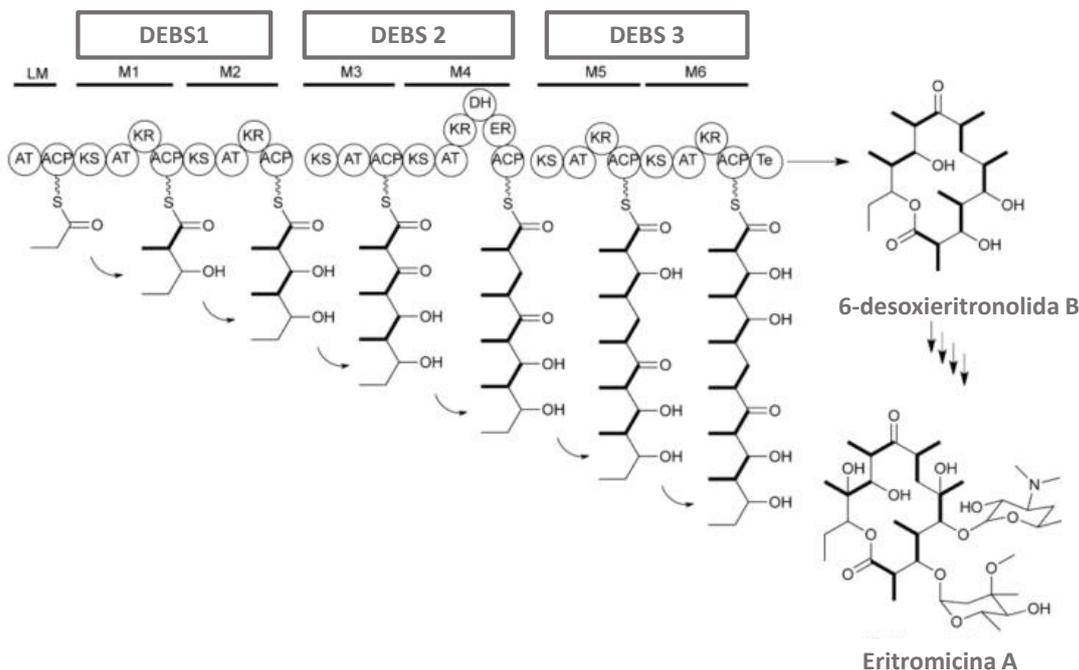


Figura 3.1: Organización de la PKS productora de eritromicina, DEBS. El complejo multienzimático consiste en seis módulos localizados en tres grandes proteínas homodiméricas (DEBS1, DEBS2 y DEBS3). AT, acyl transferasa, ACP, proteína transportadora de acilos, KS, queto sintasa, DH deshidratasa, ER enoil reductasa, KR, queto reductasa. TE tioesterasa.

Esta línea de ensamblaje enzimática incorpora unidades extensoras derivadas de metilmalonil-CoA (Figura 3.1). Cada módulo de DEBS está programado para establecer inequívocamente la funcionalidad y la estereoquímica en los átomos de α -y β -carbono de la cadena del poliquétido creciente antes de que sea translocada al siguiente módulo. Para ello, cada módulo de extensión de cadena incluye un dominio catalítico quetosintasa (KS), acil transferasa (AT), y una proteína portadora de acilo (ACP), además de actividades enzimáticas que modifican la cadena en crecimiento, tal como quetorreductasa (KR), deshidratasa (DH), y enoil reductasa (ER). La síntesis de poliquétidos comienza con un dominio de carga (LD), y el producto 6-desoxieritronolida B es liberado por un dominio tioesterasa (TE)^{120,121}.

Debido a la naturaleza modular de estas sintasas, se ha centrado mucha atención en la posibilidad de generar nuevos antibióticos través de la manipulación genética de los dominios que la constituyen^{122,123}. La diversidad de estas moléculas puede ser aún mayor mediante la alteración del proceso de iniciación de la cadena de manera que el sistema acepte sustratos alternativos. Sin embargo, hay muchos factores que en conjunto determinan la eficiencia con la que un análogo de sustrato puede ser utilizado por

poliquétido sintasas en microorganismos genéticamente modificados, incluyendo permeabilidad celular, toxicidad celular, susceptibilidad a la degradación y la necesidad de derivatizar el sustrato de modo de dirigirlo a una PKS¹¹⁹.

Por lo tanto, resulta de gran interés el uso de enzimas purificadas *in vitro* como alternativa para la síntesis de nuevos poliquétidos. Recientemente se ha reportado el acoplamiento *in vitro* de los tres módulos de DEBS en solución¹²⁴. El mismo se testeó a escala de laboratorio donde se llevó a cabo la síntesis de 6- Deoxieritronolida B. Además, el uso *in vitro* de módulos individuales de DEBS también ya ha sido previamente reportado. Se ha realizado el estudio de un derivado bimodular DEBS1-TE *in vitro* con una serie de análogos de sustrato lo que permitió estudiar la especificidad del sistema bimodular y la tolerancia a cambios estructurales en su sustrato¹¹⁹. Y por otro lado se estudió la optimización de la expresión heteróloga de DEBS3 mediante la co-expresión de chaperonas GroEL/GroES³⁶. Este hallazgo facilita ampliamente su uso *in vitro* para la síntesis de pequeños poliquétidos.

El estudio de estos complejos *in vitro* continua siendo un desafío debido a su baja estabilidad en solución¹¹⁸. Es por esto que la inmovilización de poliquétido sintasas para su aplicación *in vitro* podría ser ventajosa para la estabilidad de las PKSs.

En esta sección se llevaron a cabo estudios de inmovilización en nanopartículas de sílica biomimética del sistema mini PKS DEBS3. La aplicación *in vitro* de las preparaciones inmovilizadas obtenidas podría facilitar el estudio de los mecanismos enzimáticos involucrados, la evaluación de la especificidad de los sustratos y la producción de diversos poliquétidos evaluar la especificidad de sustrato , y producir diversos compuestos con posible actividad biológica a partir de poliquétidos.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Expresión y purificación de DEBS3

Se partieron de cepas liofilizadas de *E. coli* transformada con plásmido conteniendo la secuencia de DEBS3³⁶ obtenidas del grupo del Prof. Leadlay del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge (Cambridge- Inglaterra).

DEBS3 fue expresada de forma heteróloga en *E. coli* BL-21 (DE3) con una cola de His C-terminal (6x His-tag), fue purificada por cromatografía de afinidad con níquel y cromatografía de intercambio iónico. Se realizó el intercambio a un tampón de

actividad apropiado por gel filtración y se culminó con la concentración de la muestra a valores de 10 mg/mL.

Se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE de cada fracción (Figura 3.2) donde puede observarse una banda correspondiente a un PM de 300 KDa, el PM de la subunidades de DEBS3, denotando la presencia de dicha proteína en la fracción soluble de las proteínas de *E. coli*, esto implica que la inducción fue exitosa. A su vez, durante la purificación, parte de la fracción eluída de la cromatografía de intercambio iónico fue además concentrada con un concentrador con membrana de corte de 100KDa con el propósito de eliminar proteínas de menor peso molecular que co-purificaron. Sin embargo, como se observa en la figura 3.2 la fracción concentrada no aumentó la homogeneidad de la muestra sino que incluso podría haberse degradado la proteína de interés en el proceso. Por esto se decidió utilizar la fracción eluída previamente. La falta de homogeneidad de la fracción final puede ser mejorada mediante el uso de gradiente en la etapa de elución de los primeros dos pasos cromatográficos. Mediante el proceso llevado a cabo en este trabajo se obtuvieron por cada litro de cultivo bacteriano 3.3 mg de proteína en la fracción final.

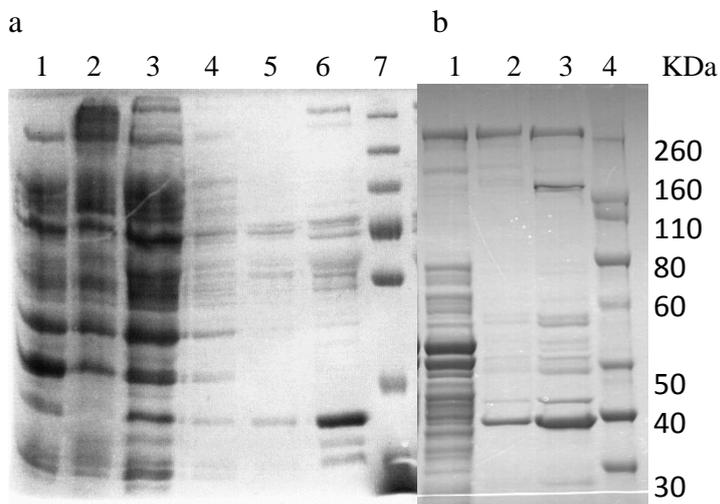


Figura 3.2: Análisis de expresión y purificación de DEBS3. SDS-PAGE 10% (a) Carril 1, Sin inducir, carril 2, fracción insoluble, carril 3, fracción soluble, carril 4 fracción no unida en IMAC, carril 5, lavado 60 mM de imidazol en IMAC, carril 6, eluído con 250 mM de imidazol en IMAC, carril 7 Marcador de peso molecular. (b) Carril 1, fracción no unida por adsorción iónica, carril 2, eluído con 300 mM de NaCl, carril 3, fracción gel filtrada y concentrada, carril 4 maracador de peso molecular.

3.2.2 Estudio de actividad quetoreductasa de DEBS3

Se llevó a cabo el estudio de actividad parcial de DEBS3 en solución, la enzima fue testeada en su actividad quetoreductasa (KR). La misma fue seleccionada ya que se

contaba con un ensayo espectrofotométrico el cual permitía estudiar rápidamente la actividad de al menos una de las entidades catalíticas presentes en el sistema. Los primeros ensayos realizados no dieron lugar a medidas de actividad satisfactorias. Se debieron optimizar los tiempos del proceso de purificación, ya que los mismos aparecieron como un factor clave para la recuperación de actividad enzimática. De este modo se logró obtener una preparación que constaba de 0.08 UI/mg para la actividad KR en la muestra, estas unidades no necesariamente se corresponden con las unidades de enzima del complejo en su totalidad. Se procedieron entonces con los ensayos de inmovilización.

3.2.3 Inmovilización de DEBS3

Como se mencionó previamente, la inestabilidad de las PKS limita su estudio *in vitro*. Actualmente no hay reportes de inmovilización de PKS de tipo I, sin embargo se encuentra reportada la inmovilización de PKS de tipo III para la síntesis enzimática de análogos poliketídicos donde se evaluaron varios métodos de inmovilización de enzimas. Los mismos incluían adsorción física sobre sílica, unión covalente a sílica funcionalizada con glutaraldehído y agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). En ninguno de los casos se lograron mejoras en la estabilidad de las preparaciones inmovilizadas lo cual generó la hipótesis que residuos aminoacídicos cercanos al sitio de unión del CoA interactuaban con el soporte bloqueando la unión al sustrato. Para evitar problemas de bloqueo de unión a sustrato las PKS fueron unidas a soporte por sus colas de histidina lo cual dio lugar a complejos que mantenían el 80% de la actividad inicial y que presentaban un 50% de actividad luego de 2 horas de reacción.

Como estrategia de inmovilización para DEBS3 se propuso el atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética (Figura 3.3). Esta estrategia fue elegida principalmente debido a que DEBS3 al estar conformada por una serie de sitios catalíticos contiguos, la inmovilización unipuntual o multipuntual podrían bloquear dichos sitios, como se reportó en el caso de las PKS de tipo III. Esto podría traer como consecuencia la inactivación de dichos sitios y/o podría dificultar la transferencia de la cadena en crecimiento. Se pretende mediante la inmovilización por atrapamiento lograr la estabilización del catalizador sin bloquear sus sitios de unión a sustrato o impedir la transferencia del mismo. Se genera a la vez la posibilidad de su reuso para la síntesis de tricetolactona.

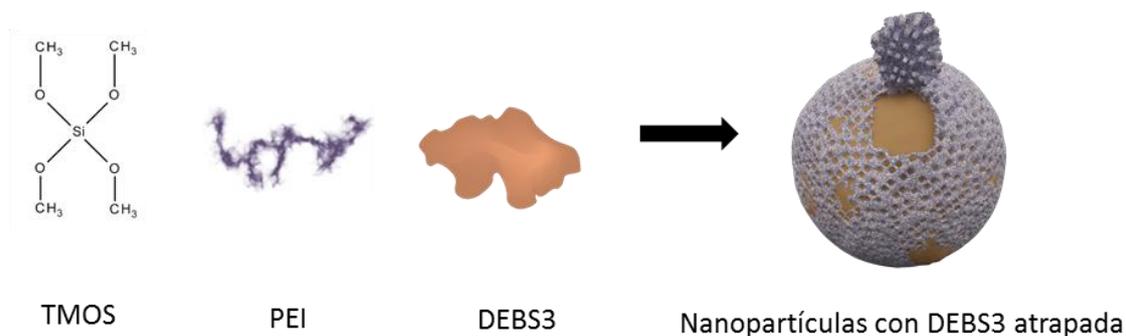


Figura 3.3: Inmovilización para DEBS3 por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética. TMOS, tetrametil ortosilicato, PEI, polietilenimina.

El porcentaje de inmovilización obtenido por cuantificación de proteínas fue de $77\% \pm 4.5$ mientras que por medida de la actividad quetoreductasa se obtuvo $56.8\% \pm 1.1$. Esta diferencia en los porcentajes de inmovilización podrían deberse a que la muestra no se encuentra pura. Se debe mejorar la estrategia de purificación para obtener muestras de mayor pureza de manera de obtener preparaciones enzimáticas más cargadas de la enzima deseada. En estos ensayos se obtuvo un $37.1\% \pm 3.2$ de rendimiento, el bajo rendimiento podría deberse a una serie de factores, se podría estar frente a una modificación estructural que afecte la actividad KR del sistema, podría haber impedimento estérico dentro de la nanopartícula que dificulte la unión del sustrato o podrían haberse bloqueado algunos sitios con actividad KR.

De cara a un uso continuo o reuso de las preparaciones inmovilizadas, se deben mejorar las condiciones de inmovilización para obtener mejores rendimientos.

Los ensayos presentados ensayos representan el primer reporte de esta clase de complejos enzimáticos inmovilizados por lo que se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de los mismos de modo de conocer si es ésta efectivamente una estrategia estabilizante.

El estudio preliminar de la estabilidad térmica de las preparaciones inmovilizadas puede observarse en la figura 3.4 donde se observa que a 30°C la enzima inmovilizada es más estable que la enzima en solución. Este ensayo demuestra que el atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética podría ser una estrategia estabilizante.

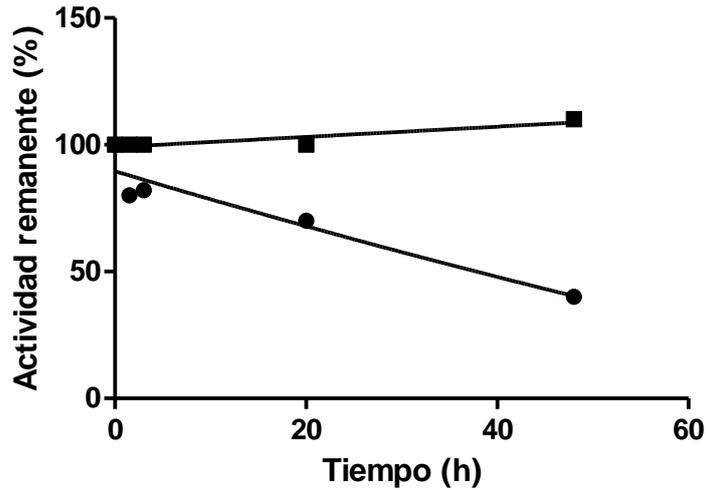


Figura 3.4: Estabilidad térmica de DEBS3 soluble (●) e inmovilizada (■) a 30°C.

El uso *in vitro* de este inmovilizado requiere una caracterización más profunda del efecto de la inmovilización en sus sitios catalíticos parciales. En el contexto de este trabajo aún no se ha alcanzado un análisis del preparado inmovilizado satisfactorio previo a la síntesis del producto de las actividades concertadas. Sin embargo se considera que se ha podido proponer una estrategia de insolubilización para un sistema enzimático extremadamente complejo. Esto ha abierto la posibilidad de numerosos estudios adicionales que en este momento se encuentran en proceso. Así por ejemplo, debe evaluar metodologías para el estudio de las demás actividades parciales del sistema a modo de tener información más globalizadora del efecto de la inmovilización en la proteína en su totalidad.

Conclusiones

Se logró inmovilizar y estabilizar las 5 enzimas necesarias para la síntesis de alfa hidroxiácidos. Esto se alcanzó utilizando la estrategia de unión covalente multipuntual sobre glioxil-agarosa para las 5 enzimas, lo que facilita el proceso de inmovilización y aplicación biocatalítica de los derivados por unificación de la estrategia de unión y uso de un solo tipo de soporte en el proceso.

En el caso particular de la LDH, se abordó su insolubilización mediante un enfoque de ingeniería de inmovilización, en el que debieron variarse condiciones tales como tiempo, temperatura, aditivos, concentración de reactivos etc, para lograr preparados inmovilizados activos.

El preparado inmovilizado óptimo de LDH fue caracterizado en profundidad, lográndose una estabilización sin precedentes para LDH de 1600 veces con respecto a la enzima soluble.

Se logró acoplar las enzimas de la vía de síntesis de ácido L-láctico propuesta tanto en solución como inmovilizadas probando su utilidad en esta conversión. El acoplamiento multienzimático permitió obtener un 33% de conversión de una mezcla 10 mM D/L alanina al producto estereoespecífico en las primeras 2 horas de reacción.

Con respecto al sistema enzimático para la síntesis de la butirosina B, se logró expresar de manera recombinante y purificar parcialmente todas las enzimas de la vía.

Se propuso una estrategia de inmovilización en nanopartículas de sílica para esta vía. Para ello se debió optimizar la síntesis del soporte. Se logró caracterizar físicamente el soporte. Además, se encontraron condiciones que mejoraron la homogeneidad de las nanopartículas y redujeron su tamaño aumentando así el área superficial disponible para la inmovilización de las enzimas en superficie.

El acoplamiento in vitro de las 8 enzimas implicadas en la vía de la butirosina B no fue exitoso por lo que se seleccionó una estrategia alternativa quimio enzimática. En esta se utilizó un sustrato sintético para desafiar a BtrH y lograr la síntesis de butirosina B mediante acoplamiento con BtrG.

BtrH resultó activa frente al sustrato sintético. Sin embargo, no se logró síntesis de butirosina cuando se acopló a BtrG en solución, coincidiendo con lo reportado en bibliografía.

Se abordó la inmovilización de BtrG y BtrH utilizando diferentes estrategias de asociación a las nanopartículas de sílica: unión covalente en superficie y atrapamiento físico. Con ambas estrategias se lograron inmovilizados y co-inmovilizados con buenos rendimientos de inmovilización.

La inmovilización permitió el acoplamiento de BtrH y BtrG *in vitro* para la síntesis de butirosina B. Bajo las mismas condiciones de reacción en las que las enzimas solubles no lograron conversión a butirosina B, la síntesis utilizando co-inmovilizados ya sea atrapados o unidos en superficie mostró la presencia del producto deseado.

Acerca de los resultados obtenidos para DEBS3 se puede concluir que se ha logrado reproducir la expresión y purificación una de los sistemas enzimáticos más complejos de la naturaleza.

El seguimiento de la actividad parcial cetoreductasa permitió obtener por primera vez preparados inmovilizados de este complejo con buenos rendimientos.

La estabilidad de la KR inmovilizada dentro del complejo fue mejorada con respecto a la que se encontraba en solución. Esto podría indicar una mayor estabilización del complejo en su conjunto, sin embargo no es posible arribar a tal conclusión sin realizar experimentos adicionales de la actividad global de DEBS3.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la base de futuros estudios que optimicen la inmovilización del complejo facilitando la síntesis de triketolactonas con DEBS3 inmovilizada.

Como conclusión globalizadora de este trabajo de Maestría se puede indicar que varios de los resultados aquí presentados se cree que constituyen un aporte importante en áreas tales como biocatálisis, enzimología y tecnología enzimática. Para lograrlo se ha abordado la expresión y purificación de enzimas, la síntesis química y el diseño de reacciones biosintéticas *in vitro* que se considera de complejidad por involucrar varios catalizadores en simultáneo. Este trabajo además ha sentado las bases para el desarrollo de nuevas líneas de investigación en el laboratorio donde se ha desarrollado

Bibliografía

1. Carrera, J. E. & Clave, P. Production and Application of Industrial Enzymes. *Rev. Fac. Ciencias Agropecu.***1**, 7 (2003).
2. Aldridge, S. Industry backs biocatalysis for greener manufacturing. *Nat. Biotechnol.***31**, 95–6 (2013).
3. Bruggink, A., Schoevaart, R. & Kieboom, T. Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert. *Org. Process Res. Dev.***7**, 622–640 (2003).
4. Xue, R. & Woodley, J. M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. *Bioresour. Technol.***115**, 183–195 (2012).
5. Doig, S. D., Simpson, H., Alphand, V., Furstoss, R. & Woodley, J. M. Characterization of a recombinant Escherichia coli TOP10 [pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer–Villiger oxidations. *Enzyme Microb. Technol.***32**, 347–355 (2003).
6. Santacoloma, P. A., Sin, G., Gernaey, K. V. & Woodley, J. M. Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis. *Org. Process Res. Dev.***15**, 203–212 (2011).
7. Baldwin, C. V. F. & Woodley, J. M. On oxygen limitation in a whole cell biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation process. *Biotechnol. Bioeng.***95**, 362–9 (2006).
8. Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S. & Liese, A. Biocatalytic ketone reduction--a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***76**, 249–55 (2007).
9. Schoffelen, S. & van Hest, J. C. M. Multi-enzyme systems: bringing enzymes together in vitro. *Soft Matter***8**, 1736–1746 (2012).
10. Busto, E., Richter, N., Grischek, B. & Kroutil, W. Biocontrolled Formal Inversion or Retention of L- α -Amino Acids to Enantiopure (R)- or (S)-Hydroxyacids. *Chem. - A Eur. J.***20**, 11225–11228 (2014).
11. Betancor, L., Berne, C., Luckarift, H. R. & Spain, J. C. Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system. *Chem. Commun. (Camb)*. 3640–3642 (2006). doi:10.1039/b604689d
12. Cao, L., Langen, L. van & Sheldon, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.***14**, 387–94 (2003).
13. Mateo, Cesar, Palomo, Jose M., Fernandez-Lorente, Gloria, Guisan, Jose M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.***40**, 1451–1463 (2007).
14. Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.***349**, 1289–1307 (2007).

15. Tischer, W. & Kasche, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.***17**, 326–35 (1999).
16. Betancor, L. *et al.* Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: Stabilization of D-amino acid oxidase. *Biotechnol. Prog.***19**, 784–788 (2003).
17. Fernández-Lafuente, Roberto, Verónica Rodríguez and Guisán, J. M. The coimmobilization of D -amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D -amino acids (D -phenylalanine) into α -cetoacids (phenylpyruvic acid). *Enzym. Microb. Technol.***23**, 28–33 (1998).
18. Mateo, C. *et al.* Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase–nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron: Asymmetry***17**, 320–323 (2006).
19. Betancor, L., Johnson, G. R. & Luckarift, H. R. Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts. *ChemCatChem***5**, 46–60 (2013).
20. Blanco, R. M., Calvete, J. J. & Guisán, J. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme Microb. Technol.***11**, 353–359 (1989).
21. Marques, D. *et al.* Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin. *Biotechnol. Prog.***27**, 677–83
22. Guisán, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.***10**, 375–382 (1988).
23. Mateo, C. *et al.* Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb. Technol.***39**, 274–280 (2006).
24. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.***40**, 1451–1463 (2007).
25. Tavano, O. L., Fernandez-Lafuente, R., Goulart, A. J. & Monti, R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. *Process Biochem.***48**, 1054–1058 (2013).
26. Betancor, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.***39**, 877–882 (2006).
27. Berne, C., Betancor, L., Luckarift, H. R. & Spain, J. C. Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase. *Biomacromolecules***7**, 2631–6 (2006).
28. Betancor, L. & Luckarift, H. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.***27**, 95–114 (2010).
29. Betancor, L. & Luckarift, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends Biotechnol.***26**, 566–572 (2008).

30. Hashimoto, Y., Kobayashi, E., Endo, T., Nishiyama, M. & Horinouchi, S. Conversion of a cyanhydrin compound into S-(-)-3-phenyllactic acid by enantioselective hydrolytic activity of *Pseudomonas* sp. BC-18. *Biosci. Biotechnol. Biochem.***60**, 1279–83 (1996).
31. Xue, Y.-P., Xu, S.-Z., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G. & Shen, Y.-C. Enantioselective biocatalytic hydrolysis of (R,S)-mandelonitrile for production of (R)-(-)-mandelic acid by a newly isolated mutant strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.***38**, 337–45 (2011).
32. Llewellyn, N. M., Li, Y. & Spencer, J. B. Biosynthesis of Butirosin: Transfer and Deprotection of the Unique Amino Acid Side Chain. *Chem. Biol.***14**, 379–386 (2007).
33. Llewellyn, N. M. Biosynthesis of Butirosin : Incorporation of the Unique (S) -4- Amino-2- hydroxybutyryl Amino Acid Side Chain This dissertation is submitted for the degree of Doctor of Philosophy. (2008).
34. Staunton, J. & Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.***18**, 380–416 (2001).
35. Kuan, I. C., Chuang, C. A., Lee, S. L. & Yu, C. Y. Alkyl-substituted methoxysilanes enhance the activity and stability of d-amino acid oxidase encapsulated in biomimetic silica. *Biotechnol. Lett.***34**, 1493–1498 (2012).
36. Betancor, L., Fernández, M.-J., Weissman, K. J. & Leadlay, P. F. Improved catalytic activity of a purified multienzyme from a modular polyketide synthase after coexpression with *Streptomyces* chaperonins in *Escherichia coli*. *Chembiochem***9**, 2962–2966 (2008).
37. Brown, R. E., Jarvis, K. L. & Hyland, K. J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.***180**, 136–139 (1989).
38. Jackson, E. *et al.* Protein-Templated Biomimetic Silica Nanoparticles. *Langmuir***31**, 3687–95 (2015).
39. Mateo, C. *et al.* Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.***37**, 456–462 (2005).
40. Klopries, S., Sundermann, U. & Schulz, F. Quantification of N-acetylcysteamine activated methylmalonate incorporation into polyketide biosynthesis. *Beilstein J. Org. Chem.***9**, 664–74 (2013).
41. Cui, H.-K. *et al.* Diaminodiacid-Based Solid-Phase Synthesis of Peptide Disulfide Bond Mimics. *Angew. Chemie***125**, 9737–9741 (2013).
42. Taylor, H. D. & Schmitz, H. Antibiotics derived from a mutant of *Bacillus circulans*. *J. Antibiot. (Tokyo)***29**, 532–5 (1976).
43. Ota, Y. *et al.* Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*. *J. Antibiot. (Tokyo)***53**, 1158–67 (2000).
44. Langslet, J. & Habel, M. L. The aminoglycoside antibiotics. *Am. J. Nurs.***81**, 1144–1146 (1981).

45. Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.***43**, 727–737 (1999).
46. Kahlmeter, G. & Dahlager, J. I. Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *J. Antimicrob. Chemother.***13 Suppl A**, 9–22 (1984).
47. Moazed, D. & Noller, H. F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**, 389–94 (1987)
48. Karimi, R. & Ehrenberg, M. Dissociation rate of cognate peptidyl-tRNA from the A-site of hyper-accurate and error-prone ribosomes. *Eur. J. Biochem.***226**, 355–360 (1994).
49. Benveniste, R. & Davies, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.***42**, 471–506 (1973).
50. Li, Y., Llewellyn, N. M., Giri, R., Huang, F. & Spencer, J. B. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: Possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. *Chem. Biol.***12**, 665–675 (2005).
51. Llewellyn, N. M. & Spencer, J. B. Chemoenzymatic acylation of aminoglycoside antibiotics. *Chem. Commun. (Camb)*. 3786–3788 (2008).
52. Patwardhan, S. V. Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications. *Chem. Commun. (Camb)***47**, 7567–7582 (2011).
53. Tong, Z., Yang, D., Xiao, T., Tian, Y. & Jiang, Z. Biomimetic fabrication of g-C₃N₄/TiO₂ nanosheets with enhanced photocatalytic activity toward organic pollutant degradation. *Chem. Eng. J.***260**, 117–125 (2015).
54. Briggs, B. D., Pekarek, R. T. & Knecht, M. R. Examination of Transmetalation Pathways and Effects in Aqueous Suzuki Coupling Using Biomimetic Pd Nanocatalysts. *J. Phys. Chem. C***118**, 18543–18553 (2014).
55. Jin, R.-H., Yao, D.-D. & Levi, R. T. Biomimetic synthesis of shaped and chiral silica entities templated by organic objective materials. *Chemistry* **20**, 7196–214 (2014).
56. Kröger, N. & Poulsen, N. Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu. Rev. Genet.***42**, 83–107 (2008).
57. Zane, A. C., Michelet, C., Roehrich, A., Emani, P. S. & Drobny, G. P. Silica morphogenesis by lysine-leucine peptides with hydrophobic periodicity. *Langmuir***30**, 7152–61 (2014).
58. Belton, D. J., Patwardhan, S. V, Annenkov, V. V, Danilovtseva, E. N. & Perry, C. C. From biosilicification to tailored materials: optimizing hydrophobic domains and resistance to protonation of polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***105**, 5963–8 (2008).
59. Li, D., Qu, X., Newton, S. M. C., Klebba, P. E. & Mao, C. Morphology-controlled synthesis of silica nanotubes through pH- and sequence-responsive morphological change of bacterial flagellar biotemplates. *J. Mater. Chem.***22**, 15702–15709 (2012).

60. Song, X., Jiang, Z., Li, L. & Wu, H. Immobilization of β -glucuronidase in lysozyme-induced biosilica particles to improve its stability. *Front. Chem. Sci. Eng.***8**, 353–361 (2014).
61. Sheppard, V. C., Scheffel, a., Poulsen, N. & Kröger, N. Live diatom silica immobilization of multimeric and redox-active enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.***78**, 211–218 (2012).
62. Berne, C., Betancor, L., Luckarift, H. R. & Spain, J. C. Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase. *Biomacromolecules***7**, 2631–2636 (2006).
63. Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.***7**, 779–86 (2012).
64. Majouga, A. *et al.* New separation materials based on gold nanoparticles. *J. Manuf. Technol. Manag.***21**, 950–955 (2010).
65. Abian, O. *et al.* Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules. *J. Mol. Catal. B Enzym.***19-20**, 295–303 (2002).
66. Tang, G. & Cheng, C.-H. Synthesis of α -Hydroxy Carboxylic Acids via a Nickel(II)-Catalyzed Hydrogen Transfer Process. *Adv. Synth. Catal.***353**, 1918–1922 (2011).
67. Wang, Y.-F. *et al.* Nickel (II)-induced cytotoxicity and apoptosis in human proximal tubule cells through a ROS- and mitochondria-mediated pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***259**, 177–86 (2012).
68. Wohlgemuth, R. Biocatalysis--key to sustainable industrial chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.***21**, 713–24 (2010).
69. Matsuoka, Y., Kanda, N., Lee, Y. M. & Higuchi, A. Chiral separation of phenylalanine in ultrafiltration through DNA-immobilized chitosan membranes. *J. Memb. Sci.***280**, 116–123 (2006).
70. Hofstetter, O., Hertweck, J. K. & Hofstetter, H. Detection of enantiomeric impurities in a simple membrane-based optical immunosensor. *J. Biochem. Biophys. Methods***63**, 91–99 (2005).
71. Millot, M. C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.***797**, 131–159 (2003).
72. DeSantis, G. *et al.* An enzyme library approach to biocatalysis: Development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.***124**, 9024–9025 (2002).
73. Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I. & Komatsu, K. I. Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.***57**, 3028–3032 (1991).

74. Hua, Q., Dabin, L. & Chunxu, L. Ultrasonically-promoted synthesis of mandelic acid by phase transfer catalysis in an ionic liquid. *Ultrason. Sonochem.***18**, 1035–7 (2011).
75. Choi, W. J., Lee, K. Y., Kang, S. H. & Lee, S. B. Biocatalytic enantioconvergent separation of racemic mandelic acid. *Sep. Purif. Technol.***53**, 178–182 (2007).
76. Kim, B.-Y., Hwang, K.-C., Song, H.-S., Chung, N. & Bang, W.-G. Optical resolution of RS-(±)-mandelic acid by *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.***22**, 1871–1875 (2000).
77. Tsuchiya, S., Miyamoto, K. & Ohta, H. Highly efficient conversion of (*L*)-mandelic acid to its (*R*)-enantiomer by combination of enzyme-mediated oxidation and reduction. *Biotechnol. Lett.***14**, 1137–1142 (1992).
78. Castillo Martinez, F. A. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.***30**, 70–83 (2013).
79. Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. & Kondo, A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***85**, 413–423 (2010).
80. Wang, Y., Tashiro, Y. & Sonomoto, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J. Biosci. Bioeng.***119**, 10–18 (2015).
81. Marques, F. L. *et al.* Synthesis of lactic acid from glycerol using a Pd/C catalyst. *Fuel Process. Technol.***138**, 228–235 (2015).
82. Gourinchas, G. *et al.* A synthetic biology approach for the transformation of α -amino acids to the corresponding enantiopure (*R*)- or (*S*)- α -hydroxy acids. *Chem. Commun.***51**, 2828–2831 (2015).
83. Espaillat, A. *et al.* Structural basis for the broad specificity of a new family of amino-acid racemases. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.***70**, 79–90 (2014).
84. Pollegioni, L., Butò, S., Tischer, W., Ghisla, S. & Pilone, M. S. Characterization of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.***31**, 709–17 (1993).
85. Pilone, M. S. & Pollegioni, L. D-amino Acid Oxidase as an Industrial Biocatalyst. *Biocatal. Biotransformation***20**, 145–159 (2002).
86. Butò, S., Pollegioni, L., D'Angiuro, L. & Pilone, M. S. Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of alpha-cetoacids: a reactor system. *Biotechnol. Bioeng.***44**, 1288–94 (1994).
87. De Wildeman, S. M. A., Sonke, T., Schoemaker, H. E. & May, O. Biocatalytic reductions: from lab curiosity to 'first choice'. *Acc. Chem. Res.***40**, 1260–6 (2007).
88. Chenault, H. K. & Whitesides, G. M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.***14**, 147–97 (1987).

89. Gutheil, W. G., Stefanova, M. E. & Nicholas, R. a. Fluorescent coupled enzyme assays for D-alanine: application to penicillin-binding protein and vancomycin activity assays. *Anal. Biochem.***287**, 196–202 (2000).
90. Hashimoto, A. *et al.* Free d-serine, d-aspartate and d-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking d-amino acid oxidase. *Neurosci. Lett.***152**, 33–36 (1993).
91. Bes, M. T., Gomez-Moreno, C., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Selective oxidation: stabilisation by multipoint attachment of ferredoxin NADP⁺ reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *J. Mol. Catal. A Chem.***98**, 161–169 (1995).
92. Kolappan, S. *et al.* Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.***71**, 185–195 (2015).
93. Wichmann, R. & Vasic-Racki, D. Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.***92**, 225–60 (2005).
94. Hollmann, F., Hofstetter, K. & Schmid, A. Non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin cofactors for monooxygenase catalysis. *Trends Biotechnol.***24**, 163–71 (2006).
95. Patel, R. N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomol. Eng.***17**, 167–82 (2001).
96. Bommarius, A. S., Schwarm, M. & Drauz, K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals—examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B Enzym.***5**, 1–11 (1998).
97. Seisser, B., Lavandera, I., Faber, K., Spelberg, J. H. L. & Kroutil, W. Stereo-Complementary Two-Step Cascades Using a Two-Enzyme System Leading to Enantiopure Epoxides. *Adv. Synth. Catal.***349**, 1399–1404 (2007).
98. Rocha-Martín, J., Rivas, B. D. Las, Muñoz, R., Guisán, J. M. & López-Gallego, F. Rational co-immobilization of bi-enzyme cascades on porous supports and their applications in bio-redox reactions with insitu recycling of soluble cofactors. *ChemCatChem***4**, 1279–1288 (2012).
99. Betancor, L. *et al.* Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnol. Prog.***19**, 763–767 (2003).
100. Bolivar, J. M. *et al.* Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Biomacromolecules***7**, 669–673 (2006).
101. López, C., Ríos, S. D., López-Santín, J., Caminal, G. & Álvaro, G. Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. *Biochem. Eng. J.***49**, 414–421 (2010).
102. Nesakumar, N., Thandavan, K., Sethuraman, S., Krishnan, U. M. & Rayappan, J. B. B. An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods. *J. Colloid Interface Sci.***414**, 90–96 (2014).

103. Yusdy, Patel, S. R., Yap, M. G. S. & Wang, D. I. C. Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem. Eng. J.***48**, 13–21 (2009).
104. Colbert, J. D., Farfán-Arribas, D. J. & Rock, K. L. Substrate-induced protein stabilization reveals a predominant contribution from mature proteins to peptides presented on MHC class I. *J. Immunol.***191**, 5410–9 (2013).
105. Campos, L. A. & Sancho, J. Native-specific stabilization of flavodoxin by the FMN cofactor: structural and thermodynamical explanation. *Proteins***63**, 581–94 (2006).
106. Kaushik, J. K. & Bhat, R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J. Biol. Chem.***278**, 26458–26465 (2003).
107. Jain, N. K. & Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.***18**, 24–36 (2009).
108. Light, a. & Sinha, N. K. Difference in the chemical reactivity of the disulfide bonds of trypsin and chymotrypsin. *J. Biol. Chem.***242**, 1358–1359 (1967).
109. Henley, J. P. & Sadana, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme Microb. Technol.***7**, 50–60 (1985).
110. Nesakumar, N., Sethuraman, S., Krishnan, U. M. & Rayappan, J. B. B. Fabrication of lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized on cerium oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.***410**, 158–164 (2013).
111. Reed, M. C., Lieb, A. & Nijhout, H. F. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *BioEssays***32**, 422–429 (2010).
112. Poso, D., Clarke, A. R. & Burston, S. G. A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions in a single-ring mutant of GroEL. *J. Mol. Biol.***338**, 969–977 (2004).
113. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.***7**, 285–95 (2003).
114. Wilkinson, B. & Micklefield, J. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nat. Chem. Biol.***3**, 379–86 (2007).
115. Tatsuta, K. & Hosokawa, S. Total syntheses of polyketide-derived bioactive natural products. *Chem. Rec.***6**, 217–33 (2006).
116. Van Lanen, S. G. & Shen, B. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr. Opin. Microbiol.***9**, 252–60 (2006).
117. Zhou, H., Zhan, J., Watanabe, K., Xie, X. & Tang, Y. A polyketide macrolactone synthase from the filamentous fungus *Gibberella zeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***105**, 6249–54 (2008).
118. Fecik, R. A. Natural product biosynthesis moves *in vitro*. *Nat. Chem. Biol.***3**, 531–2 (2007).

119. Weissman, K. J. *et al.* Evaluating precursor-directed biosynthesis towards novel erythromycins through in vitro studies on a bimodular polyketide synthase. *Chem. Biol.***5**, 743–54 (1998).
120. Cane, D. E. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.***285**, 27517–27523 (2010).
121. Edwards, A. L., Matsui, T., Weiss, T. M. & Khosla, C. Architectures of Whole-Module and Bimodular Proteins from the 6-Deoxyerythronolide B Synthase. *J. Mol. Biol.***426**, 2229–2245 (2014).
122. Leadlay, P. F. Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.***1**, 162–8 (1997).
123. Khosla, C. & Zawada, R. J. Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. *Trends Biotechnol.***14**, 335–41 (1996).
124. Lowry, B. *et al.* In vitro reconstitution and analysis of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *J. Am. Chem. Soc.***135**, 16809–16812 (2013).

Anexo

6.1 Análisis por NMR de las etapas de síntesis de γ -Glu-AHBA-SNAC

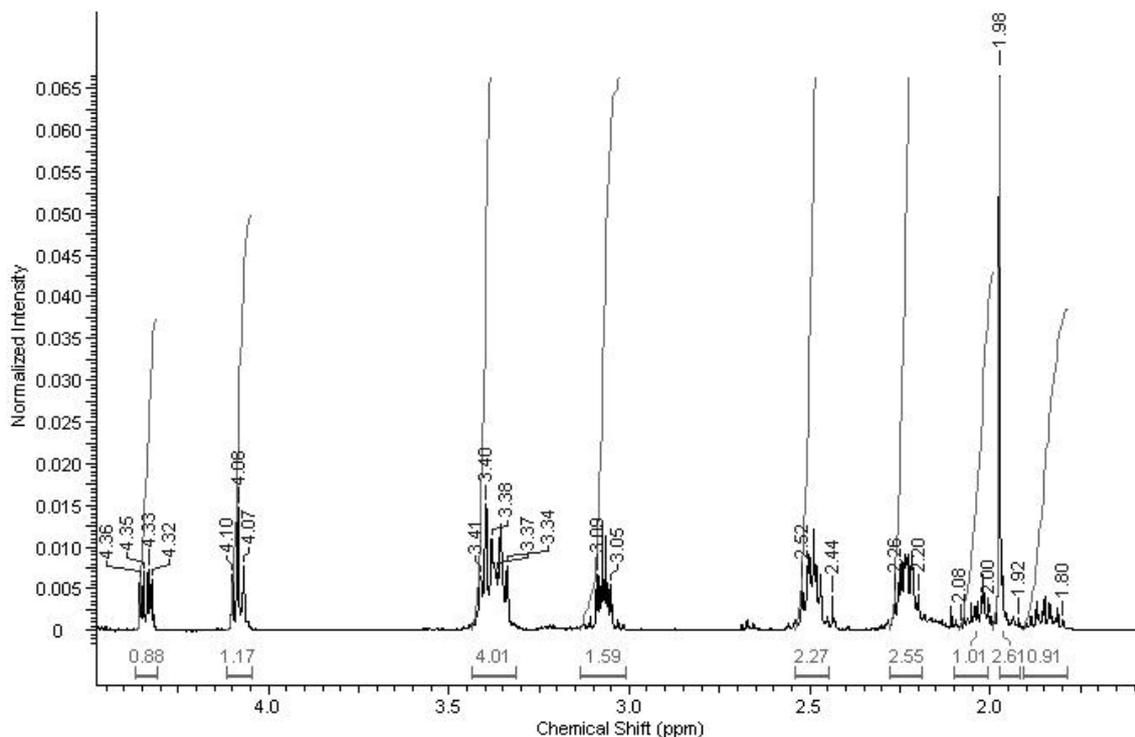


Figura 6.1: NMR de compuesto F. ^1H NMR esperado según lo previamente descrito: (250MHz, D_2O) δ : 1.72 (1H, m), 1.86 (3H, s), 1.92 (1H, m), 2.09 (2H, m), 3.24 (2H, m), 3.29 (2H, m), 3.88 (1H, t, $J=6.3$ Hz), 4.22 (dd, $J_1=3.9$ Hz, $J_2=9$ Hz).

6.2 Estudio por LC-MS de síntesis de butirosina B con BtrH y BtrG inmovilizadas

Las muestras fueron numeradas de la siguiente manera:

Muestra 1 Control de ribostamicina incubada con nanopartículas de sílica

Muestra 2 Reacción con enzimas en solución

Muestra 3 Reacción con enzimas co-atrapadas

Muestra 4 Reacción con enzimas atrapadas

Muestra 5 Reacción con enzimas co-inmovilizadas en superficie

Muestra 6 Reacción con enzimas inmovilizadas en superficie

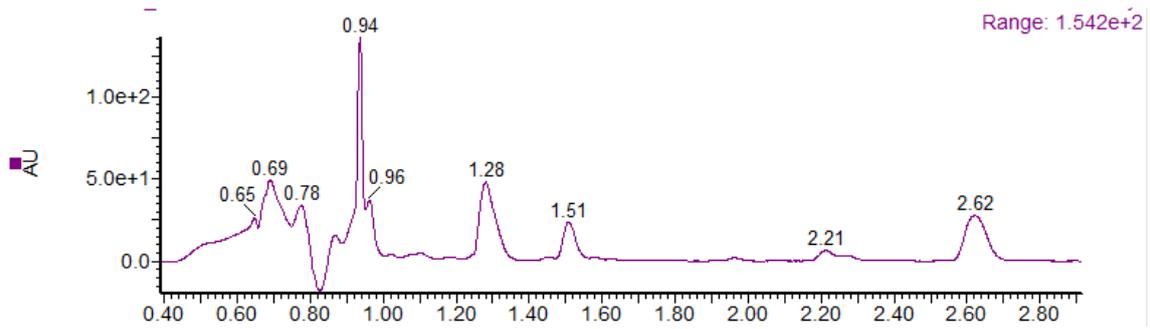


Figura 6.1: Cromatograma de la muestra 1.

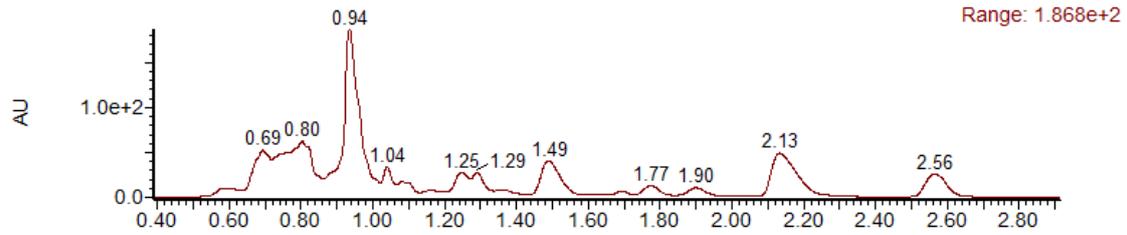


Figura 6.2: Cromatograma de la muestra 2

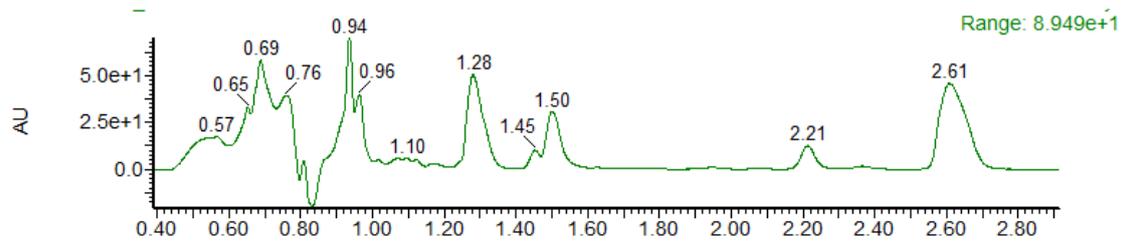


Figura 6.3: Cromatograma de la muestra 3

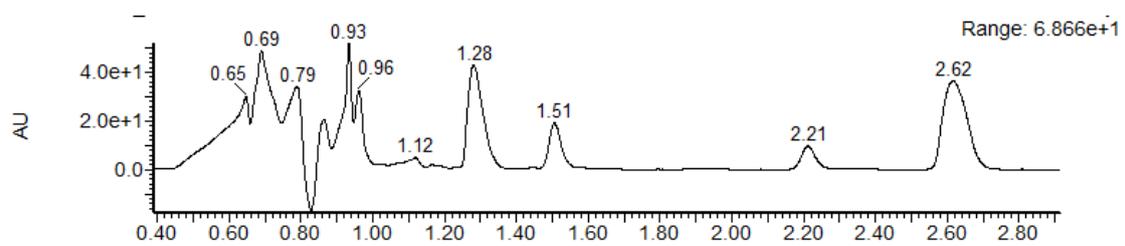


Figura 6.4: Cromatograma de la muestra 4

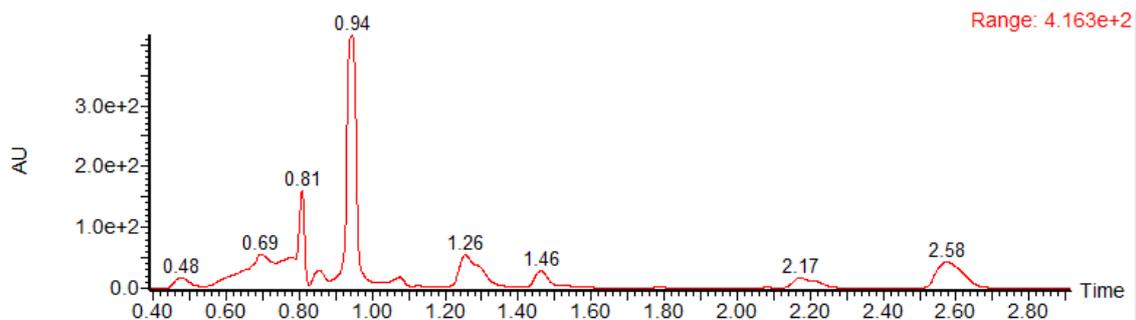


Figura 6.5: Cromatograma de la muestra 5

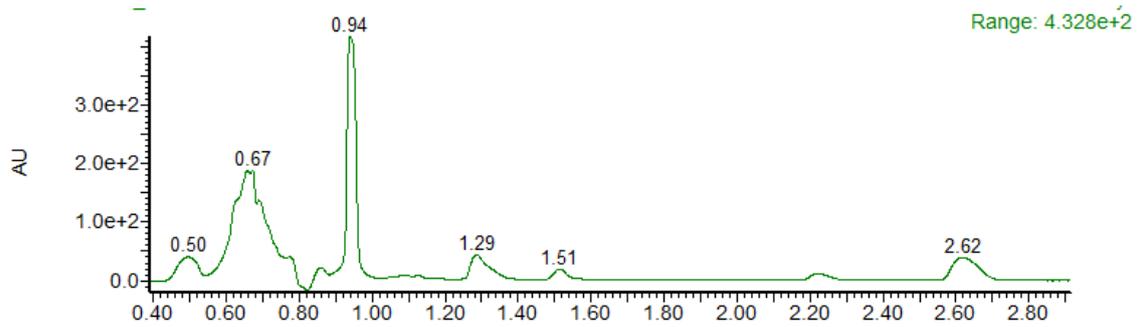


Figura 6.6: Cromatograma de las muestra 6

Se muestran a continuación las masas correspondientes a los picos a 0.93, 2,64 y 1,28 min donde esperamos encontrar ribostamicina (masa esperada 455), Glu-butirosina B (masa esperada 685) y butirosina B (masa esperada 556) respectivamente.

6.2.1 Análisis de las masas encontradas a 0.93 min

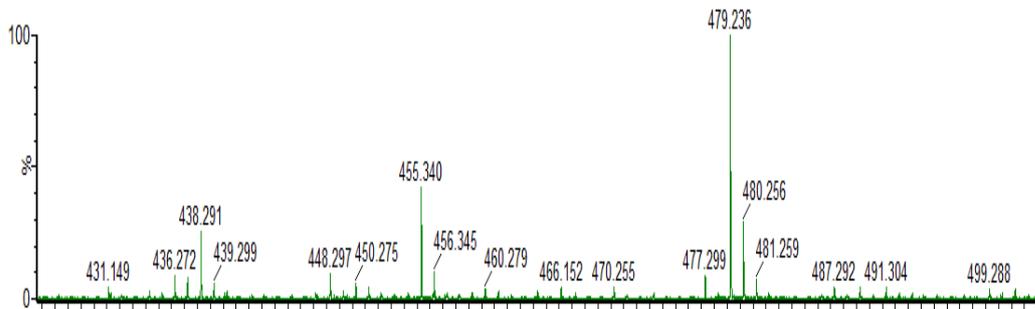


Figura 6.7: Muestra 1

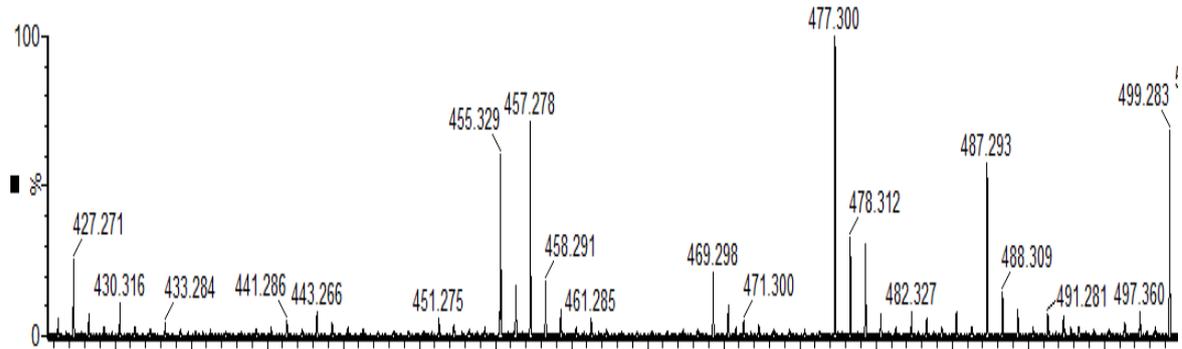


Figura 6.8: Muestra 2

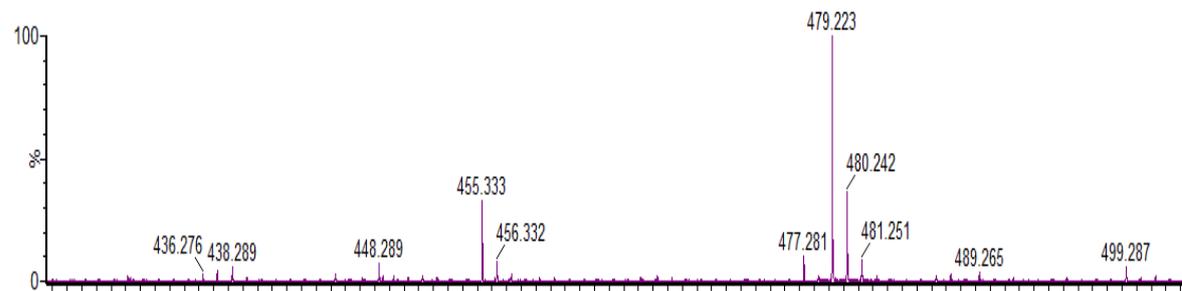


Figura 6.9: Muestra 3.

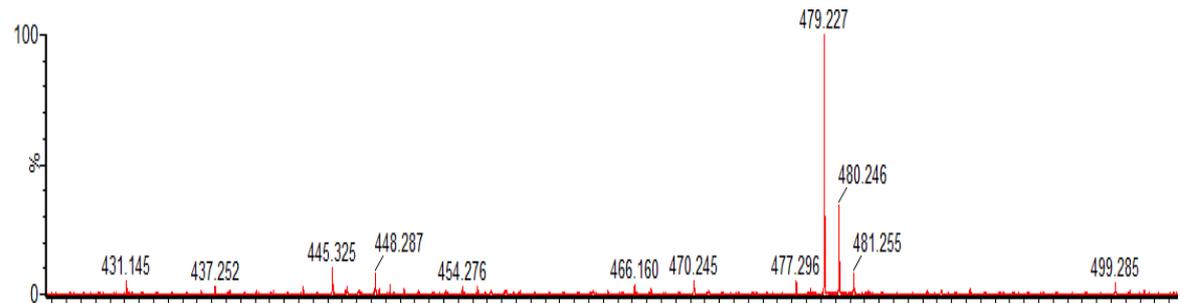


Figura 6.10: Muestra 4

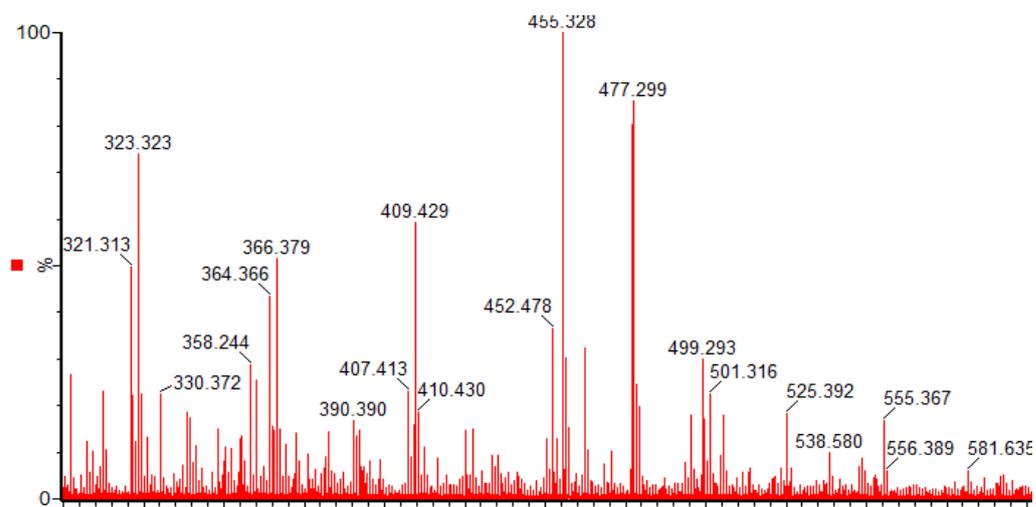


Figura 6.11: Muestra 5

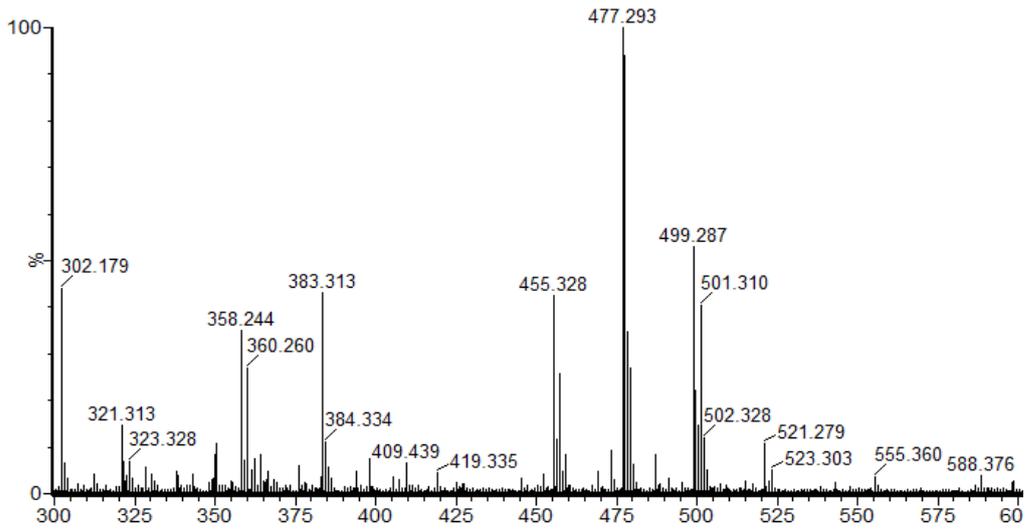


Figura 6.12: Muestra 6

6.2.2 Análisis de las masas encontradas a 2.64 min

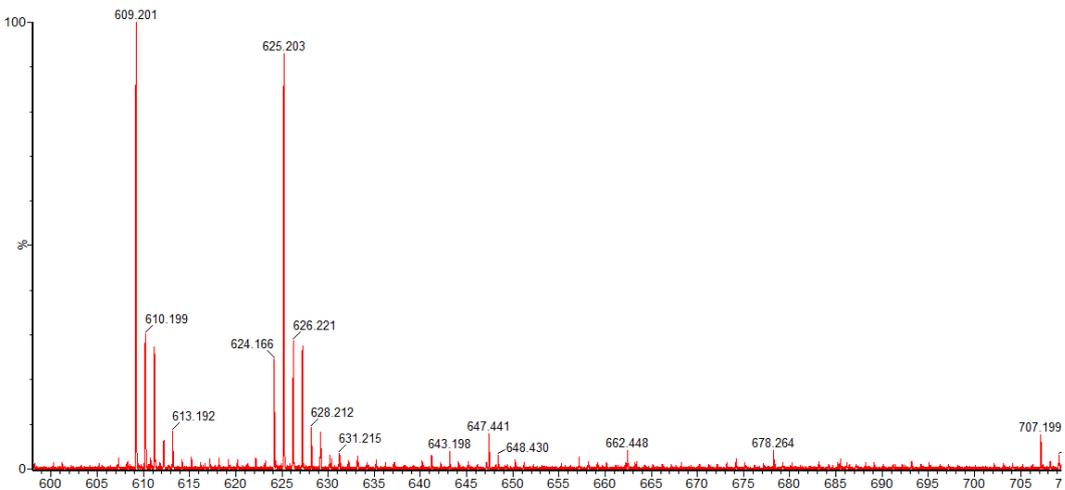


Figura 6.13: Muestra 1

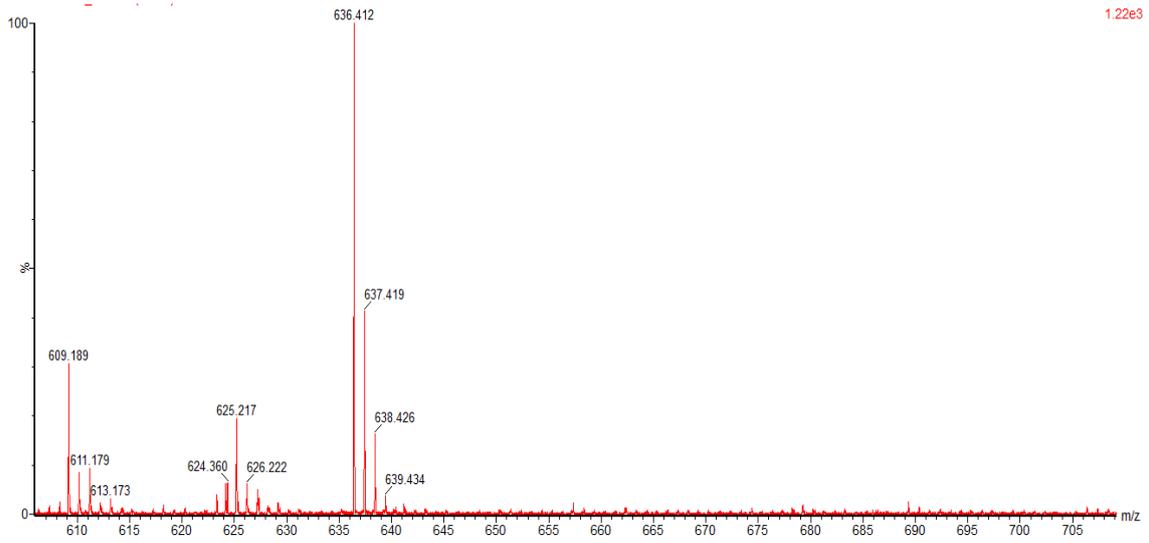


Figura 6.14: Muestra 2

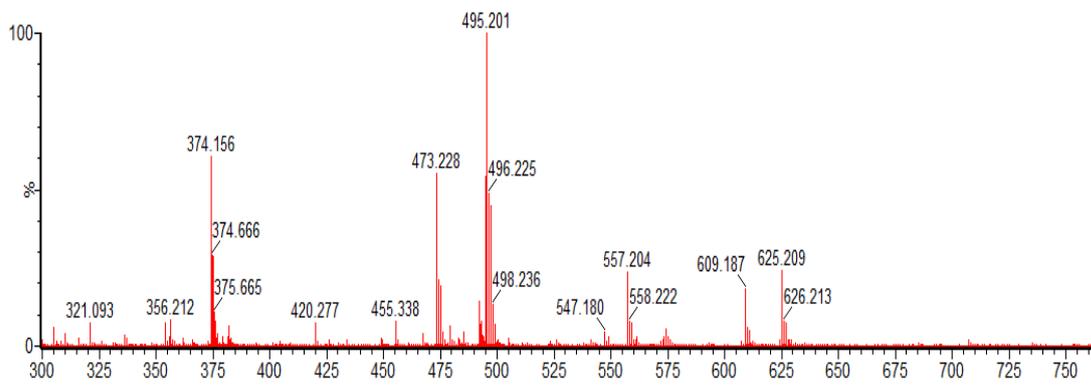


Figura 6.15: Muestra 3

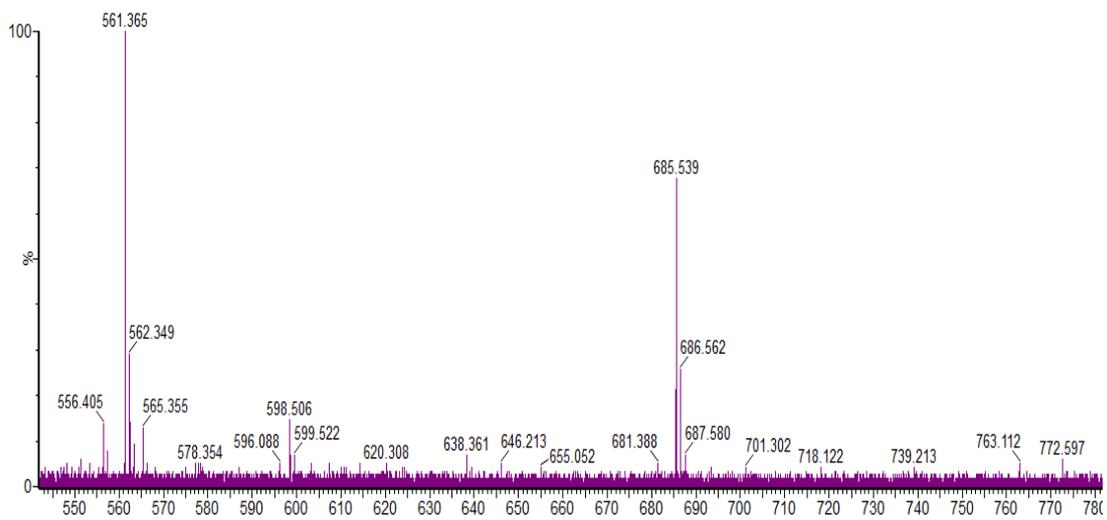


Figura 6.16: Muestra 4

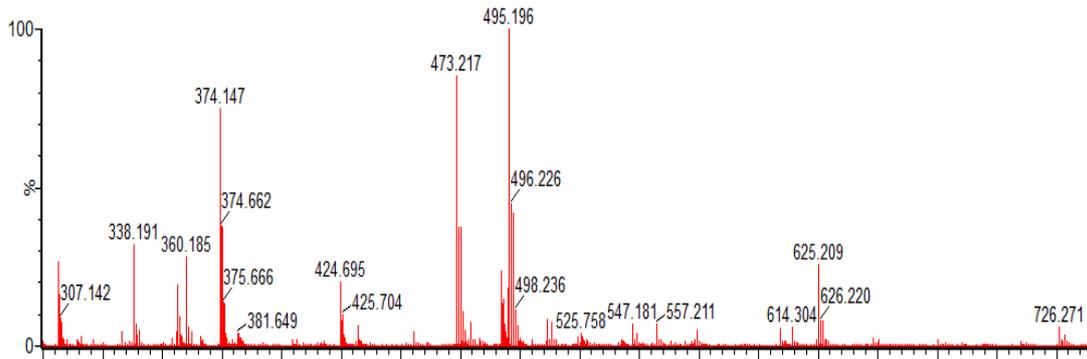


Figura 6.17: Muestra 5

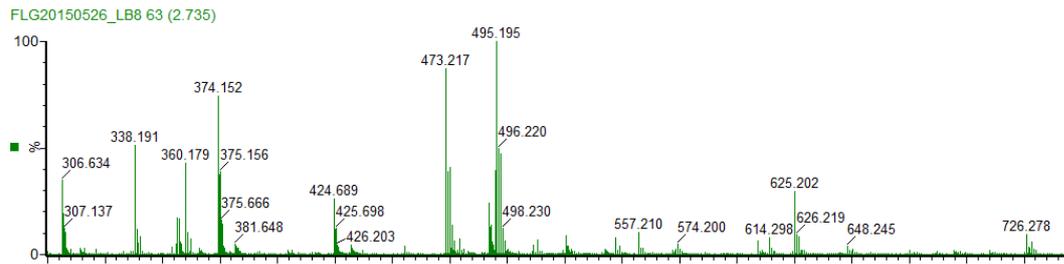


Figura 6.18: Muestra 6

6.2.3 Análisis de las masas encontradas a 1.28 min

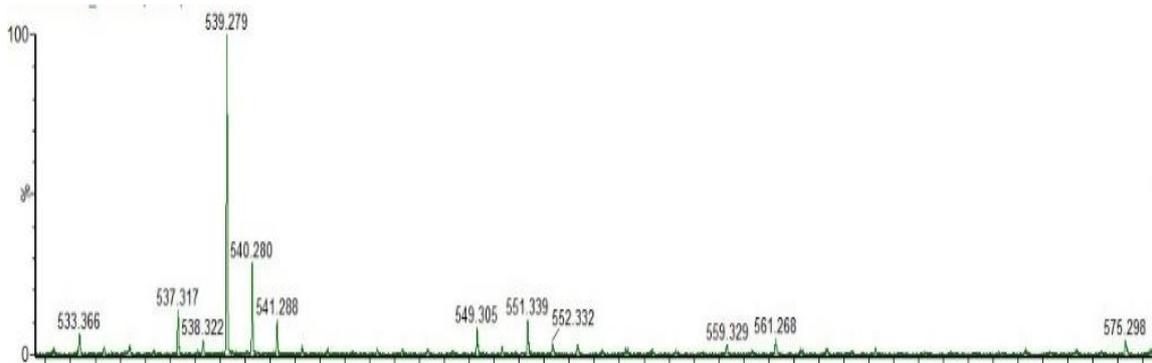


Figura 6.19: Muestra 1



Figura 6.20: Muestra 2

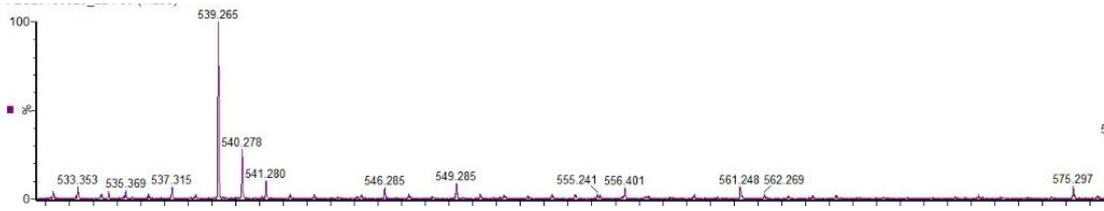


Figura 6.21: Muestra 3

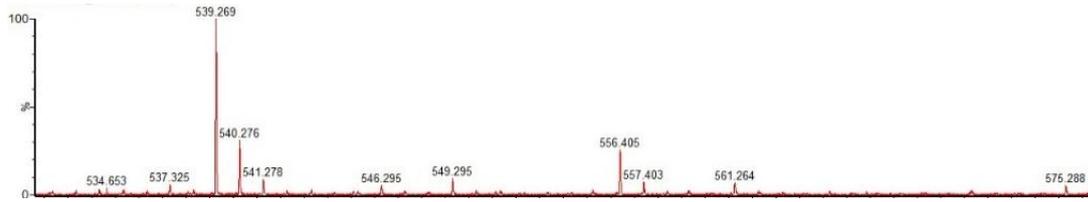


Figura 6.22: Muestra 4

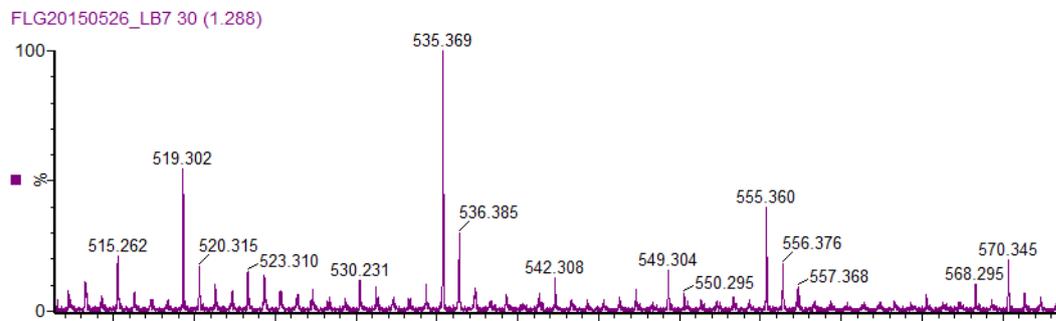


Figura 6.23: Muestra 5

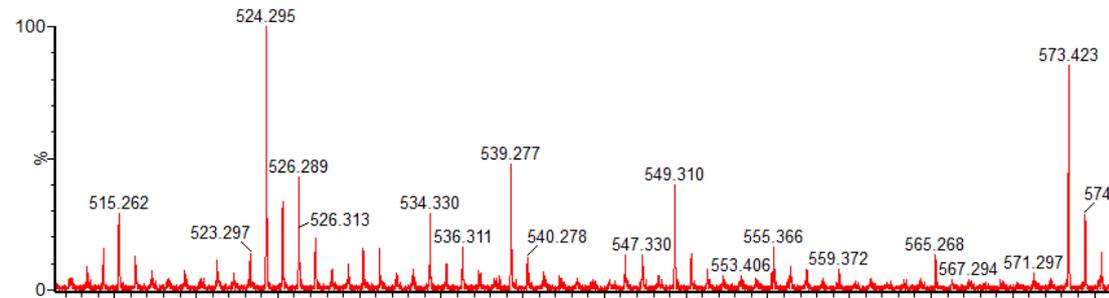


Figura 6.24: Muestra 6

